

Received: 2010.01.14  
Accepted: 2010.05.11  
Published: 2010.06.09

## Rola białek szoku cieplnego w apoptozie komórek\*

### Role of heat shock proteins in cell apoptosis

Arleta Kaźmierczuk, Zofia M. Kiliańska

Zakład Biochemii Medycznej, Katedra Cytobiochemii, Uniwersytet Łódzki, Łódź

#### Streszczenie

Apoptoza – śmierć programowana – jest oprócz nekrozy i autofagii jednym z możliwych sposobów śmierci, dzięki któremu dochodzi do eliminacji z organizmu komórek zbędnych, nieprawidłowych, błędnie umiejscowionych czy zainfekowanych. Proces ten zapewnia organizmowi kontrolę jakościową i ilościową komórek. Proces śmierci programowanej jest ściśle regulowany – wymaga aktywacji wielu genów i nakładu energii. Dotychczas dobrze poznano dwa główne szlaki apoptozy, tj. zewnętrzny/receptorowy, związany z błoną komórkową i wewnętrzny/mitochondrialny przebiegający z udziałem mitochondriów. W przebiegu śmierci programowanej komórki istotne funkcje odgrywają białka szoku cieplnego – HSPs (heat shock protein), znane z właściwości opiekuńczych i konserwatywności molekularnej. Wśród tej rodziny białek, do której zaliczamy podrodziny HSP100, HSP90, HSP70, HSP60 i HSP40 oraz małopcząsteczkowe – sHSP (small), znajdują się głównie czynniki chroniące komórki przed śmiercią programowaną. Jednak niektóre z nich, w określonych warunkach i typach komórek, stanowią modulatory sprzyjające przebiegowi apoptozy. W artykule przedstawiono interakcje podstawowych białek apoptotycznych z głównymi przedstawicielami podrodzin HSP i omówiono konsekwencje tych zdarzeń dla przeżycia bądź śmierci komórek.

Słowa kluczowe:

apoptoza • HSPs • mitochondria • kaspazy • receptory śmierci • transdukcja sygnału

#### Summary

Apoptosis is, apart from necrosis and autophagy, one of the possible cell death mechanisms eliminating needless, not normal or infected cells. This process ensures quantitative and qualitative cell control of organisms. Apoptosis is tightly regulated, it requires both activation of a large number of genes and energy input. Up-to-date two main apoptotic pathways have been recognized – external/receptor and internal, processed with the participation of mitochondria. Heat shock proteins HSPs, the molecules known from their chaperone activity and molecular conservatism, play essential functions in the course of apoptosis. Among that proteins family, i.e. HSP100, 90, 70, 60, 40 and small molecular (sHSP), there are agents mainly protective against programmed cell death. However, in some conditions some of these proteins may promote apoptosis. This review describes different key apoptotic proteins interacting with main members of HSP family and the consequence of these events for cell survival or apoptosis.

Key words:

apoptosis • HSPs • mitochondria • caspases • death receptors cell • cell signalling

Full-text PDF:

<http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=911831>

\* Praca wykonana w ramach grantu objętego Decyzją MNiSzW nr 298/N-Austria/2008/0 oraz projektu własnego UE (umowa nr 505/0375).

**Word count:** 5326  
**Tables:** –  
**Figures:** 1  
**References:** 74

**Adres autorki:** prof. dr hab. Zofia M. Kiliańska, Zakład Biochemii Medycznej, Katedra Cytochemii Uniwersytetu Łódzkiego, ul. Banacha 12/16, 90-237 Łódź; e-mail: zkilian@biol.uni.lodz.pl

**Wykaz skrótów:** **AIF** – czynnik indukujący apoptozę (apoptosis inducing factor); **Apaf-1** – czynnik aktywujący proteazy w apoptozie (apoptosis protease activating factor-1); **Ask-1** – kinaza należąca do kaskady MAPK (apoptosis signal-regulating kinase-1); **Bcl-2** – rodzina endogennych białkowych regulatorów apoptozy (B-cell leukemia/lymphoma-2); **CAD** – (caspase activated DNase); **CDC37** – białko współopiekuńcze, oddziałuje z HSP90 (cell division cycle 37); **DISC** – kompleks sygnalizacyjny na szlaku receptorowym apoptozy (death-inducing signaling complex); **Endo G** – endonukleaza G (endonuclease G); **FLIP** – białko antyapoptotyczne, hamuje kaspazę 8 (FLICE inhibitory protein); **Her2** – czynnik wzrostu naskórka, czynnik transkrypcyjny (human homolog ERB2); **HIF1 $\alpha$**  – czynnik indukowany hipoksją, czynnik transkrypcyjny (hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ ); **IAPs** – białko z rodziny inhibitorów apoptozy (inhibitory apoptosis proteins); **I $\kappa$ B $\alpha$**  – inhibitor czynnika transkrypcyjnego NF- $\kappa$ B; **IKK** – kinaza inhibitora NF- $\kappa$ B (I $\kappa$ B kinase); **MPTP** – megakanał mitochondrialny (mitochondrial permeability transition pore); **NF- $\kappa$ B** – czynnik jądrowy  $\kappa$ B zidentyfikowany w limfocytach B (nuclear factor  $\kappa$ B); **Omi/Htr2** – proteaza serynowa (high temperature requiring protein A2); **PARP** – polimeraza poli(ADP-rybozy), (poli(ADP-ribose) polymerase); **PCD** – śmierć programowana komórki (programmed cell death); **PKB/Akt** – kinaza białkowa B opisywana także symbolem Akt (protein kinase B); **Raf-1** – kinaza białkowa serynowo-treoninowa szlaku MAPK, oddziałuje z białkami rodziny Ras (RAF protooncogene serine/threonine protein kinase); **RIP** – białko oddziałujące z receptorem Fas; kinaza ser/thr (receptor interacting protein); **ROS** – reaktywne formy tlenu (reactive oxygen species); **SAPK/JNK** – kinaza białkowa MAPK aktywowana przez stres/fosforylująca N-koniec białka Jun (stress-activated protein kinase/Jun N-terminal kinase); **SEK** – kinaza aktywowana stresem (SAPK/ERK kinase-1); **Smac/DIABLO** – białko proapoptotyczne; wtórny mitochondrialny aktywator kaspazy/białko wiążące IAP o niskim pI (second mitochondrial activator of caspase/direct IAP binding protein with low pI); **STAT 1-5** – czynniki transkrypcyjne (signal transduced and activator of transcription 1-5); **tBid** – skrócona forma białka Bid (truncated Bid); **TNF** – czynnik martwicy nowotworu (tumor necrosis factor); **TRAIL-R** – receptor dla liganda martwicy nowotworu indukującego apoptozę (TNF-related apoptosis-inducing ligand-receptor).

