

Białka opiekuńcze – pomagają czy szkodzą?

Michał Piotr Marszałł

Katedra i Zakład Chemii Leków, Collegium Medicum, UMK, Wydział Farmaceutyczny, Bydgoszcz

Adres do korespondencji: Michał Piotr Marszałł, Katedra i Zakład Chemii Leków, Collegium Medicum, UMK, Wydział Farmaceutyczny, ul. Skłodowskiej-Curie 9, 85-094 Bydgoszcz, e-mail: mmars@cm.umk.pl

Molecular chaperones (proteins) – help or damage? · Molecular chaperones are the component of prokaryotic as well as eukaryotic cells and protect them against environmental stress. It was proved that mutations in the chaperone gene can cause a neurodegenerative or cancer diseases. Presently, there are many studies on their molecular recognition in biochemical processes.

The present review summarizes current results of studies about influence of molecular chaperones on the pathogenic diseases and their application in therapy.

Keywords: molecular chaperones, environmental stress, neurodegenerative disease, cancer.

© Farm Pol, 2010, 66(7): 484-487

Białka opiekuńcze (*ang. molecular chaperones*) należą do rodziny białek szoku termicznego (*ang. heat shock protein, Hsp*). Białka szoku termicznego spełniają ważną rolę w organizmach żywych i są tematem badań w wielu ośrodkach naukowych z całego świata. Są to specyficzne białka występujące w komórkach zarówno prokariotycznych, jak i eukariotycznych, których nadekspresja obserwowana jest jako odpowiedź na bodźce stresowe, takie jak: zmiana temperatury, stres tlenowy oraz brak substancji odżywczych [1]. W warunkach bezstresowych białka te uczestniczą w wielu procesach biochemicznych, odgrywając istotną rolę w funkcjonowaniu komórki.

Głównym kryterium przynależności do rodziny *Hsp* jest obecność domeny α -krystaliny zawierającej około 90 reszt aminokwasowych w części karboksylowej białka. Stąd często spotykane jest inne nazewnictwo dla tej grupy białek – α -*Hsp*. Ponieważ w procesie ewolucji sekwencje aminokwasowe białek opiekuńczych zostały zachowane uważa się, że *Hsp* jest najbardziej konserwatywną strukturą białka w organizmach żywych. Przypuszcza się, iż umożliwia im to spełnianie funkcji białek opiekuńczych.

Rodzina *Hsp* obejmuje grupę protein o masach rzędu od 10 do 110 kDa, które pełnią różne funkcje w komórce (**tabela 1**). Najliczniejszą grupę białek (ponad 30) stanowią tak zwane małe białka szoku termicznego (*ang. small heat shock protein, sHsp*). Są to głównie roślinne białka charakteryzujące się niską masą od 15 do 40 kDa, występujące w cytozolu, jądrze i organellach komórkowych [2].

Rola białek opiekuńczych polega głównie na pośredniczeniu w procesach transkrypcji, translacji oraz replikacji DNA. Dlatego mutacje w genach kodujących *Hsp* są dla komórek „zabójcze” [3]. Uważa się, iż *Hsp* powoduje buforowanie skutków powstałych w wyniku pojedynczych mutacji w genach (indukowanych np. paleniem tytoniu lub nadmierną ekspozycją na słońce) powodując, iż organizm nie odczuwa ich negatywnych skutków [3]. Ten „efekt buforowy” przyczynia się do bezobjawowych skutków kumulacji różnego rodzaju mutacji w organizmie. Nadmiar nagromadzonych mutacji w wieku starczym, połączony z osłabioną produkcją *Hsp* może być przyczyną gwałtownego procesu starzenia się oraz zwiększenia liczby nowotworów.

