

Received: 2009.06.05  
Accepted: 2009.09.14  
Published: 2009.10.27

## Pleiotropowa aktywność białek szoku cieplnego

### The pleiotropic activity of heat-shock proteins

Arleta Kaźmierczuk, Zofia M. Kiliańska

Zakład Biochemii Medycznej, Katedra Cytobiochemii, Uniwersytet Łódzki, Łódź

#### Streszczenie

Białka szoku cieplnego (heat shock proteins – HSPs), nazywane powszechnie „białkami stresu”, należą do rodziny polipeptydów o wysokim stopniu konserwatywności struktury pierwszorzędowej. Występują zarówno w komórkach organizmów *Prokaryota*, jak i *Eukaryota*, zapewniając ochronę przed czynnikami stresu komórkowego i środowiskowego. Masa cząsteczkowa stanowi główne kryterium podziału tych białek na: wielkocząsteczkowe, duże – HSP100 (100–110 kDa), HSP90 (75–96 kDa), średniocząsteczkowe HSP70 (66–78 kDa), HSP60 i HSP40 oraz małocząsteczkowe, małe – sHSP (8,5–40 kDa).

Białka te odgrywają istotną rolę jako czynniki opiekuńcze/współopiekuńcze towarzyszące przy prawidłowym fałdowaniu syntetyzowanych czy gromadzonych pod wpływem stresu białek – substratów, zapobiegając ich oligomeryzacji, a także uczestnicząc w ich transporcie przez błony czy degradacji. Przedstawiciele rodziny HSP wykazują podwójną aktywność warunkowaną ich wewnątrz- czy zewnątrzkomórkowym/błonowym rozmieszczeniem. Wewnątrzkomórkowe HSP pełnią głównie rolę ochronną. Natomiast zewnątrzkomórkowo czy błonowo umiejscowione białka pośredniczą w mechanizmach immunologicznych. Wśród funkcji pełnionych przez HSP wymienia się ich udział w sygnalizacji komórkowej.

W pracy przedstawiono budowę, właściwości głównych przedstawicieli HSP, ich rolę w licznych komórkowych i pozakomórkowych procesach.

#### Słowa kluczowe:

podrodziny białek szoku cieplnego • funkcje opiekuńcze • fałdowanie białek • cykl ATP-azowy • kontrola jakości białek • funkcje zewnątrzkomórkowe

#### Summary

Stress or heat-shock proteins (HSPs) are highly conserved proteins present in cells of both prokaryotes and eukaryotes, providing them with protection from cellular and environmental stress factors. Based on molecular-weight, HSPs can be divided into the large (HSP100: 100–110 kDa and HSP90: 75–96 kDa), intermediate (HSP70: 66–78 kDa, HSP60, and HSP40), and small (sHSP: 8.5–40 kDa) subfamilies. These proteins play an essential role as molecular chaperones/co-chaperones by assisting the correct folding of nascent and stress-accumulated protein-substrate assembly, preventing the aggregation of these proteins, as well as transport across membranes and the degradation of other proteins. Members of HSP family display dual activity depending on their intra- or extracellular distribution. Intracellular HSPs mainly play a protective role. Extracellular or membrane-bound HSPs mediate immunological functions. Among the functions of HSPs is their participation in cell signaling. This review deals with the structure and properties of the main members of the HSPs and their role in a large number of cellular/extracellular processes.

#### Key words:

heat-shock protein subfamilies • chaperoning • protein folding • ATPase cycle • quality control • extracellular functions

**Full-text PDF:** <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=897164>**Word count:** 10235**Tables:** 2**Figures:** 3**References:** 163**Adres autorki:** prof. dr hab. Zofia M. Kiliańska, Zakład Biochemii Medycznej, Katedra Cytobiochemii Uniwersytetu Łódzkiego, ul. Banacha 12/16, 90-237 Łódź; e-mail: zkilian@gmail.com

**Wykaz skrótów:** **APC** – komórka prezentująca antygen (antigen presenting cell); **BAG-1** – białko współopiekuńcze z rodziny białek BAG (BAG family molecular chaperone regulator-1); **CD** – molekuly powierzchniowe uczestniczące w prezentacji antygenów (cluster of differentiation); **Cdk** – kinaza zależna od cyklin (cyclin-dependent kinase); **Cyp40** – cyklofilina 40 (cyclophilin 40); **CHIP** – ligaza ubikwitylowa E3 (carboxyl terminus of Hsp70-interacting protein); **ER** – retikulum endoplazmatyczne (endoplasmic reticulum); **ErbB2** – receptor naskórkowego czynnika wzrostu o funkcji kinazy tyrozynowej (epidermal growth factor – EGF); **FKBP51/52** – immunofiliny (FK506 binding protein 51/52); **GRP** – białko z rodziny HSP regulowane poziomem glukozy (glucose regulated protein); **HIP** – białko współopiekuńcze (HSP integrating protein); **HOP** – białko oddziałujące z HSC70/HSP90 (HSC70/HSP90-organizing protein); **HSE** – element odpowiedzi na szok ciepły (heat shock element); **HSF** – czynnik szoku ciepłego (heat shock factor); **HSP** – białko szoku ciepłego (heat shock protein); **MHC** – główny kompleks zgodności tkankowej (major histocompatibility complex); **NEF** – czynniki regulujące cykl ATP-azowy, uczestniczą w wymianie nukleotydów ADP/ATP (nucleotide exchange factor); **NK** – komórka naturalna zabijająca (natural killer); **PKB/Akt** – kinaza białkowa B opisywana również symbolem Akt (protein kinase B); **RAF-1** – kinaza białkowa serynowo-treoninowa szlaku MAPK, oddziałująca z białkami z rodziny Ras (RAF protooncogene serine/threonine protein kinase); **sHSP** – małe/małocząsteczkowe białka szoku ciepłego (small HSPs); **TLR2/TLR4** – receptory powierzchniowe (toll-like receptor-2/4); **TPR** – sekwencja 34 reszt aminokwasowych o zdegradowanym konsensusie, występuje w wielu kopiach, powtórzenia mogą stanowić domeny asocjacji (tetra-tricopeptide repeat).

## WSTĘP

Białka szoku ciepłego wykrył przypadkowo włoski genetyk Ferruccio Ritossa [124], jako wynik nieplanowanego działania nieznacznie podwyższonej temperatury w inkubatorze, w którym hodował muszki owocowe *Drosophila melanogaster*. Analiza mikroskopowa komórek gruczołów ślinowych owadów poddanych szokowi pozwoliła na obserwację zgrubień na tzw. chromosomach olbrzymich (giant), które zidentyfikowano jako *loci* genów szoku ciepłego.

W kilkanaście lat później produkty ekspresji genów szoku termicznego okazały się powszechnym zjawiskiem zarówno u *Prokaryota*, jak i *Eukaryota*, ulegając biosyntezie w wyniku działania podwyższonej temperatury, ale również innych czynników stresogennych (stresorów) zarówno fizycznych, jak i chemicznych oraz biologicznych. Niezwykłą cechą HSP jest zdolność do oddziaływania ze znaczną liczbą białek „klientów” (clients), co odróżnia je od większości białek komórkowych, które wchodzi w interakcję zwykle z jednym bądź niewielką liczbą partnerów. Ta właściwość zapewne wiąże się z plejotropową aktywnością HSP, które chronią komórki/organizmy przed szkodliwym działaniem czynników środowiskowych, metabolicznych uczestniczą w prawidłowym zwijaniu nowo syntetyzowanych łańcuchów białkowych, rozwijaniu białek nieprawidłowo zwiniętych lub uszkodzonych, transporcie białek do ich miejsc przeznaczenia. Biosynteza HSP, na niskim poziomie, odbywa się również w warunkach prawidłowych [76].

Rozmieszczenie HSP w komórkach wynika z ich powinowactwa do określonego organelum lub miejsca występowania substratu/ów. W prawidłowych warunkach białka te gromadzą się w miejscach biosyntezy białek – w siateczce śródplazmatycznej (endoplasmic reticulum - ER), a także w mitochondriach i lizosomach. Wiążą się również z cytoszkieletem, np. mikrofilamentami aktywny czy mikro-tubulami i centrosomami podczas podziału komórkowego, w ten sposób stabilizują go i chronią przed reorganizacją w warunkach stresu [66,73].

W komórkach zmienionych nowotworowo białka tej rodziny występują w błonie cytoplazmatycznej, gdzie pełnią funkcje antygenów komórek NK (natural killer). Jest to związane z funkcją immunologiczną jaką pełnią HSP [34,76,128].

W warunkach stresu obserwuje się wzrost poziomu HSP w cytoplazmie oraz ich transport m.in. do jądra komórkowego, gdzie chronią DNA, pre-mRNA, prerybosomy oraz białka jądrowe przed degradacją i uszkodzeniem, a także uczestniczą w aktywacji określonych genów [73,76].

## CHARAKTERYSTYKA I KLASYFIKACJA HSP

Przedstawiciele rodziny HSP wykazują aktywność cytoochronną i są czynnikami opiekuńczymi innych białek komórkowych. Należą do polipeptydów, które charakteryzuje wysoka zachowawczość sekwencji aminokwasowej. Ze względu na masę cząsteczkową (m.cz.) w opisywanej ro-

dzinie białek można wyodrębnić następujące podrodziny: HSP100, HSP90, HSP70, HSP60, HSP40 oraz małowczątkowe (small HSP – sHSP) o m.cz. 8,5–40 kDa. Powyższy podział odzwierciedla także różnice w cechach biologicznych tych molekuł. W obrębie opisywanej rodziny mieszczą się również HSP, których nie można zaklasyfikować do żadnej z wymienionych podrodzin ze względu na ich odmienny charakter i właściwości np. GRPs (glucose regulated proteins), których ekspresję indukują zmiany poziomu glukozy, a ich m.cz. osiąga 75, 78 i 94/96 kDa [76,109,127].

Ekspresję genów kodujących HSP indukuje wiele szkodliwych czynników egzo- i endogennych na jakie narażona jest komórka. Do stresorów zalicza się m.in. temperaturę, trucizny metaboliczne, analogi aminokwasów, niedobór glukozy, cytokiny, alkohole, metale ciężkie, wolne rodniki, zakażenia wirusowe i bakteryjne, a także różne typy promieniowania [72].

Członkowie tej rodziny stanowią 5–10% wszystkich białek. Są one syntetyzowane głównie w odpowiedzi komórki na stres, dlatego transkrypcja ich genów zachodzi z większą wydajnością w warunkach niefizjologicznych w porównaniu z warunkami prawidłowymi. Białka te ulegają ekspresji podczas cyklu komórkowego, embriogenezy, różnicowania i podlegają stymulacji przez czynniki wzrostu [109]. Uważa się, że ekspresja HSP90 osiąga wysoki poziom w warunkach prawidłowych, natomiast białek HSP70 i HSP27 – niski, który wzrasta dopiero w warunkach stresu [143].

W komórkach nowotworowych przeciwnie, obserwuje się wzrost puli HSP70 i/ albo HSP27 stąd przypisuje się im rolę w stymulacji procesu nowotworzenia. W komórkach nieprawidłowych dochodzi do zmiany aktywności białek, zwłaszcza uczestniczących w cyklu komórkowym, kinaz, fosfataz i czynników wzrostu. Rola HSP70 i HSP27 w nowotworzeniu związana jest głównie z ich antyapoptotycznymi właściwościami [43,51,88].

Podstawową funkcją jaką pełnią polipeptydy należące do rodziny HSP, jest rola ochronna, która polega na wyciszeniu lub osłabianiu efektów działania czynników stresu. Cząsteczki HSP łączą komórke ze środowiskiem zewnętrznym, czego dowodem jest ich szybka i intensywna synteza po zadziałaniu zewnątrzkomórkowego stresora. Wykazują one jednak zdolność reakcji na sygnały wewnątrzkomórkowe, chroniąc ją przed szkodliwymi metabolitami. Aktywność HSP nie ogranicza się do procesów patologicznych, bowiem uczestniczą również w procesach fizjologicznych. Białka te niezależnie od warunków odpowiadają za prawidłowe funkcjonowanie wszystkich organelli oraz są ogniwem różnych szlaków metabolicznych i sygnalizacyjnych (tabela 1).

Plejotropowa aktywność HSP, jako tzw. „molekularnych przyzwoitek” (molecular chaperones), wiąże się z ich zdolnością do tworzenia przejściowych kompleksów z innymi białkami, co skutkuje zmianą ich konformacji i umożliwia przemieszczanie przez błony biologiczne do różnych organelli. Poza transportem białek, HSP biorą udział w ich fałdowaniu, zapobiegają denaturacji i agregacji oraz uczestniczą w naprawie uszkodzonych cząsteczek umożliwiając im powrót do postaci natywnej. Ponadto, pośrednio bądź bezpośrednio, są zaangażowane w ich aktywację lub inak-

tywację. W przypadku poważnych uszkodzeń, gdy naprawa zdenaturowanych białek nie jest możliwa, HSP przyczyniają się do ich eliminacji z udziałem proteasomów [76]. Inną ważną rolą HSP jest zapobieganie nieprawidłowym oddziaływaniom między białkami a DNA [68,126].

Białka z rodziny HSP występują głównie wewnątrz komórki, chociaż mogą być również związane z błoną komórkową. Ponadto, HSP70, HSP90 i GRP96 zidentyfikowano w przestrzeni pozakomórkowej [127,128]. Zewnątrzkomórkowo umiejscowione białka biorą udział w odpowiedzi immunologicznej oraz wpływają na reakcję zapalną, czego wynikiem jest synteza cytokin zapalnych [161].

Podkreśla się, że HSP usytuowane w błonie cytoplazmatycznej komórek wpływają na odpowiedź immunologiczną; uczestniczą w prezentacji antygenów i biosyntezie przeciwciał [34,83]. Cząsteczki np. HSP70 funkcjonują jako antygeny na powierzchni komórek i są rozpoznawane przez komórki NK. Polipeptydy te umożliwiają aktywność tzw. kompleksów MHC (major histocompatibility complex), odpowiedzialnych za prawidłowe reakcje układu odpornościowego [20,128]. Mogą również brać udział w powstawaniu wielu zaburzeń immunologicznych oraz chorób, m.in. reumatoidalnego zapalenia stawów, cukrzycy insulinozależnej czy choroby Alzheimera [34,134,139,157]. Ponadto, znaczący wzrost poziomu aktywności białek HSP72 i HSP73 obserwuje się po transplantacji, co koreluje w wysokim stopniu z odrzuceniem przeszczepu [161].

Mitochondrialne kompleksy białek HSP60 i HSP10 pełnią ochronną rolę w uszkodzeniach serca i mózgu wywołanych niedokrwieniem (ischemia) czy niedotlenieniem (hypoxia). Zapobiegają chorobom, które wynikają z nieprawidłowego funkcjonowania naczyń krwionośnych np. choroba wieńcowa, nadciśnienie czy miażdżycza tętnic, poprzez hamowanie uszkodzeń oraz szlaków apoptotycznych [76,141].

Akceptuje się pogląd, że odpowiedni poziom HSP jest związany z nabywaniem przez komórki tolerancji na różne stresory. Białka te mają szansę znaleźć zastosowanie w profilaktyce wielu chorób dzięki m.in. zdolności modulowania procesu apoptozy w komórkach nowotworowych, indukcji NK oraz aktywacji swoistych mechanizmów odporności humoralnej i komórkowej [6,15,52]. Wyniki badań sugerują, że poziom HSP może stanowić marker agresywności choroby bądź odpowiedzi pacjentów na chemioterapię, stąd wskazuje się na ich potencjalną rolę w prognozowaniu i leczeniu nowotworów [43,67,128]. Należy podkreślić, że w związku z funkcją opiekuńczą i ich zdolnością tworzenia kompleksów z różnymi białkami prowadzi się badania nad ich wykorzystaniem do konstrukcji szczepionek przeciwwzakaźnych i przeciwnowotworowych [76,80,133].

Wyniki przeprowadzonych badań pozwalają na stwierdzenie, że cząsteczki tej rodziny mogą pełnić funkcję w zależności od miejsca występowania, tj. wewnątrzkomórkową – ochronną (antyapoptotyczną) i pozakomórkową – immunogenną (proapoptotyczną).

