

Stymulacja aktywności białek szoku cieplnego jako nowy kierunek terapii

Arkadiusz Kazula¹, Ewa Kazula²

¹ Zakład Chorób Zwierząt Instytutu Weterynarii PAN

² Apteka Prywatna, Tarnobrzeg

Adres do korespondencji: Arkadiusz Kazula, ul. Portowa 18/4, 27-600 Sandomierz, tel. 600 950 923, e-mail: kazula.gen@wp.pl

Białka szoku cieplnego (HSP – ang. *Heat Shock Proteins*) odkryto przypadkowo w latach 60. ubiegłego wieku u muszki owocowej *Drosophila sp.*, a po kilku latach zostały znalezione również w komórkach ssaków, z człowiekiem włącznie. Należą one do rodziny białek opiekuńczych tzw. molekularnych czaperonów i ze względu na masę cząsteczkową (wyrażaną w kDa) zostały podzielone na cztery główne rodziny: białka niskocząsteczkowe – sHsp, białka Hsp60, Hsp70 i Hsp90 [1]. Ich sekwencja aminokwasowa jest silnie konserwatywna, a w komórkach współtworzą jeden z najstarszych mechanizmów przetrwania, chroniony w toku ewolucji. Funkcje białek Hsp są podobne u wszystkich żywych organizmów i pełnią one ważną rolę w prawidłowej homeostazie komórkowej. Biorą udział w procesie formowania odpowiedniej konformacji dla nowo syntetyzowanych białek, uczestniczą w renaturacji uszkodzonych białek, umożliwiają transport określonych białek do właściwych organelli komórkowych, chronią istniejące białka przed działaniem czynników degradujących oraz biorą udział w kierowaniu do proteosomów lub lizosomów białek uszkodzonych, których nie można już naprawić [2]. Białka szoku cieplnego są produkowane w komórce konstytutywnie, ale ich ekspresja wzrasta, kiedy komórki są narażone na działanie czynników stresowych, np. podwyższonej temperatury, toksyn, promieniowania UV, głodzenia, niedotlenienia oraz w stanach zapalnych i infekcjach [3]. Pełnią rolę ochronną przed skutkami działania różnorodnych stresów na nasz organizm oraz pomagają komórkom w niezakłóconym przebiegu procesów wewnątrzkomórkowych w trudnych sytuacjach. Chronią przed uszkodzeniem spowodowanym niedotlenieniem, urazem i krwotokiem: serce, płuca, wątrobę, błonę śluzową jelit [4]. Ich synteza jest indukowana przez różne stany patofizjologiczne. Wykazano, że poziom ekspresji tych białek jest podwyższony

Stimulation activity of Heat shock proteins as new trend in therapy

Heat shock proteins are known as major effectors of cellular stress response and they are present in all organisms. Their basic intracellular roles are assisting in folding of newly translated proteins and degradation of denatured proteins. Hsp have also an important extracellular function e.g. They take part in initiation of the inflammation process and they are recognized as antigens by immune system cells. Considering these facts, upregulation of Hsp synthesis seems to be a potential therapeutic intervention in treatment of carcinomas, renal failure and neurodegenerative diseases.

Keywords: heat shock proteins, new therapy, carcinoma renal failure, neurodegenerative diseases.

© Farm Pol, 2009, 65(10): 697-706

u pacjentów w przypadku wielu nowotworów [5], chorobie Alzheimera [6] i w chorobach nerek [7]. W ostatnich latach wykazano, że białka tego typu pełnią jeszcze inne funkcje tj. uczestniczą w odpowiedzi układu immunologicznego skierowanej przeciwko patogenom i nowotworom. Wyniki tych badań próbuje się wykorzystać do wprowadzania nowych metod terapii chorób infekcyjnych oraz w immunoterapii nowotworów. Próbuje się również zastosować farmakologiczną stymulację syntezy białek szoku cieplnego (Hsp) do złagodzenia skutków różnych procesów patologicznych, np. udaru mózgu, wrzodów żołądka czy cukrzycy [8].

Charakterystyka, podział i mechanizm działania białek szoku cieplnego

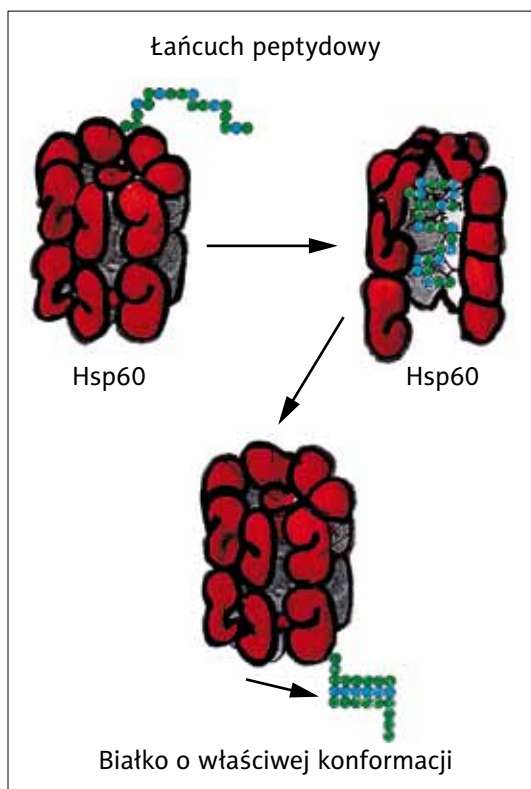
Wiele istotnych białek komórkowych oddziałuje skutecznie w komórce zaledwie z jednym lub kilkoma białkami czy polipeptydami. Przykładem mogą być receptory i ich ligandy, które funkcjonują jak

Białka szoku cieplnego biorą aktywny udział w procesach formowania odpowiedniej konformacji dla nowo syntetyzowanych białek, uczestniczą w renaturacji uszkodzonych białek, umożliwiają transport określonych białek do właściwych organelli komórkowych, chronią istniejące białka przed działaniem czynników degradujących oraz biorą udział w kierowaniu do proteosomów lub lizosomów białek uszkodzonych, których nie można już naprawić.

zamek i pasujący do niego klucz. Określony receptor jest aktywowany tylko przez jeden ligand lub analogiczne cząsteczki naśladujące jego budowę. W odróżnieniu od tych białek, białka szoku cieplnego mogą oddziaływać z dużą grupą różnorodnych białek, co umożliwia pełnienie rozmaitych funkcji w komórce. Białka Hsp wykazują zdolność wiązania się z reaktywnymi powierzchniami polipeptydów. Działając w ten sposób oddzielają reaktywne powierzchnie białek docelowych i skutecznie zapobiegają ich agregacji, wpływając na właściwy sposób fałdowania określonego polipeptydu. Wynikiem ich działania jest modyfikacja przestrzenna substratów białkowych. Proces fałdowania polipeptydu nazywany jest wtórną translacją kodu genetycznego i następuje bezpośrednio po syntezie cząsteczki na rybosomach [9]. Określona funkcja danego białka zależy od odpowiednio aktywnej konformacji, która jest zdefiniowana przez jej sekwencję aminokwasową. Nowo

powstające łańcuchy polipeptydowe przybierają właściwą konformację przestrzenną pod wpływem wielu czynników komórkowych. Jednym z takich czynników determinujących strukturę przestrzenną cząsteczki jest obecność wody w cytozolu. Każdy aminokwas wchodzący w skład danej cząsteczki białka reaguje inaczej na obecność wody. Aminokwasy o charakterze hydrofobowym „starają się” uniknąć kontaktu z cząsteczkami wody i preferują położenie wewnątrz molekule białkowej, natomiast aminokwasy hydrofilowe, oddziaływujące z cząsteczkami wody, ustawiają się na zewnątrz cząsteczki białka. Jeśli te i inne mechanizmy nie wystarczą, aby zapewnić właściwe zwijanie łańcuchów peptydowych dodatkowo do tego procesu włączają się białka Hsp, takie jak Hsp60, które pomagają w tym procesie [10]. Cząsteczki Hsp60 łączą się w struktury przypominające klatki (**rycina 1**). Ich brzegi są silnie hydrofobowe i przyciągają aminokwasy o charakterze hydrofobowym, które wystają na zewnątrz molekule białkowej i to te, które nie zwinęły się prawidłowo. Kiedy cząsteczka białka zostanie wciągnięta do wnętrza klatki zbudowanej z Hsp60, napotyka hydrofilowe wnętrze. Źle ułożone hydrofobowe reszty aminokwasowe białek przemieszczają się do wnętrza cząsteczki, co wymusza ich określone zmiany konformacyjne. W wielu przypadkach cząsteczka proteinowa uwięziona w kompleksie Hsp60 nie osiąga od razu prawidłowej konformacji, może być ona wielokrotnie uwalniana i ponownie wychwytywana przez klatkę Hsp60, aż do przyjęcia właściwej konformacji. Z racji swojego działania białka Hsp60 włączono do grupy białek zwanych foldazami (ang. *fold* – składać się, związać się) [11].