Kolejną z istotnych funkcji białek opiekuńczych jest stabilizacja ważnych fizjologicznie białek, która jednocześnie zapobiega ich denaturacji i agregacji. Zaobserwowano istnienie związku pomiędzy zdolnością komórek do produkcji *Hsp* a występowaniem i nasileniem chorób neurodegeneracyjnych (Parkinsona, Alzheimerza) powodujących zmiany zwyrodnieniowe komórek nerwowych poprzez tworzenie złogów amyloidalnych w mózgu. Proces utraty neuronów postępuje wraz z wiekiem – starzeniem się organizmu. Degradacja komórek neuronowych przebiega bardzo szybko, a w miejscach obumarłych neuronów tworzą się złogi białka zwanego beta-amyloidem, które uniemożliwiają wymianę informacji w tkance nerwowej. Obecnie trwają prace nad zastosowaniem *Hsp* do hamowania (opóźniania) procesu tworzenia prekursorów agregatów złogów amyloidalnych [4, 5].

W genomie człowieka znajduje się 10 genów kodujących *sHsp* [6]. Produkowane są one głównie w tkance mięśniowej. Wykazano, że w warunkach stresu termicznego i oksydacyjnego stabilizują mikrofilamenty aktyny poprzez pośrednie lub bezpośrednie oddziaływanie na cytoszkielet komórek eukariotycznych, uczestniczą w stabilizacji miofibrili w komórkach mięśniowych oraz zapobiegają agregacji płytek krwi [7]. Dwa rodzaje białek *sHsp*: α A-kryształina oraz α B-kryształina stanowią aż 35% wszystkich białek w soczewce oka ssaków [8]. Stopień oligomeryzacji oraz aktywność α -kryształiny zmienia się wraz z wiekiem, a ich niskie stężenie prowadzi do agregacji innych białek strukturalnych soczewki β - i γ -kryształin i w konsekwencji rozwoju zaćmy. Stąd zaburzenia syntezy białek opiekuńczych oraz szereg mutacji w genach *sHsp* odpowiedzialny jest za rozwój m.in. zaćmy, desminopatii i neuropatii [2].

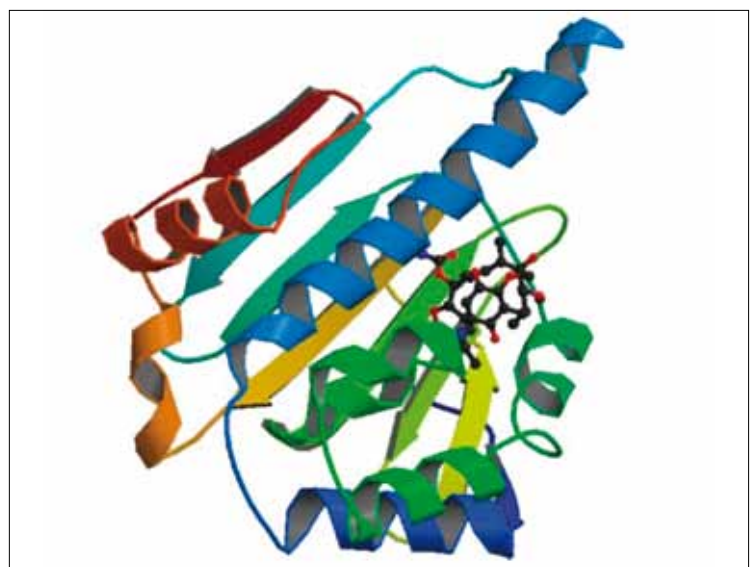
W ostatnim dziesięcioleciu, szereg badań *in vitro* wykazało, że białka szoku termicznego spełniają ważną rolę opiekuńczą w organizmach żywych. Chronią one inne białka przed zmianą struktury oraz zapobiegają procesowi apoptozy, którego zaburzenie może wywołać transformację nowotworową. Stąd „zdolność opiekuńcza” *Hsp* może być zębna dla organizmu w przypadku obecności komórek nowotworowych. Paradoksalnie, białka opiekuńcze hamując apoptozę, chronią również komórki nowotworowe przed czynnikami cytotoksycznymi stosowanymi w terapii nowotworowej. Podwyższony poziom *Hsp* (głównie *Hsp27*, *Hsp60*, *Hsp70* oraz *Hsp90*) zaobserwowano w nowotworach ośrodkowego układu nerwowego, raku piersi, jajnika, płuc i skóry [2, 9]. Uważa się, że *Hsp27* może być przyczyną oporności na chemioterapię w przypadku ostrej białaczki szpikowej, raka gruczołu krokowego, raka piersi i raka płuc [10]. Dodatkowo, stosowanie leków przeciwnowotworowych indukujących syntezę *Hsp27* (np. doksorubicyna) może obniżać wrażliwość komórek nowotworowych na leki. Dlatego wskazane jest w uzasadnionych przypadkach uzupełnienie terapii antynowotworowej o czynnik obniżający poziom lub aktywność *Hsp*. W przypadku leczenia raka płaskokomórkowego jamy ustnej czynnikiem obniżającym poziom *Hsp27* jest interferon γ [11].