#### REGULACJA SYNTEZY HSP

Aktywację genów HSP indukuje stres, a jej regulacja zachodzi zarówno na poziomie transkrypcji, jak i translacji

Tabela 1. Podrodziny białek szoku cieplnego; główne, indywidualne HSP – nazwy/symbole, lokalizacja, funkcje

Podrodzina	Białko	Lokalizacja	Główne funkcje
<b>HSP100</b> [29,42,44,60, 98,110,129]	HSP104/HSP105	cytosol	udział w naprawie/proteolizie zdenaturowanych białek
	HSP110	cytosol	ułatwianie rozpuszczania agregatów białkowych; białko współopiekuńcze HSP25 i HSP70; wiązanie i aktywacja antygenów i komórek APC; indukcja odpowiedzi antynowotworowej
<b>HSP90</b> [41,57,83,96, 103,112,115,136,142]	HSP90	cytosol/jądro komórkowe	aktywacja receptorów steroidowych i niesteroidowych; regulacja aktywności/stabilizacja czynników transkrypcyjnych, enzymów; udział w transdukcji sygnałów, różnicowaniu i proliferacji; udział w naprawie/usuwaniu zdenaturowanych białek
	GRP94/96	ER/cytosol/błona komórkowa	transport białek; właściwości antyapoptotyczne; funkcje immunologiczne
<b>HSP70</b> [37,38,39,52, 54,58,76,82,90,129]	HSC70	cytosol/jądro komórkowe	transport białek do organelli
	HSP70/72	cytosol/jądro komórkowe	udział w fałdowaniu nowo syntetyzowanych białek oraz naprawie lub usuwaniu denaturowanych polipeptydów; hamowanie powstawania agregatów denaturowanych białek; regulacja aktywności enzymów; właściwości antyapoptotyczne; udział w transdukcji sygnałów; funkcje immunologiczne
	GRP78/Bip	ER/cytosol/jądro komórkowe/ błona komórkowa	koordynacja transportu przez błonę komórkową; ochrona rybosomów
	GRP75/mortalina/ HSPA9/Mot-2/ PBP74	mitochondria/cytosol	ochrona mitochondriów
	HSP70-HOM/ /Hum70t	cytosol/jądro komórkowe	naprawa DNA, ochrona telomerów
<b>HSP60-40</b> [28,36,56, 117,146,154]	HSP60	mitochondria/cytosol	składanie nowo zsyntetyzowanych polipeptydów/naprawa uszkodzonych białek mitochondrialnych/cytosolowych; funkcje immunologiczne; transport białek do mitochondriów; regulator apoptozy
	HSP56	cytosol/błona komórkowa	transport cholesterolu, wiązanie receptorów steroidowych
	HSP47	ER	ochrona włókien kolagenowych
	HSP40/DnaJ (A,B,C)	cytosol/jądro komórkowe/ER/ mitochondria/aparat Golgiego/ błona komórkowa	białko współopiekuńcze; wiązanie uszkodzonych białek, udział w ich naprawie; wiązanie receptorów LDL oraz jonów; udział w cyklu komórkowym; aktywność GTP-azowa; regulator apoptozy; wiązanie DNA i RNA – regulacja replikacji i transkrypcji; aktywator ATP; regulator aktywności enzymów; udział w utrzymaniu homeostazy redox; udział w transporcie białek
<b>HSP40-10 (sHSP)</b> [35,36,46,55,59,61,64, 77,79,87,89,92,93, 102,104,108,118,138, 146,149,150]	HSP10/CPN10/ Chaperonin 10	zewnątrzkomórkowa/ mitochondria	zapobieganie agregacji zdenaturowanych białek; udział w denaturacji polipeptydów; białko współopiekuńcze; aktywator prokaspaz
	HSP20/HSPB6	zewnątrzkomórkowa/ cytoszkielet	stabilizacja aktywny i cytoszkieletu; udział w fałdowaniu białek; białko budujące oko; udział w skurczach mięśni
	HSP22/HSPB8	cytosol/błona komórkowa	regulacja aktywności enzymów
	HSP27/28/25/ HSPB1/B2/B3	cytosol/jądro komórkowe/ błona komórkowa	hamowanie agregacji denaturowanych białek; udział w naprawie/usuwaniu zdenaturowanych białek oraz ich fałdowaniu; aktywator enzymów; aktywność antyapoptotyczna; udział w przetrzutowaniu; rola w rozwoju/ funkcjonowaniu komórek nerwowych i mięśni; stabilizacja mikrofilamentów i cytoszkieletu
	$\alpha$ A-krystalina/ HSPB4	cytosol	białko budujące soczewkę oka; udział w fałdowaniu białek
	$\alpha$ B-krystalina/ HSPB5	cytosol/jądro komórkowe/błona komórkowa	receptor szlaków sygnalizacyjnych; udział w rozwoju mięśni i fałdowaniu białek
	HSP32 (HMOX1/ HMOX2)	ER/błona komórkowa/mito- chondria	aktywność oksygenazy hemowej (HO-1, HO-2); ochrona przed ROS; udział w przekazywaniu $e^-$ ; aktywator NF- $\kappa$ B

[8,134]. Wzrost ekspresji HSP jest reakcją komórek zmniejszającą niebezpieczeństwo uszkodzenia podczas stresu lub ułatwiającą ich regenerację. W warunkach fizjologicznych czynnik opisany jako HSF1 (heat shock factor 1) występuje w postaci nieaktywnej jako monomer, związany przez kompleks białek cytoplazmatycznych HSP90 i HSP70, który uniemożliwia jego translokację do jądra komórkowego i wiązanie z DNA. Stres komórkowy indukuje wzrost zdenaturowanych białek, co prowadzi do odłączania HSF1 z kompleksu białek opiekuńczych. Monomery uwolnionego czynnika transkrypcyjnego ulegają fosforylacji, co umożliwia ich trimeryzację, a następnie w tej postaci są transportowane do jądra komórkowego. Proces aktywacji polega na przyłączeniu HSF1 do konserwatywnej sekwencji DNA, występującej w obszarze promotorów genów HSP, nazywanej elementem odpowiedzi na szok cieplny (heat shock element, HSE). Hiperfosforylacja HSF1 aktywuje jego wiązanie z DNA i indukuje wzrost transkrypcji genów HSP. Dotąd zidentyfikowano cztery czynniki u człowieka, tj. HSF1-4. Główną funkcję pełni HSF1, natomiast ostatni z wymienionych czynników – HSF4 bierze udział w hamowaniu ekspresji HSP. Wysoki poziom HSP może blokować aktywność czynnika HSF1 przez wiązanie się do jego monomerów lub trimerów [67,134].

W strukturze większości genów HSP nie występują introny, co zwiększa szybkość powstawania dojrzałych, funkcjonalnych transkryptów i w konsekwencji pozwala na szybszą reakcję na stres. W warunkach stresu zmniejsza się synteza wielu białek – z wyjątkiem HSP. Gdy czynniki patogenne działają efektywnie, to transkrypcji ulegają głównie geny HSP, ponieważ powstający transkrypt jest bardziej stabilny, a jego wykorzystanie jest promowane w translacji [67,74].

Przedstawiono wyniki doświadczeń wskazujące, że w komórkach HeLa indukcja cząsteczek receptora FAS może powodować wzrost aktywności czynnika HSF1. Zaobserwowano również, że komórki te mimo obecności pobudzonych receptorów śmierci są niewrażliwe na apoptozę. Natomiast nadekspresja aktywnego HSF1 uwalnia te komórki do apoptozy na szlaku zależnym od FAS. Inne białko modulujące szlak receptorowy apoptozy – DAXX również indukuje transaktywację HSF1 w warunkach stresu w komórkach ludzkich. Opublikowane niedawno wyniki badań zespołu Arya [8] wskazują, że HSF1 wydaje się funkcjonować jako ważny modulator procesów przeżycia i śmierci komórek. Ponadto, odpowiedź na stres może być indukowana także przez czynniki zapalne i przez fosfolipazę A2, które pośredniczą w wiązaniu HSF1 do DNA. Zaobserwowano, że poziom reaktywnych form tlenu (RFT) również prowadzi do aktywacji HSF1 [113]. Synteza HSP w warunkach prawidłowych zależy od ich poziomu w komórce. Konstytutywną ekspresję reguluje stan powinowactwa do substratu/ów i stężenie zdenaturowanych białek. Niski poziom niezwiązanych z substratem/ami HSP stanowi sygnał do indukcji ich syntezy.

Przedstawiono dane wskazujące, że zmiany w regulacji syntezy HSP są związane z procesem starzenia. Wraz z wiekiem spada poziom tych czynników i ich aktywność opiekuńcza, co przyczynia się do zmian fizjologicznych i morfologicznych – destabilizacji i uszkodzeń białek oraz struktur komórkowych, gromadzenia szkodliwych czynni-

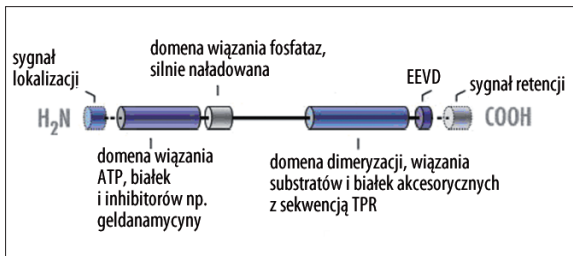
ków, wzrostu wrażliwości na stresory, co prowadzi do nasilenia starzenia komórek [134]. Białka HSP pośrednio i bezpośrednio przyczyniają się do starzenia się komórek. Przedstawiciele tej rodziny są modulatorami funkcji, aktywności i konformacji innych polipeptydów. Spadek poziomu HSP prowadzi do nieprawidłowości w transporcie, syntezie, naprawie i krążeniu wielu cząsteczek między błoną plazmatyczną i organellami, a także do zaburzeń oddziaływań białko–białko oraz reorganizacji cytoszkieletu (np. destabilizacja aktyny i tubuliny) [89,102,108]. Ponadto, udział HSP w replikacji DNA, transkrypcji genów, transdukcji sygnałów i procesach metabolicznych, sprawia, że zahamowanie ich biosyntezy prowadzi do gromadzenia efektów mutacji, niestabilności genetycznej, zaburzeń w cyklu komórkowym, różnicowaniu i nieprawidłowej homeostazy [134,135]. Spadek poziomu czynników opiekuńczych przyczynia się do zmian w ekspresji białek lub zmianą ich funkcji. Rozwój chorób autoimmunologicznych i neurodegeneracyjnych, takich jak np. choroba Parkinsona, Huntingtona czy Alzheimerera jest związany m.in. z zahamowaniem syntezy HSP, co powoduje wzrost poziomu uszkodzonych białek odpowiedzialnych za te schorzenia [21,26,31,77]. Szacuje się, że prawie połowa białek organizmu osób po 80. roku życia ulega oksydacyjnym uszkodzeniom, czego wynikiem jest starzenie się. Uszkodzone w wyniku utlenienia polipeptydy współzawodniczą z HSF w wiązaniu do HSP. U osób starszych obserwuje się zmniejszoną syntezę HSP, ale nie jest to wynik spadku aktywacji czynnika HSF, a głównie zahamowania jego wiązania do DNA. Czynniki opiekuńcze także ulegają uszkodzeniu i degradacji w procesie starzenia, a wzrost poziomu i gromadzenie utlenionych cząsteczek może skutkować tym, że HSP nie spełniają efektywnie swoich funkcji w stosunku do potrzeb starzejących się komórek [100,134].

## CHARAKTERYSTYKA I FUNKCJE WYBRANYCH PODRODZIN HSP

### HSP90

Jak dotąd najlepiej poznanymi przedstawicielami podrodziny HSP90 są HSP90 $\alpha$ , HSP90 $\beta$  i GRP94/96 [112]. W komórkach występuje kilka genów kodujących te białka, a ich ekspresja zachodzi zarówno w warunkach prawidłowych, jak i w warunkach stresu, co przemawia za tym, że są niezbędne do ich funkcjonowania. Homologia sekwencji aminokwasowej członków tej podrodziny w organizmach eukariotycznych osiąga prawie 50%. Obie izoformy HSP90  $\alpha$  i  $\beta$  kodowane przez różne geny – umiejscowione odpowiednio na chromosomach 14 i 6 – tworzą oligomeryczne kompleksy, reprezentujące ich aktywną (funkcjonalną) postać [109,136].

Wyniki badań wskazują, że HSP90 $\alpha$  ulega ekspresji po indukcji stresem, natomiast HSP90 $\beta$  – ekspresji konstytutywnej. Wyróżnia się także izoformę HSP90N, której ekspresja jest związana z transformacją nowotworową i różni się ona zarówno budową (krótsza domena N-końcowa), jak i właściwościami od pozostałych członków tej podrodziny. Niektórzy badacze zaliczają do HSP90 również umiejscowione w ER białko GRP94/96 czy mitochondrialną postać HSP75, opisywaną jako TRAP1 [103,112,148]. Dowiedziono, że wyizolowane z komórek nowotworowych cząsteczki HSP90N są około 100 razy bardziej wrażliwe



Ryc. 1. Budowa domenowa HSP90 (wg [136] zmodyfikowano)

na działanie inhibitorów (np. pochodnych geldanamycyny) w porównaniu z białkami tej podrodziny komórek prawidłowych [57]. Wykazano, że HSP90 $\alpha$  łatwiej ulega dimeryzacji, chociaż białko to może tworzyć zarówno homo-, jak i heterodimery czy oligomery [136]. Prawdopodobnie nadekspresja HSP90 $\alpha$  hamuje różnicowanie komórek nowotworowych, natomiast HSP90 $\beta$  wydaje się niezbędna we wczesnych etapach rozwoju embrionów. Stwierdzono, że geny kodujące obie izoformy HSP90 zawierają odrębne promotory i/lub różnią się składaniem ich pre-mRNA. Postać HSP90 $\beta$  bierze udział w prawidłowym funkcjonowaniu komórek w warunkach fizjologicznych, odpowiada za rozwój i dojrzewanie zarodków oraz stabilizację cytoskieletu. Ponadto, ekspresja tej postaci może być indukowana tylko długotrwałym stresem, co wiąże się z nabywaniem lekooporności i udziałem w nowotworzeniu. Natomiast ekspresję HSP90 $\alpha$  indukuje stres, a wzrost jej poziomu towarzyszy progresji nowotworowej, wiąże się z regulacją cyklu komórkowego oraz transdukcją sygnałów (zwłaszcza z udziałem czynników wzrostu i kinaz tyrozynowych). Nadekspresję białek podrodziny HSP90 opisano w przebiegu wielu typów nowotworów [80]. Zaobserwowano, że nadekspresja HSP90N przyczynia się w komórkach nowotworowych do wzrostu aktywności białek na szlaku sygnalizacyjnym Raf/Ras [113]. Podwyższony poziom HSP90 $\alpha$  koreluje z szybką odpowiedzią na stresor, natomiast HSP90 $\beta$  z adaptacją do długo trwających warunków niefizjologicznych [136].

### Struktura domenowa i właściwości HSP90

Na ryc. 1 przedstawiono budowę domenową przedstawiciela tej podrodziny. W izoformach HSP90 wyróżnia się pięć wysoce zachowawczych regionów, z których trzy znajdują się w N-końcowej domenie (aa 38-59, 106-114 i 130-145 w HSP90 $\alpha$  człowieka), a dwie – w domenie środkowej (aa 360-370 i 387-401) [136]. Z kolei w domenie C-końcowej znajduje się około 190-aminokwasowy region odpowiadający za dimeryzację cząsteczek, wiązanie nukleotydów, białek akcesorycznych i substratów z sekwencją TPR (tetra-tricopeptide repeat). Ponadto, C-końcowy region może zawierać motyw sekwencyjny EEVD – wykorzystywany w oddziaływaniach z białkami współopieczniczymi oraz tzw. sygnał retencji [27].

Monomery HSP90 wiążąc się formują funkcjonalne dimery, wykorzystują do tego zarówno C- jak i N-końcowe regiony cząsteczki. Wzajemne oddziaływanie wymienionych regionów jest niezbędne zarówno do przebiegu dimeryzacji, jak i tzw. cyklu ATP-azowego. Wyniki doświadczeń wykazały, że za dimeryzację końców N cząsteczek odpowiadają ich 24-aminokwasowe segmenty dystalne. Reakcja

ta wymaga wcześniejszej dimeryzacji końców C. Miejsce wiązania ATP znajduje się w N-końcowej domenie białek, jednak w związaniu tych cząsteczek uczestniczą wszystkie trzy domeny. Związanie ATP powoduje zmiany konformacyjne białek, które pozwalają na zbliżenie i dimeryzację końców N. Proces ten jest istotny dla stymulacji reakcji hydrolizy, gdyż to dimer końców N bierze udział w hydrolizie ATP. Potwierdzeniem tego oddziaływania są wyniki badań, które wykazały, że produkty zmutowanych genów, ze skróconą N-końcową domeną cechuje słabsza aktywność ATP-azowa [116,119,120]. Wnikliwe doświadczenia ujawniły, że brak 8 pierwszych aminokwasów w N-końcowych domenach nie zakłóca ich dimeryzacji, co sugeruje, że wymieniona sekwencja nie jest nieodzowna do stymulacji tego procesu. W tzw. „dzikim typie” HSP90 stwierdzono hamowanie cyklu przyłączania ATP przez wymienioną sekwencję, a także, że utrata 8 pierwszych N-końcowych aminokwasów powoduje wzrost aktywności tego białka. Ponadto zaobserwowano, że sekwencja 16 aminokwasów końca N odpowiada za dimeryzację. Katalityczna aktywność HSP90 zależy od wewnątrzcząsteczkowej interakcji między N-końcowymi aminokwasami. Natomiast funkcja opiekuńcza jest wynikiem oddziaływania zarówno regionów dimerycznych końca N jak i C, a także segmentu środkowego [105,120]. Wiązanie inhibitora tego białka – geldanamycyny odbywa się przez motyw usytuowany w domenie N-końcowej cząsteczki, natomiast przyłączanie białek akcesorycznych (co-chaperones) zawierających tzw. motyw TPR, np. HOP (HSC70/HSP90-organizing protein) przez domenę asocjacji końca C łańcucha [99,114].

Niedawno wykazano, że białko HSP90 może przybierać trzy odmienne konformacje związane z oddziaływaniem między N-końcowymi odcinkami i domeną środkową tego polipeptydu. Struktura otwarta białka HSP90 pozostaje wolna od ATP, a kolejne zmiany konformacyjne zachodzą dzięki przyłączaniu i uwalnianiu białek współopieczniczych są typowe dla struktury zamkniętej – wiążącej ATP. Ostateczna, aktywna postać HSP90 powstaje w wyniku hydrolizy ATP do ADP. Taka postać białka jest zdolna do wiązania substratu. Natomiast oddziaływanie między końcem C a środkową domeną cząsteczki decyduje o jej otwartej konformacji, która nie wiąże ATP [120].

### Funkcje HSP90

W warunkach fizjologicznych cytosolowe białko HSP90 oddziałuje z wieloma cząsteczkami sygnałowymi, dzięki czemu kontroluje i reguluje szlaki śmierci komórkowej. Polipeptyd ten może się wiązać m.in. z czynnikami transkrypcyjnymi aktywowanymi ligandem – receptory steroidowe (np. androgenów) i niesteroidowe (np. ErbB2), czynnikami transkrypcyjnymi niezależnymi od ligandów (np. MyoD, p53), kinazami tyrozynowymi (np. Src), kinazami serynowo-treoninowymi (np. Raf-1) oraz kinazami cyklu komórkowego (np. Wee1). Wykazano również zdolność HSP90 do asocjacji z aktywną, tubuliną, kalmoduliną i podjednostkami białek G [84,109,128].

### Oddziaływania z receptorami steroidowymi i niesteroidowymi

Główna rola opiekuńcza HSP90 polega na tym, że odpowiadają za zmiany konformacyjne i dojrzewanie recepto-

rów steroidowych. Przedstawiciele tej podrodziny wiążące się z wolnymi receptorami wykazują znaczny wpływ na asocjację receptora steroidowego z odpowiednim ligandem bądź na fosforylację receptora o aktywności kinazy tyrozynowej. Stwierdzono, że ich obecność stabilizuje receptory, zapewnia odpowiednią konformację i w zależności od typu receptora utrzymuje go w stanie gotowości do wiązania ligandów (hormonów steroidowych lub innych substratów) albo ułatwia ich fosforylację [107,113,128]. Wyniki badań nad oddziaływaniami w kompleksach utworzonych przez hormony steroidowe, ich receptory i HSP90 sugerują, że za związanie hormonu odpowiada HSP90, które „współpracuje” z innymi białkami, m.in. HSP70, p23, HOP, HIP (HSP70/HSC70-interacting protein), kinazą CDC37 (p50) oraz immunofilinami, np. FKBP51 i 52 (FK506 binding protein 51 and 52) oraz cyklofiliną CyP-40 [122,123,125]. Okazało się, że jeśli nie utworzy się ten wieloskładnikowy kompleks, receptor nie ulega aktywacji. Następnie oddziaływanie ligand-receptor odsłania obszar receptora wiążący DNA, który wcześniej „przysłonięty” był przez HSP90, powodując przemieszczenie receptora steroidowego do jądra komórkowego, przyczyniając się do aktywacji transkrypcji określonych genów [107]. Doniesiono, że fosfataza białkowa PP5 uczestniczy w formowaniu kompleksów HSP90-receptory steroidowe. Prawdopodobnie enzym ten wiąże się z białkiem opiekuńczym przez motyw TPR, a powstały kompleks umożliwia oddziaływanie HSP90 z innymi cząsteczkami m.in. z glikozylfosfatydyloinozytolem w błonie komórkowej. Ponadto PP5 hamuje aktywność transkrypcyjną receptorów przez regulację ich fosforylacji/defosforylacji [105,107].