Do najlepiej poznanych białek szoku cieplnego należy zaliczyć grupę białek Hsp70, których głównymi przedstawicielami w komórkach ssaków są białka o masie 72 kDa (Hsp72), indukowane przez stres oraz białka o masie 73 kDa (Hsp73), ulegające konstytutywnej ekspresji we wszystkich komórkach naszego organizmu. Białka te wykazują ponad 80% homologii. Zbudowane są z domeny ATP-azowej w części N-terminalnej (o masie 45 kDa), domeny C-terminalnej (15–18 kDa), wiążącej substrat oraz trzeciej domeny (10 kDa), zawierającej wolną grupę karboksylową, której funkcja nie jest zbadana [12]. Białka z grupy Hsp70 występują w cytozolu, jądrze komórkowym, mitochondriach i siateczce wewnątrzplazmatycznej, mogą też być obecne w przestrzeni międzykomórkowej, do której są wydalane w czasie aktywnego transportu [13]. W przestrzeni międzykomórkowej białka Hsp70 ulegają wiązaniu do różnych typów komórek, m.in. NK, dendrytycznych, makrofagów, monocytów i limfocytów B, za pomocą specyficznych receptorów, takich jak CD36 czy CD40. Wiązanie się do tych receptorów uruchamia kaskadę sygnałową, prowadzącą do syntezy i wydzielania cytokin prozapalnych [7, 14]. Hsp70 w cytozolu tworzą wielopodjednostkowe



Rycina 1. Białka powstałe w rybosomach, lub te, które utraciły swoją prawidłową konformację są wciągane do wnętrza klatek zbudowanych z cząsteczek Hsp60. Wewnątrz tych struktur białka docelowe przyjmują właściwą konformację i następnie są usuwane do cytozolu komórki

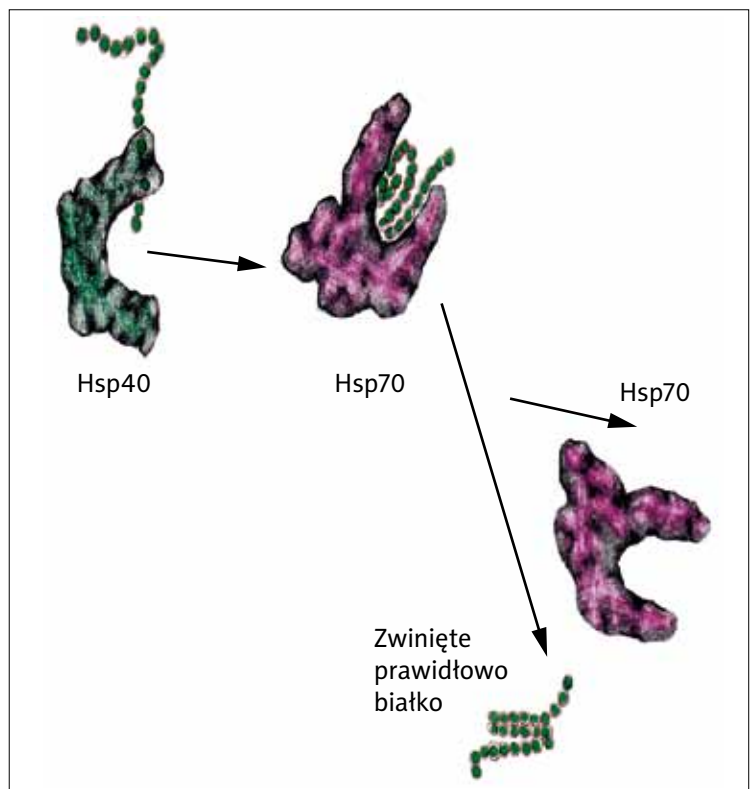
kompleksy, których funkcja polega na rozwijaniu uszkodzonych i szkodliwie zlepionych agregatów białkowych. W odróżnieniu od białek Hsp60, białka Hsp70 (**rycina 2**) nie „wiążą” białek docelowych wewnątrz swoich kompleksów, tylko przyłączają je na swojej powierzchni do odpowiednich centrów aktywnych, ukrytych w niewielkim wgłębieniu. W przypadku, gdy białko Hsp70 jest połączone z cząsteczką ATP, następuje odsłonięcie centrum aktywnego i peptydy docelowe mogą się przyłączyć i odłączyć od białka Hsp70. Kiedy brak jest cząsteczki ATP, kompleks Hsp70 ulega przekształceniom konformacyjnym i łańcuch peptydowy zostaje uwięziony w kompleksie.

W komórkach, białka Hsp70 są odpowiedzialne nie tylko za właściwe łądowanie natywnych białek i ponowne łądowanie cząsteczek o nieprawidłowej strukturze, ale również pełnią ważną rolę w transporcie protein z cytozolu do danych organelli przez błony biologiczne. Po translacji białka Hsp70 utrzymują nową cząsteczkę polipeptydową w konformacji, która zapobiega przedwczesnemu połądowaniu przestrzennemu. Następnie przy udziale ATP przenoszą dany polipeptyd w stanie niesfałdowanym przez błonę organelli. Po translokacji przez błonę np. mitochondrium, chloroplastu, białko docelowe zostaje odpowiednio sfałdowane przez Hsp70, aby spełniało swoje określone funkcje [9]. Pomimo że białka Hsp70 są aktywne w normalnych warunkach, to pełnią szczególnie ważną rolę w ekstremalnych warunkach np. w wysokiej temperaturze, wobec braku tlenu, odwodnienia czy głodu (**patrz ramka obok**). W takim przypadku białka Hsp70 minimalizują obciążenie komórki, chronią najważniejsze białka i enzymy komórkowe oraz doprowadzają do rozpadu źle funkcjonujących i uszkodzonych protein, powodując podtrzymywanie funkcjonowania komórki w jak najmniej zakłócony sposób [15].

Grupa białek Hsp90 jest w komórce odpowiedzialna za regulację aktywności czynników transkrypcyjnych i różnych kinaz białkowych. Hsp90 należą do białek czaperonowych (opiekuńczych), występują u eubakterii i wszystkich eukariontów, ale wydają się być nieobecne w komórkach archaeanów [16,17]. Cytoplazmatyczne białka Hsp90 (**rycina 3**) są niezbędne do prawidłowego funkcjonowania komórek eukariontów w każdej sytuacji, natomiast u bakterii produkt białkowy bakteryjnego homologu genu HtpG jest niezbędny w warunkach szoku cieplnego [18].