Odkrycie zębnej roli białek szoku termicznego w kancerogenezie pozwoliło na opracowanie nowych metod walki z rakiem. Obecnie prowadzi się intensywne badania nad inhibitorami białka *Hsp90*, które pośrednio wraz z ATP zależnym systemem białek *Hsp40* i *Hsp70* uczestniczy w regulacji cyklu komórkowego (tabela 2), [12]. Najważniejszymi przedstawicielami inhibitorów z grupy antybiotyków ansamycynowych są geldanamycyna oraz jej pochodne: 17-AAG oraz 17-DMAG. Badania *in vitro* wspomagane modelowaniem molekularnym wykazały

Tabela 1. Białka szoku termicznego (*Heat shock protein, Hsp*), nazwa, lokalizacja oraz funkcja *Hsp* u człowieka [2, 9]

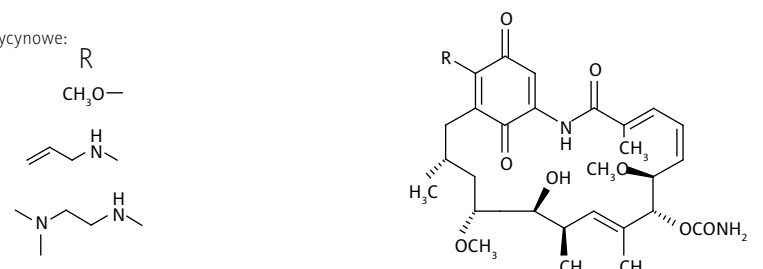
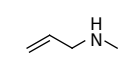
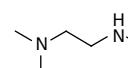
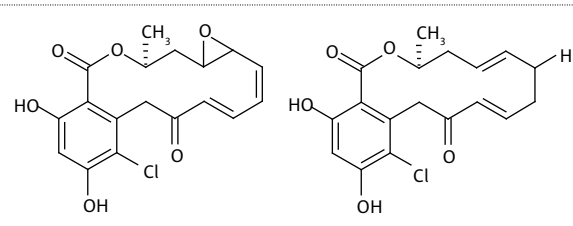
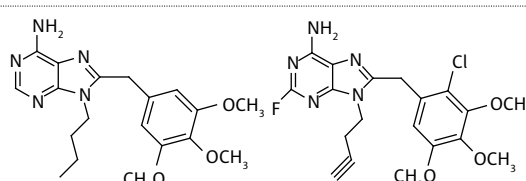
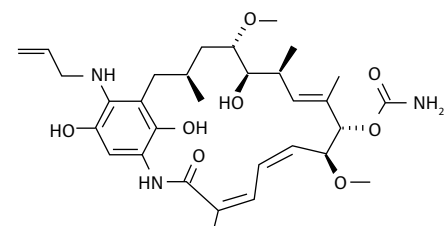
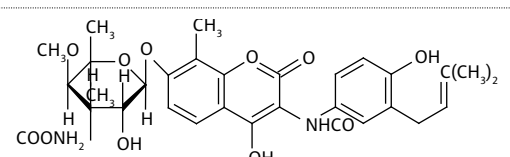
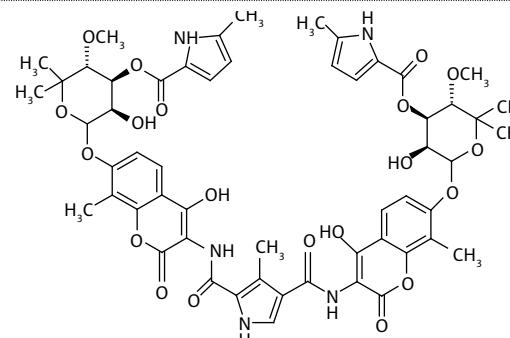
Nazwa	Masa cząsteczkowa (kDa)	Lokalizacja/Funkcje	Choroby wywołane przez mutacje w genie kodujący Hsp
<i>Hsp20</i>	20	mięśnie, serce hamuje agregację płytek krwi	
<i>Hsp27</i>	27	mięśnie, serce stabilizuje mikrofilamenty aktyny, hamowanie apoptozy	dziedziczna neuropatia ruchowa, (CMT)
α A-kryształina	monomer ~20	soczewka zapobieganie agregacji białek w soczewce oka	zaćma
α B-kryształina	monomer ~20	soczewka, śledziona hamuje apoptozę i agregację płytek krwi	zaćma
<i>Hsp40</i>	40	tworzą ATP zależny system, uczestniczą w regulacji cyklu komórkowego	nadekspresja białek <i>Hsp</i> – nowotwory
<i>Hsp60</i>	60		
<i>Hsp70</i>	70		
<i>Hsp90</i>	90		