## WSTĘP

Apoptoza – proces genetycznie planowanych zdarzeń, opisywany jako śmierć programowana komórki – PCD (programmed cell death) stanowi istotny szlak sygnalizacji komórkowej. Do przebiegu tego procesu nieodzowna jest aktywacja wielu genów, ekspresja białek regulatorowych i wykonawczych oraz nakład energii. Ten aktywny i wysoce uporządkowany proces zapewnia usuwanie z organizmu komórek niepotrzebnych, szkodliwych czy zainfekowanych, co odbywa się bez indukcji stanu zapalnego i uszkodzenia sąsiadujących komórek. Śmierć programowana zapewnia prawidłową homeostazę [34,45,49]. Apoptozę indukują różne sygnały – bodźce fizjologiczne i patologiczne – zarówno zewnątrzkomórkowe, jak i pochodzenia wewnątrzkomórkowego. W przebiegu apoptozy komórek wyróżnia się następujące fazy:

- inicjatorową, związaną z odbiorem sygnału/ów śmierci;
- wykonawczą, w której różne sygnały zostają przekazane do „maszyny” odpowiedzialnej za proteolizę i nukleolizę organelli komórkowych, aktywacji enzymów wykonawczych;

- zniszczenia, podczas której dochodzi do degradacji struktur i składników komórkowych, wytworzenia tzw. ciałek apoptotycznych i ich fagocytozy.

Uważa się, że śmierć programowana komórek przebiega na dwóch głównych szlakach, tj. zewnętrznym/receptorowym i wewnętrznym/mitochondrialnym. W niektórych typach komórek fragmenty tych szlaków są zbieżne [35,49]. Apoptoza może być zainicjowana sygnałami zewnątrzkomórkowymi (ligandami) przez rozpoznanie i aktywację receptorów śmierci (death receptors) umiejscowionych w błonie komórkowej bądź na szlaku wewnątrzkomórkowym, gdy po uzyskaniu przez mitochondria sygnału dochodzi do zmiany potencjału błonowego tych organelli, formowania megakanałów czy porów, przez które do cytosolu wypływają białka apoptogenne [6,21,34,49,68].

Wśród receptorów śmierci wyróżnia się cytokiny z rodziny TNF (tumor necrosis factor) np. TNFR-1, Fas/CD95/APO-1, TRAIL-R (TNF-related apoptosis-inducing ligand-receptor), które po rozpoznanie odpowiedniego liganda i zmianach strukturalnych (trimeryzacja receptora)



przekazują sygnał poprzez domenę śmierci DD (death domain) na białko adaptorowe, np. TRADD (TNF-R1 associated death domain), FADD (Fas-associated death domain), RIP (receptor interacting protein). Białka odbierające sygnał z receptorów zawierają na N-końcu łańcucha domenę efektorową śmierci DED (death effector domain), dzięki której w tzw. kompleksie DISC (death-inducing signaling complex)/receptorosomie, dochodzi do rozpoznania białka efektorowego – prokaspazy 8 (lub 10) przez jej N-końcową domenę DED. Aktywacja kaspazy 8/10 rozpoczyna proteolizę enzymów i białek struktur komórkowych, która często przebiega kaskadowo. Zmianom tym towarzyszy nukleoliza przebiegająca stopniowo, której wymiernym następstwem jest tzw. „drabinka apoptotyczna” [34,63,67].

Szlak wewnętrzny jest związany ze zmianami przepuszczalności błon mitochondriów po indukcji, m.in. czynnikami genotoksycznymi, stresogennymi, wzrostem poziomu reaktywnych form tlenu – ROS (reactive oxygen species), zmianami poziomu jonów  $Ca^{2+}$  [49]. W wielu typach komórek transdukcja sygnału śmierci wiąże się z aktywnością tzw. megakanalów mitochondrialnych (mitochondrial permeability transition pore – MPTP). Struktury te tworzą wielobiałkowe kompleksy – składniki zarówno zewnętrznej, jak i wewnętrznej błony mitochondrialnej, z którymi oddziałują czynniki regulatorowe rodziny Bcl-2 (B-cell leukemia/lymphoma-2). Wśród polipeptydów tej rodziny znajdują się aktywatory i inhibitory apoptozy [7,10,34]. W komórkach apoptotycznych dochodzi do otwierania MPTP, co wywołuje m.in. spadek potencjału transbłonowego ( $\Delta\Psi_m$ ) wypływ z macierzy mitochondrialnej jonów  $Ca^{2+}$ , spadek poziomu zredukowanego glutationu i uwolnienie z przestrzeni międzybłonowej mitochondriów ponad 40 białek regulatorowych i wykonawczych apoptozy m.in.: AIF (apoptosis inducing factor), IAPs (inhibitor apoptosis proteins), cytochrom c, prokaspazy, Smac/DIABLO (second mitochondrial activator of caspase/direct IAP binding protein with low pI), proteaza serynowa Omi/Htr2 (high temperature requiring protein A2) czy endonukleaza G (Endo G) [6,53,68,69]. Na szlaku mitochondrialnym, uwolniony z przestrzeni mitochondrialnej cytochrom c stanowi czynnik promujący powstanie kompleksu zwanego apoptosomem. Kompleks ten tworzą cząsteczki: cytochromu c, białka cytosolowego Apaf-1 (apoptosis protease activating factor-1) i prokaspazy 9 w obecności źródła energii w postaci ATP/dATP [8,34,68,73]. Aktywacja prokaspazy 9 w wyniku ograniczonej proteolizy może aktywować prokaspazę 3 lub prokaspazę 7, które z kolei aktywują kaskady kaspaz i proteolizy białek komórkowych. Akceptuje się pogląd, że kaspazy 3 i 7 mogą inicjować aktywację innych enzymów np. kalpajny czy endonukleazy CAD (caspase activated DNase), które są związane z proteolizą czy nukleolizą składników komórkowych, towarzyszącą apoptozie [37,63,67].

W apoptozie przebiegającej na szlaku zewnętrznym istotną rolę pełnią – kaspaza 8 i 10, a na szlaku wewnętrznym – kaspaza 9, które aktywują kaspazy wykonawcze: 3, 6, 7 [7,35,37]. Molekularnym łącznikiem szlaku receptorowego i mitochondrialnego apoptozy jest białko Bid (BH3 interacting domain) – przedstawiciel białek rodziny Bcl-2, które ulega proteolizie dokonywanej przez kaspazę 8/10. To proteolityczne cięcie uwalnia fragment tBid (truncated Bid; Bid p15) [23], który przyłącza się do zaktywowanych

cząsteczek białka Bax czy Bak na powierzchni mitochondriów i odpowiada za powstanie porów w błonach tych organeli, przez które wypływa cytochrom c, a następnie formuje się apoptosom [34,64,71].