Transkrypcja genów Hsp

Transkrypcja genów Hsp i translacja kodowanych przez nie białek jest indukowana przez wiele czynników, które zostały podzielone na trzy grupy: stres środowiskowy, stany patofizjologiczne i procesy fizjologiczne. Ekspresja genów i produkcja białek Hsp wymaga odpowiedniej aktywności czynnika

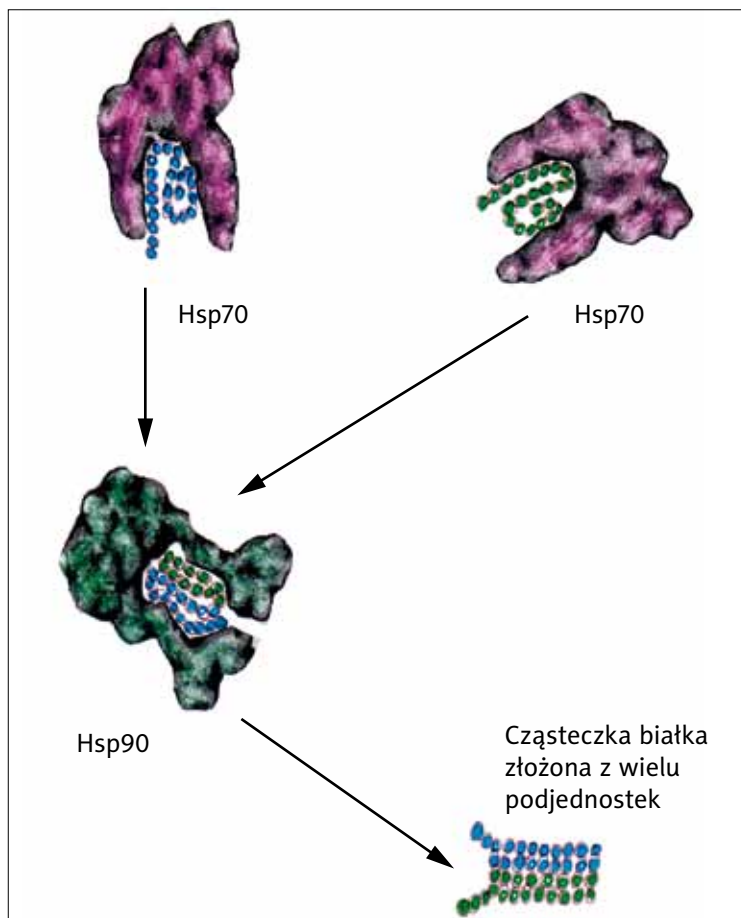


Rycina 2. Udział białek Hsp70 w procesach zwijania polipeptydów do właściwej konformacji. Białko Hsp40 dostarcza nowo powstały łańcuch peptydowy lub białko o niewłaściwej konformacji białku Hsp70, które zwija dostarczoną cząsteczkę w sposób prawidłowy, umożliwiając właściwe funkcjonowanie

transkrypcyjnego HSF (ang. *Heat Shock Transcription Factor*). Czynniki HSF występują w czterech formach – HSF1, HSF2, HSF3, HSF4. Obecny jest w komórkach w postaci nieaktywnego monomeru i jest uważany za główny czynnik odpowiedzi stresowej. W wyniku zadziałania czynników stresowych następuje jego aktywacja [19]. W komórkach niepoddanych stresowi, czynnik transkrypcyjny HSF1 jest zlokalizowany w jądrze i cytoplazmie [20, 21]. Występuje on w postaci nieaktywnej i niezwiązanej z DNA, gdyż oddziałuje z białkami opiekuńczymi Hsp70, Hsp90 [22]. W warunkach stresowych część białek komórkowych ulega denaturacji, co wymusza wiązania do nich pewnej puli białek Hsp. Powoduje to uwalnianie czynnika HSF1, który z cytoplazmy ulega translokacji do jądra komórkowego, gdzie wiąże się do sekwencji HSE (ang. *Heat Shock Promotor Element*), a efektem tego jest odpowiednia transkrypcja genów szoku cieplnego. Pod koniec odpowiedzi stresowej w komórce, aktywność transkrypcyjna HSF1 jest hamowana przez

Funkcja białek Hsp70 [7]

Białka Hsp70 uczestniczą w procesie formowania prawidłowej struktury białek, reaktywują białka zdenaturowane i uszkodzone, zapobiegają niewłaściwym oddziaływaniom białek i tworzeniu agregatów białkowych, kierują uszkodzone białka do degradacji na proteasomach, biorą aktywny udział w transdukcji sygnału, wpływają na właściwą strukturę cytoszkieletu, działają anty-apoptycznie poprzez hamowanie aktywności kinaz białkowych, hamują syntezę cytokin prozapalnych.



Rycina 3. Białko Hsp90 przyłączają zwinięte właściwie białka przez inne białka Hsp i pomaga się im łączyć w większe kompleksy białkowe zbudowane z kilku podjednostek

wiązanie białka Hsp70 oraz białka HSPB1 (ang. *HSF1 Binding Protein*), co powoduje powrót czynnika HSF1 do formy nieaktywnego monomeru [7] (tabela 1).

Rola białek szoku cieplnego w odpowiedzi immunologicznej

W latach 90. ubiegłego wieku zidentyfikowano białko nazwane gp96, które było w stanie wywołać immunizację w stosunku do niektórych nowotworów. Okazało się, że białko to należy do rodziny białek Hsp90 i występuje w normalnych komórkach oraz w komórkach nowotworowych. Cząsteczki gp96

Tabela 1. Białka szoku cieplnego [7]

Nazwa	Lokalizacja komórkowa	Funkcja
Ubikwityna	Cytoplazma i jądro komórkowe	Degradacja białek
sHsp (Hsp27)	Cytoplazma i jądro komórkowe	Różnicowanie komórek
Hsp40	Cytoplazma i jądro komórkowe	Kofaktor dla Hsp70
Hsp60	Mitochondria	Białka opiekuńcze
Hsp70	Cytoplazma i jądro komórkowe	Białka opiekuńcze
Hsp90	Cytoplazma i jądro komórkowe	Białka opiekuńcze

wyzolowane z obu populacji komórek posiadały identyczną sekwencję aminokwasową. Z tego względu zaczęto się zastanawiać skąd bierze się zdolność do wywoływania odporności na niektóre nowotwory. Badania wykazały, że izolaty białek Hsp90 z tkanek nowotworowych indukują odporność przeciwnowotworową, natomiast oczyszczone ich frakcje są pozbawione takiego działania. W czasie badań wyjaśniono, że za przeciwnowotworowe efekty białek Hsp są odpowiedzialne krótkie peptydy przyłączone do białek Hsp [10]. Przedstawiciele rodzin Hsp60, Hsp70 i Hsp90 podczas całego życia komórki nieustannie transportują produkowane w niej peptydy. A kiedy pobierze się frakcję białek Hsp z tkanki nowotworowej albo zainfekowanej wirusem lub innymi patogenami, zawsze niosą ze sobą peptydy wywodzące się od antygenów specyficznych dla nowotworów, wirusów czy innych patogenów. Związane z Hsp peptydy reprezentują zatem „antygenowy odcisk” komórek czy tkanek z których pochodzą. Zdolność przyłączania i przechowywania peptydów reprezentujących profil peptydowy komórki, pozwala poszczególnym białkom szoku cieplnego Hsp odgrywać ważną rolę w procesach odporności immunologicznej związanej z rozpoznawaniem komórek nowotworowych lub zainfekowanych patogenami [10]. Proces identyfikacji antygenów w komórkach przez limfocyty T jest związany z ich prezentacją na zewnątrz komórki. Większość antygenów wytwarzanych w komórce jest degradowana do krótkich peptydów zawierających określone epitopy antygenowe. Te krótkie peptydy są najczęściej związane z frakcjami białek Hsp60, Hsp70 czy Hsp90. W końcowym etapie peptydy te są umieszczane na powierzchni tzw. białek głównego układu zgodności tkankowej typu I (MHC-I), który występuje na większości komórek ssaków. Limfocyty T rozpoznają kompleksy MHC-I-peptyd i niszczą te, które pochodzą od zainfekowanych komórek lub komórek nowotworowych [11]. Białka Hsp uczestniczą w przygotowaniu peptydów do prezentacji antygenowej głównemu układowi zgodności tkankowej (MHC-I). Komórki prezentujące antygen APC (ang. *Antigen Presenting Cells*) występują w każdej tkance naszego organizmu. Ich funkcja polega na poszukiwaniu obcych antygenów i prezentacji limfocytom T, które po rozpoznaniu niszczą odpowiednie komórki nowotworowe czy zainfekowane patogenami. Komórki APC posiadają na swojej powierzchni receptory dla Hsp. Pierwszy odkryty receptor tego typu nazwano receptorem CD91 [10]. W przypadku gdy komórka APC natknie się na kompleks Hsp-peptyd, następuje jego wchłonięcie, w czym pomaga receptor CD91 i prezentuje peptyd limfocytom T, które w odpowiedzi mogą się namnożyć i unieszkodliwiać komórki nowotworowe czy komórki zainfekowane patogenami. Białka Hsp nie tylko podsuwają układowi immunologicznemu peptydy o właściwościach antygenów, ale