Polipeptydy tej podrodziny, podobnie jak HSP70 i HSP60, wiążą ATP i ulegają konformacyjnej zmianie, a ich aktywność ATP-azowa pozwala na ponowne prawidłowe fałdowanie zdenaturowanych białek [76]. Cząsteczki HSP90 uczestniczą w formowaniu kompleksów opiekuńczych, a proces ten uzależniony jest od cyklu wiązania ATP/ADP. Stąd wiele leków i czynników o aktywności farmakologicznej działa jako związki mimetyczne wymienionych nukleotydów, blokując w ten sposób aktywność ATP-azową i opiekuńczą HSP90 [112]. Hamowanie aktywności polipeptydu opiekuńczego powoduje spadek lekooporności oraz degradację substratów w proteasomach z udziałem białka CHIP (carboxyl terminus of Hsp70-interacting protein) o aktywności ligazy ubikwitylowej E3, które oddziałuje zarówno z HSP70, jak i HSP90 [12,32,45].

Członkowie tej podrodziny wykazują zdolność wiązania receptorów niesteroidowych, jak np. kinazy tyrozynowej ErbB2 (erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2, neuro/glioblastoma derived oncogene homolog avian) [62]. Uczestniczą one w zmianach konformacyjnych, modyfikacjach potranslacyjnych, a także odpowiadają za stabilizację, aktywność i lokalizację komórkową głównych białek onkogennych, takich jak kinazy tyrozynowe ErbB2, C-RAF i BCR-ABL, kinaza CDK4 oraz PKB/Akt, zmutowanej postaci p53, czynnika transkrypcyjnego HIF1 $\alpha$  (hypoxia inducible factor 1  $\alpha$ ), surwiwiny, receptora błonowego MET/HGFR (mesenchymal-epithelial transition factor; hepatocyte growth factor receptor) i podjednostki telomerazy TERT. Modulacja przez HSP90 wymienionych czynników oraz szlaków sygnalizacyjnych i procesów biologicznych może prowadzić do zahamowania rozwoju złośliwego fenotypu komórek [57,112].

## CYKL ATP-AZOWY

Cykl ATP-azowy zapewnia energię zmianom konformacyjnym białek oraz stymuluje aktywność receptorów steroidowych i niesteroidowych [27,48,114,120]. Związanie ATP powoduje utworzenie pierścienia przez oddziaływanie N-końcowych regionów cząsteczki z pozostałymi domenami, tj. z domeną środkową i dimerycznym segmentem C-końcowym. Powstała w ten sposób struktura „wieczka” zamyka ATP wewnątrz pierścienia N-końcowych domen, co umożliwia ich dimeryzację i hydrolizę ATP. W nieobecności hormonu HSP90 utrzymuje nieaktywne receptory steroidowe w stanie gotowości, co zapewnia skuteczną odpowiedź na pojawiający się ligand. Ostatnio doniesiono, że stosowanie inhibitorów/aktywatorów czynników transkrypcyjnych o naturze receptorów steroidowych, umożliwia regulację ich aktywności [107,122,142]. Aktywatorami/inhibitorami są czynniki transdukcji sygnału, które wywołują zmiany prowadzące do aktywacji receptorów. Zaobserwowano, że fosforylacja receptorów steroidowych przez kinazy może w pewnych warunkach prowadzić do ich indukcji, nawet w przypadku braku ligandów (hormonów), a dzięki oddziaływowaniu z HSP90 mogą wiązać się do promotorów genów [114,132].

Jak dotąd sekwencja rozpoznająca i wiążąca substraty nie została w pełni określona. Wiadomo natomiast, że HSP90 nie wchodzi w interakcje z nowo syntetyzowanymi białkami [76,128]. Cząsteczki HSP90 mogą hamować lub indukować aktywność substratów. Te ostatnie wykazują wspólną cechę – stanowią krótko żyjące białka, podatne na zmiany konformacyjne, od których zależą ich właściwości oraz funkcje. Uważa się, że wiązanie substratów z HSP90 zapobiega ich degradacji i zmianie konformacji. W powstałym kompleksie stają się one mniej wrażliwe na działanie enzymów proteolitycznych. Natomiast w przypadku receptorów hormonów zmniejsza się ich zdolność do wiązania ligandów [48,115].

Mechanizm interakcji HSP90 z innymi białkami – „klientami” jest wciąż słabo poznany. Chociaż związanie HSP90 z substratem jest procesem ATP-niezależnym, to jednak jego uwalnianie wymaga energii pochodzącej z hydrolizy ATP. Cykl przyłączania i uwalniania substratu jest regulowany przez oddziaływanie HSP90 z innymi białkami współopiekuńczymi (co-chaperones), takimi jak HSP70, HOP czy p23 [111,130,160]. **Polipeptyd HOP** oddziałuje z C-końcową domeną HSP90 poprzez jego motyw TPR, co prowadzi do zmiany konformacji HSP i uniemożliwia dimeryzację N-końców. Dopiero oddysocjowanie z kompleksu białek HOP i HSP70 umożliwia wiązanie ATP i przejściową dimeryzację N-końcowych regionów HSP90, podczas gdy C-końcowe domeny pozostają nadal w postaci dimeru. Ponadto uważa się, że czynnik HOP wykazuje zdolność do wypierania inhibitorów HSP90 np. pochodnych geldanamycyny z kompleksów z tym białkiem opiekuńczym [63,96,99]. Opublikowane dane wskazują, że białko HOP wiąże się zarówno z C, jak i środkową domeną HSP90, ale nie asocjuje z jego N-końcowymi domenami. Wyniki badań sugerują, że HOP przyłącza się również do białka opiekuńczego niezwiązanego z ATP (tzw. struktura otwarta), a kompleks ulega rozluźnieniu w wyniku zmian konformacyjnych indukowanych po związaniu z ATP [113,120]. Ponadto wykazano, że HOP funkcjonuje jako dimer i wią-

że się do obydwu monomerów HSP90, tworząc tzw. kłamerę. To umożliwia oddziaływanie z sąsiadującą środkową domeną HSP90, zwiększając jego powinowactwo do hydrofobowych substratów [114,115]. Interakcja HOP z białkami HSP70 i HSP90 ułatwia przeniesienie substratu, np. receptora steroidowego z HSP70 na HSP90. Odbywa się to dzięki interakcji domen TPR1 i TPR2 białka współopiekuńczego z motywami EEVD końców C odpowiednio HSP70 i HSP90, a także wielu innych miejsc końca C cząsteczki tego ostatniego [105,130,132]. Wiązanie ATP z kompleksem HOP-HSP90 powoduje jego dysocjację i umożliwia interakcję z innymi czynnikami, np. p23, CyP40 czy FKBP52, które są nieodzowne do hydrolizy ATP i zmian konformacyjnych receptorów [122,123,160]. W przypadku receptora steroidowego prowadzi to do silniejszego powinowactwa do hormonu, a receptorom o aktywności kinaz tyrozynowych umożliwia fosforylację i/lub wiązanie swoistych ligandów [27,96]. Wyniki ostatnich badań wskazują, że czynnik HOP nie wpływa bezpośrednio na wiązanie ATP do HSP90, ale może oddziaływać pośrednio na to wiązanie [99,119,120].

Związanie ATP przez HSP90 inicjuje powstanie funkcjonalnego dimeru HSP90 i umożliwia przyłączenie np. p23. Analizy oddziaływań między składnikami białkowych kompleksów sugerują, że interakcja HSP90 z p23 umożliwia dimeryzację końców N cząsteczek pierwszego polipeptydu oraz hydrolizę ATP. Czynniki p23 ułatwia wiązanie  $\gamma$ -fosfatazy do centralnej domeny HSP90, w przeciwieństwie do białka HOP [99,114]. Hydroliza ATP wywołuje otwarcie molekularnego kanału utworzonego przez N-końcowe odcinki dimeru HSP90 i umożliwia uwolnienie substratu [57,115,159]. Uznaje się, że obecność p23 jest niezbędna do stabilizacji kompleksów opiekuńczych i dojrzewania substratu/ów, umożliwia jego fosforylację przez kinazę AKT i/lub wiązanie swoistego liganda (receptory steroidowe). Brak tego czynnika powoduje zanik powinowactwa do substratu/ów, rozpad kompleksów, a nawet degradację substratów. Dowiedziono, że p23 oddziałuje z kompleksem opiekuńczym wyłącznie po wcześniejszym związaniu ATP do HSP90 i nigdy nie blokuje całkowicie jego aktywności ATP-azowej [27,112,130]. Ponadto, uznaje się, że p23 stymuluje HSP90 do interakcji z p53, a także odpowiada za swoistość wiązania substratu. Z kolei istnieją dowody, że HSP90 wspomaga wiązanie p53 oraz innych białek (np. telomerazy) do DNA, a także uczestniczy w prawidłowej reorganizacji chromatyny podczas aktywacji transkrypcji [48,120,125]. Prawdopodobnie HSP90 może także uczestniczyć w rozbijaniu kompleksów transkrypcyjnych, promować dysocjację niektórych receptorów steroidowych związanych z chromatyną i uczestniczyć w ich eksporcie poza jądra komórkowe do cytoplazmy [142]. Główną rolę w tych procesach odgrywa p23, który reguluje cykl wiązania tych kompleksów do DNA i aktywność transkrypcyjną receptorów jądrowych. Wiadomo, że zarówno HSP90, jak i p23 są nieodzowne do wiązania receptorów steroidowych z promotorami i aktywowania określonych genów, co jednak nie tylko stabilizuje wiązanie receptor-ligand, ale także moduluje dynamikę wiązania/odłączania aktywnego receptora jądrowego z kompleksu z DNA [48,57,114]. Według Picarda i wsp. [107] czynnik współopiekuńczy p23 jest niezbędny do przeżycia komórek. Inhibitory HSP90 – pochodne geldanamycyny współzawodniczą z ATP o miejsce wiązania, uniemożliwiają

oddziaływanie z p23, co w konsekwencji zapobiega uwalnianiu substratu [27,48]. Wyniki doświadczeń wskazują, że w komórkach człowieka HOP nie hamuje bezpośrednio aktywności ATP-azowej HSP90, natomiast blokuje dimeryzację jego N-końcowych regionów; odwrotnie oddziałuje p23 [114,130,159]. Doniesiono, że białko CDC37 (p50) hamuje aktywność ATP-azową HSP90 [57,125]. Dowiedziono, że ATP asocjuje ze środkową domeną białka opiekuńczego, tworząc otwartą konformację, co uniemożliwia ATP-zależną dimeryzację końców N cząsteczki. Wyniki te wskazują na istotną funkcję domeny środkowej HSP90 w przebiegu i regulacji cyklu ATP-azowego. Domena ta może przybierać konformację otwartą/nieaktywną bądź zamkniętą/aktywną, która indukuje dimeryzację końców N cząsteczki i odsłonięcie jej aktywnych miejsc [130]. Wyniki doświadczeń ujawniły, że izoforma HSP90 $\alpha$  jest mniej aktywna niż  $\beta$ , stąd cząsteczki ATP związane z izoformą  $\beta$  łatwiej ulegają hydrolizie. Mniejsza aktywność ATP-azowa HSP90 $\beta$  wynika z jego mniejszej zdolności do tworzenia dimerów, uwarunkowanej hydrolizą ATP [119,120]. Stwierdzono, że białko CDC37 jest niezbędne do wiązania substratów przez HSP90. Występuje ono w postaci dimerycznej, ale jako monomer tworzy kompleks z HSP90, w którym obydwa wymienione białka oddziałują z domeną katalityczną kinaz (substratów). Prawdopodobnie domena kinazowa zawiera kilka miejsc wiązania, które są położone blisko siebie, a nawet mogą być wspólne dla białek tworzących kompleks. Interakcje CDC37 z kinazami (np. CDK2, CDK4) możliwe są dzięki fosforylacji jego N-końcowej domeny [57,125]. Zaobserwowano, że może dochodzić do hamowania aktywności kinaz lub nawet mogą być kierowane na drogę degradacji w obecności inhibitorów HSP90. Może to wynikać z wyższego powinowactwa HSP90 do tych leków i ATP niż do substratów. Należy także podkreślić, że pochodne geldanamycyny, np. 17-AAG (17-allylo-17-demetoksygeldanamycyna) skutecznie działają w komórkach nowotworowych niż w prawidłowych [80]. Ekspresja białek onkogennych, takich jak ErbB2 – receptor o aktywności kinazy tyrozynowej – wpływa na wzrost poziomu kompleksów HSP90-substrat, co z kolei prowadzi do zwiększonej ekspresji opisywanych receptorów. Zastosowanie inhibitorów HSP90 wywołuje szybką degradację niektórych kinaz, z powodu ich odmiennej wrażliwości na leki i powinowactwo do białka opiekuńczego. Okazało się, że ErbB2 silniej oddziałuje z HSP90 niż ErbB1 i przez to kompleks ten łatwiej ulega rozpadowi. Kinazy, które oddziałują z HSP90 można podzielić na dwie grupy:

- 1) niestabilne, w nieaktywnej postaci – np. CDK4, która oddziałuje z kompleksem HSP90/CDC37 jeszcze przed związaniem cykliny D, co powoduje stabilizację i aktywację enzymu oraz wzrost powinowactwa do cykliny i
- 2) kinazy wymagające wiązania HSP90 do fałdowania zsyntetyzowanego łańcucha oraz do dojrzewania, np. ErbB2 wiąże HSP90, co pomaga w przyłączaniu ATP do kinazy. W przypadku kinaz wiążących ligand lub ATP brak tych dwóch czynników powoduje niestabilność enzymów. Ponadto, niedobór HSP90 i/lub obecność jego inhibitorów wywołuje degradację kinaz. Zaobserwowano także, że fosforylacja kinaz moduluje ich aktywność i przyczynia się do ich stabilizacji. Sytuację taką opisało w przypadku kinaz PKB/Akt i ZAP-70, wrażliwych na 17-AAG (pochodną geldanamycyny) tylko w pewnych typach komórek. Skuteczność inhibitorów zależy od tego czy kinaza wymaga wiązania białka opiekuń-



czego do stabilizacji i aktywacji [27,62,96]. Fosforylacja substratów HSP90 może modulować ich aktywność i selektywność wiązania do białek opiekuńczych. Poczynione obserwacje mogą się okazać istotne w przyszłości w hamowaniu wzrostu i progresji nowotworów. Ponadto różne funkcje HSP90, takie jak naprawa białek bądź kierowanie ich na drogę degradacji – mogą wynikać z odmiennych konformacji polipeptydu opiekuńczego oraz czynników modulujących ten proces [80].

Ważnym stymulatorem cyklu ATP-azowego jest również współopiekuńcze **białko AHA1** (activator of HSP90 ATPase), które może uczestniczyć w dojrzewaniu, stabilizacji i funkcjonowaniu białek onkogennych [57,101]. Wspomniany inhibitor HSP90 – 17-AAG, wywołuje degradację tych substratów na szlaku ubikwitynozależnym w proteasomach. Nadekspresja AHA1 nie zmienia wrażliwości komórek nowotworowych na 17-AAG, ale wzmacnia aktywność C-RAF i indukuje wzrost poziomu fosforylacji MEK1/2 i ERK1/2, bez zmiany całkowitej puli tych kinaz. Zastosowanie strategii siRNA lub inhibitorów kompleksów AHA1-HSP90, w celu zahamowania ekspresji AHA1, powoduje spadek aktywności C-RAF oraz stopnia fosforylacji ERK1/2 i MEK1/2. Ponadto uwrażliwia komórki nowotworowe na działanie pochodnych geldanamycyny, przyczyniając się do wzrostu ich apoptozy.

### Stabilizacja głównych czynników transdukcji sygnałów

Białka HSP90 stabilizują główne biomolekuły uczestniczące w transdukcji sygnałów związane z nowotworzeniem – produkty onkogenów m.in.: RAF, CDK4 i ErbB2. Częsteczki te są utrzymywane w gotowości do aktywacji przez białka opiekuńcze, co w komórkach nowotworowych ułatwia progresję i rozwój złośliwego fenotypu [65,69,85]. Ponadto, nadekspresja AHA1 powoduje zwiększoną fosforylację kinazy PKB/Akt, bez wpływu na poziom jej ekspresji oraz wzrost aktywności receptorów glukokortykoidowych [84,112,113].

W opinii badaczy polipeptydy tej podrodziny mogą stanowić ważny cel dla leków przeciwnowotworowych, gdyż ich zahamowanie powoduje zmniejszenie poziomu i aktywności czynników uczestniczących w nowotworzeniu. Inhibitory HSP90 blokują ich N-końcowe regiony, uniemożliwiając hydrolizę ATP, co przyczynia się do degradacji onkogennych białek z udziałem ubikwityny [80,113]. Niezwykle ważna jest obserwacja wskazująca, że pochodne geldanamycyny cechuje zdolność zarówno do hamowania cyklu komórkowego, jak i indukcji apoptozy. Powszechnie stwierdza się, że antyapoptotyczne HSP90 przyczynia się do rozwoju nowotworów. Prawdopodobnie czynnik HSF1 stymuluje indukcję biosyntezy i wzrost aktywności białka AHA1, które wiążąc się z HSP90 powoduje zwiększoną proliferację komórek nowotworowych. Zaobserwowano, że nadekspresja AHA1 nie zmienia wrażliwości komórek nowotworowych traktowanych 17-AAG, natomiast spadek ekspresji tego białka powoduje znaczny wzrost wrażliwości, co wywołuje indukcję apoptozy. Wykazano, że AHA1 oddziałuje ze środkową domeną HSP90, a przez interakcję z jego N-końcowymi regionami umożliwia wiązanie ATP, co wzmacnia aktywność ATP-azową białka opiekuńczego [57,101,105].