Na podkreślenie zasługują doniesienia, że lizosomy mogą także uczestniczyć w śmierci programowanej, zainicjowanej aktywacją receptorów śmierci czy działaniem leków. W ich błonie mogą powstawać kanały, przez które w komórkach apoptotycznych wypływają enzymy lizosomalne, a także protony  $H^+$ . Obniżenie pH w komórkach jest czynnikiem aktywującym szlak wewnętrzny [9,29,47].

Apoptozie komórek towarzyszy wiele zmian morfologicznych, w tym: obkurczanie komórki, zmiany w błonie cytoplazmatycznej, fragmentacja jąder i cytoplazmy, formowanie ciałek apoptotycznych oraz zmian biochemicznych, m.in. aktywacja kaspaz, kalpain, kinaz/fosfatyz białkowych, nukleaz z następczą fragmentacją DNA, synteza RNA i białek niezbędnych w realizacji określonego programu genetycznego. Nieprawidłowa regulacja procesu apoptozy i zachwianie równowagi między proliferacją komórek i ich śmiercią stanowi główny element w rozwoju wielu chorób, w tym nowotworów [34].

Białka szoku cieplnego – HSPs (heat shock proteins) wykazują właściwości zarówno pro- jak i antyapoptotyczne, a dzięki roli opiekuńczej są zdolne wiązać się i oddziaływać z wieloma czynnikami komórkowymi. Cząsteczki te wpływają na rozkład zdenaturowanych białek lub ułatwiają poprawne fałdowanie polipeptydów o zaburzonej konformacji przestrzennej [33]. Poziom ekspresji HSP decyduje o losie komórek, gdyż te biomolekuły mogą kierować je na drogę apoptozy bądź szlak przeżycia [7,24,45]. Polipeptydy te mogą modulować proces programowanej śmierci we wczesnych jej etapach, poprzez wyciszanie ekspresji genów, które kodują cząsteczki zdolne do odbioru sygnału śmierci. Ponadto HSP mogą hamować aktywność białek fazy wykonawczej apoptozy. Dzięki ich aktywności dochodzi do osłabienia lub blokowania sygnałów śmierci, ograniczania aktywacji białek związanych z przebiegiem apoptozy przez zatrzymanie lub naprawę uszkodzeń komórkowych wywołanych przez działanie stresorów. Należy podkreślić, że opisywane białka w różny sposób oddziałują z cząsteczkami biorącymi udział w szlakach przeżycia lub śmierci programowanej i odbywa się to na określonych etapach. Przeważa pogląd, że nadekspresja HSP zapobiega apoptozie indukowanej różnymi czynnikami [53,60,65,66], a endogenny ich poziom wystarcza, aby kontrolować ten proces. Ponadto uważa się, że inhibicja ekspresji większości przedstawicieli HSP wystarcza by „uwarżliwić” komórki na apoptozę [14,40,71,72].

Hamowanie apoptozy przez białka opiekuńcze polega na ograniczeniu proteolitycznego dojrzewania, aktywacji i/albo aktywności w pełni funkcjonalnych kaspaz. Nadekspresja HSP27, HSP60, HSP70 i HSP90 zapobiega aktywacji tych proteaz cysteinowych w wielu typach komórek w warunkach, gdy dochodzi do nagromadzenia nieprawidłowo zwiniętych białek lub uszkodzeń DNA, wywołanych przez różne stresory m.in. ROS [1,45,67]. Z kolei, spadek poziomu ich ekspresji wywołany obecnością w układzie np. anty-sensorych nukleotydów lub krótkich interferencyjnych RNA (small interference RNA – siRNA), które wyciszają

transkrypcję genów *HSP*, powoduje wzrost wrażliwości komórek na apoptozę [32].

Ponadto HSP pośrednio bądź bezpośrednio uczestniczą w regulacji aktywności kaspaz. Polipeptydy te mogą hamować główne szlaki apoptozy zarówno wewnętrzny, jak i zewnętrzny, poprzez oddziaływanie z ich głównymi białkami, co odbywa się na następujących poziomach: modulacji transdukcji sygnału; szlaku mitochondrialnego – HSP kontrolują proces uwalniania czynników apoptotycznych z mitochondriów; zdarzeń postmitochondrialnych – białka opiekuńcze wykazują zdolność do hamowania późnej fazy apoptozy, czego nie wykazują inne białka czy czynniki wpływające na wzrost przeżycia komórek w warunkach stresu [3,37].

## ROLA PODRODZIN HSP W PRZEBIEGU APOPTOZY

### HSP90

#### Modulacja transdukcji sygnału śmierci

Białko HSP90 może modulować aktywność i stabilność wielu czynników transkrypcyjnych i kinaz związanych z apoptozą m.in. NF- $\kappa$ B (nuclear factor  $\kappa$ B), p53, PKB/Akt (protein kinase B) [4,62], Raf-1 [55,56] czy SAPK/JNK (stress-activated protein kinase/Jun N-terminal kinase) [7,36,37,67] (ryc. 1). Polipeptyd ten reguluje szlak z udziałem NF- $\kappa$ B – czynnikiem transkrypcyjnym warunkującym przeżycie komórek, poprzez tworzenie kompleksu z kinazą IKK (IK $\beta$  kinase). Interakcję HSP90-IKK wzmacnia białko Cdc37 (cell division cycle 37), które jest nieodzowne do aktywacji NF- $\kappa$ B w szlaku indukowanym przez TNF- $\alpha$  [2,15,63]. Inhibicja HSP90 zapobiega aktywacji IKK poprzez TNF- $\alpha$ , dzięki czemu dochodzi do indukcji NF- $\kappa$ B. Do białek modulowanych przez HSP90 zalicza się Her2 (human homolog ERB2), HIF1 $\alpha$  (hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ ) oraz STAT3 [14,37,63]. Cząsteczki HSP90 stabilizują także kinazę RIP (receptor interacting protein), która po związaniu receptora TNFR-1 promuje aktywację czynnika NF- $\kappa$ B oraz kinazy SAPK/JNK. Degradacja RIP w przypadku braku lub inhibicji HSP90 uniemożliwia aktywację NF- $\kappa$ B, na szlaku z udziałem TNF- $\alpha$ , co uwrażliwia komórki na apoptozę [41].