również stymulują aktywność komórek APC, gdyż kontakt tych komórek z białkami z rodziny Hsp70 i Hsp90 wywołuje kilka zmian, w tym inicjuje wyrzut prozapalnych cytokin, takich jak TNF- α , Il-6, ważnego elementu obrony immunologicznej [4, 16]. Białka Hsp, szczególnie z rodziny białek Hsp70, posiadają wysoką zdolność do immunizacji układu odpornościowego, należą do jednych z głównych epitopów bakteryjnych rozpoznawanych przez nasze limfocyty. Niestety również własne białka Hsp70 wpływają niekorzystnie na nasz organizm, gdyż mogą stymulować układ odpornościowy i uczestniczyć w patogenezie chorób autoimmunologicznych, np. młodzieńczego zapalenia stawów, stwardnienia rozsianego czy zapalenia naczyń w toczniu rumieniowatym¹ [23, 24]. Badania prowadzone na modelu zwierzęcym wykazały, że podawane w dużych ilościach białka Hsp mogą łagodzić cukrzycę typu I i autoimmunologiczne zapalenie mózgu. Przypuszcza się, że białko Hsp60 wraz z niesionymi przez nie peptydami może być autoantygenem w cukrzycy typu I i wywoływać atak immunologiczny na komórki produkujące insulinę [25]. W chwili obecnej trwają prace nad opracowaniem szczepionek zawierających kompleks Hsp-peptydy, służących leczeniu chorób zakaźnych, takich jak opryszczka narządów płciowych i gruźlica [16].

Białka Hsp w terapii nowotworów

Wykorzystanie kompleksów Hsp-peptydy w terapii nowotworów opiera się na ich zdolnościach do immunizacji. Procedura terapii polega na ekstrakcji peptydów związanych z białkami Hsp z komórek nowotworowych pacjenta, a następnie wprowadzaniu ich z powrotem do organizmu w oczyszczonej postaci, jako szczepionki, która powinna stymulować układ odpornościowy do ataku na komórki nowotworowe zawierające określone antygeny. Sposób takiej terapii jest obecnie testowany w badaniach klinicznych fazy I i II. Obecnie testowana szczepionka o nazwie onco-phane jest oparta na kompleksach białka Hsp gp96 z antygenami komórek nowotworowych. Kompleksy te są izolowane z guzów nerek pacjenta i charakteryzują się wysoką specyficznością w immunizacji układu odpornościowego przeciwko komórkom rakowym [7]. Prowadzone są również badania w celu zastosowania takiej terapii w leczeniu czerniaka. Choć na czerniaka ograniczonego do skóry, węzłów chłonnych i płuc, którzy otrzymali dostateczną dawkę szczepionki zawierającej kompleks Hsp-peptydy, żyli statystycznie dłużej niż pacjenci poddani leczeniu standardowemu tj. chemioterapii [11]. Wykazano

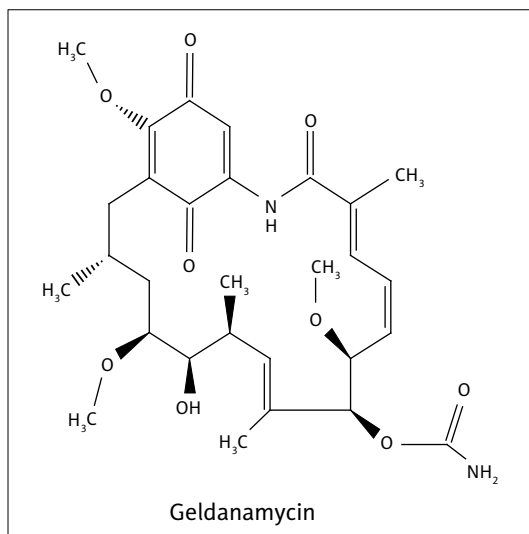
również, że immunizacja zbyt dużymi dawkami Hsp nie wywołuje odporności, a przynosi wręcz odwrotne skutki [11].

Innym aspektem działania białek szoku cieplnego jest ich cytoprotekcyjny efekt w stosunku do komórek poddanych działaniu czynnikami cytotoksycznymi, takimi jak: promieniowanie UV, reaktywne formy tlenu, jony metali ciężkich, gorączka, infekcje. Mechanizm cytoprotekcyjny białek Hsp, głównie Hsp90, w przypadku komórek nowotworowych związany jest z adaptacją do niekorzystnych warunków, hamowaniem apoptozy², stabilizacją i ochroną białek odpowiedzialnych za proces transformacji nowotworowej np. kinazy serynowe oraz prawdopodobnie czynnym udziałem białek Hsp w naprawie genomowego i mitochondrialnego DNA, uszkodzonego przez czynniki stresowe [26]. Cytoprotekcyjny efekt w przypadku komórek zdrowych jest korzystny dla naszego organizmu, natomiast w przypadku nowotworów działanie to jest niepożądane, gdyż powoduje powstawanie oporności komórek nowotworowych wobec cytotoksycznych efektów wywołanych przez leki przeciwnowotworowe [27].

Wyniki ostatnich lat wykazały zdumiewający przykład niezwykle aktywnego działania białek Hsp jako czynników łagodzących wpływ warunków stresowych na mechanizmy wewnątrzkomórkowe. Okazało się, że zablokowanie działania Hsp90 w organizmie *Drosophila* sp. prowadzi do ujawnienia ogromnej liczby ukrytych mutacji. Wydaje się, że białka Hsp90 buforują wpływ mutacji na organizm. Pomimo że istnieje znaczna różnorodność genetyczna wewnątrz każdego gatunku, to nie ujawnia się ona, ponieważ maskują ją białka Hsp. Powoduje to skrytą kumulację zmian genetycznych, która ujawnia się pod wpływem działania sytuacji stresowej. W ten sposób różnorodne warianty zmutowanych genomów mają możliwość manifestowania swojego istnienia w wyniku zadziałania doboru naturalnego [9]. Białka Hsp90 promują różnorodność genetyczną i wspomagają ewolucję. Odgrywają one pewną rolę w powstawaniu nowych cech np. odporności na określone leki. W komórkach nowotworowych białka Hsp90 buforują efekty kumulowania mutacji oraz zwiększają ich zjadliwość. Hsp90 odgrywają istotną rolę w regulacji cyklu komórkowego, wzrostu komórki, jej przeżycia, apoptozy, angiogenezy i tumorogenezy, zaburzenia ich aktywności uwrażliwia komórki nowotworowe na działanie chemioterapeutyków [9]. Te i inne dane skłoniły badaczy do postulowania, że specyficzne gatunkowo inhibitory Hsp90 mogą stać się skutecznymi lekami przeciwnowotworowymi nowej generacji.

¹ Toczeń rumieniowaty układowy jest autoimmunologiczną chorobą tkanki łącznej. Za proces zapalny w tej chorobie odpowiedzialne są przeciwciała skierowane przeciwko komórkom śródbłonna (ang. anti-endothelial cell antibodies – AECA). AECA indukują apoptozę komórek śródbłonna, a determinantą antygenową (AECA) w tym procesie jest białko szoku cieplnego Hsp60.

² Białka Hsp mogą działać na dwa sposoby: pro- albo antyapoptotycznie. O przeciwnym działaniu często decyduje umiejscowienie w komórce, które determinuje funkcję danego białka. Przykładem może być mitochondrialne HSP60 (zwane inaczej chaperonin), które po uwolnieniu do cytoplazmy promuje aktywację prokaspazy 3, natomiast cytosolowe HSP60 posiada funkcję antyapoptyczną [39].