Kolejne białko współopiekuńcze z rodziny immunofilin – **CyP40** również bierze udział w tworzeniu „kompleksów opiekuńczych”, których rola polega prawdopodobnie na indukcji aktywności ATP-azowej HSP90. Zaobserwowano, że CyP40 wiąże się z C-końcową domeną białka opiekuńczego [99]. Komórki, w których odnotowano niedobór CyP40 cechuje nadwrażliwość na pochodne geldanamycyny, co potwierdza sugestię, że poziom białek współopiekuńczych warunkuje wrażliwość komórek na inhibitory HSP90, dzięki ich zdolności do modulowania aktywności ATP-azowej [57]. Ponadto CyP40 oraz inne immunofiliny, jak np.: FKBP52 i FKBP51 stymulują receptory steroidowe i odpowiadają za wiązanie przez nie swoistego liganda [122,123,159].

Badania nad inhibitorami HSP90 wskazują, że pochodne geldanamycyny konkurują o miejsca wiązania, zarówno z postacią  $\alpha$  jak i  $\beta$ , tego białka opiekuńczego z innym partnerem – SGT (small glutamine rich TPR-containing protein) w komórkach HeLa, co wywołuje rozpad kompleksu HSP90-SGT i translokację tego ostatniego białka z cytoplazmy do jądra komórkowego. W strukturze białka SGT występują trzy domeny TPR i bogaty w glutaminę C-końcowy region, który umożliwia oddziaływanie z hydrofobowym segmentem innych cząsteczek. Wykazano także, że w jądrze komórkowym białko SGT funkcjonuje jako czynnik proapoptotyczny i reguluje ekspresję genów związanych z przebiegiem cyklu komórkowego. Natomiast postać SGT występująca w cytoplazmie, poza HSP90, może również oddziaływać z HSP70/HSC70 i regulować ich funkcje opiekuńcze. Akceptuje się pogląd, że funkcje białek SGT zależą od ich umiejscowienia i czynników, z którymi asocjują [162].

Aktywność HSP90 jest związana zarówno z procesami fizjologicznymi, jak i patologicznymi. Białka te oddziałują z regulatorami szlaków metabolicznych, transdukcji sygnałów oraz cyklu komórkowego odpowiadają za utrzymanie prawidłowej homeostazy. Najnowsze badania wskazują, że polipeptydy HSP90 uczestniczą także w procesach związanych z metabolizmem DNA i RNA, takich jak replikacja czy transkrypcja oraz stabilizację transkryptów i telomerów. Sugeruje się, że białko HSP90 promuje wiązanie telomerazy do DNA, w podobny sposób, jak receptory hormonów [40,48,113].

### Inne funkcje HSP90

HSP90 funkcjonuje jako białko opiekuńcze kinazy ZAP-70, której wysoka ekspresja jest charakterystyczna w komórkach linii B pacjentów z przewlekłą białaczką limfocytową. Zahamowanie aktywności HSP90 prowadzi do degradacji ZAP-70 i śmierci komórek białaczkowych [76].

Białko HSP90 $\beta$  stabilizuje wraz z HSC70 składniki nukleo- i cytoszkieletu, oddziałuje z mikrotubulami oraz filamentami pośrednimi. Odpowiadają za ochronę aktywny przed degradacją [109,119].

Ocenia się, że ponad 100 substratów wiąże się z HSP90, a wśród nich są kinazy, receptory steroidowe, białka G czy telomeraza [112]. Wiele składników jest wymaganych do aktywności opiekuńczych HSP90, które są swoiste dla określonego substratu.

Podkreśla się, że białka GRP94/96 wraz z HSP70 są umiejscowione m.in. w błonie plazmatycznej komórek; bio-

Tabela 2. Charakterystyka białek podrodziny HSP70

Białka	Alternatywne nazwy/symbole	Homologia z HSP70-1a (%)	Gen/Lokalizacja na chromosomie	Lokalizacja komórkowa	Synteza indukowana stresem
HSP70-1a	HSP70, HSP72, HSP70-1	100	HSPA1A / 6p21.3	cytosol, jądro, lizosomy	+
HSP70-1b	HSP70, HSP72, HSP70-1	99	HSPA1B / 6p21.3	cytosol, jądro, lizosomy	+
HSP70-1t	HSP70-hom	91	HSPA1L / 6p21.3	cytosol, jądro	-
HSP70-2	HSP70-3, HSPA2	84	HSPA2 / 14q24.1	cytosol, jądro	-
HSP70-5	Bip, Grp78	64	HSPA5 / 9q33-q34.1	ER	-
HSP70-6	HSP70B'	85	HSPA6 / 1cen-qter	cytosol, jądro	+
HSC70	HSP70-8, HSP73	86	HSPA28 / 11q23.3-q25	cytosol, jądro	-
HSP70-9	Grp75, mtHSP75, Mortalina	52	HSPA 9 / 5q31.1	mitochondria	-

Opracowano wg [38].

rą udział w transporcie cząsteczek, transdukcji sygnałów zewnątrzkomórkowych oraz pełnią funkcje immunogene [41,76,80].

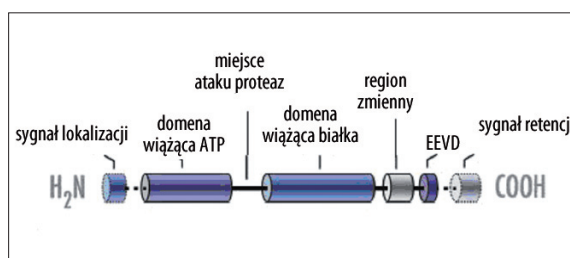
## HSP70

Do podrodziny tej zalicza się najbardziej konserwatywne i najlepiej scharakteryzowane białka HSP, które w komórkach ludzkich stanowią produkty 17 genów rozmieszczonych na różnych chromosomach [23]. Jak dotąd szerzej poznano 8 przedstawicieli tej podrodziny (639-679 aa), które charakteryzują się największą stabilnością ewolucyjną i wysokim powinowactwem do ATP, natomiast różnią się między sobą odmiennym poziomem ekspresji i komórkową lokalizacją (tabela 2).

W siateczce śródplazmatycznej i mitochondriach występują HSP70 charakterystyczne dla tych struktur, odpowiednio HSP70-5/Bip/GRP78 i HSP70-9/mtHsp70/GRP75/mortalina, podczas gdy innych przedstawicieli tej podrodziny odnajduje się głównie w cytosolu i w jądrach komórkowych. Białka GRP78 wiążą łańcuchy ciężkie immunoglobulin w ER komórek plazmatycznych i limfocytów B, co zapobiega przedwczesnemu ich łączeniu się [38,76].

### STRUKTURA DOMENOWA

Przedstawiciele podrodziny HSP70 wykazują wysoce konserwatywną strukturę pierwszorzędową. W końcu N cząsteczki tych białek znajduje się domena wiążąca nukleotydy ADP/ATP (nucleotide binding domain/ATPase binding domain – NBD/ABD), z którą sąsiaduje środkowa domena, zawierająca miejsce wrażliwe na proteazy. W końcu C łańcucha członków podrodziny HSP70 występuje domena PBD/SBD (peptide binding domain/substrate binding domain), bogata w Gly/Pro, odpowiadająca za wiązania substratów [76,143]. W tym regionie występuje sekwencja EEVD – motyw wiązania białek współpociękujących m.in. BAG-1 (BAG family molecular chaperone regulator-1), HOP czy HSP90 i HSP40 (ryc.2).



Ryc. 2. Budowa domenowa HSP70 (wg [38,51] zmodyfikowano)

Polipeptydy HSP, które występują w określonych przedziałach komórkowych (np. mitochondria, ER, jądro komórkowe) cechuje sygnał lokalizacji w końcu N i/lub sygnał zatrzymania (retencji) w tych organellach w końcu C cząsteczki (np. HSP70-5) [38]. Stwierdzono również, że w końcu N łańcucha HSC70 znajduje się domena oddziaływania z kalmoduliną [109].

### Białka podrodziny HSP70 i ich komórkowe rozmieszczenie

Synteza **HSP70-1a i 1b** ulega indukcji w warunkach stresu, a geny kodujące te białka są umiejscowione na krótszym ramieniu chromosomu 6, w obszarze genów głównego kompleksu zgodności tkankowej klasy I i II (MHC). W warunkach fizjologicznych HSP70-1 ulega również ekspresji w różnych komórkach. Zaobserwowano wzrost poziomu tego białka na pograniczu faz G1 i S cyklu komórkowego, co wynika z jego cytoochronnych właściwości warunkujących przeżycie komórek. Podczas szoku cieplnego HSP70-1 chroni komórki mitotyczne przed nieprawidłowymi podziałami spowodowanymi uszkodzeniem centrosomu. Ponadto, polipeptydy te charakteryzuje aktywność antyapoptotyczna, co zwiększa przeżycie komórek (w tym nowotworowych) narażonych na działanie stresorów. Stąd sugeruje się, że białka te mogą uczestniczyć w rozwoju nowotworów różnych tkanek. [88]. Wyniki licznych badań potwierdzają korelację wzrostu ich ekspresji ze zwiększoną liczbą podziałów komórkowych, zmniejsz-

szonym tempem lub brakiem różnicowania, przerzutami do węzłów chłonnych i lekoopornością. Bezintronowy gen HSPA1 umieszczony na chromosomie 6 koduje słabo dotąd poznane **HSP70-1t**, które występuje zarówno w cytosolu, jak i w jądrze komórkowym. Białko **HSP70-2** zapobiega nagromadzeniu i agregacji nieprawidłowo zwiniętych białek i/lub produktów zmutowanych genów, odpowiedzialnych za rozwój chorób neurodegeneracyjnych, np. choroba Huntingtona, Alzheimerera czy Parkinsona, poprzez ich wiązanie i kierowanie na szlak degradacji w proteasomach [26,82,128]. Jego wysoki poziom jest charakterystyczny dla tkanki nerwowej [38].

Gen HSPA5 usytuowany na chromosomie 9 koduje **HSP70-5** (opisywane także Bip albo Grp78), które ułatwia transport nowo zsyntetyzowanych polipeptydów do światła ER i innych błonowych przedziałów komórkowych. W końcu N łańcucha HSP70-5 znajduje się sygnał lokalizacji, który kieruje cząsteczkę do ER, natomiast koniec C zawiera sekwencję „KDEL” – sygnał zatrzymania w ER, charakterystyczny dla rozpuszczalnych białek związanych z tym organellum. Wysoka ekspresja HSP70-5 cechuje komórki wydzielnicze tarczycy i wysp trzustkowych [38].

Trzy białka, tj. HSP70-1a, HSP70-1b i **HSP70-6** są indukowane stresem i chronią komórki przed jego skutkami, natomiast HSC70, HSP701t i HSP70-2 są nieodzowne do pełnienia podstawowych funkcji opiekuńczych. Indywidualne cechy i swoista tkankowo ekspresja sugerują, że pełnią one odmiennie funkcje biologiczne.

W warunkach fizjologicznych cząsteczki **HSC70/HSP70-8** (heat shock cognate 70), odpowiadają za dojrzewanie zsyntetyzowanych *de novo* polipeptydów, ich transport przez błony, ale także pośrednio biorą udział w autofagocytocie, demontażu białek opłaszczonych klątryną. Natomiast w warunkach stresu zapobiegają agregacji i denaturacji białek komórkowych [25]. HSC70 uczestniczy m.in. w potranskrypcyjnej regulacji aktywności proapoptotycznego białka rodziny Bcl-2 – Bim, w której pośredniczą również cytokiny. Białko opiekuńcze wiąże się z sekwencją bogatą w AU na końcu 3' nici w nietranskrybowanym mRNA kodującym Bim, stabilizując jego cząsteczkę [38]. Aktywność opiekuńcza HSC70 nie jest więc ograniczona do oddziaływań białko-białko, obejmuje także interakcje z kwasami nukleinowymi.

Kolejnym przedstawicielem tej podrodziny jest powszechnie występująca **mortalina/HSP70-9/mtHSP70/Grp75/PBP74/p66mot** (około 74 kDa, 679 aa), której obecność zidentyfikowano w różnych miejscach komórek ze znaczną przewagą w mitochondriach [153]. W 1993 roku sklonowano cDNA kodujący białko PBP72/74 w komórkach człowieka i myszy, które po wnikliwych analizach zostało zakwalifikowane do białek HSP70 [152]. Wyniki badań *in vivo* i *in vitro* potwierdziły również jego zdolność do interakcji z HSP60. Zaobserwowano, że spadek poziomu zarówno HSP60, jak i mortaliny powoduje zatrzymanie proliferacji komórek nowotworowych. Natomiast wzrost ekspresji genu kodującego mtHSP70, ale nie HSP60, wydłuża życie prawidłowych fibroblastów. Wśród istotnych funkcji pełnionych przez mortalinę wymienia się zdolność do zwijania i rozwijania białek zarówno w mitochondriach, jak i poza nimi, udział w transporcie białek z cytosolu do mitochondriów i ich translokacji przez błony [154]. Uważa się rów-

nież, że ułatwia ona biogenezę mitochondriów i utrzymanie integralności błon tych organelli. Wśród licznych aktywności mortaliny wymienia się także zdolność ograniczania poziomu RFT przez stabilizację składników łańcucha oddechowego, co jest ważne m.in. dla neuronów i kardiomiocytów, charakteryzujących się wysokim zapotrzebowaniem energetycznym [39].

Istotne wydaje się to, że w komórkach nowotworowych silnie wzrasta poziom mortaliny. Chociaż należy ona do białek, które ulegają ekspresji konstytutywnej, to jednak jej poziom może wzrastać pod wpływem różnych stresorów chemicznych i fizycznych, z wyjątkiem szoku cieplnego. Na podkreślenie zasługuje odmienna lokalizacja mortaliny w zależności od stopnia rozwoju klinicznego nowotworu. W komórkach prawidłowych białko to występuje w cytosolu, natomiast w guzach nowotworowych i różnych liniach komórek nowotworowych gromadzi się w pobliżu jądra komórkowego. Umiejscowienie tego białka zmienia się wraz z złośliwieniem/rewersją fenotypu nowotworu, co potwierdza przypuszczenia o roli mortaliny w nowotworzeniu. W wielu doświadczeniach wykazano, że HSP odpowiadają za przeżycie komórek nowotworowych, przyczyniając się do ograniczania różnicowania i wzrostu proliferacji. Ponadto mortalina, podobnie jak i inne HSP, również pełni opiekuńczą rolę w stosunku do białek mitochondrialnych – uczestniczy w ich transporcie i prawdopodobnie zaangażowana jest w replikację mtDNA [153,154].

Mimo że homologia sekwencji mortaliny z cytosolowym HSP70 wynosi zaledwie około 50% sugeruje się, że białko to może w analogiczny sposób oddziaływać z C-końcowym fragmentem p53 i regulować jego funkcje. Po zadziałaniu stresu w komórkach nowotworowych okołojądrowo umiejscowiona mortalina wiąże się z „dzikim” typem p53 i w ten sposób zapobiega jego translokacji do jądra komórkowego oraz hamuje jego właściwości supresorowe. Przedstawione dane wskazują, że mortalina może także ograniczać ekspresję p53, wpływać na jego zmiany konformacyjne, prowadzące do inaktywacji, a nawet kierować na drogę degradacji. Brak właściwej regulacji cyklu komórkowego przez produkt zmutowanego genu p53 wydaje się potwierdzać udział mortaliny w transformacji nowotworowej [39,153]. Zaobserwowano również, że białko to reguluje homeostazę Ca<sup>2+</sup> w mitochondriach oraz ułatwia przepływ jonów przez kanał VDAC (voltage dependent anion channel) [37].

## FUNKCJE PRZEDSTAWICIELI PODRODZINY HSP70

Mechanizm naprawy uszkodzonych białek wymaga zmian konformacyjnych HSP70 i energii pochodzącej z hydrolizy ATP. Oddziaływanie z innymi białkami współopiekuńczy mi może modulować ten proces przez indukcję/hamowanie lub zmianę interakcji HSP70-substrat [97,155]. Cykl ATP-azowy indukuje zmiany konformacyjne HSP70, które umożliwiają wiązanie lub uwalnianie substratu. Aktywność ATP-azowa zapewnia oddziaływanie m.in. z białkami jądrowymi (w tym p53), pęcherzykami opłaszczonymi klątryną, łańcuchami ciężkimi immunoglobulin, wimentyną, aktyną i kalmoduliną [109].

Proces naprawy i/lub dojrzewania substratu przebiega podobnie jak w przypadku HSP90, tj. wyróżnia się etapy formowania wczesnego, pośredniego i późnego kompleksu

opiekuńczego, obejmujące zmiany między stanem z wysokim powinowactwem do ATP i szybką wymianą substratu lub odwrotnie – z niskim powinowactwem do ADP i nieznacznym poziomem wymiany substratu [22,155].

Aktywność opiekuńczą przedstawicieli tej podrodziny regulują czynniki z tzw. „domeną J”, np. HSP40, które wpływają na hydrolizę ATP związanego z HSP70, co umożliwia utworzenie kompleksu opiekuńczego [117,143]. Ponadto, współopiekuńcze cząsteczki HSP40 wiążą uszkodzone polipeptydy i ułatwiają ich przyłączenie do HSP70. Hydroliza ATP jest niezbędna do aktywności opiekuńczej i wiązania substratu/ów. Kompleks HSP70-ADP jest stabilizowany przez czynnik HIP, który oddziałuje z domeną ATP-azową białka opiekuńczego. Podczas fosforylacji ADP do ATP białko HSP70 powraca do otwartej konformacji, w której dochodzi do rozluźnienia kompleksu i oddysocjowania dojrzałego substratu [38]. Aktywność HSP70 może być regulowana również przez inne białka współopiekuńcze – CHIP lub BAG-1, które indukują zmiany ADP/ATP, hamując jego aktywność opiekuńczą [12,146].

Przedstawiciele tej podrodziny wiążą się z nowo syntetyzowanymi polipeptydami i zapewniają im odpowiednią konformację; biorą udział w ich transporcie z cytosolu do innych przedziałów komórkowych, takich jak mitochondria czy ER. Ponadto uczestniczą w zwijaniu/relaksacji innych białek, a także chronią je przed denaturacją. Energia z hydrolizy ATP zapewnia zmiany konformacji zarówno białek opiekuńczych, jak i substratów, co umożliwia powrót uszkodzonym białkom do struktury natywnej [22,25,128].