Przedstawiono dowody, że HSP90 może również oddziaływać z produktem genu supresorowego – p53, przyczyniając się do skierowania komórek na szlak przeżycia. HSP90 może wchodzić w interakcję z produktem zmutowanego genu p53, stabilizując go. W przewlekłych białaczkach hamowanie HSP90 zwiększa aktywność dzikiego typu p53, a zmniejsza zmutowanego p53, co prowadzi do indukcji apoptozy. Ponadto białko p53 może ograniczać ekspresję genu *HSP90 $\alpha$*  w komórkach ekspozowanych na działanie UV, wywołując programowaną śmierć komórki [37,38]. Polipeptyd HSP90 stabilizuje ufosforylowaną postać kinazy serynowo-treoninowej – PKB/Akt [4,62], dzięki czemu ten może modyfikować proapoptotyczne białko rodziny Bcl-2 – Bad oraz kaspazę 9, co prowadzi do ich unieczynnienia, a w konsekwencji hamuje apoptozę. Inhibicja HSP90 indukuje apoptozę poprzez supresję aktywności tej kinazy [38,62]. Wiązanie PKB/Akt przez HSP90 chroni enzym przed defosforylacją, którą dokonuje białkowa fosfataza A<sub>2</sub> (PPA<sub>2</sub>) [4]. Wspomniana kinaza

może fosforylować również inhibitor I $\kappa$ B, czego wynikiem jest dysocjacja kompleksu I $\kappa$ B – NF- $\kappa$ B, co prowadzi do aktywacji czynnika transkrypcyjnego, odpowiedzialnego za przeżycie komórek [14,15]. Przypuszcza się, że w interakcji HSP90 z PKB/Akt bierze udział czynnik Cdc37, a utworzony kompleks zapobiega degradacji kinazy w proteasomach [37,38]. Obecność inhibitorów HSP90 np. geldanamycyny promuje apoptozę komórek przez aktywację kaspaz, w wyniku której obserwuje się proteolizę polimerazy poli ADP-rybozy 1 (PARP-1; poly (ADP-ribose)polymerase 1) i spadek poziomu aktywności PKB/Akt. Interakcja między PKB/Akt i HSP90 chroni białko stresu przed inhibitorami, a wspomnianą kinazę przed defosforylacją i destabilizacją i w konsekwencji hamuje indukcję apoptozy. Ponadto utworzenie kompleksu PKB/Akt-HSP90 ochrania kinazę przed jej degradacją w proteasomach i promuje przeżycie komórek poprzez hamowanie JNK [4,62]. Udowodniono, że fosforylacja kinazy Ask-1 (apoptosis signal-regulating kinase-1) przyczynia się do jej inaktywacji, co uniemożliwia oddziaływanie z kinazą JNK i hamuje apoptotyczną ścieżkę z jej udziałem [14,37,38]. Cząsteczki HSP90 wiążą także kinazę Raf-1, a dysocjacja tego kompleksu inicjuje apoptozę wielu komórek, np. limfocytów linii B [46,55,56].

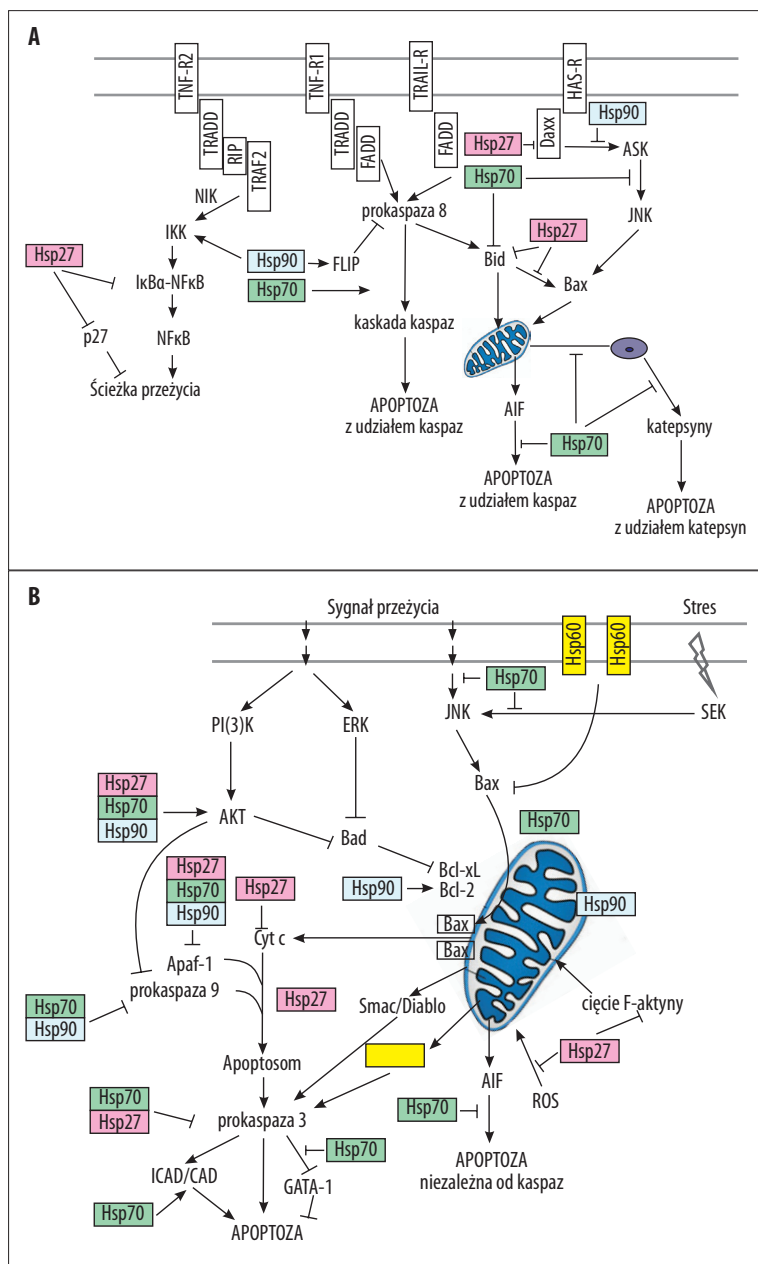
Cytokiny, w tym IL-6 i interferony (np. IFN- $\gamma$ ), wpływają na wzrost ekspresji HSP90 zapewniając wzrost przeżycia komórek [5,37].