Rycina 4. Schemat budowy geldanamycyny

Obecnie w onkologii testuje się specyficzne farmakologiczne inhibitory Hsp90 [7]. Potwierdzeniem celowości takiej terapii są liczne badania, w których wykazano zwiększoną ekspresję białek Hsp90 w złośliwych guzach nowotworowych [26, 29]. Przykładem takiego zastosowania terapeutycznego jest Geldanamycyna (Geldanamycin, GA) – benzochinonowy antybiotyk ansamycynowy (rycina 4), wiążący i inhibujący białko Hsp90. Geldanamycyna przez swoje działanie indukuje degradację produktów białkowych genów, zmutowanych w komórkach nowotworowych, takich jak: v-Src, Bcr-Abl i P53, wykazując preferencję wobec nieprawidłowych białek. Mimo korzystnych działań, zastosowanie geldanamycyny jako leku jest problematyczne, ze względu na działania niepożądane związane z hepatotoksycznością [30].

Oprócz białek Hsp90 inne białka szoku cieplnego również pełnią istotną rolę w procesie transformacji nowotworowej. Wykazano, że istnieje nadekspresja białek Hsp27 w raku piersi, nerek i pęcherza moczowego [30]. Podwyższony poziom Hsp27 podaje się jako jedną z przyczyn rozwoju tego typu nowotworów [30, 31]. Wysoki poziom białka Hsp72 w komórkach nowotworowych koreluje ze złymi rokowaniami w terapii raka piersi [32], oraz zwiększa odporność na chemioterapię raka kości [33]. Podwyższony poziom białek Hsp70 oraz Hsp27, określane metodą immunohistochemiczną, korelowały z obecnością inwazyjnych naczyń krwionośnych oraz rozmiarem i stopniem progresji guza. Wydaje się, że podwyższony poziom Hsp70 i Hsp27 może promować proliferację komórek guza, a więc powstawanie i progresję raka, dzięki hamowaniu apoptozy [34] oraz pełnić ważną rolę w oporności nowotworów na

chemioterapię [35]. Wyniki badań sugerują, że również w przypadku Hsp70 i Hsp27 zastosowanie inhibitorów aktywności tych białek może mieć istotne znaczenie w nowej strategii dotyczącej terapii nowotworów [35].

Białka Hsp w przewlekłej i ostrej niewydolności nerek

Przewlekła niewydolność nerek (PNN)

Badania prowadzone na modelu zwierzęcym (myszy) wykazały, że białka Hsp72 pełnią istotną rolę w immunizacji komórek układu odpornościowego w przebiegu kłębuszkowego zapalenia nerek [7, 36] oraz toczniowego zapalenia nerek [7, 37]. Wyniki badań sugerują metodę terapii przewlekłej niewydolności nerek (PNN), która opierałaby się na wprowadzeniu do tego narządu przeciwciał monoklonalnych anty-Hsp72, natomiast obecność w nerkach przeciwciał anty-Hsp72, może posiadać znaczenie diagnostyczne w przebiegu PNN. Istnieją nadzieje, że selektywne hamowanie ekspresji białka Hsp72 przy pomocy terapii genowej, może wykazywać pozytywne działanie w przypadku PNN [7].

Ostra niewydolności nerek

Ostra niewydolność nerek (ONN) wywołana niedokrwieniem lub reperfuzyą (ang. *ischemia/reperfusion, I/R*) tego narządu jest czynnikiem stresowym indukującym odpowiedź białek Hsp i ich ekspresję w komórkach nerkowych [7, 38, 39]. Niedokrwienie komórek przy ONN powoduje szereg negatywnych skutków na poziomie komórkowym, poczynając od zaburzenia funkcji komórek przy stosunkowo krótkim okresie niedokrwienia, a kończąc na apoptozie komórek (śmierci programowanej) i nekrozie, jako konsekwencji długiego okresu niedokrwienia i wyczerpania komórkowego zapasu ATP [7, 40]. Wydaje się, że o tym czy komórka jest w stanie odwrócić zmiany wywołane czynnikami stresowymi, czy też ulec apoptozie, decydują m.in. białka szoku cieplnego, szczególnie Hsp72, które pełnią rolę ważnego regulatora procesów apoptozy. Nadekspresja Hsp70 w komórkach epitelialnych nerek zmniejsza apoptozę wywołaną wyczerpaniem ATP, które następuje na skutek niedokrwienia [41]. Mechanizm hamowania apoptozy przez białko Hsp72 polega na blokowaniu kinazy MAP, co powoduje zahamowanie uwalniania cytochromu C z mitochondriów [42]. Ochronna rola białek szoku cieplnego, szczególnie Hsp72 w komórkach poddanych niedokrwieniu przy ONN jest związana nie tylko z hamowaniem apoptozy w komórkach nerkowych. Szkodliwość niedokrwienia w tej jednostce chorobowej polega głównie na zaburzeniu organizacji aktywnego cytoszkieletu komórek nerkowych. Powoduje to utratę biegunowości komórek, co ma istotne znaczenie w przypadku komórek cewkowych,

Zdolność przyłączania i przechowywania peptydów reprezentujących profil peptydowy komórki przez białka szoku cieplnego, pozwala tym białkom odgrywać ważną rolę w procesach odporności immunologicznej związanej z rozpoznawaniem komórek nowotworowych lub zainfekowanych patogenami.

gdyż takie zaburzenia mogą doprowadzić do przesunięcia pompy Na/K ATP-azowej oraz zmiany kierunku wydalania sodu i w konsekwencji redukcję filtracji kłębuszkowej [7]. Białka Hsp70 i Hsp27 posiadają istotną rolę w przywracaniu integralności cytoskieletu i biegunowości komórki [7]. Stres wywołany niedokrwiem i wyczerpaniem ATP powoduje wzrost ekspresji białek Hsp. Białka Hsp70 i Hsp27 pomagają przywrócić białkom błonowym (Na/K APT-aza) swoją pierwotną lokalizację. W oparciu o te dane opracowano model przeciwdziałający skutkom ONN, oparty na podawaniu rekombinowanego białka Hsp72 i Hsp27 do komórek poddanych stresowi niedokrwiennemu [7, 43]. Cytoprotekcyjny efekt działania białek Hsp72 i Hsp27 może zostać wykorzystany do obniżenia ryzyka wystąpienia ONN lub przyczynić się do łagodzenia jej skutków.

Hsp w terapii miażdżycy

Miażdżycza jest przewlekłym procesem zapalnym toczącym się w tętnicach. Coraz większą uwagę zwraca się na rolę układu odpornościowego i limfocytów T CD4 oraz makrofagów, gdyż obecność wymienionych komórek sugeruje udział układu odpornościowego w rozwoju miażdżycy [44, 45]. Szczególnie ważnymi autoantygenami, którym przypisuje się rozwój blaszek miażdżycowych są białka Hsp, uwalniane z uszkodzonych komórek na skutek zapalenia [45]. Na modelu zwierzęcym, wykazano w śledzienie i węzłach chłonnych obecność swoistych dla białek Hsp60 limfocytów B i T, co potwierdza tezę o autoagresyjnej stymulacji układu odpornościowego przez Hsp60 i wskazuje na ich istotną rolę, jako stymulatora układu odpornościowego w rozwoju miażdżycy [19, 46, 47, 48]. Ostatnio rozważa się możliwość zastosowania szczepionek w terapii miażdżycy. Na modelach zwierzęcych zaobserwowano zmniejszenie nasilenia zmian miażdżycowych po podaniu bakterii zawierających zmodyfikowane fosfolipidy lub białka Hsp60. Wykazano, że w przypadku immunizacji z użyciem mykobakteryjnego Hsp65, który podano drogą donosową, nastąpiło zmniejszenie rozmiaru blaszek miażdżycowych (u zwierząt) oraz obniżenie liczby limfocytów CD4 i nacieku zapalnego w tych miejscach [49, 50]. Ocena czy tego typu postępowanie będzie możliwe do wykorzystania u ludzi, wymaga dalszych badań.