Substratami chronionymi przez HSP70 są m.in. jądrowe receptory (np. receptory hormonów steroidowych), kinazy (np. Raf), kompleks cykliny B1/CDK1) czy czynniki transkrypcyjne (np. HSF, eIF2a, c-Myc, pRb), z którymi oddziałują w warunkach stresu. Członkowie tej podrodziny, po zadziałaniu stresu termicznego, mogą się wiązać również z białkami regulującymi cykl komórkowy np. z inhibitorem p27KIP1, który blokuje aktywność kompleksów cykliny E/CDK2 i cykliny A/CDK2 na granicy faz G1/S [109]. Niedawno doniesiono, że zablokowanie genów HSP72 i HSC70 powoduje spadek ekspresji genów kodujących CDK4, C-RAF i ErbB2, białek regulujących cykl komórkowy i odpowiedzialnych za transformację nowotworową. Okazało się, że wyciszenie genu AHA1 nie wywołuje podobnych efektów, a jedynie wpływa na spadek aktywności tych czynników [63,84].

Wyniki obserwacji wskazują, że ekspresja genów HSP70 jest nieodzowna w nabywaniu termotolerancji. Brak mechanizmów zabezpieczających przed szokiem cieplnym może wywoływać nieodwracalne uszkodzenia i prowadzić do zaburzeń w funkcjonowaniu komórek i ich śmierci. Komórki „uodpornione” na stres temperaturowy wykazują wysoki, stały poziom ekspresji HSP. Termotolerancja jest związana z obecnością w jądrze komórkowym HSP72 i HSP73 [72,73]. Uważa się, że w warunkach stresu cieplnego białka te pełnią funkcje ochronne podczas replikacji i transkrypcji (regulują składanie pre-mRNA i stabilizują jego cząsteczki) oraz warunkują prawidłową translację [76,128].

Należy podkreślić, że niektóre geny kodujące HSP70 są umiejscowione na chromosomie 6, na którym znajdują się również *loci* głównego układu zgodności tkankowej (MHC)

[90]. Przedstawiciele tej podrodziny wykazują znaczne podobieństwo międzygatunkowe, dzięki temu może dochodzić do reakcji krzyżowej i reakcji skierowanej przeciwko własnemu białkom, występującym na powierzchni komórek gospodarza. Udział w odpowiedzi immunologicznej zarówno układu odporności wrodzonej, jak i nabytej, przypisuje się zewnątrzkomórkowym lub związanym z błoną HSP70 i HSP90. Wykazują one zdolność aktywacji komórek NK i oddziałują z komórkami APC (antigen presenting cell), receptorami TLR2/TLR4 (toll-like receptor-2/4) oraz cząsteczkami CD14 (cluster of differentiation 14), związanymi z glikozylfosfatydyloinozytolem (GPI) umiejscowionym w błonie komórkowej, wpływając na uwalnianie cytokin np. TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12 oraz czynnikiem stymulującym tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów – GM-CSF (granulocyte-macrophage colony stimulating factor) [10,11,78]. W następstwie stresu podwyższony poziom zewnątrzkomórkowych i usytuowanych w błonie komórkowej białek HSP70 koreluje z indukcją apoptozy, którą poprzedza aktywacja receptorów na powierzchni komórek NK oraz prezentacja antygenów przez GRP94/96, co inicjuje odpowiedź CTL/CD8+ [41,52,53].

Zaobserwowano, że cytosolowe HSP70 mogą być transportowane poza komórkę za pomocą egzosomów lub też wiązać się z błoną komórkową poprzez oddziaływanie z białkami zawierającymi domenę transbłonową. Wiązanie np. cząsteczek receptora CD40 kardiomiocytów aktywuje zależny od jonów Ca<sup>2+</sup> szlak uwalniania cytokin prozapalnych, chemokin i tlenku azotu [156]. Cząsteczki HSP70 mogą także oddziaływać z fosfolipidowymi składnikami błony m.in. z fosfatydyloseryną (PS) i być przenoszone przez nie z wykorzystaniem mechanizmu „flip-flop”. Ponadto, przedstawiciele tej podrodziny cechuje zdolność do aktywacji kanału jonowego w dwuwarstwie lipidowej. Przedstawiono wyniki wskazujące, że białko HSP56 może oddziaływać z cholesterolem, uczestniczącym w tworzeniu mikrodomen w błonach komórkowych, tzw. tratw lipidowych. Prawdopodobnie białka formujące te struktury, wspólnie z HSP70/90, biorą udział w transdukcji sygnału/ów do wnętrza komórek [4,5,41,46]. Stymulacja komórek lipopolisacharydem indukuje asocjację kompleksów HSP70/90, usytuowanych w mikrodomenach błony z receptorami TLR2/4 i CD14 [9,10,11].

Bausero i wsp. [16] ujawnili, że w wielu typach komórek nowotworowych obserwuje się wzrost egzosomalowego transportu HSP70 (na zewnątrz komórki), po działaniu interferonu  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ). W surowicy pacjentów z różnymi nowotworami, a także w środowisku hodowlanym komórek nowotworowych wykryto wysokie stężenie HSP70. Wyniki obserwacji potwierdzają nagromadzenie HSP70 w błonie komórek nowotworowych, czego nie obserwuje się w komórkach prawidłowych [50,75]. Akceptuje się pogląd, że wiele białek błonowych tworzy kompleksy z HSP70 na powierzchni komórek nowotworowych, uczestnicząc w procesie prezentacji antygenów, a także w indukcji apoptozy z udziałem perforyny i granzymu B [53,54].

Wewnątrzkomórkowe HSP70 i HSP90 chronią komórki przed utratą ich funkcji i śmiercią w warunkach stresu, co w przypadku komórek nowotworowych prowadzi do rozwoju nowotworu, a następnie sprzyja jego przerzutowaniu [43,50]. Z kolei zewnątrzkomórkowo i błonowo umiejscowione

wione HSP, pełnią funkcje odpornościowe i wykazują właściwości przeciwnowotworowe [41,83,90].

Na uwagę zasługują sugestie, że HSP70 i mtHSP75 mogą służyć jako marker uszkodzeń neuronów oraz stanowić tzw. indeks „ostrości” uszkodzeń, gdyż ich poziom wydaje się korelować ze stopniem uszkodzenia tych komórek [39,128].

Zaobserwowano, że HSP stymulują wiele procesów przebiegających w płytkach krwi. Polipeptydy HSC70 wraz z HSP90 działają jako cząsteczki sygnałowe, które biorą udział w regulacji funkcji płytek krwi m.in. w adhezji, migracji, proliferacji i apoptozie, poprzez modulację aktywności białek zaangażowanych w te procesy. Wymienione białka tworzą duże ufosforylowane kompleksy, które oddziałują m.in. z fosfatazą PP1 i wchodzi w interakcję z miozyną. Adhezja płytek, indukowana kolagenem, powoduje dysocjację tych kompleksów, aktywację PP1 i defosforylację składników [109].

Plejotropowa aktywność członków tej podrodziny wynika z:

- występowania wielu izoform białek danej podrodziny, kodowanych przez geny umiejscowione na różnych chromosomach;
- współpracy z białkami współopiekuńczymi, takimi jak HIP, HOP, czy CDC37 (p50), które są wybiórczo wiązane przez HSP;
- oddziaływań między różnymi członkami rodziny HSP (np. HSP70 i HSP90, HSP70 i HSP40, HSP60 i HSP10) [82].

#### ODDZIAŁYWANIE HSP70 Z BIAŁKAMI WSPÓLOPIEKUŃCZYMI

**Białko HIP** (m.c.z. 43 kDa) oddziałuje z domeną ATP-azową HSP70/HSC70, zwiększając jego „aktywność opiekuńczą”. Stabilizacja kompleksu HSP70-ADP wpływa na wiązanie substratu do HSP70 oraz zapobiega przedwczesnemu jego uwalnianiu [94]. Wysokie powinowactwo do białek współopiekuńczych wynika z obecności w nich sekwencji TPR. Opublikowane wyniki badań wskazują, że HIP może również funkcjonować niezależnie od HSP, np. aktywować receptory glikokortykoidów. Natomiast **białko BAG-1** hamuje aktywność opiekuńczą HSP70 przez aktywację fosforylacji ADP do ATP, co wywołuje dysocjację kompleksu opiekuńczego [82,143,146]. Okazało się, że polipeptydy HIP i BAG-1 współzawodniczą między sobą, gdyż wykazują powinowactwo do tego samego fragmentu domeny ATP-azowej HSP70 [97]. W komórkach *Eukaryota* zidentyfikowano kilka postaci białka BAG-1. W oddziaływaniach z HSP w komórkach człowieka istotną rolę pełnią trzy izoformy, tj. BAG-1L (m.c.z. 50 kDa), BAG-1M/Rap46 (46 kDa) i BAG-1S (36 kDa). Isoformy BAG-1M i BAG-1S wykrywa się w cytosolu. Natomiast najdłuższa postać – BAG-1L zawiera sekwencję NLS w końcu N cząsteczki i występuje głównie w jądrze komórkowym, w którym może oddziaływać z DNA. Analizy struktury pierwszorzędowej ujawniły, że BAG-1L i BAG-1M, zawierają w N-końcowym odcinku kilka powtórzeń 6 aminokwasów – TRSEEX (treonina, arginina, seryna, dwie cząsteczki kwasu glutaminowego oraz dowolny aminokwas). Motyw ten nie jest identyczny we wszystkich powtórzeniach [143,146]. W końcu C opisywanego białka znajduje się wysoce zachowawczy segment BD (BAG domain) oddziałujący z innymi polipeptydami. Z kolei środkowa domena ULD (ubiquitin linking

domain) odpowiada za kierowanie białek na szlak degradacji z udziałem ubikwityny i jest ona wspólna dla wszystkich izoform BAG-1 [81]. Interakcja białka BAG-1 z enzymami o aktywności ligazy E3 ubikwityny – Siah i CHIP przyspiesza wymianę nukleotydów ADP/ATP związanych z HSP70, dzięki czemu dochodzi do przedwczesnego uwolnienia substratu z kompleksu opiekuńczego i jego degradacji w proteasomie [3]. Okazało się, że kinaza Raf-1 i HSP70 współzawodniczą ze sobą o wiązanie z Bag-1, co również może regulować szlak degradacji substratów i indukcję apoptozy [146].

Biologiczna rola współopiekuńczych czynników w regulacji HSP70 jest słabo poznana. Wynika to z tego, że zarówno Hip jak i Bag-1, oddziałują tylko z około 1% cząsteczek HSP70. Oceniono, że Bag-1 wpływa na aktywność opiekuńczą HSP70, gdy ich stosunek molowy wynosi 1:1. To oznacza, że Bag-1 moduluje tylko niewielki odsetek HSP70 w komórce i zapewne nie należy do głównych regulatorów jego aktywności. Prawdopodobnie BAG-1 i HIP mogą oddziaływać między sobą, a także są zdolne do interakcji z innymi białkami komórkowymi. Doniesiono, że Bag-1 wpływa na funkcję niektórych głównych czynników apoptozy i szlaków sygnalizacji komórkowej, m.in. wiąże się z antyapoptocycznym białkiem Bcl-2, Rb czy kinazą Raf-1. Uznaje się, że obecność Bag-1 jest niezbędna w kontroli wzrostu i śmierci komórek, gdy poziom HSP70 wzrasta w odpowiedzi na stres [3,97,143].

Kolejne **białko CHIP** (carboxyl terminus of HSC70-interacting protein; m.c.z. 35 kDa) hamuje defosforylację i powstawanie opiekuńczego kompleksu pośredniego wiążącego substrat. Należy do białek akcesorycznych z motywami TPR i współzawodniczy z HOP (m.c.z. 60 kDa) o miejsce wiązania z sekwencją EEVD w C-końcowym regionie HSP70 [12,95,106]. W cyklu wiązania substratów CHIP funkcjonuje jako E3-ligaza ubikwitylowa; powoduje odłączenie substratu z kompleksu z HSP70, a następnie jego degradację w proteasomach. Białka CHIP wraz z BAG-1 działają jako inhibitory cyklu naprawy białek komórkowych; ich aktywność prowadzi do degradacji substratów [32,106].

W warunkach stresu HSP70 stanowi czynnik współopiekuńczy HSP90. W komórkach nowotworowych polipeptydy te hamują funkcje HSP90 i ich inhibitorów, czego nie obserwuje się w prawidłowych komórkach. Wykazano, że indukcja HSP70 może zmniejszać wiązanie i działanie inhibitorów HSP90. Spadek ekspresji HSC70 lub HSP70 w komórkach nowotworowych wpływa na aktywność HSP90 i proliferację komórek zmienionych nowotworowo. Natomiast spadek poziomu ekspresji obydwu izoform jednocześnie powoduje degradację uszkodzonych białek z udziałem proteasomów, zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G1 i aktywację apoptozy [111,113]. Funkcje opiekuńcze HSP70, np. fałdowanie nowo syntetyzowanych polipeptydów czy naprawa uszkodzonych są regulowane przez dwie grupy czynników współopiekuńczych, tj. białka zawierające domenę J, np. **HSP40**, przyspieszające hydrolizę ATP oraz NEFs (nucleotide exchange factors), które powodują odłączenie ADP od HSP70 [82,117,143]. Wiadomo, że cząsteczki HSP40, w przeciwieństwie do HSP110, oddziałują z motywem PBD białka HSP70. Zarówno substrat, jak i białko HSP40, które zawiera domenę J, indukują hydrolizę ATP związanego z HSP70 [82].

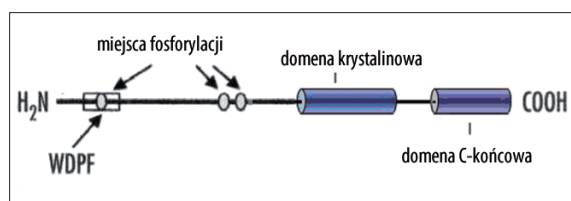
Analiza struktury pierwszorzędowej wykazała znaczną homologię HSP110 do HSP70. W ich strukturze występuje domena wiązania z ADP/ATP, trzy domeny helikalne (domain three helix bundle domain – 3HBD), odpowiedzialne za oddziaływanie HSP70-HSP110 oraz domena rozpoznawana przez substrat. **Białko HSP110** związane z ATP powoduje oddysocjowanie ADP od HSP70. W kolejnym etapie do HSP70 przyłącza ATP, co skutkuje dysocjacją kompleksu HSP110-HSP70-substrat. Szybkie formowanie kompleksu opiekuńczego i jego strukturalne zmiany indukowane przez HSP110 mogą spowodować przedwczesne uwolnienie substratu, zanim zdąży osiągnąć postać dojrzałą. Akceptuje się pogląd, że częściowe zwinięcie nie zakłóca ponownej jego asocjacji z HSP70 w kolejnym cyklu [110,129]. Prawdopodobnie HSP110 przyspiesza dojrzewanie substratów, przez interakcję zarówno z substratem, jak i HSP70, a białko może zostać uwolnione w postaci całkowicie lub częściowo sfałdowanej. Ponadto, wykazano, że polipeptydy HSP110 nie są niezbędne w przebiegu cyklu wiązania i naprawy substratów oraz zmian strukturalnych HSP70. Przypuszcza się, że HSP110 mogą uczestniczyć w oddziaływaniach jedynie z niektórymi swoistymi substratami i samodzielnie nie są zdolne indukować naprawy uszkodzonych białek [110]. Główną funkcją HSP110, sugerowaną od lat, jest ochrona innych białek przed denaturacją i agregacją. Liczne badania dowodzą, że w warunkach stresu wzrasta poziom ekspresji tego polipeptydu [98]. Przedstawiciele podrodziny HSP110 reprezentują czynniki współopiekuńcze potrzebne do formowania kompleksów HSP70 lub HSP90 z innymi cząsteczkami m.in. w cyklu wiązania i dojrzewania substratów [25,58]. Zaliczane są do białek NEF, które uczestniczą w wymianie nukleotydów ADP/ATP i regulują aktywność ATP-azową HSP70 oraz jego zdolność do wiązania substratów. Czynniki NEF działają jako inhibitory, inicjują dysocjację kompleksu HSP70-ADP, uwalnianie substratu i hamują funkcje białek opiekuńczych. Na podkreślenie zasługuje to, że w warunkach stresu cząsteczki HSP110 mogą oddziaływać zarówno z N-końcową domeną ATP-azową, jak i z domeną wiązania substratu znajdującą się w końcu C łańcucha HSP70, co sugeruje ich różnorodne funkcje [98,129].

W warunkach stresu cytosolowe HSP110 i HSP104/105 wiążą zdenaturowane białka i uczestniczą w ich naprawie. Natomiast w warunkach prawidłowych – umiejscowione w ER cząsteczki biorą udział w składaniu nowo syntetyzowanych białek i ich transporcie [60,110]. Wraz z HSP70 oddziałują również z rybosomami tworząc kompleks RAC (ribosome associated complex), który reguluje proces translacji [42].

## sHSP

### Właściwości i budowa domenowa sHSP

W genomie człowieka zidentyfikowano 10 genów kodujących sHSP [70]. Uważa się, że mutacje w tych genach mogą odpowiadać za rozwój zaćmy, desminopatii i neuropatii oraz zaburzeń neurodegeneracyjnych m.in. choroby Parkinsona, Huntingtona czy Alzheimera [77,139,157]. Podwyższony poziom małych HSP (m.c. 8,5–40 kDa) obserwuje się w warunkach długotrwałego stresu termicznego. Reprezentują wyjątkowo stabilne cząsteczki, które można wykryć nawet po ustąpieniu stresora [109]. Jak dotąd w komórkach ludzkich poznano 10 przedstawicie-



Ryc. 3. Budowa domenowa HSP27 (wg [27,51] zmodyfikowano)

li sHSP, wśród których powszechnie występują – HSPB1, HSPB5, HSPB6 i HSPB8. Z kolei polipeptydy – HSPB2, HSPB3, HSPB4, HSPB7, HSPB9 i HSPB10 występują tylko w określonych tkankach [59,70,144].

Monomery sHSP zawierają wysoce zachowawczą około 90-aminokwasową domenę  $\alpha$ -krystalinową – odpowiedzialną za wielkość tworzonych oligomerów, zmienną domenę N-końcową, która moduluje oligomeryzację, a także katalizuje i reguluje szybkość zmian konformacyjnych i wiązanie substratów oraz region C-końcowy, który odpowiada za rozdzysocjowanie oligomerów, funkcje opiekuńcze i wewnątrzdomenową dimeryzację (ryc. 3) [55,61].