#### Szlak wewnętrzny/mitochondrialny

Antyapoptotyczne właściwości HSP90 przejawiają się również w interakcjach z czynnikami, które nie są zaliczane do substratów – tzw. „klientów” [33]. Stabilność i aktywacja tych czynników nie jest regulowana przez HSP90. Wyniki doświadczeń wskazują, że cząsteczki HSP90 w pewnych typach białaczek mogą zapobiegać aktywacji kaspaz w cytosolu w obecności cytochromu c, prawdopodobnie dlatego, że HSP90 oddziałuje z czynnikiem Apaf-1, zapobiegając jego oligomeryzacji, a następnie blokuje jego interakcję z prokaspazą 9 i formowanie apoptosomu [51]. Usytuowane w mitochondriach cząsteczki HSP90 regulują zmiany przepuszczalności ich zewnętrznej błony i uwalnianie cytochromu c [46]. Wykazano, że powstawanie kompleksów Bcl-2 – HSP90 $\beta$  zapobiega wpływowi cytochromu c i aktywacji kaspazy 3 [17]. Cząsteczki HSP90 podobnie, jak HSP70, hamują apoptozę poprzez oddziaływanie z białkiem Apaf-1, uniemożliwiając jego oligomeryzację, przyłączenie prokaspazy 9 i utworzenie apoptosomu [2,53,67].

Jak dotąd niewiele jest danych dotyczących różnic w aktywności między zidentyfikowanymi postaciami HSP90 –  $\alpha$  i  $\beta$ . Uważa się, że ich nadekspresja jest wymagana do przeżycia komórek. Obniżenie poziomu HSP90 $\beta$  przez siRNA wystarcza do indukcji apoptozy. Ponadto prawdopodobieństwo indukcji apoptozy wzrasta, gdy dodatkowo obniża się poziom HSP90 $\alpha$ . Obserwacje te wskazują zarówno na różnice we właściwościach i aktywnościach tych izoform, a także na ich współdziałanie podczas apoptozy [14]. W komórkach tucznych HSP90 $\beta$  oddziałuje z inhibitorem apoptozy – Bcl-2 [46]. Zastosowanie siRNA lub inhibitorów HSP90 powoduje spadek poziomu izoformy  $\beta$ , co wywołuje zahamowanie formowania kompleksów z Bcl-2, wpływ cytochromu c, aktywację kaspaz i apoptozę [17]. Wyniki badań wskazują, że izoformy HSP90- $\alpha$  i - $\beta$





Ryc. 1. Oddziaływania między głównymi przedstawicielami rodziny HSP i cząsteczkami uczestniczącymi w zewnętrznym (A) i wewnętrznym (B) szlaku apoptozy (opracowano na podstawie [2,18,24,29,37, 49,67])

mogą wykazywać odmienne właściwości apoptotyczne. Przypuszcza się, że jest to spowodowane tym, że białka te mogą oddziaływać z różnymi czynnikami, a jeśli nawet wchodzi w interakcję z tymi samymi, to może się to odbywać w odmienny sposób.

### Szlak zewnętrzny/receptorowy

Głównym regulatorem apoptozy, indukowanej przez cytokinę TRAIL, jest białko FLIP (FLICE inhibitory protein) – inhibitor kaspazy 8. Niedawno doniesiono, że w komórkach glejaka, HSP90 oddziałuje z FLIP (w sposób zależny od ATP) poprzez jego N-końcową domenę (ryc. 1).

W następstwie indukcji TRAIL, w komórkach glejaka sygnał śmierci przekazywany jest do kompleksu sygnalizacyjnego – DISC/receptorosom poprzez HSP90 i FLIP.

W sytuacji spadku poziomu ekspresji HSP90α obserwowano zmniejszenie wiązania FLIP do tego kompleksu, powodując apoptozę badanych komórek [37,63]. HSP90 może również uczestniczyć w modulacji sygnalizacji szlaku receptorowego, inicjowanego przez TNF. Po związaniu TNFR-1 z tym ligandem, sygnał śmierci jest przekazywany na białko adaptorowe – kinazę RIP-1, co z kolei promuje aktywację czynnika transkrypcyjnego NF-κB oraz kinazy SAPK/JNK. Stwierdzono, że degradacja RIP-1 (w nieobecności HSP90) wyklucza aktywację NF-κB, co zwiększa wrażliwość komórek na apoptozę [41]. Inny mechanizm z udziałem białka podrodziny HSP90 na szlaku receptorowym inicjowanym przez rozpoznanie liganda TNF przez receptor, prowadzi do oddziaływania HSP90 z białkiem Bid, co uniemożliwia jego proteolizę przez kaspazę 8/10 i translokację aktywnej postaci tBid do mitochondriów [63,71]. Zmiany aktywności NF-κB regulowane przez

HSP90 odnotowano również w przypadku, gdy ten czynnik transkrypcyjny ulega aktywacji przez kinazę IKK, która unieczynnia inhibitor NF- $\kappa$ B. Enzym ten budują trzy podjednostki: dwie katalityczne (IKK $\alpha$  i IKK $\beta$ ) oraz jednostka regulatorowa – IKK $\gamma$  (NEMO). Na szlaku receptorowym inicjowanym po związaniu liganda przez TNF-R1, kinaza IKK przyłącza się do tego receptora. Rekrutacja IKK do powstającego kompleksu DISC/receptorosom, poza białkiem adaptorowym TRADD, wykorzystuje ponadto czynnik TRAF2 (TNF-R associated factor 2). Na tym etapie może uczestniczyć kinaza RIP, jednak nie jest ona czynnikiem niezbędnym do rekrutacji i aktywacji IKK. Aktywny enzym IKK indukuje czynnik NF- $\kappa$ B. Wyniki opublikowanych doświadczeń wskazują, że HSP90 wraz z białkiem Cdc37 uczestniczy w stabilizacji IKK. Obecność inhibitora HSP90 – geldanamycyny przyczynia się do rozpadu kompleksu IKK-HSP90-CDC37, uniemożliwiając aktywację NF- $\kappa$ B zainicjowaną przez TNF [15,55,56]. Ponadto cząsteczki HSP90 w określonych warunkach, mogą okazać się proapoptotyczną aktywność, co wiąże się z hamowaniem aktywności kalpain – proteaz cysteinowych zależnych od jonów Ca<sup>2+</sup>. Polipeptyd Grp94, należący do podrodziny HSP90, może promować proteolizę kalpainsy i w ten sposób prowadzić do apoptozy komórek nowotworowych wywołanej niedotlenieniem [63,67].

Wimentyna, składnik filamentów pośrednich komórek ulega degradacji w odpowiedzi na induktory apoptozy. Proteoliza tego białka przez kaspazy wywołuje zaburzenia w strukturze filamentów, co może ułatwić kondensację chromaty i fragmentację jądra komórkowego. Odnotowano, że HSP90 oddziałuje z filamentami wimentynowymi i chroni je przed apoptotyczną degradacją [37].

Wykazano, że TNF poza apoptozą komórek, może także indukować nekrozę np. w niektórych liniach komórkowych – w tym nowotworowych. Białko HSP90 wydaje się kontrolować i decydować o tym czy komórki zostaną usunięte w procesie nekrozy czy apoptozy. Zablokowanie aktywności HSP90 przez różne leki prowadzi do aktywacji receptora TNF, który inicjuje jeden z tych procesów, prawdopodobnie jako wynik destabilizacji wewnątrzkomórkowych białek z nim oddziałujących [37,46,56].