Wykorzystanie białek Hsp w terapii molekularnej

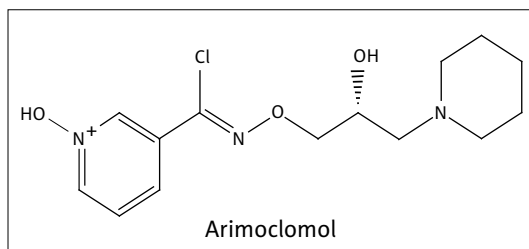
Poznanie funkcji białek szoku cieplnego w patologii molekularnej niektórych chorób dziedzicznych zainspirowało badaczy do prób z wykorzystaniem białek Hsp w nowym typie terapii, zwanej terapią molekularną. Terapia tego typu dotyczy głównie chorób

molekularnych, których podłożem są zmiany właściwości fizykochemicznych białek w następstwie mutacji kodujących je genów. Najpoważniejsze zmiany zachodzą, gdy na skutek mutacji następuje wymiana aminokwasu hydrofilowego na aminokwas lipofilowy lub odwrotnie. Takie mutacje powodują najczęściej zmiany konformacyjne białek i zaburzenia ich funkcji. W naprawie zmutowanego genu można posłużyć się terapią genową, która polega na wprowadzeniu do komórek organizmu terapeutycznego DNA, który skoryguje mutację genową. Wydaje się jednak, że wspomaganie procesu poprawnego fałdowania białek w wyniku zwiększenia ekspresji białek Hsp60 i Hsp70 może być prostszym sposobem leczenia w chorobach spowodowanych niektórymi mutacjami. Skuteczność takiej terapii wykazano w przypadku mukowiscydozy, której podłożem jest najczęściej delecja 3 nukleotydów kodonu fenyloalaniny w genie CFTR. Kodowane przez ten gen białko jest błonowym kanałem dla jonów chlorkowych. Pozbawiony fenyloalaniny wariant CFTR wykazuje właściwości zbliżone do białka prawidłowego, pod warunkiem, że zostanie dotransportowany do błony komórkowej. Proces ten jednak nie zachodzi, gdyż białko o niewłaściwej konformacji jest degradowane przez komórkowe proteasomy. Wykazano, że w hodowlach komórek nabłonka, u których zwiększono ekspresję białek Hsp60 i Hsp70, zmutowane białka CFTR dotarły do błony komórek i pozostały w niej stabilne oraz poprawnie spełniały swoje funkcje kanałów chlorkowych [51]. Terapia, której celem byłoby zachowanie stabilności białka przez wprowadzenie dodatkowych kopii białek Hsp, może okazać się prostszą metodą niż somatyczna korekta samego genu przy użyciu terapii genowej. Prowadzone są również badania efektów nadekspresji białek Hsp w przypadku rodzinnej hipercholesterolemii (*familial hypercholesterolemia – FH*, hiperlipidemia typu IIa), w której stwierdzono kilkadziesiąt różnych mutacji genu receptora dla LDL (LDLR), co powoduje syntezę polipeptydu niezdolnego do prawidłowego pofałdowania, który jest zatrzymywany wewnątrz komórki, w drodze z siateczki śródplazmatycznej do aparatu Golgiego [52].

Rola białek Hsp w chorobach neurodegeneracyjnych

W niektórych przypadkach białko, które przyjęło niewłaściwą konformację, czy uległo rozfałdowaniu nie tylko traci swoją aktywność, ale może również wykazywać toksyczne efekty wobec komórki [53, 54]. Najczęściej wspólna cechą takich toksycznych białek

Wykorzystanie kompleksów Hsp-peptydy w terapii nowotworów polega na ekstrakcji peptydów związanych z białkami Hsp pacjenta, a następnie wprowadzaniu ich z powrotem do organizmu w oczyszczonej postaci, jako szczepionki, która powinna stymulować układ odpornościowy do ataku na komórki zawierające określone antygeny związane z nowotworem.



Rycina 5. Schemat budowy arimoklozolu

jest ich zdolność do tworzenia agregatów. Białka takie odgrywają ważną rolę w patogenezie wielu chorób neurodegeneracyjnych, takich jak: stwardnienie zanikowo boczne (ang. *amyotrophic lateral sclerosis* – ALS), chorobie Alzheimera (AD), chorobie Parkinsona (PD), chorobie Huntingtona (HD) oraz w pasażalnych encefalopatiach gąbczastych (TSE) [55, 56]. Pomimo że charakterystyczne zmiany w tych chorobach są bardzo podobne, tj. występują nieprawidłowo sfałdowane białka o podobnych właściwościach biochemicznych (krzyżowe β -struktury, odporność na proteazy i zdolność do wiązania lipofilowych barwników, takich jak czerwien Kongo), to jednak sekwencja aminokwasowa tych patologicznych białek w różnych jednostkach chorobowych jest odmienna. Szczególnie niebezpieczną cechą tych nieprawidłowo sfałdowanych białek jest zdolność wpływania na strukturę prawidłowo zwiniętych polipeptydów, co indukuje ich zmiany konformacyjne, agregację o charakterze cytotoksycznym i postęp chorób neurodegeneracyjnych [57–59]. Białka szoku cieplnego są wysoce konserwatywną klasą protein, które ewoluowały w celu zapobiegania niewłaściwym interakcji między komórkowymi polipeptydami [60, 61].

Działanie molekularnych czaperonów w wielu wypadkach jest wystarczające, aby zapobiec akumulacji niesfałdowanych protein w cytozolu, a poziom ich ekspresji dostosowuje się do wzrostu stężenia uszkodzonych białek w komórce. Jednak w warunkach

patologicznych (być może ze względu na długotrwały stres podczas choroby), szybkość i odpowiedni stopień ich skutecznej aktywności jest niewystarczający, co prowadzi do zmian patologicznych, związanych z gromadzeniem się białek nieprawidłowych w cytozolu [62–64]. Wydaje się, że zwiększenie ekspresji i aktywności białek Hsp może mieć znaczenie terapeutyczne w chorobach neurodegeneracyjnych. W chwili obecnej trwają prace zmierzające do opracowania leków zwiększających skutecznie poziom wewnątrzkomórkowych białek Hsp, które działałyby terapeutycznie w chorobach neurodegeneracyjnych [65]. O celowości takiej terapii przekonują nas dane doświadczalne, które wykazują, że wzrost poziomu Hsp posiada korzystne działanie w przypadku PD, AD, HD, oraz ALS i kilka mniej znanych chorób neurodegeneracyjnych, takich jak ataksja rdzenia oraz zanik mięśni [66].

Białka szoku cieplnego (Hsps) pełnią również ważną rolę ochronną podczas stresu oksydacyjnego, który jest istotną przyczyną powstawania zmian patologicznych w chorobach neurodegeneracyjnych OUN oraz w chorobach układu krążenia i udaru mózgu, a nawet pełni ważną rolę w mechanizmach starzenia organizmu [67]. Ze względu na ten potencjał terapeutyczny próbuje się zastosować stymulację aktywności białek Hsp w terapii tych schorzeń. Pomimo że terapia wydaje się obiecującym podejściem, należy pokonać różne bariery, by takie podejście było skuteczne. Do barier tych należy zaliczyć trudność w kontrolowaniu wzrostu ekspresji białek Hsp do właściwego poziomu i to w określonych komórkach. Wydaje się, że te cele nie będą mogły być zrealizowane za pomocą stymulacji farmakologicznej, a jedynie poprzez kierowaną terapię genową [67].

Hsp w ALS

Przykładem choroby neurodegeneracyjnej, w której wykorzystano stymulację aktywności białek Hsp w celach terapeutycznych, jest ALS. Stwardnienie zanikowo-boczne (ALS) jest schorzeniem w którym występuje wybiórcza degeneracja motoneuronów w rdzeniu kręgowym i mózgu. W wielu przypadkach ALS jest determinowane genetycznie i pojawia się w wyniku mutacji genu kodującego enzym, dysmutazę ponadtlenkową typu I (SOD-1), którego locus znajduje się na chromosomie 21. Istnieją przypuszczenia, że zmutowane białka powstałe w wyniku ekspresji wadliwych genów przybierają nieprawidłową konformację. W efekcie tworzą kompleksy z komórkowymi czaperonami, które nie ulegają sprawnej degradacji przez proteasomy i odkładają się w postaci nierozpuszczalnych inkluzji w cytozolu komórek (agrosomy) [67]. Inna hipoteza zakłada, że nieprawidłowa konformacja zmutowanych białek SOD-1 wymusza ich wiązanie z białkami szoku cieplnego Hsp70. Natomiast białko Hsp70 inaktywuje czynnik indukujący apoptozę

Wykorzystanie białek Hsp w terapii molekularnej dotyczy głównie chorób molekularnych i polega na wspomaganie procesu poprawnego fałdowania białek zmutowanych (poprzez zwiększenie ekspresji białek Hsp60 i Hsp70 w komórkach).