Dzięki oddziaływaniom funkcjonalnych regionów cząsteczki sHSP mogą tworzyć dimery, które są podstawowymi jednostkami strukturalnymi oligomerów [137,138,149].

Większe kompleksy osiągają nawet do 50 podjednostek i są charakterystyczne dla  $\alpha$ -krystaliny [2,64,93]. Oligomeryzacja sHSP jest wymagana do ich aktywności opiekuńczej. Wyniki badań wskazują, że aktywność wyłącznie domeny krystalinowej nie wystarcza do oligomeryzacji cząsteczek, do której niezbędne jest współdziałanie wszystkich domen sHSP [61,137].

W strukturze sHSP brak jest domeny ATP-azowej, a ich główną funkcją opiekuńczą jest ochrona białek przed agregacją oraz nieodwracalną denaturacją w warunkach stresu. Niskocząsteczkowe HSP występują w tkance kostnej i mięśniach szkieletowych, w sercu i mózgu. Wysoki poziom ekspresji przedstawiciela podrodziny sHSP –  $\alpha$ -krystaliny, wykryto w soczewce oka kręgowców [2,66,77]. Białka te mogą występować zarówno w homo- jak i w heterokompleksach, izoformach o różnym stopniu ufosforylowania. Właściwości jednego z sHSP – HSP27 zależą od stanu jego oligomeryzacji i fosforylacji [61,79]. Polipeptyd ten w warunkach stresu tworzy duże oligomery nawet powyżej 1000 kDa. Oligomeryzacja stanowi proces dynamiczny, modulowany przez poziom fosforylacji. Stwierdzono, że HSP27 może ulegać fosforylacji na trzech resztach seryny. Modyfikują je kinazy MAPKAP2 i 3 w odpowiedzi na działanie stresorów, takich jak: нефизиологична температура, czynniki różnicowania, mitogeny, cytokiny prozapalne, np. czynnik martwicy nowotworu (tumor necrosis factor  $\alpha$  – TNF- $\alpha$ ) i interleukiny np. IL-1 $\beta$ , nadtlenuk wodoru i inne utleniające. Fosforylacja sHSP umożliwia przejście oligomerów do form niskocząsteczkowych [59,71].

W warunkach prawidłowych sHSP występują w nieaktywnej postaci oligomerycznej. W wyniku szoku ciepłego, następuje częściowy rozpad oligomerów sHSP, dzięki czemu możliwe jest wiązanie białek substratowych i tworzenie kompleksów [33,47,49]. Wyniki opublikowanych ostatnio

badan wskazuja, ze po zadziaaniu szoku cieplnego nie dochodzi do rozpadu/rozluźnienia podjednostek oligomerow, a jedynie zachodza zmiany konformacyjne, ktore powoduja wzrost aktywnosci sHSP i powinowactwa do substratu/ow [79,92,158]. Aktywne oligomery sHSP wiazuja uszkodzone bialka tworzac kompleksy sHSP-substrat, co zabezpiecza przed ich denaturacja i agregacja [102,108,145]. W wiązaniu substratu/ow uczestnicza regiony zarowno koncow N, jak i C bialek sHSP [13,58,89]. Ponadto, bialka te zawieraja rowniez motyw odpowiedzialny za wiązanie transferazy S-glutoni, dzieki czemu mozliwe jest oddziaływanie z bialkami zdenaturowanymi [92]. W warunkach prawidlowych kompleksy opiekuńcze ulegaja rozpadowi, a substraty sa przekazywane i wiązane przez HSP90 lub HSP70, ktore biora udzial w ich naprawie [14,104,149].

Wiadomo, ze bialka HSP10 i HSP60 tworza mitochondrialne kompleksy opiekuńcze. Okolo 80% HSP60 wystepuje w mitochondriach, natomiast 20% znajduje sie poza tymi organellami. W komorkach prawidlowych obserwuje sie wysoki poziom ekspresji HSP60. Wyniki przeprowadzonych doswiadczen wskazuja, ze ekspresja tego bialka nie osiaga znacząco wysokiego poziomu w wyniku szoku cieplnego. Z najnowszych obserwacji wynika, ze czasteczki HSP60 moga wystepowac nie tylko w cytosolu, ale rowniez na powierzchni komorek oraz zewnatrzkomorkowo i brać udzial w odpowiedzi immunologicznej [28,56,147]. Wykazano, ze HSP60 wplywaja na przezywanie i proliferacje komorek nowotworowych, dlatego sugeruje sie, ze ich poziom w komorkach nowotworowych oraz w surowicy pacjentow chorych na raka moze stanowic istotny czynnik w diagnostyce onkologicznej (chaperonotherapy) [36,128,131]. Polipeptydy te biora udzial w prawidlowym fałdowaniu bialek mitochondrialnych oraz w ich naprawie i degradacji w ATP-zalezny sposob. Opiekuńcze funkcje HSP60 regulowane sa przez male – HSP10, ktore zwiększaja aktywnosc ATP-azow HSP60 oraz ich zdolnosc do wiązania substratow. W obecności ADP dwie czasteczki HSP10 oddiałyuja z jedna HSP60. Na podkreślenie zasluguja obserwacje, ze bialka te nie zawsze wspolwystepuja i dzialaja w kompleksie. Prawdopodobnie tylko podczas transportu nowo syntetyzowanych bialek z cytosolu do mitochondriow niezbedny jest udzial HSP10 [35,76,91]. Uwage przyciagaja doniesienia, ze mitochondrialne kompleksy bialek HSP60 i HSP10 chronia komorki serca przed uszkodzeniami w wyniku niedotlenienia i niedokrwienia, ulatwiaja regeneracje i zapobiegaja apoptozie kardiomiocytow [37,141].

## FUNKCJE sHSP

Wyniki badan wskazuja, ze glownie oligomery sHSP wykazuja aktywnosc opiekuńcza oraz chronia komorki przed stresem oksydacyjnym, cieplnym i hamuja apoptoze [59,79,140]. Przedstawiciele tej podrodziny moga wiązac uszkodzone substraty, przez co zapobiegaja ich denaturacji i agregacji [86,87]. Jednakze nie biora udzialu w naprawie substratow, a jedynie w niej posrednicza, przekazujac czesciowo zdenaturowane bialka kompleksom opiekuńczym ATP-zalezny [55,137]. Prawdopodobnie, nawet podczas stresu, zdenaturowane bialka sa uwalniane z polaczen z sHSP i „przekazywane do naprawy” kompleksom HSP70-HSP40. Ponadto, zaobserwowano, ze nie wchodzi w interakcje z natywnymi czy nowo syntetyzowanymi,

niezwiniętymi polipeptydami, co potwierdza sugestia, ze glowna ich funkcja jest ochrona bialek przed denaturacja [14,47,163]. W komorkach nerwowych polipeptydy HSP27 i  $\alpha$ B-krystalina przeciwdiałyuja gromadzeniu sie uszkodzonych bialek, odpowiedzialnych za rozwój chorob neurodegeneracyjnych, kierujac je na ubikwitynozalezna degradacje w proteasomach [77,104].

Z jednej strony sHSP jako czynniki opiekuńcze chronia strukture bialek komorkowych umozliwiajac im prawidlowe funkcjonowanie, a tym samym zapobiegaja rozwojowi wielu chorob. Na podkreślenie zasluguje odkrycie, ze nadekspresja genow HSP27 i  $\alpha$ B-krystaliny oraz wzrost poziomu ich bialkowych produktow zapobiega katarakcie, a ponadto chroni przed uszkodzeniami naczyń krwionośnych, niedokrwieniem i niedotlenieniem podczas zawału serca czy udaru mózgu [31,118,139]. Z drugiej strony, jesli dojdzie do mutacji kodujacych je genow, moga sie przyczyniac do zaburzen funkcji komorkowych, wywolujacych rózne schorzenia, np. miopatie (desminomiopatii), choroby autoimmunologiczne bądż neurodegeneracyjne (Parkinsona, Alzheimerza czy stwardnienie rozsiane) [77,157,161].

Niedawno ujawniono, ze zarowno homo- jak i heterokompleksy innych przedstawicieli sHSP  $\alpha$ A- i  $\alpha$ B-krystaliny moga sie wiązac odwracalnie, bądż nieodwracalnie z błona plazmatyczna komorek oka. Nagromadzenie obu postaci krystaliny w soczewce oka powoduje utrate jej przezroczystosci [2,77].

Natomiast ekspresja genow HSP27 podlega wybiórczej regulacji w czasie ciąży, podczas wysilku. Krazenie tych bialek i wiązanie postaci cytosolowej do błony komorkowej jest regulowana stanem ich fosforylacji [31,64,77].

Ponadto, czlonkowie tej podrodziny uczestnicza w ochronie antyoksydacyjnej komorek, glownie przez indukcje spadku poziomu RFT. Bialka te chronia komorki przed smiercia spowodowana uwalnianiem RFT posrednio przez wzrost komorkowego poziomu glutationu i bezposrednio przez neutralizacje toksycznych skutkow utleniania bialek. Ten ostatni efekt, w którym biora udzial ufosforylowane czasteczki HSP27 jest bardzo wazny m.in. do prawidlowego funkcjonowania komorek nerwowych. Bialko to przyjecie nazywac markerem stresu oksydacyjnego [7,118,128].

Opublikowane dane wskazuja, ze HSP27 uczestniczy w reorganizacji wlokien aktywnych, dzieki czemu zapobiega zaburzeniom struktury i funkcji cytoszkieletu. Zarowno w warunkach stresu termicznego, jak oksydacyjnego, polipeptydy HSP27, HSP25, HSP20 i  $\alpha$ B-krystalina stabilizuja mikrofilamenty aktywne, natomiast HSPB2 i HSPB3 oddiałyuja na miofibryle miesniowe [1,55,89,102,145].

Wyniki wieloletnich badan wskazuja, ze bialka tej podrodziny moga sie rowniez wiązac z błona komorkowa lub byc transportowane na zewnatrz komorki, mimo ze nie zawieraja ani domeny transbłonowej ani sygnalu wiązania z błonami. Ostatnio doniesiono, ze sHSP odgrywaja wazna role w kontroli stabilnoscii błon komorkowych, przyczyniajac sie do utrzymania ich integralnoscii w warunkach stresu. Ponadto z przeprowadzonych doswiadczen wynika, ze sHSP wchodzi w interakcje z lipidami i bialkami błony komorkowej

kowej oraz uczestniczą w transporcie cząsteczek z udziałem kaweoli [150,151]. Natomiast sHSP usytuowane w błonach mitochondriów, oprócz stabilizacji tych struktur, biorą również udział w transporcie elektronów i procesach redoks [92]. Zwiększony poziom cząsteczek HSPB2 związanych z zewnętrzną błoną mitochondrialną odnotowano w sercu i mięśniach szkieletowych [91].

Wśród różnych aktywności przedstawicieli sHSP należy odnotować, że białko HSP16.2 (C1orf41), którego ekspresję stwierdzono w komórkach różnych linii i tkanek, jest czynnikiem stabilizującym błony komórkowe, jak i otaczające organella. Wykrywa się go głównie w jądrze komórkowym i cytosolu, a w mniejszym stopniu także w mitochondriach. Nadekspresję HSP16.2 odnotowano jako czynnik sprzyjający formowaniu traw lipidowych oraz stwierdzono, że indukuje fosforylację kinazy PKB/Akt. Sugeruje się, że jego obecność ochrania komórki przed śmiercią przez stabilizację błon mitochondrialnych oraz traw lipidowych, aktywując HSP90 i ścieżki z udziałem kinazy PKB/Akt [17,18].

Analiza składu białek błony komórkowej w różnych komórkach nowotworowych, potwierdza obecność składników opiekuńczych, takich jak np. GRP94/96, GRP78, GRP75, HSP70, HSP60 oraz HSP27 [24,127,147,161]. Na obecnym etapie badań wydaje się, że poznane dotąd HSP związane z błoną nie zawierają domeny transbłonowej ani sekwenckiej, która kierowałaby je do egzosomów. Ciekawa wydaje się obserwacja, że na powierzchni komórek nowotworowych odnotowano znacznie podwyższony poziom HSP w porównaniu z komórkami prawidłowymi [30,121,133].

Białka mtHSP75, HSP60 i HSP10 ulegają ekspresji w wielu typach komórek i tkanek, w określonych etapach rozwoju i różnicowania. Ulegają nadekspresji w nowotworach złośliwych przyczyniając się do wzrostu guza i indukują oporność komórek nowotworowych na leki, dlatego mogą stanowić markery nowotworzenia [37,131].

Ponadto wskazuje się, że sHSP pełnią rolę w „kontrolu jakości” błony komórkowej, jej stabilności i integralności. Opiswane białka uznaje się za występujące powszechnie, a zarazem niezbędne, czynniki stabilizacji błony komórkowej. Te istotne organelle odbierają bowiem sygnały zewnątrzkomórkowe oraz biorą udział w ich transdukcji, m.in. dzięki obecności HSP i ich oddziaływaniom z innymi cząsteczkami sygnałowymi. Ponadto ich cząsteczki utrzymują integralność błon komórkowych w warunkach szoku cieplnego, który może zaburzać organizację mikrodomen oraz ich płynność [150,151]. Doniesiono, że HSP10 oddziałuje z białkami wiążącymi się z DNA i zaangażowanymi w regulację cyklu komórkowego, biorą udział w eksporcie RNA oraz imporcie białek jądrowych [28]. Sugeruje się, że cząsteczki HSP10 mogą być rozpatrywane nie tylko jako czynniki uczestniczące w procesie składania i naprawy białek, ale także jako ważny element komórkowej sygnalizacji, regulujący cykl komórkowy, transport między jądrem komórkowym a cytosolem oraz niektóre szlaki metaboliczne. Ponadto przypuszcza się, że może również hamować różnicowanie komórek i ich apoptozę. Wysoki poziom HSP10 w cytosolu wydaje się korelować z rozwojem nowotworów [35,36].

## UDZIAŁ sHSP W NAPRAWIE SUBSTRATÓW

Rola sHSP polega na wiązaniu i gromadzeniu uszkodzonych substratów podczas stresu i kierowaniu ich na drogę naprawy z udziałem innych białek opiekuńczych tej rodziny. Uważa się, że sHSP pośredniczą w naprawie uszkodzonych białek, zapobiegając ich denaturacji i agregacji w warunkach nefizjologicznych. Indukowane stresem kompleksy sHSP/substrat są wyjątkowo stabilne [14,49,137]. Przedstawiciele tej podrodziny samodzielnie lub z HSP70, mogą pełnić funkcje opiekuńcze również w stosunku do białek matriksu jądrowej [1,72,158].

Po ustaniu działania czynnika stresu, w warunkach prawidłowych w obecności kompleksów opiekuńczych HSP104/HSP70/HSP40/ATP, następuje dysocjacja oligomerów sHSP/substrat(y) [29,60,155]. Uznaje się, że obecność białek sHSP jest niezbędna do prawidłowego funkcjonowania układu naprawczego z udziałem kompleksów HSP110/HSP70/HSP40 [44]. Detekcja cząsteczek HSP27 w jądrach komórkowych sugeruje, że uszkodzone białka jądrowe mogą formować kompleksy HSP27/substrat, w których ulegają szybszej naprawie [27]. Wśród wymienianych funkcji HSP27 istotny wydaje się udział w nabywaniu termotolerancji [79]. Główną rolę w destrukcji nierozpuszczalnych agregatów uszkodzonych białek, które podczas stresu wiążą się z sHSP pełnią również HSP104. Stwierdzono, że nadekspresja sHSP sprzyja degradacji białek z długimi „wstawkami” poliglutaminowymi na szlaku proteosomowym; podczas tej aktywności nieodzowny jest udział HSP104 [29,60,86,87].

## PODSUMOWANIE

Badania nad powszechnie występującymi białkami rodziny HSP zintensyfikowano pod koniec lat osiemdziesiątych ubiegłego wieku, gdy okazało się, że poza podwyższoną temperaturą o kilka stopni w stosunku do temperatury fizjologicznej inne czynniki fizyczne, chemiczne (w tym leki i ich metabolity) czy biologiczne indukują ich biosyntezę. Uznaje się, że „wszechobecność” HSP zapewnia organizmowi jeden z najstarszych układów ochronnych przed ogólnie pojętym stresem. Wyjątkowość przedstawicieli tej rodziny polega na ich zdolności do interakcji ze znaczną liczbą różnych białek, nazywanymi substratami czy „klientami” (clients), przez co mogą wypełniać tak różnorodne funkcje.

Dzięki badaniom ostatniej dekady poznano dodatkowe funkcje HSP związane z obserwacjami, że uczestniczą one w odpowiedzi układu odpornościowego skierowanej przeciwko nowotworom i patogenom wirusowym i bakteryjnym [6,19]. Stąd ich potencjalne możliwości wykorzystania jako cząsteczek pomocnych w strategiach terapeutycznych i profilaktyce wielu schorzeń, w tym konstrukcji szczepionek przeciwnowotworowych i przeciwzakaźnym włącznie. Duże nadzieje wiąże się z możliwością modulacji (zwiększania/obniżania) poziomu ekspresji tych białek w komórkach nowotworowych, czy w różnych zaburzeniach neurodegeneracyjnych, co zostaje w ścisłej korelacji z procesem śmierci programowanej. To obszerne zagadnienie wymaga jednak oddzielnego opracowania.