Ponadto doniesiono, że białko HSP90 $\beta$  moduluje szlak sygnalizacyjny z udziałem prolaktyn, podczas apoptozy towarzyszącej spermatogenezie. Receptory prolaktynowe wiążą się z HSP90 $\beta$ , a ich inhibicja inicjuje apoptozę komórek uczestniczących w spermatogenezie [63].

## HSP70

### Modulacja transdukcji sygnału śmierci

Białko HSP70 jest najlepiej poznanym dotychczas białkiem rodziny HSP oraz inhibitorem większości etapów apoptozy komórek [24,33,67]. Uważa się, że brak ekspresji dwóch genów kodujących indukowalną postać HSP70 – gen *hsp70.1* i *hsp70.3*. istotnie uwrażliwia komórki na apoptozę [63]. Zaobserwowano, że zarówno w komórkach germinalnych, jak i nowotworowych spadek poziomu HSP70 wywołuje ich apoptozę [37]. Białko HSP70 może ograniczać aktywność kinaz indukowanych stresem, np. Ask1, PKB/Akt, SAPK/JNK czy p38 warunkujących

transdukcję sygnałów apoptotycznych (ryc. 1B). W komórkach nowotworowych odnotowano wzrost ekspresji HSP70 i aktywację kinazy PKB/Akt, która fosforyluje białko Bad i kaspazę 9 hamuje ich aktywność proapoptotyczną, natomiast aktywuje STAT5 (signal transduced and activator of transcription 5). Zdarzenie to ułatwia wiązanie wspomnianego czynnika transkrypcyjnego do DNA, co w konsekwencji wywołuje wzrost ekspresji antyapoptotycznego białka Bcl-X<sub>L</sub> i przeżycie komórek nowotworowych [26,37]. Oddziaływanie białka HSP70 z kinazą SAPK/JNK odbywa się przez jego domenę ATP-azową, co prowadzi do inaktywacji enzymu i zahamowania transdukcji sygnału [63]. Aktywność tego polipeptydu opiekuńczego wynika ze zdolności ograniczania defosforylacji SAPK/JNK. Wyniki badań wskazują, że dziki typ HSP70 zapobiega dojrzewaniu zymogenów kaspazy 9 i 3. Zaobserwowano, że brak aktywności opiekuńczej produktu ekspresji zmutowanego *HSP70* obniża tylko aktywność SAPK/JNK, nie ograniczając innych szlaków apoptozy. Hamowanie aktywności tej kinazy nie wystarczy by zapobiec apoptozie, ponieważ do tego nieodzowna jest opiekuńcza aktywność HSP70 [40,45]. Opisany polipeptyd oddziałuje z C-końcową domeną nieufosforylowanej kinazy PKC (protein kinase C), stabilizując ją i ułatwiając ponowną jej fosforylację, co skutkuje zahamowaniem jej aktywności. W podobny sposób HSP70 oddziałuje z kinazą PKB/Akt, ASK-1 oraz p38 należącą do szlaku MAP-kinaz. Białko to stabilizuje i inaktywuje te kinazy [23,37,50,63].

Udowodniono, że HSP70 może wchodzić w interakcję z niektórymi czynnikami transkrypcyjnymi, np. z białkiem p53, regulującym ekspresję członków rodziny Bcl-2. Uznaje się, że w komórkach nowotworowych ekspresja genu kodującego inhibitor apoptozy – Bcl-2 jest hamowana przez p53, podczas gdy proapoptotycznego białka Bax ulega indukcji [37,74]. Wiadomo, że w wielu typach komórek nowotworowych występują produkty zmutowanego genu *p53*, a białka HSP70 i HSC70 okazują zdolność tworzenia stabilnych kompleksów ze zmienionymi postaciami tego białka. Interesujące jest to, że HSP70 może blokować sekwencję NLS (nuclear localization signal) białka p53, co zapobiega jego importowi do jądra komórkowego [20].

Inhibitory wzrostu (inhibitors of growth – INGs) stanowią supresory rozwoju nowotworów, a ich ekspresja jest regulowana i zmienia się w zależności od typu nowotworu. W wyniku uszkodzeń DNA i zaburzeń w wiązaniu histonów, cząsteczki ING indukują zmiany w strukturze chromaty i aktywują p53. Białka INGs indukują HSP70, co zwrótnie promuje interakcję receptora TNF-R z TNF- $\alpha$  i wiązanie I $\kappa$ B $\alpha$  do czynnika NF- $\kappa$ B, co osłabia sygnał przeżycia [22,57]. Rola HSP70 w regulacji aktywności czynnika NF- $\kappa$ B budzi kontrowersje. Cytosolowe białko HSP70 może hamować wspomniany czynnik transkrypcyjny, podczas gdy jego cząsteczki umieszczone w błonie plazmatycznej mogą się przyczyniać do aktywacji NF- $\kappa$ B. W warunkach stresu HSP70 gromadzi się zwykle w obydwu tych przedziałach komórkowych. W komórkach śródbłonna indukowanych przez TNF- $\alpha$  odnotowano, że znaczny poziom ekspresji HSP70 hamuje ścieżkę przeżycia z udziałem NF- $\kappa$ B, ograniczając jego aktywację poprzez blokowanie aktywacji kinazy IKK, co zapewnia eliminację komórek z uszkodzonym DNA [57,63].



### Szlak wewnętrzny/mitochondrialny

Białka szoku cieplnego hamują apoptozę zarówno przed, jak i po aktywacji kaskady kaspaz. Ich cząsteczki mogą oddziaływać bezpośrednio z tymi proteazami lub też pośrednio przez interakcję z czynnikami wiążącymi się i wpływającymi na aktywację lub hamowanie ich aktywności [3,24,67].