Tabela 2. Nowe leki modyfikujące funkcję i aktywność białek szoku cieplnego

Inhibitory Hsp90	Alvespimycin	Rak piersi
	Tanespimycin	Białaczki
	CNF 2024	Chłoniaki, guzy lite
	Metasulfonian SNX-422	Guzy lite
	AUY-922 BIB021	Guzy lite Białaczki, chłoniaki
Inhibitory Hsp27	OGX-427	Guzy lite
Szczepionka Hsp65	HspE7	Komórki nabłonka szyjki macicy w stanie przedrakowym
Szczepionka Hsp70	AG-707	Opryszczka pospolita
	HSPCC-70/AG-858	Białaczka szpikowa
Szczepionka Gp96	HSPCC-96	Guzy lite

AIF. W przypadku związania białka Hsp70 następuje uwolnienie spod jego kontroli czynnika AIF, który aktywuje apoptozę [66]. Podnoszenie poziomu Hsp70 w wyniku iniekcji lub przy użyciu wektorów terapii genowej, zawierających dodatkowe kodony dla białka Hsp70, zmniejszało toksyczne efekty mutacji SOD1 i przedłużało czas przeżycia motoneuronów [68]. Potwierdzeniem roli białek szoku cieplnego w ALS było zastosowanie arimoklomu, nowego terapeutycznego opracowanego w leczeniu ALS i obecnie testowanego w badaniach klinicznych (**rycina 5**). Związek ten jest strukturalnie zmodyfikowaną formą bimoklomu i został odkryty jako metaboliczny produkt jego biotransformacji [69]. Podobnie jak bimoklomu, arimoklomu wzmacnia produkcję i aktywność białek Hsp60, Hsp70 i Hsp90 [70, 71] w warunkach stresu komórki poprzez fosforylację i aktywację HSF-1 [72]. Trwają również badania nad wykorzystaniem tego związku w szeregu innych chorób neurodegeneracyjnych, takich jak: AD, PD i HD [73,74].

Podsumowanie

Różne role pełnione przez białka Hsp w komórkach czynią je ciekawymi molekułami, których odpowiednią aktywność można wykorzystać do celów terapeutycznych. W chwili obecnej testuje się leki, które modyfikują funkcję i aktywność białek szoku cieplnego [9]. Wśród tych leków wyróżniamy inhibitory i induktory Hsp oraz szczepionki. Inhibitory Hsp hamują działanie głównie białek Hsp90, pełniących istotną rolę w przeżyciu chorobotwórczych bakterii i komórek zakażonych wirusami lub komórek nowotworowych. Induktory białek Hsp są natomiast zdolne do aktywacji białek szoku cieplnego, tak by chroniły narząd podczas operacji lub chemioterapii. Szczepionki z kolei są antygenowymi kompleksami Hsp-peptyd, które uzyskuje się z tkanki pacjenta i zwrotnie wprowadza do organizmu, w celu wywołania odpowiedzi immunologicznej przeciwko nowotworom lub patogenom (**tabela 2**).

Aby zrozumieć i wykorzystać te białka w terapii, należy dokładnie wyjaśnić mechanizm ich działania. Wydaje się, że w niedalekiej przyszłości będziemy stosować wiele typów leków, które w sposób pośredni lub bezpośredni będą wpływać na poziom aktywności Hsp i modyfikować procesy patofizjologiczne zależne od tych białek.

Otrzymano: 2009.08.01 · Zaakceptowano: 2009.08.20

Piśmiennictwo

- Łabędzka K., Izdebska M.: Mitochondrium a śmierć komórki. *Postępy Hig. Med. Dośw.* 2006, 60, 439–446.
- Parcellier A., Gurbuxani S., Schmitt E.: Heat shock proteins, cellular chaperones that modulate mitochondrial cell death pathways. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2003, 304, 505–512.
- Pivovarova A. V., Mikhailova V.V.: Effects of small heat shock proteins on the thermal denaturation and aggregation of F-actin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2005, 331, 1548–1553.
- Mizushima Y.: Preinduction of heat shock proteins protects cardiac and hepatic functions. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2000, 276, 352–359.
- Heimbrecht K., Zeise E., Rensing L.: Chaperones in cell cycle regulation and mitogenic signal transduction: a review. *Cell Prolif.* 2000, 33, 341–352.
- Dewji N.N., Do C.: Heat shock factor-1 mediates the transcriptional activation of Alzheimer's beta-amyloid precursor protein gene in response to stress. *Brain. Res. Mol. Brain Res.* 1996, 35, 325–333.
- Marzec Ł., Zdrojewski Z., Bryl E.: Białko szoku termicznego 72(Hsp72) w chorobach nerek. *Nefrol. Dial. Pol.* 2007, 11, 78–82.
- Soti C., Nagy E.: Heat shock proteins as emerging therapeutic targets. *Br. J. Pharmacol.* 2005, 146, 769–776.
- Testori A.: Heat shock protein. *Journal of Clinical Oncology*, 2008, 26 (6), 955–962.
- Dai Ch.: Heat shock factor 1 is powerful multifaceted modifier of carcinogenesis. *Cell.* 2007, 30 (6), 1005–1018.
- Whitesell L.: HSP90 and the chaperoning of cancer. *Nature Reviews Cancer.* 2005, 5 (10), 761–772.
- Mayer M.P., Bukau B.: Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. *Cell. Mol. Life. Sci.* 2005, 62, 670–678.
- Garrido C., Gurbuxani S.: Heat shock proteins: endogenous modulators of apoptotic cell death. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2001, 286, 433–442.
- Asea A.: Stress proteins and initiation of immune response: chaperone activity of hsp72. *Immunol. Rev.* 2005, 11, 34–43.
- Pramod K.: Role of heat shock proteins in innate and adaptive immunity. *Nature Reviews Immunology.* 2002, 2(3), 185–194.
- Czermely P., Schneider T., Soti C.: The 90-kDa molecular chaperone family: structure, function, and clinical applications. *Pharmacol Ther.* 1998, Aug. 79, 2, 129–168.
- Chen B., Zhong D., Monteiro A.: Comparative genomics and evolution of the HSP90 family of genes across all kingdoms of organisms. *BMC Genomics.* 2006, 7, 156–164. Thomas J.G., Baneyx F.: Roles of the *Escherichia coli* small heat shock proteins IbpA and IbpB in thermal stress management: comparison with ClpA, ClpB, and HspG *in vivo*. *J. Bacteriol.* 1998, 180(19), 5165–72.
- Morimoto R.I.: Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators. *Genes Dev.* 1998, 12, 3788–3795.
- Mercier P.A., Winegarden N.A., Westwood J.T.: Human heat shock factor is predominantly a nuclear protein before and after heat stress. *J. Cell. Sci.* 1999, 112 (Pt 16), 2765–2769.
- Brown I.R., Rush S.J.: Cellular localization of the heat shock transcription factors HSF1 and HSF2 in the rat brain during postnatal development and following hyperthermia. *Brain. Res.* 1999, 821, 333–344.
- Cotto J.J., Morimoto R.I.: Stress-induced activation of the heat-shock response: cell and molecular biology of heat-shock factors. *Biochem. Soc. Symp.* 1999, 64, 105–115.
- Cieślak P., Kluciński P.: Uszkodzenie i zapalenie naczyń w toczniu rumieniowatym układowym. *Pol. Arch. Med.* 2008, 118(1–2), 57–63.
- Jamin C., Alard J.E.: Induction of endothelial cell apoptosis by the binding of anti-endothelial cell antibodies to Hsp60 in vasculitis associated systemic autoimmune diseases. *Arthritis Rheum.* 2005, 52, 4028–4038.
- Deocaris C.C., Wadhwa R.: On the brotherhood of the mitochondrial chaperones mortalin and heat shock protein 60. *Cell Stress Chaperones*, 2006, 11, 116–128.
- Creagh E.M., Cotter T.G.: Heat shock proteins – modulators of apoptosis in tumor cells. *Leukemia*, 2000, 14, 1161–1173.
- Joo M., Chi J.G., Lee H.: Expression of Hsp70 and Hsp 27 in hepatocellular carcinoma. *J. Korean Med. Sci.* 2005; 20: 829–834.
- Maloney A., Workman P.: HSP90 as a new therapeutic target for cancer therapy: the story unfolds. *Expert opinion on biological therapy.* 2002, 1(2), 3–24.
- Bedin M., Gaben A.M., Saucier C.: Geldanamycin, an inhibitor of the chaperone activity of HSP90, induces MAPK-independent cell cycle arrest. *Int J Cancer.* 2004, 109, 5, 643–652. Chen M., Aosai F.: *Toxoplasma gondii* infection inhibits the development of lupus-like syndrome in autoimmune. *Int. Immunol.* 2004, 16, 937–945.
- Dinh H.K.: Cytoprotection against thermal injury. *Pharmacogenomics J.* 2002, 2, 318–326.
- Romanucci M., Marinelli A.: Heat shock protein expression in canine malignant mammary tumours. *BMC Cancer.* 2006, 6, 171–185.
- Trieb K., Kohibek R.: Heat shock protein 72 expression in chondrosarcoma correlates with differentiation. *J. Cancer. Res. Clin. Oncol.* 2000, 126, 667–673.