domenę aminową ATP zależną *Hsp90*, jako miejsce wiążące powyższe antybiotyki (rycina 1). Ponieważ badania przedkliniczne wykazały dużą aktywność cytotoksyczną geldanamycyny przy jednoczesnym silnym działaniu hepatotoksycznym, konieczne stało się poszukiwanie nowych analogów. 17-AGG pozytywnie przeszedł II-ą fazę badań klinicznych, jednak ze względu na szybki metabolizm konieczne jest stosowanie większych dawek tego leku [13, 14]. Obecnie nadzieję pokłada się w 17-DMAG, która charakteryzuje się dobrą dostępnością biologiczną oraz rozpuszczalnością w wodzie, w przeciwieństwie do pozostałych analogów [15]. Dodatkowo, działanie przeciwnowotworowe tych inhibitorów spotęgowane jest poprzez indukcję degradacji produktów białkowych (np. białko P53, v-Src, HER2) zmutowanych



Rycina 1. Przykład modelowania molekularnego przedstawiającego dokowanie cząsteczek geldanamycyny do aminowej domeny *Hsp90* [23]

Tabela 2. Inhibitory białka opiekuńczego *Hsp90* o wysokiej aktywności przeciwnowotworowej

Nazwa	Struktura	Miejsce wiązania się z <i>Hsp90</i> (domena)
Antybiotyki ansamycynowe: geldanamycyna		
17-AAG		-NH ₂
17-DMAG		
Antybiotyki makrolidowe: radicalol pochonina D		-NH ₂
Pochodne puryn: PU-3 PU24FC1		-NH ₂
Inne: retaspimycyna (IPI504)		-NH ₂
nowobiocyna		-COOH
kumermycyna A ₁		-COOH

genów w komórkach nowotworowych [16]. Liczba zidentyfikowanych „klientów” *Hsp90* obejmująca zmutowane białka, czynniki transkrypcyjne, enzymy i receptory wzrasta z roku na rok [17].

Do związków wykazujących aktywność hamującą *Hsp90* należy również radicalol oraz jego analogi pochoniny K-P [18]. Związki te należą do grupy antybiotyków makrolidowych. Najsilniejszym inhibitorem