- [1] Adhikari A.S., Sridhar Rao K., Rangaraj N., Parnaik V.K., Mohan Rao C.: Heat stress-induced localization of small heat shock proteins in mouse myoblasts: intranuclear lamin A/C speckles as target for  $\alpha$ B-crystallin and Hsp25. *Exp. Cell Res.*, 2004; 299: 393–403
- [2] Ahmad M.F., Raman B., Ramakrishna T., Rao C.M.: Effect of phosphorylation on  $\alpha$ B-crystallin: differences in stability, subunit exchange and chaperone activity of homo and mixed oligomers of  $\alpha$ B-crystallin and its phosphorylation-mimicking mutant. *J. Mol. Biol.*, 2008; 375: 1040–1051
- [3] Alberti S., Esser C., Höhfeld J.: BAG-1 – a nucleotide exchange factor of Hsc70 with multiple cellular functions. *Cell Stress Chaperones*, 2003; 8: 225–231
- [4] Arispe N., De Maio A.: ATP and ADP modulate a cation channel formed by Hsc70 in acidic phospholipid membranes. *J. Biol. Chem.*, 2000; 275: 30839–30843
- [5] Arispe N., Doh M., Simakova O., Kurganov B., De Maio A.: Hsc70 and Hsp70 interact with phosphatidylserine on the surface of PC12 cells resulting in a decrease of viability. *FASEB J.*, 2004; 18: 1636–1645
- [6] Arnold-Schild D., Hanau D., Spehner D., Schmid C., Rammensee H.G., de la Salle H., Schild H.: Cutting edge: receptor-mediated endocytosis of heat shock proteins by professional antigen-presenting cells. *J. Immunol.*, 1999; 162: 3757–3760
- [7] Arrigo A.P., Firdaus W.J., Mellier G., Moulin M., Paul C., Diaz-latoud C., Kretz-remy C.: Cytotoxic effects induced by oxidative stress in cultured mammalian cells and protection provided by Hsp27 expression. *Methods*, 2005; 35: 126–138
- [8] Arya R., Mallik M., Lakhotia S.C.: Heat shock genes – integrating cell survival and death. *J. Biosci.*, 2007; 32: 595–610
- [9] Asea A.: Mechanisms of HSP72 release. *J. Biosci.*, 2007; 32: 579–584
- [10] Asea A., Kraeft S.K., Kurt-Jones E.A., Stevenson M.A., Chen L.B., Finberg R.W., Koo G.C., Calderwood S.K.: HSP70 stimulates cytokine production through a CD14-dependant pathway, demonstrating its dual role as a chaperone and cytokine. *Nat. Med.*, 2000; 6: 435–442
- [11] Asea A., Rehli M., Kabling E., Boch J.A., Baré O., Auron P.E., Stevenson M.A., Calderwood S.K.: Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70: role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4. *J. Biol. Chem.*, 2002; 277: 15028–15034
- [12] Ballinger C.A., Connell P., Wu Y., Hu Z., Thompson L.J., Yin L.Y., Patterson C.: Identification of CHIP, a novel tetratricopeptide repeat-containing protein that interacts with heat shock proteins and negatively regulates chaperone functions. *Mol. Cell Biol.*, 1999; 19: 4535–4545
- [13] Basha E., Friedrich K.L., Vierling E.: The N-terminal arm of small heat shock proteins is important for both chaperone activity and substrate specificity. *J. Biol. Chem.*, 2006; 281: 39943–39952
- [14] Basha E., Lee G.J., Brechi L.A., Hausrath A.C., Buan N.R., Giese K.C., Vierling E.: The identity of proteins associated with a small heat shock protein during heat stress *in vivo* indicates that these chaperones protect a wide range of cellular functions. *J. Biol. Chem.*, 2004; 279: 7566–7575
- [15] Basu S., Srivastava P.K.: Heat shock proteins: the fountainhead of innate and adaptive immune responses. *Cell Stress Chaperones*, 2000; 5: 443–451
- [16] Bausero M.A., Gastpar R., Multhoff G., Asea A.: Alternative mechanism by which IFN- $\gamma$  enhances tumor recognition: active release of heat shock protein 72. *J. Immunol.*, 2005; 175: 2900–2912
- [17] Bellyei S., Szigeti A., Boronkai A., Pozsgai E., Gomori E., Melegh B., Janaky T., Bognar Z., Hocsak E., Sumegi B., Gallyas F.Jr.: Inhibition of cell death by a novel 16.2 kD heat shock protein predominantly via Hsp90 mediated lipid rafts stabilization and Akt activation pathway. *Apoptosis*, 2007; 12: 97–112
- [18] Bellyei S., Szigeti A., Pozsgai E., Boronkai A., Gomori E., Hocsak E., Farkas R., Sumegi B., Gallyas F.Jr.: Preventing apoptotic cell death by a novel small heat shock protein. *Eur. J. Cell Biol.*, 2007; 86: 161–171
- [19] Binder R.J., Blachere N.E., Srivastava P.K.: Heat shock protein-chaperoned peptides but not free peptides introduced into the cytosol are presented efficiently by major histocompatibility complex I molecules. *J. Biol. Chem.*, 2001; 276: 17163–17171
- [20] Binder R.J., Vatner R., Srivastava P.: The heat-shock protein receptors: some answers and more questions. *Tissue Antigens*, 2004; 64: 442–451
- [21] Björkdahl C., Sjögren M.J., Zhou X., Concha H., Avila J., Winblad B., Pei J.J.: Small heat shock proteins Hsp27 or  $\alpha$ B-crystallin and the protein components of neurofibrillary tangles: tau and neurofilaments. *J. Neurosci. Res.*, 2008; 86: 1343–1352
- [22] Broadley S.A., Hartl F.U.: The role of molecular chaperones in human misfolding diseases. *FEBS Lett.*, 2009; 583: 2647–2653
- [23] Brocchieri L., Convey de Macario E., Macario A.J.: hsp70 genes in the human genome: Conservation and differentiation patterns predict a wide array of overlapping and specialized functions. *BMC Evol. Biol.*, 2008; 8: 1–19
- [24] Broquet A.H., Thomas G., Masliah J., Trugnan G., Bachelet M.: Expression of the molecular chaperone Hsp70 in detergent-resistant microdomains correlates with its membrane delivery and release. *J. Biol. Chem.*, 2003; 278: 21601–21606
- [25] Bukau B., Weissman J., Horwich A.: Molecular chaperones and protein quality control. *Cell*, 2006; 125: 443–451
- [26] Calabrese V., Cornelius C., Mancuso C., Pennisi G., Calafato S., Bellia F., Bates T.E., Giuffrida Stella A.M., Schapira T., Dinkova Kostova A.T., Rizzarelli E.: Cellular stress response: a novel target for chemoprevention and nutritional neuroprotection in aging, neurodegenerative disorders and longevity. *Neurochem. Res.*, 2008; 33: 2444–2471
- [27] Caplan A.J., Mandal A.K., Theodoraki M.A.: Molecular chaperones and protein kinase quality control. *Trends Cell Biol.*, 2007; 17: 87–92
- [28] Cappello F., de Macario E.C., Marasa L., Zummo G., Macario A.J.: Hsp60 expression, new locations, functions and perspectives for cancer diagnosis and therapy. *Cancer Biol. Ther.*, 2008; 7: 801–809
- [29] Cashikar A.G., Duennwald M., Lindquist S.L.: A chaperone pathway in protein disaggregation. Hsp26 alters the nature of protein aggregates to facilitate reactivation by Hsp104. *J. Biol. Chem.*, 2005; 280: 23869–23875
- [30] Ciocca D.R., Calderwood S.K.: Heat shock proteins in cancer: diagnostic, prognostic, predictive, and treatment implications. *Cell Stress Chaperones*; 2005; 10: 86–103
- [31] Cobb B.A., Petrash J.M.: Alpha-Crystallin chaperone-like activity and membrane binding in age-related cataracts. *Biochemistry*, 2002; 41: 483–490
- [32] Connell P., Ballinger C.A., Jiang J., Wu Y., Thompson L.J., Höhfeld J., Patterson C.: The co-chaperone CHIP regulates protein triage decisions mediated by heat-shock proteins. *Nat. Cell Biol.*, 2001; 3: 93–96
- [33] Csermely P., Korcsmáros T., Kovács I.A., Szalay M.S., Soti C.: Systems biology of molecular chaperone networks. *Novartis Found. Symp.*, 2008; 291: 45–54
- [34] Cymerys J., Niemiłowski M.: Białka szoku cieplnego – molekularne perpetuum mobile. *Post. Biol. Kom.*, 2004; 31: 331–352
- [35] Czarnecka A.M., Campanella C., Zummo G., Cappello F.: Heat shock protein 10 and signal transduction: a “capsula eburnea” of carcinogenesis? *Cell Stress Chaperones*, 2006; 11: 287–294
- [36] Czarnecka A.M., Campanella C., Zummo G., Cappello F.: Mitochondrial chaperones in cancer: from molecular biology to clinical diagnostics. *Cancer Biol. Ther.*, 2006; 5: 714–720
- [37] Czarnecka A.M., Golik P., Bartnik E.: Mitochondria jako integratory apoptozy. *Post. Biol. Kom.*, 2006; 33: 525–541
- [38] Daugaard M., Rohde M., Jäättelä M.: The heat shock protein 70 family: Highly homologous proteins with overlapping and distinct functions. *FEBS Lett.*, 2007; 581: 3702–3710
- [39] Deocaris C.C., Kaul S.C., Wadhwa R.: From proliferative to neurological role of an hsp70 stress chaperone, mortalin. *Biogerontology*, 2008; 9: 391–403
- [40] Dezaan D.C., Freeman B.C.: HSP90: the Rosetta stone for cellular protein dynamics? *Cell Cycle*, 2008; 7: 1006–1012
- [41] Doody A.D., Kovalchin J.T., Mihalyo M.A., Hagymasi A.T., Drake C.G., Adler A.J.: Glycoprotein 96 can chaperone both MHC class I- and class II-restricted epitopes for *in vivo* presentation, but selectively primes CD8+ T cell effector function. *J. Immunol.*, 2004; 172: 6087–6092
- [42] Dragovic Z., Broadley S.A., Shomura Y., Bracher A., Hartl F.U.: Molecular chaperones of the Hsp110 family act as nucleotide exchange factors of Hsp70s. *EMBO J.*, 2006; 25: 2519–2528
- [43] Du X.L., Jiang T., Wen Z.Q., Gao R., Cui M., Wang F.: Silencing of heat shock protein 70 expression enhances radiotherapy efficacy and inhibits cell invasion in endometrial cancer cell line. *Croat. Med. J.*, 2009; 50: 143–150

- [44] Easton D.P., Kaneko Y., Subject J.R. The Hsp110 and Grp170 stress proteins: newly recognized relatives of the Hsp70s. *Cell Stress Chaperones*, 2000; 5: 276–290
- [45] Fan M., Park A., Nephew K.P.: CHIP (carboxyl terminus of Hsc70-interacting protein) promotes basal and geldanamycin-induced degradation of estrogen receptor- $\alpha$ . *Mol. Endocrinol.*, 2005; 19: 2901–2914
- [46] Foster L.J., De Hoog C.L., Mann M.: Unbiased quantitative proteomics of lipid rafts reveals high specificity for signaling factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2003; 100: 5813–5818
- [47] Franzmann T.M., Wuhr M., Richter K., Walter S., Buchner J.: The activation mechanism of Hsp26 does not require dissociation of the oligomer. *J. Mol. Biol.*, 2005; 350: 1083–1093
- [48] Freeman B.C., Felts S.J., Toft D.O., Yamamoto K.R.: The p23 molecular chaperones act at a late step in intracellular receptor action to differentially affect ligand efficacies. *Genes Dev.*, 2000; 14: 422–434
- [49] Friedrich K.L., Giese K.C., Buan N.R., Vierling E.: Interactions between small heat shock protein subunits and substrate in small heat shock protein-substrate complexes. *J. Biol. Chem.*, 2004; 279: 1080–1089
- [50] Garrido C., Brunet M., Didelot C., Zermati Y., Schmitt E., Kroemer G.: Heat shock proteins 27 and 70: anti-apoptotic proteins with tumorigenic properties. *Cell Cycle*, 2006; 5: 2592–2601
- [51] Garrido C., Schmitt E., Candé C., Vahsen N., Parcellier A., Kroemer G.: HSP27 and HSP70: potentially oncogenic apoptosis inhibitors. *Cell Cycle*, 2003; 2: 579–584
- [52] Gastpar R., Gehrman M., Bausero M.A., Asea A., Gross C., Schroeder J.A., Multhoff G.: Heat shock protein 70 surface-positive tumor exosomes stimulate migratory and cytolytic activity of natural killer cells. *Cancer Res.*, 2005; 65: 5238–5247
- [53] Gross C., Hansch D., Gastpar R., Multhoff G.: Interaction of heat shock protein 70 peptide with NK cells involves the NK receptor CD94. *Biol. Chem.*, 2003; 384: 267–279
- [54] Gross C., Koelch W., DeMaio A., Arispé N., Multhoff G.: Cell surface-bound heat shock protein 70 (Hsp70) mediates perforin-independent apoptosis by specific binding and uptake of granzyme B. *J. Biol. Chem.*, 2003; 278: 41173–41181
- [55] Gusev N.B., Bukach O.V., Marston S.B.: Structure, properties and probable physiological role of small heat shock protein with molecular mass 20 kD (Hsp20, HspB6). *Biochemistry*, 2005; 70: 629–637
- [56] Habich C., Baumgart K., Kolb H., Burkart V.: The receptor for heat shock protein 60 on macrophages is saturable, specific, and distinct from receptors for other heat shock proteins. *J. Immunol.*, 2002; 168: 569–576
- [57] Harst A., Lin H., Obermann W.M.: Aha1 competes with Hop, p50 and p23 for binding to the molecular chaperone Hsp90 and contributes to kinase and hormone receptor activation. *Biochem. J.*, 2005; 387: 789–796
- [58] Hartl F.U., Hayer-Hartl M.: Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science*, 2002; 295: 1852–1858
- [59] Haslbeck M., Franzmann T., Weinfurter D., Buchner J.: Some like it hot: the structure and function of small heat-shock proteins. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 2005; 12: 842–846
- [60] Haslbeck M., Miess A., Stromer T., Walter S., Buchner J.: Disassembling protein aggregates in the yeast cytosol. The cooperation of Hsp26 with Ssa1 and Hsp104. *J. Biol. Chem.*, 2005; 280: 23861–23868
- [61] Hayes D., Napoli V., Mazurkiewicz A., Stafford W.F., Graceffa P.: Phosphorylation dependence of hsp27 multimeric size and molecular chaperone function. *J. Biol. Chem.*, 2009; 284: 18801–18807
- [62] Holbro T., Civenni G., Hynes N.E.: The ErbB receptors and their role in cancer progression. *Exp. Cell Res.*, 2003; 284: 99–110
- [63] Holmes J.L., Sharp S.Y., Hobbs S., Workman P.: Silencing of HSP90 cochaperone AHA1 expression decreases client protein activation and increases cellular sensitivity to the HSP90 inhibitor 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin. *Cancer Res.*, 2008; 68: 1188–1197
- [64] Horwitz J.: Alpha-crystallin. *Exp. Eye Res.*, 2003; 76: 145–153
- [65] Hostein I., Robertson D., DiStefano F., Workman P., Clarke P.A.: Inhibition of signal transduction by the Hsp90 inhibitor 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin results in cytoskeleton and apoptosis. *Cancer Res.*, 2001; 61: 4003–4009
- [66] Jakubowicz-Gil J., Gawron A.: Rozmieszczenie i rola białek szoku termicznego w komórce zwierzęcej. *Post. Biol. Kom.*, 1999; 26: 267–283
- [67] Jolly C., Morimoto R.I.: Role of the heat shock response and molecular chaperones in oncogenesis and cell death. *J. Natl. Cancer Inst.*, 2000; 92: 1564–1572
- [68] Kalinowska M., Garnarczyk W., Pietrowska M., Garrard W.T., Widlak P.: Regulation of the human apoptotic DNase/RNase endonuclease G: involvement of Hsp70 and ATP. *Apoptosis*, 2005; 10: 821–830
- [69] Kamal A., Thao L., Sensintaffar J., Zhang L., Boehm M.F., Fritz L.C., Burrows F.J.: A high-affinity conformation of Hsp90 confers tumour selectivity on Hsp90 inhibitors. *Nature*, 2003; 425: 407–410
- [70] Kappe G., Franck E., Verschuure P., Boelens W.C., Leunissen J.A., de Jong W.W.: The human genome encodes 10  $\alpha$ -crystallin-related small heat shock proteins: HspB1-10. *Cell Stress Chaperones*, 2003; 8: 53–61
- [71] Kato K., Ito H., Inaguma Y.: Expression and phosphorylation of mammalian small heat shock proteins. *Prog. Mol. Subcell. Biol.*, 2002; 28: 129–150
- [72] Kiliańska Z.M.: Apoptoza organizmów zwierzęcych. W: *Cytobiochemia*. Red.: Kłyszewko-Stefanowicz L. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 2002; 772–815
- [73] Kiliańska Z.M., Ptasieńska A.: Zmiany w jądrach komórkowych wywołane szokiem termicznym. *Acta Biochem. Biophys.*, 1999; 14: 103–122
- [74] Krawczyk Z., Lisowska K.: Regulacja ekspresji genów szoku termicznego hsp70i. *Post. Biochem.*, 2000; 46: 24–37
- [75] Lancaster G.I., Febbraio M.A.: Exosome-dependent trafficking of HSP70: a novel secretory pathway for cellular stress proteins. *J. Biol. Chem.*, 2005; 280: 23349–23355
- [76] Lanneau D., Brunet M., Frisan E., Solary E., Fontenay M., Garrido C.: Heat shock proteins: essential proteins for apoptosis regulation. *J. Cell. Mol. Med.*, 2008; 12: 743–761
- [77] Laskowska E.: Małe białka szoku termicznego – rola w apoptozie, karcinogenezie i chorobach związanych z agregacją białek. *Post. Biochem.*, 2007; 53: 19–26
- [78] Lehner T., Wang Y., Whittall T., McGowan E., Kelly C.G., Singh M.: Functional domains of HSP70 stimulate generation of cytokines and chemokines, maturation of dendritic cells and adjuvanticity. *Biochem. Soc. Trans.*, 2004; 32: 629–632
- [79] Lelj-Garolla B., Mauk A.G.: Self-association and chaperone activity of Hsp27 are thermally activated. *J. Biol. Chem.*, 2006; 281: 8169–8174
- [80] Li Y., Zhang T., Schwartz S.J., Sun D.: New developments in Hsp90 inhibitors as anti-cancer therapeutics: mechanisms, clinical perspective and more potential. *Drug Resist. Updat.*, 2009; 12: 17–27
- [81] Lüders J., Demand J., Höfeld J.: The ubiquitin-related BAG-1 provides a link between the molecular chaperones Hsc70/Hsp70 and the proteasome. *J. Biol. Chem.*, 2000; 275: 4613–4617
- [82] Mayer M.P., Bukau B.: Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2005; 62: 670–684
- [83] Ménoiret A., Chandawarkar R.Y., Srivastava P.K.: Natural autoantibodies against heat-shock proteins hsp70 and gp96: implications for immunotherapy using heat-shock proteins. *Immunology*, 2000; 101: 364–370
- [84] Meyer P., Prodromou C., Liao C., Hu B., Roe S.M., Vaughan C.K., Vlasic L., Panaretou B., Piper P.W., Pearl L.H.: Structural basis for recruitment of the ATPase activator Aha1 to the Hsp90 chaperone machinery. *EMBO J.*, 2004; 23: 1402–1410
- [85] Meyer P.N., Roychowdhury S., Kini A.R., Alkan S.: HSP90 inhibitor 17AAG causes apoptosis in ATRA-resistant acute promyelocytic leukemia cells. *Leuk. Res.*, 2008; 32: 143–149
- [86] Mogk A., Bukau B.: Molecular chaperones: structure of a protein disaggregase. *Curr. Biol.*, 2004; 14: 78–80
- [87] Mogk A., Deuring E., Vorderwülbecke S., Vierling E., Bukau B.: Small heat shock proteins, ClpB and the DnaK system form a functional triad in reversing protein aggregation. *Mol. Microbiol.*, 2003; 50: 585–595
- [88] Mosser D.D., Morimoto R.I.: Molecular chaperones and the stress of oncogenesis. *Oncogene*, 2004; 23: 2907–2918
- [89] Mounier N., Arrigo A.P.: Actin cytoskeleton and small heat shock proteins: how do they interact? *Cell Stress Chaperones*, 2002; 7: 167–176
- [90] Multhoff G.: Heat shock protein 70 (Hsp70): membrane location, export and immunological relevance. *Methods*, 2007; 43: 229–237
- [91] Nakagawa M., Tsujimoto N., Nakagawa H., Iwaki T., Fukumaki Y., Iwaki A.: Association of HSPB2, a member of the small heat shock protein family, with mitochondria. *Exp. Cell Res.*, 2001; 271: 161–168
- [92] Nakamoto H., Vigh L.: The small heat shock proteins and their clients. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2007; 64: 294–306
- [93] Narberhaus F.:  $\alpha$ -crystallin-type heat shock proteins: socializing minichaperones in the context of a multichaperone network. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 2002; 66: 64–93