32. Boltze C., Mundschenk J., Unger N.: Expression profile of the telomeric complex discriminates between benign and malignant pheochromocytoma. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2003, 9(88), 4280–4286.
33. Garrido C., Brunet M.: Białka szoku cieplnego. *Cell Cycle*, 2006, 5, 233–238.
34. Hsu H.C., Zhou T.: Production of a novel class of polyreactive pathogenic autoantibodies in BXD2 mice causes glomerulonephritis and arthritis. *Arthritis Rheum*. 2006, 54, 343–348.
35. Schober A., Muller E.: The response of heat shock proteins 25 and 72 to ischaemia in different kidney zones. *Pflugers Arch*. 1997, 434, 292–303.
36. Van Why S.K., Hildebrandt F.: Induction and intracellular localization of HSP-72 after renal ischemia. *Am. J. Physiol*. 1992, 263, 769–773.
37. Bonegio R., Lieberthal W.: Role of apoptosis in the pathogenesis of acute renal failure. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens*. 2002, 11, 301.
38. Beere H.M.: The stress of dying[®]: the role of heat shock proteins in the regulation of apoptosis. *J. Cell Sci*. 2004, 117, 2641–2649.
39. Bidmon B., Endemann M., Muller T.: Heat shock protein-70 repairs proximal tubule structure after renal ischemia. *Kidney Int*. 2000, 58, 2400–2411.
40. Hansson G.K., Libby P., Schonbeck U., Yan Z.Q.: Innate and adaptive immunity in the pathogenesis of atherosclerosis. *Circ. Res*. 2002, 91, 281–291.
41. Benaglio M., Azzurri A., Ciervo A.: Thelper type 1 lymphocytes drive inflammation in human atherosclerotic lesions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2003, 100, 6658–6663.
42. Methe H., Brunner S., Wiegand D.: Enhanced T-helper-1 lymphocyte activation patterns in acute coronary syndromes. *J. Am. Coll. Cardiol*. 2005, 45, 1939–1945.
43. Pockley A.G.: Heat shock proteins, inflammation, and cardiovascular disease. *Circulation*. 2002, 105, 1012–1017.
44. Hakamada-Taguchi R., Uehara Y.: Inhibition of hydroxymethylglutaryl-coenzyme areductase reduces Th1 development and promotes Th2 development. *Circ. Res*. 2003, 93, 948–956.
45. Ghayour-Mobarhan M., Lamb D.J.: Heat shock protein antibody titers are reduced by statin therapy in dyslipidemic subjects: pilot study. *Angiology*. 2005, 56, 61–68.
46. Hansson G.K.: Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N. Engl. J. Med*. 2005, 352, 1685–1695.
47. Hansson G.K.: Vaccination against atherosclerosis: science or fiction? *Circulation*, 2002, 106, 1599–1601.
48. Ramos C.H., Ferreira S.T.: Protein folding, misfolding, and aggregation: evolving concepts and conformational diseases. *Protein Pept Lett*. 2005, 12(3), 213–222.
49. Panno J.: Gene therapy. *The New Biology*. 2004, 44, 137–145.
50. Silani V., Leigh N.: Stem therapy for ALS: hope and reality. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord*. 2003, 4(1), 8–10.
51. Stefani M.: Protein misfolding and aggregation: new examples in medicine and biology of the dark side of the protein world. *Biochim Biophys Acta*. 2004, 1739(1), 5–25.
52. Muchowski P.J., Wacker J.L.: Modulation of neurodegeneration by molecular chaperones. *Nature Reviews*. 2005, 6, 11–22.
53. Walsh D.M., Selkoe D.J.: Oligomers on the brain: the emerging role of soluble protein aggregates in neurodegeneration. *Protein Pept*. 2004, 11(3), 213–228.
54. Bieschke J.: Oxidative metabolites accelerate Alzheimer's amyloidogenesis by a two-step mechanism, eliminating the requirement for nucleation. *Biochemistry*. 2005, 44(13), 4977–4983. Chakraborty C.: Prion disease: a deadly disease for protein misfolding. *Curr Pharm Biotechnol*. 2005, 6(2), 167–177. Borges J.C., Ramos C.H.: Protein folding assisted by chaperones. *Protein Pept Lett*. 2005, 12(3), 257–261.
55. Lee S., Tsai F.T.: Molecular chaperones in protein quality control. *J Biochem Mol Biol*. 2005, 38(3), 259–265.
56. McClellan L.: Protein quality control: chaperones culling corrupt conformations. *Nature Cell Biol*. 2005, 7, 736–741.
57. Ross C.A., Pickart C.M.: The ubiquitin-proteasome pathway in Parkinson's disease and other neurodegenerative diseases. *Trends Cell Biol*. 2004, 14(12), 703–711.
58. Jana N.R., Nukina N.: Recent advances in understanding the pathogenesis of polyglutamine disease: involvement of molecular chaperones and ubiquitin-proteasome pathway. *J Chem Neuroanat*. 2003, 26(2), 95–101. Tummala P.: Inhibition of chaperone activity is a shared property of several Cu,Zn-superoxide dismutase mutants that cause amyotrophic lateral sclerosis. *J. Biol. Chem*. 2005, 280, 17725–17731. Sakahira P.: Molecular chaperones as modulators of polyglutamine protein aggregation and toxicity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99, 16412–16418. Bonini N.M.: Chaperoning brain degeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002, 99, 16407–16411.
59. Ross C.P.: Protein aggregation and neurodegenerative disease. *Nat. Med*. 2004, 10, 10–22.
60. Kalmar B., Greensmith L.: Indukcja białka szoku cieplnego dla ochrony przed stresem oksydacyjnym. *Adv. Drug Deliv*. 2009, 61 (4), 310–318.
61. Fredovich I.: Amyotrophic lateral sclerosis. *Proc Natl. Acad Sci*. 2002, 99, 9010–9014.
62. Bruening, W.: Up-regulation of protein chaperones preserves viability of cells expressing toxic Cu/Zn superoxide dismutase mutants associated with amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurochem*. 2002, 72, 693–699. Kurthy K.: Effect of BRX-220 against peripheral neuropathy and insulin resistance in diabetic rat models. *Ann NY Acad Sci*. 2002, 967, 482.
63. Brown I.R.: Heat shock proteins and protection of the nervous system. *Exp. Neurol*. 2007, 1113, 147–58.
64. Kieran D., Kalmar B.: Treatment with arimoclolom in ALS. *Nat. Med*. 2004, 10(4), 402–5.
65. Amaral M.D.: CFTR and chaperones: processing and degradation. *J Mol Neurosci*. 2004, 23, 41–48.
66. Hooper P.L.: Loss of defense against stress: diabetes and heat shock proteins. *Diabetes Technol Ther*. 2005, 7, 204–208.