Cząsteczki HSP70 zmniejszają lub całkowicie hamują aktywację kaspaz oraz ograniczają uszkodzenia mitochondriów i jąder komórkowych. Mogą kierować komórki na ścieżkę przeżycia zarówno przez blokowanie wypływu z mitochondriów białek apoptogennych, takich jak cytochrom c czy AIF, jak i przez interakcję z uwolnionymi już do cytosolu czynnikami. Białka opiekuńcze mogą zapobiegać aktywacji zymogenu kaspazy 3, a nawet hamować działanie aktywnego już enzymu przez bezpośrednie oddziaływanie, czego nie wykazuje żaden inny czynnik antyapoptotyczny [19,26,53]. Przedstawiono dowody, że HSP70 oddziałuje z białkami Bcl-2 i Mcl-1 [19,48,65], wspólnie z HSP40 blokując translokację proapoptotycznego białka Bax [64] i ograniczając zmiany w przepuszczalności zewnętrznej błony mitochondrialnej, przez co hamują wpływ cytochromu c i innych cząsteczek mitochondrialnych np. AIF, Smac/DIABLO czy Endo G. Zakłada się, że obserwowane efekty zależą zarówno od aktywności domeny opiekuńczej HSP70, jak i od jego domeny ATP-azowej [16,30,31,61]. Oddziaływanie HSP70 z cytosolowymi członkami rodziny Apaf (-1,-2,-3) blokuje powstawanie apoptosomu oraz aktywację prokaspazy 3 [8,24,63]. Wiązanie Apaf-1 przez HSP70 chroni komórki przed apoptozą, a za to oddziaływanie odpowiada domena ATP-azowa białka opiekuńczego. Cząsteczki HSP70 w sposób pośredni hamują formowanie pęcherzyków błonowych (blebbing), które zalicza się do charakterystycznych zmian morfologicznych towarzyszących apoptozie [34,37,53]. Domena ATP-azowa HSP70 jest niezbędna do interakcji m.in. z prokaspazą 3 i 7, co zapobiega dojrzewaniu tych kaspaz wykonawczych i tym samym hamuje apoptozę zależną od ich aktywności [63].

### Szlak zewnętrzny/receptorowy

Od lat uznaje się, że podczas fazy wykonawczej apoptozy, DNA ulega fragmentacji z udziałem m.in. endonukleazy CAD, opisywanej także jako DFF40 (DNA fragmentation factor 40) [34,49]. Prawidłowe składanie pre-mRNA dla CAD/DFF40 i jego aktywność enzymatyczna są regulowane przez inhibitor – ICAD (inhibitor caspase activated DNase) oraz przez HSP70 i HSP40 (czynnik pomocniczy). Opublikowano dowody przemawiające za tym, że cząsteczki HSP biorą udział w wiązaniu utworzonych kompleksów CAD-ICAD; w tym zdarzeniu uczestniczy kompleks HSP70-HSP40 z ICAD. Białko HSP70 oddziałując z CAD wzmacnia jego aktywność [2,24,37,63].

W apoptozie komórek indukowanej reakcją ligand-receptor rodziny TNF, polipeptydy HSP70 zapobiegają morfologicznym zmianom charakterystycznym dla umierających komórek, które są jej następstwem np. aktywacji fosfolipazy A2 czy zaburzonej morfologii jąder komórkowych. Cząsteczki białka opiekuńczego hamują działanie aktywnej kaspazy 3 i w ten sposób mogą chronić komórki przed śmiercią nawet w końcowej fazie apoptozy [2,37].

Wyniki badań ujawniły, że białka HSP70 hamują śmierć komórek na szlaku receptorowym (TNF), zależnym od białka Bid. Przedstawiciele tej podrodziny HSP ograniczają proapoptotyczną aktywność Bid, przez wiązanie z kinazą JNK [23]. Antyapoptotyczna rola HSP70 wynika z blokowania fosforylacji kinazy JNK, zarówno przez kinazę SEK (SAPK/ERK kinase-1) na szlaku wewnętrznym, jak i przez kinazę Ask1 na szlaku receptorowym apoptozy. Ponadto jego cząsteczki mogą również wyciszać transdukcję sygnału na etapie aktywacji Ask-1 przez białko Daxx na szlaku receptorowym [50] (por. ryc. 1 A,B). Akceptuje się pogląd, że oddziaływanie HSP70 z kinazami odbywa się przez regulację fosforylacji i stabilizacji tych enzymów [16,24,45]. Prawdopodobnie białka HSP70 mogą także bezpośrednio blokować proteolityczne cięcie Bid przez kaspazę 8 [23].

Ujawniono, że ekspozycja komórek hematopoetycznych na cytokiny oddziałujące z receptorami TNF indukuje proapoptotyczną aktywność kinazy PKR (protein kinase R), zależnej od dwuniciowego RNA. Okazało się, że inhibitor PKR stanowi produkt genu grupy komplementacji C anemii Fanconiego (FANCC). HSP70 oddziałuje z białkiem FANCC przez jego ATP-azową domenę i wraz z czynnikiem pomocniczym HSP40 hamuje apoptozę indukowaną TNF przez utworzenie potrójnego kompleksu HSP70 – FANCC – PKR [37].

W komórkach białaczkowych, eksponowanych na cytokinę TRAIL (TNF-related apoptosis inducing ligand), HSP70 moduluje ich apoptozę z udziałem kinazy tyrozynowej Bcr-Abl [26,37]. Aktywność HSP70 w apoptozie inicjowanej przez ligand Fas jest kontrowersyjna, a odmienne wyniki badań są prawdopodobnie spowodowane zastosowaniem różnych modeli komórkowych. Cząsteczki HSP70 wiążą się z receptorami DR4 i DR5, w ten sposób hamują formowanie i aktywność kompleksu DISC/receptorosom.

Wśród aktywności HSP70 podkreśla się udział tych cząsteczek w różnicowaniu erytrocytów [38]. Wykazano, że czynnik transkrypcyjny GATA-1 (GATA binding protein-1) stanowi substrat dla kaspazy 3 [59]. W ludzkich prekursorowych komórkach erytroidalnych HSP70 może chronić ten czynnik przed atakiem kaspazy 3. W konsekwencji wspomniane komórki nie giną w procesie apoptozy, ale ulegają różnicowaniu. Domena ATP-azowa białka HSP70 nie zawsze okazuje aktywność antyapoptotyczną. Ten motyw HSP70 jest nieodzowny do wiązania AIF i Apaf-1 [8,28,61,66], natomiast nie jest potrzebny do interakcji białka opiekuńczego z czynnikiem transkrypcyjnym GATA-1 (erytroblasty) [59] czy kinazą JNK [16,24,61].

### Udział HSP70 w apoptozie niezależnej od kaspaz

Podczas apoptozy komórek na szlaku wewnętrznym, oprócz cytochromu c, mitochondria uwalniają również inne czynniki apoptogenne, np. AIF i EndoG – składniki przestrzeni międzybłonowej mitochondriów [6]. Po opuszczeniu mitochondriów cząsteczki tych białek są transportowane do jąder komórkowych, gdzie wywołują niezależne od kaspaz procesy wiodące do apoptozy [31,43,44]. Uznaje się, że białko HSP70 może hamować apoptozę niezależną od kaspaz, na co wskazują wyniki doświadczeń z zastosowaniem egzogennych inhibitorów tych proteaz [19,48,66].