z tej grupy leków jest pochinityna D [19]. W ostatnim czasie obiecujące wyniki uzyskano dla związków pu-rynowych. Pochodne o nazwie PU-3 oraz PU24FC1 okazały się selektywnymi inhibitorami *Hsp90* komórek nowotworowych w stosunku do *Hsp90* produkowanych przez komórki zdrowe. Wyjątkiem są komórki nowotworowe raka piersi, charakteryzujące się nadekspresją ludzkiego naskórkowego czynnika wzrostu (HER2) [20]. Innymi związkami o potencjalnej aktywności przeciwnowotworowej są nowobiocyna i kumermycyna A1 – antybiotyki otrzymywane z hodowli grzyba *Streptomyces spheroides* lub *Streptomyces niveus*. Podobnie jak cisplatyna, od dłuższego czasu stosowane są one w terapii przeciwnowotworowej, jednak dopiero od kilku lat ich mechanizm działania został dokładnie poznany. Hamują i wiążą się one do *Hsp90* poprzez domenę karboksylową. Jednak ich aktywność jest znacznie mniejsza od współczesnych inhibitorów, stąd trwają poszukiwania nad ich nowymi analogami [21].

Obecnie trwają badania nad lekami o powyższym mechanizmie molekularnym, stosowanych w terapii guzów stromalnych przewodu pokarmowego (GIST). Wstępne wyniki wydają się zachęcające dla retaspimycyny określanej symbolem IPI504, której aktywność przeciwnowotworowa jest zbliżona do aktywności innych leków z grupy inhibitorów kinazy tyrozynowej (sunitinib, nilotinib) [22].

W ostatnim dziesięcioleciu wiele uwagi poświęcono rodzinie białek szoku termicznego. Odkrycie niepożądanych właściwości *Hsp90* w przypadku chorób nowotworowych, spowodowało wzrost zainteresowania użycia tego białka w terapii antynowotworowej. Dlatego celem wielu badań jest poszukiwanie takich inhibitorów białka opiekuńczego oraz ich optymalnej terapii skojarzonej, która mogłaby skutecznie i selektywnie eliminować komórki nowotworowe w organizmie pacjenta. Jednak należałoby sobie zadać pytanie: czy pomimo tak ogromnej roli w funkcjonowaniu komórki białko *Hsp90* powinno nazywać się białkiem opiekuńczym?