- [94] Nelson G.M., Prapapanich V., Carrigan P.E., Roberts P.J., Riggs D.L., Smith D.F.: The heat shock protein 70 cochaperone hip enhances functional maturation of glucocorticoid receptor. *Mol. Endocrinol.*, 2004; 18: 1620–1630
- [95] Nikolay R., Wiederkehr T., Rist W., Kramer G., Mayer M.P., Bukau B.: Dimerization of the human E3 ligase CHIP via a coiled-coil domain is essential for its activity. *J. Biol. Chem.*, 2004; 279: 2673–2678
- [96] Nimmanapalli R., O'Bryan E., Kuhn D., Yamaguchi H., Wang H.G., Bhalla K.N.: Regulation of 17-AAG-induced apoptosis: role of Bcl-2, Bcl-XL, and Bax down-stream of 17-AAG-mediated down-regulation of Akt, Raf-1, and Src kinases. *Blood*, 2003; 102: 269–275
- [97] Nollen E.A., Kabakov A.E., Brunsting J.F., Kanon B., Höhfeld J., Kampinga H.H.: Modulation of *in vivo* HSP70 chaperone activity by Hip and Bag-1. *J. Biol. Chem.*, 2001; 276: 4677–4682
- [98] Oh H.J., Easton D., Murawski M., Kaneko Y., Subjeck J.R.: The chaperoning activity of hsp110. Identification of functional domains by use of targeted deletions. *J. Biol. Chem.*, 1999; 274: 15712–15718
- [99] Onuoha S.C., Coulstock E.T., Grossmann J.G., Jackson S.E.: Structural studies on the co-chaperone Hop and its complexes with Hsp90. *J. Mol. Biol.*, 2008; 379: 732–744
- [100] Palotai R., Szalay M.S., Csermely P.: Chaperones as integrators of cellular networks: changes of cellular integrity in stress and diseases. *IUBMB Life*, 2008; 60: 10–18
- [101] Panaretou B., Siligardi G., Meyer P., Maloney A., Sullivan J.K., Singh S., Millson S.H., Clarke P.A., Naaby-Hansen S., Stein R., Cramer R., Mollapour M., Workman P., Piper P.W., Pearl L.H., Prodromou C.: Activation of the ATPase activity of hsp90 by the stress-regulated co-chaperone aha1. *Mol. Cell*, 2002; 10: 1307–1318
- [102] Panasenko O.O., Kim M.V., Marston S.B., Gusev N.B.: Interaction of the small heat shock protein with molecular mass 25 kDa (hsp25) with actin. *Eur. J. Biochem.*, 2003; 270: 892–901
- [103] Panjwani N.N., Popova L., Srivastava P.K.: Heat shock proteins gp96 and hsp70 activate the release of nitric oxide by APCs. *J. Immunol.*, 2002; 168: 2997–3003
- [104] Parcellier A., Schmitt E., Gurbuxani S., Seigneurin-Berny D., Pance A., Chantome A., Plenchette S., Khochbin S., Solary E., Garrido C.: HSP27 is a ubiquitin-binding protein involved in I- $\kappa$ B $\alpha$  proteasomal degradation. *Mol. Cell. Biol.*, 2003; 23: 5790–5802
- [105] Pearl L.H., Prodromou C., Workman P.: The Hsp90 molecular chaperone: an open and shut case for treatment. *Biochem. J.*, 2008; 410: 439–453
- [106] Petrucelli L., Dickson D., Kehoe K., Taylor J., Snyder H., Grover A., De Lucia M., McGowan E., Lewis J., Prihar G., Kim J., Dillmann W.H., Browne S.E., Hall A., Voellmy R., Tsuboi Y., Dawson T.M., Wolozin B., Hardy J., Hutton M.: CHIP and Hsp70 regulate  $\tau$  ubiquitination, degradation and aggregation. *Hum. Mol. Genet.*, 2004; 13: 703–714
- [107] Picard D.: Chaperoning steroid hormone action. *Trends Endocrinol. Metab.*, 2006; 17: 229–235
- [108] Pivovarova A.V., Chebotareva N.A., Chernik I.S., Gusev N.B., Levitsky D.I.: Small heat shock protein Hsp27 prevents heat-induced aggregation of F-actin by forming soluble complexes with denatured actin. *FEBS J.*, 2007; 274: 5937–5948
- [109] Polanowska-Grabowska R., Gear A.R.: Heat shock proteins and platelet function. *Platelets*, 2000; 11: 6–22
- [110] Polier S., Dragovic Z., Hartl F.U., Bracher A.: Structural basis for the cooperation of Hsp70 and Hsp110 chaperones in protein folding. *Cell*, 2008; 133: 1068–1079
- [111] Powers M.V., Clarke P.A., Workman P.: Dual targeting of HSC70 and HSP72 inhibits HSP90 function and induces tumor-specific apoptosis. *Cancer Cell*, 2008; 14: 250–262
- [112] Powers M.V., Workman P.: Targeting of multiple signaling pathways by heat shock protein 90 molecular chaperone inhibitors. *Endocr. Relat. Cancer*, 2006; 13(Suppl.1): 125–135
- [113] Powers M.V., Workman P.: Inhibitors of the heat shock response: biology and pharmacology. *FEBS Lett.*, 2007; 581: 3758–3769
- [114] Pratt W.B., Galigniana M.D., Morishima Y., Murphy P.J.: Role of molecular chaperones in steroid receptor action. *Essays Biochem.*, 2004; 40: 41–58
- [115] Pratt W.B., Toft D.O.: Regulation of signaling protein function and trafficking by the hsp90/hsp70-based chaperone machinery. *Exp. Biol. Med.*, 2003; 228: 111–133
- [116] Prodromou C., Panaretou B., Chohan S., Siligardi G., O'Brien R., Ladbury J.E., Roe S.M., Piper P.W., Pearl L.H.: The ATPase cycle of Hsp90 drives a molecular 'clamp' via transient dimerization of the N-terminal domains. *EMBO J.*, 2000; 19: 4383–4392
- [117] Qiu X.B., Shao Y.M., Miao S., Wang L.: The diversity of the DnaJ/Hsp40 family, the crucial partners for Hsp70 chaperones. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2006; 63: 2560–2570
- [118] Read D.E., Gorman A.M.: Heat shock protein 27 in neuronal survival and neurite outgrowth. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2009; 382: 6–8
- [119] Richter K., Reinstein J., Buchner J.: N-terminal residues regulate the catalytic efficiency of the Hsp90 ATPase cycle. *J. Biol. Chem.*, 2002; 277: 44905–44910
- [120] Richter K., Soroka J., Skalniak L., Leskovaar A., Hessling M., Reinstein J., Buchner J.: Conserved conformational changes in the ATPase cycle of human Hsp90. *J. Biol. Chem.*, 2008; 283: 17757–17765
- [121] Riezman H.: Why do cells require heat shock proteins to survive heat stress? *Cell Cycle*, 2004; 3: 61–63
- [122] Riggs D.L., Cox M.B., Cheung-Flynn J., Prapapanich V., Carrigan P.E., Smith D.F.: Functional specificity of co-chaperone interactions with Hsp90 client proteins. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, 2004; 39: 279–295
- [123] Riggs D.L., Roberts P.J., Chirillo S.C., Cheung-Flynn J., Prapapanich V., Ratajczak T., Gaber R., Picard D., Smith D.F.: The Hsp90-binding peptidylprolyl isomerase FKBP52 potentiates glucocorticoid signaling *in vivo*. *EMBO J.*, 2003; 22: 1158–1167
- [124] Ritossa F.: A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila melanogaster*. *Experientia*, 1962; 18: 571–573
- [125] Roe S.M., Ali M.M., Meyer P., Vaughan C.K., Panaretou B., Piper P.W., Prodromou C., Pearl L.H.: The Mechanism of Hsp90 regulation by the protein kinase-specific cochaperone p50(cdc37). *Cell*, 2004; 116: 87–98
- [126] Sakahira H., Nagata S.: Co-translational folding of caspase-activated DNase with Hsp70, Hsp40, and inhibitor of caspase-activated DNase. *J. Biol. Chem.*, 2002; 277: 3364–3370
- [127] Schild H., Rammensee H.G. gp96 – the immune system's Swiss army knife. *Nat. Immunol.*, 2000; 1: 100–101
- [128] Schmitt E., Gehrman M., Brunet M., Multhoff G., Garrido C.: Intracellular and extracellular functions of heat shock proteins: repercussions in cancer therapy. *J. Leukoc. Biol.*, 2007; 81: 15–27
- [129] Schuermann J.P., Jiang J., Cuellar J., Llorca O., Wang L., Gimenez L.E., Jin S., Taylor A.B., Demeler B., Morano K.A., Hart P.J., Valpuesta M.J., Lafer E.M., Sousa R.: Structure of the Hsp110:Hsc70 nucleotide exchange machine. *Mol. Cell.*, 2008; 31: 232–243
- [130] Siligardi G., Hu B., Panaretou B., Piper P.W., Pearl L.H., Prodromou C.: Co-chaperone regulation of conformational switching in the Hsp90 ATPase cycle. *J. Biol. Chem.*, 2004; 279: 51989–51998
- [131] Shin B.K., Wang H., Yim A.M., Le Naour F., Brichory F., Jang J.H., Zhao R., Puravs E., Tra J., Michael C.W., Misek D.E., Hanash S.M.: Global profiling of the cell surface proteome of cancer cells uncovers an abundance of proteins with chaperone function. *J. Biol. Chem.*, 2003; 278: 7607–7616
- [132] Smith D.F.: Tetratricopeptide repeat cochaperones in steroid receptor complexes. *Cell Stress Chaperones*, 2004; 9: 109–121
- [133] Somersan S., Larsson M., Fonteneau J.F., Basu S., Srivastava P., Bhardwaj N.: Primary tumor tissue lysates are enriched in heat shock proteins and induce the maturation of human dendritic cells. *J. Immunol.*, 2001; 167: 4844–4852
- [134] Söti C., Csermely P.: Aging cellular networks: Chaperones as major participants. *Exp. Gerontol.*, 2007; 42: 113–119
- [135] Söti C., Pál C., Papp B., Csermely P.: Molecular chaperones as regulatory elements of cellular networks. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 2005; 17: 210–215
- [136] Sreedhar A.S., Kalmár E., Csermely P., Shen Y.F.: Hsp90 isoforms: functions, expression and clinical importance. *FEBS Lett.*, 2004; 562: 11–15
- [137] Stromer T., Ehrnsperger M., Gaestel M., Buchner J.: Analysis of the interaction of small heat shock proteins with unfolding proteins. *J. Biol. Chem.*, 2003; 278: 18015–18021
- [138] Sun Y., MacRae T.H.: Small heat shock proteins: molecular structure and chaperone function. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2005; 62: 2460–2476
- [139] Sun Y., MacRae T.H.: The small heat shock proteins and their role in human disease. *FEBS J.*, 2005; 272: 2613–2627

- [140] Szalay M.S., Kovács I.A., Korcsmáros T., Böde C., Csermely P.: Stress-induced rearrangements of cellular networks: Consequences for protection and drug design. *FEBS Lett.*, 2007; 581: 3675–3680
- [141] Szerafin T., Hoetzenecker K., Hacker S., Horvath A., Pollreis Z., Arpád P., Mangold A., Wlisczek T., Dworschak M., Seitelberger R., Wolner E., Ankersmit H.J.: Heat shock proteins 27, 60, 70, 90 $\alpha$ , and 20S proteasome in on-pump versus off-pump coronary artery bypass graft patients. *Ann. Thorac. Surg.*, 2008; 85: 80–87
- [142] Tago K., Tsukahara F., Naruse M., Yoshioka T., Takano K.: Regulation of nuclear retention of glucocorticoid receptor by nuclear Hsp90. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 2004; 213: 131–138
- [143] Takayama S., Reed J., Homma S.: Heat-shock proteins as regulators of apoptosis. *Oncogene*, 2003; 22: 9041–9047
- [144] Taylor R.P., Benjamin I.J.: Small heat shock proteins: a new classification scheme in mammals. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 2005; 38: 433–444
- [145] Townsend P.A., Stephanou A., Packham G., Latchman D.S.: BAG-1: a multi-functional pro-survival molecule. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 2005; 37: 251–259
- [146] Turner C.P., Panter S.S., Sharp F.R.: Anti-oxidants prevent focal rat brain injury as assessed by induction of heat shock proteins (HSP70, HO-1/HSP32, HSP47) following subarachnoid injections of lysed blood. *Mol. Brain Res.*, 1999; 65: 87–102
- [147] Vabulas R.M., Ahmad-Nejad P., da Costa C., Miethke T., Kirschning C.J., Häcker H., Wagner H.: Endocytosed HSP60s use toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 to activate the toll/interleukin-1 receptor signaling pathway in innate immune cells. *J. Biol. Chem.*, 2001; 276: 31332–31339
- [148] Vabulas R.M., Braedel S., Hilf N., Singh-Jasuja H., Herter S., Ahmad-Nejad P., Kirschning C.J., Da Costa C., Rammensee H.G., Wagner H., Schild H.: The endoplasmic reticulum-resident heat shock protein Gp96 activates dendritic cells via the Toll-like receptor 2/4 pathway. *J. Biol. Chem.*, 2002; 277: 20847–20853
- [149] Van Montfort R., Slingsby C., Vierling E.: Structure and function of the small heat shock protein/ $\alpha$ -crystallin family of molecular chaperones. *Adv. Protein Chem.*, 2001; 59: 105–156
- [150] Vigh L., Escribá P.V., Sonnleitner A., Sonnleitner M., Piotto S., Maresca B., Horváth I., Harwood J.L.: The significance of lipid composition for membrane activity: new concepts and ways of assessing function. *Prog. Lipid Res.*, 2005; 44: 303–344
- [151] Vigh L., Horváth I., Maresca B., Harwood J.L.: Can the stress protein response be controlled by 'membrane-lipid therapy'? *Trends Biochem. Sci.*, 2007; 32: 357–363
- [152] Wadhwa R., Kaul S.C., Mitsui Y., Sugimoto Y.: Differential subcellular distribution of mortalin in mortal and immortal mouse and human fibroblasts. *Exp. Cell Res.*, 1993; 207: 442–448
- [153] Wadhwa R., Taira K., Kaul S.C.: An Hsp70 family chaperone, mortalin/mthsp70/PBP74/Grp75: what, when, and where? *Cell Stress Chaperones*, 2002; 7: 309–316
- [154] Wadhwa R., Takano S., Kaur K., Aida S., Yaguchi T., Kaul Z., Hirano T., Taira K., Kaul S.C.: Identification and characterization of molecular interactions between mortalin/mthsp70 and HSP60. *Biochem. J.*, 2005; 391: 185–190
- [155] Walter S., Buchner J.: Molecular chaperones – cellular machines for protein folding. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 2002; 41: 1098–1113
- [156] Wang Y., Kelly C.G., Singh M., McGowan E.G., Carrara A.S., Bergmeier L.A., Lehner T.: Stimulation of Th1-polarizing cytokines, C-C chemokines, maturation of dendritic cells, and adjuvant function by the peptide binding fragment of heat shock protein 70. *J. Immunol.*, 2002; 169: 2422–2429
- [157] Wilhelmus M.M., Boelens W.C., Otte-Höller I., Kamps B., de Waal R.M., Verbeek M.M.: Small heat shock proteins inhibit amyloid- $\beta$  protein aggregation and cerebrovascular amyloid- $\beta$  protein toxicity. *Brain Res.*, 2006; 1089: 67–78
- [158] Willisie J.K., Clegg J.S.: Small heat shock protein p26 associates with nuclear lamins and HSP70 in nuclei and nuclear matrix fractions from stressed cells. *J. Cell. Biochem.*, 2002; 84: 601–614
- [159] Wochnik G.M., Rüegg J., Abel G.A., Schmidt U., Holsboer F., Rein T.: FK506-binding proteins 51 and 52 differentially regulate dynein interaction and nuclear translocation of the glucocorticoid receptor in mammalian cells. *J. Biol. Chem.*, 2005; 280: 4609–4616
- [160] Wochnik G.M., Young J.C., Schmidt U., Holsboer F., Hartl F.U., Rein T.: Inhibition of GR-mediated transcription by p23 requires interaction with Hsp90. *FEBS Lett.*, 2004; 560: 35–38
- [161] Wu T., Tanguay R.M.: Antibodies against heat shock proteins in environmental stresses and diseases: friend or foe? *Cell Stress Chaperones*, 2006; 11: 1–12
- [162] Yin H., Wang H., Zong H., Chen X., Wang Y., Yun X., Wu Y., Wang J., Gu J.: SGT, a Hsp90 $\beta$  binding partner, is accumulated in the nucleus during cell apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2006; 343: 1153–1158
- [163] Young J.C., Agashe V.R., Siegers K., Hartl F.U.: Pathways of chaperone-mediated protein folding in the cytosol. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2004; 5: 781–791

---

Autorki deklaruja brak potencjalnych konfliktow interesow.