Otrzymano: 2010.02.08 · Zaakceptowano: 2010.03.10

Piśmiennictwo

- Urban-Chmiel B.: Wpływ podwyższonej temperatury na ekspresję białek szoku termicznego (Hsp70) u terenowych szczepów *Mannheimia haemolytica* serotyp 1. *Medycyna weterynaryjna*. 2006, 62(3): 801–803.
- Laskowska E.: Małe białka szoku termicznego – rola w apoptozie, kancerogenezie i chorobach związanych z agregacją białek, *Postępy Biochemii*. 2007, 53(1): 19–26.
- Wysocka M.: Tajemnice białek szoku termicznego odświeżone. *Puls medycyny*. 2003, 17(66).
- Ansar S., Burlison J.A., Hadden M.K., Yu X.M., Desino K.E., Bean J., Neckers L., Audus K.L., Michaelis M.L. Blagg B.S.J.: A non-toxic Hsp90 inhibitor protects neurons from Ab-induced toxicity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2007, 17: 1984–1990.
- Dou F., Netzer W.J., Tanemura K., Li F., Hartl F.U., Takashima A., Gou-ras G.K., Greengard P., Xu H.: Chaperones increase association of tau protein with microtubules. *PNAS*, 2003, 100(21): 721–726.
- Kappe G., Franck E., Verschuure P., Boelens W.C., Leunissen J.A.M., de Jong W.W.: The human genome encodes 10 α -crystallin-related small heat shock proteins: HspB1–10. *Cell Stress & Chaperones*. 2003, 8(1): 53–61.
- Sugiyama Y., Suzuki A., Kishikawa M., Akutsu R., Hirose T., Wayne M.M. Y., Tsui S.K.W., Yoshida S., Ohno S.: Muscle Develops a Specific Form of Small Heat Shock Protein Complex Composed of MKBP/HSPB2 and HSPB3 during Myogenic Differentiation. *J. Biol. Chem.*, 2000, 275(2): 1095–1104.
- Horwitz J.: Alpha-crystallin. *Experimental Eye Research*, 2003, 76, 145–153.
- Whitesell L., Lindquist S.L.: Hsp90 and the chaperoning of cancer. *Nature Reviews*, 2005, 5, 761–772.
- Concannon C.G., Gorman A.M., Samali A.: On the role of Hsp27 in regulating apoptosis. *Apoptosis*, 2003, 8: 61–70.
- Sun Y., MacRae T.M.: The small heat shock proteins and their role in human disease. *FEBS J.* 2005, 272: 2613–2627.
- Xiao L., Lu X., Ruden D.M.: Effectiveness of Hsp90 Inhibitors as Anti-Cancer Drugs. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 2006, 6: 1137–1143.
- Banerji U., O'Donnell A., Scurr M., Pacey S., Stapleton S., Asad Y., Simmons L., Maloney A., Raynaud F., Campbell M., Walton M., Lakhani S., Kaye S., Workman P., Judson I.: Phase I pharmacokinetic and pharmacodynamic study of 17-allylamino, 17-demethoxygeldanamycin in patients with advanced malignancies. *J. Clin. Oncol.* 2005, 23: 4152–4161.
- Egorin M. J., Lagattuta T. F., Hamburger D. R., Covey J. M., White K. D., Musser S. M., Eisman J. L.: Pharmacokinetics, tissue distribution, and metabolism of 17-(dimethylaminoethylamino)-17-demethoxygeldanamycin (NSC 707545) in CD2F1 mice and Fischer 344 rats. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2002, 49(1): 7–19.
- Eisman J.L., Lan J., Lagattuta T.F., Hamburger D.R., Joseph E., Covey J.M., Egorin M.J.: Pharmacokinetics and pharmacodynamics of 17-demethoxy 17-[[[2-dimethylaminoethyl]amino]geldanamycin (17DMAG, NSC 707545) in C. B-17 SCID mice bearing MDA-MB-231 human breast cancer xenografts. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 2005, 55: 21–32.
- Walerych D, Kudla G, Gutkowska M, Wawrzynow B, Muller L, King FW, Helwak A, Boros J, Zylicz A, Zylicz M, Hsp90 Chaperones Wild-type p53 Tumor Suppressor Protein. *J. Biol. Chem.* 2004, 279(47): 48836–48845.
- <http://www.picard.ch/downloads/Hsp90interactors.pdf>; (stan z 18.01.2010).
- Shinonaga H., Kawamura Y., Ikeda A., Aoki M., Sakai N., Fujimoto N., Kawashima A.: Pochonins K–P: new radicicol analogues from *Pochonia chlamydosporia* var. *cchlamydosporia* and their WNT-5A expression inhibitory activities. *Tetrahedron*. 2009, 65: 3446–3453.
- Barluenga S., Wong C., Fontaine J.-G., Aouadi K., Beebe K., Tsutsumi S., Neckers L., Winssinger N.: Divergent Synthesis of a Pochonin Library Targeting HSP90 and in vivo Efficacy of Identified Inhibitor. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2008, 47(23): 4432–4435.
- Chiosis G., Vilenchik M., Kim J., Solit D.: Hsp90: the vulnerable chaperone. *Drug Discov. Today*. 2005, 9(20): 881–888.
- Conder R., Yu H., Ricos M., Hing H., Chia W., Lim L., Harden N.: dPak is required for integrity of the leading edge cytoskeleton during *Drosophila* dorsal closure but does not signal through the JNK cascade. *Develop. Biol.*, 2004, 276(2): 378–390.
- Demetri G. D., George S., Morgan J.A., Wagner A., Quigley M. T., Polson K., Pokela J., van den Abbeele A., Adams J., Grayzel D.: Inhibition of the Heat Shock Protein 90 (Hsp90) chaperone with the novel agent IPI-504 to overcome resistance to tyrosine kinase inhibitors (TKIs) in metastatic GIST: Updated results of a Phase I trial. *Journal of Clinical Oncology*. 2007, 25(18): 10024.
- Protein Data Bank, code 1YET, <http://www.pdb.org/pdb/home/home.do>; (stan z 18.01.2010).