Wykazano, że programowana śmierć z udziałem mitochondriów to nie jedyny szlak, jaki modulowany jest przez antyapoptotyczne HSP70 [37,47,66]. W pewnych przypadkach HSP70 może hamować indukowaną przez białka z rodziny TNF śmierć komórek bez udziału kaspaz, np. niezależną od kaspazy 8 ścieżką śmierci, w której uczestniczą Fas i kinaza RIP [7]. Ponadto wykazano, że szlak wewnętrzny apoptozy zależny od Apaf-1 może po aktywacji mitochondriów przebiegać z udziałem lub bez udziału kaspaz i jest regulowany przez HSP70 [37].

Wśród mechanizmów działania HSP70 wskazuje się na zdolność do hamowania translokacji czynnika AIF z cytosolu do jądra komórkowego, co zapobiega kondensacji chromatyny i śmierci komórek [28,61]. W interakcji HSP70 z AIF uczestniczy region między 150–228 aa czynnika indukującego apoptozę [28,43]. Wykazano, że mała ekspresja HSP70 ogranicza jego wiązanie z AIF, co indukuje apoptozę i zmniejsza uszkodzenia w przebiegu udaru mózgu, spowodowanego niedotlenieniem czy niedokrwieniem [44]. Ponadto białko HSP70 może wchodzić w interakcję z Endo G, zapobiegając translokacji tego enzymu z cytosolu do jądra komórkowego, a tym samym fragmentacji DNA. W opisywanym mechanizmie uczestniczy również czynnik AIF, działający jako molekularny pomost w wiązaniu Endo G z HSP70 [31,38].

Interesujące są wyniki doświadczeń wskazujące, że lizosomy funkcjonują jako integratory sygnałów śmierci w wielu typach komórek. Z tych organelli uwalniane są katepsyny w odpowiedzi na czynniki apoptogenne, m.in. TNF- $\alpha$ , ligand Fas, czynniki stabilizujące mikrotubule, staurosporynę, aktywne p53, stres oksydacyjny czy ograniczenie czynników wzrostu [37]. Po wpływie do cytosolu proteazy te katalizują zmiany w zewnętrznej błonie mitochondrialnej (ryc. 1A). Uwolnienie katepsyn można także obserwować w wyniku morfologicznych zmian typowych dla apoptozy, jako zjawisko niezależne od wpływu cytochromu c i AIF z mitochondriów [9,47].

Zarówno cząsteczki HSP90, jak i HSP70 mogą występować w lizosomach, co odnotowano w wielu typach nowotworów i komórek prawidłowych narażonych na stres, w których wspomniane białka hamują uwalnianie z tych organelli katepsyn do cytosolu. Wysoki poziom ekspresji HSP70 w lizosomach zmniejsza wrażliwość tych organelli na czynniki chemiczne i fizyczne, które destabilizują ich błonę [26,29,47].

### **Małocząsteczkowe HSP – sHSP**

#### **Modulacja transdukcji sygnału śmierci**

Apoptoza indukowana stresem oksydacyjnym jest regulowana przez białka tej podrodziny, głównie HSP27 (ryc. 1), w sposób zależny od stanu oligomeryzacji jego cząsteczek. Zablockowanie fosforylacji HSP27 ogranicza formowanie wysokocząsteczkowych kompleksów tego białka i wtórnie hamuje jego funkcje opiekuńcze w apoptozie indukowanej np. przez ROS [1,18]. Ten przedstawiciel sHSP zapewnia przeżycie komórek przez interakcję z PKB/Akt w warunkach stresu. Wspomniana kinaza może także fosforylować HSP27, co prowadzi do dysocjacji tego kompleksu i stabilizacji PKB/Akt [27,58].

### **Szlak wewnętrzny/mitochondrialny**

Ważnym elementem wewnętrznego szlaku apoptozy jest zmiana przepuszczalności błon mitochondrialnych i uwalnianie czynników apoptogennych z tych organelli, w tym cytochromu c, który wraz z Apaf-1 i kaspazą 9 bierze udział w formowaniu apoptosomu [6,34]. Zsyntetyzowane w wyniku stresu HSP mogą regulować bezpośrednio [7,20] bądź pośrednio wpływ tych cząsteczek z mitochondriów [23,53,54]. Zaburzenia w wewnątrzkomórkowej równowadze układów redoks oraz generowanie ROS inicjują apoptotyczną kaskadę wywołującą zmiany w mitochondriach. W warunkach stresu HSP27 utrzymuje prawidłową homeostazę mitochondriów i blokuje uwalnianie czynników apoptogennych [2]. Białko to oddziałuje z aktywną F, co chroni przed uszkodzeniem cytoszkieletu. Ponadto HSP27 hamuje redystrybucję proapoptotycznego czynnika Bid i zapobiega uwalnianiu białek z przestrzeni mitochondrialnej m.in. cytochromu c [24,37,67]. Doniesiono, że HSP27 reguluje apoptozę zależną od białka Bid [54]. Interakcja HSP27-Bid hamuje translokację tego proapoptotycznego czynnika do mitochondriów, co osłabia lub uniemożliwia uwalnianie cytochromu c. W przeciwieństwie do białek rodziny Bcl-2, cząsteczki HSP nie wykazują tak znaczącego wpływu na uwalnianie cytochromu c i czynnika AIF z mitochondriów, natomiast wiążą cytochrom c w cytosolu i osłabiają jego zdolność do formowania apoptosomu wraz z Apaf-1 i prokaspazą 9 (ryc. 1B). Grupa hemowa cytochromu c jest niezbędna, choć niewystarczająca, do tego oddziaływania. Określono, że w tworzeniu kompleksu uczestniczy region między 51. a 141. aminokwasem HSP27, a białko to musi występować w formie nieufosforylowanego dimeru [11,24]. Cząsteczki HSP27 mogą bezpośrednio oddziaływać z prokaspazą 3 lub hamować jej aktywację przez blokowanie kaspazy 9 ograniczając przebieg apoptozy [18,37]. Wśród aktywności HSP27 wskazuje się na jego zdolność w utrzymaniu integralności mitochondriów i ograniczaniu wpływu czynników apoptogennych. Odnotowano, że wysoki wewnątrzkomórkowy poziom HSP27 zapobiega aktywacji kaspaz na szlaku mitochondrialnym. Białko HSP27 może wchodzić w interakcję z cytochromem c, ograniczając tym samym, aktywność kaspazy 9 inicjującej ten szlak oraz może oddziaływać z wykonawczą kaspazą 3 i hamować jej aktywność [11].

Obserwacje wskazują, że białko HSP27 wykazuje zdolność stabilizacji mikrowłókienek aktyny. Jego cząsteczki wiążą się z F-aktyną, co nie zakłóca struktury cytoszkieletu w wyniku stresu [2,37,63]. sHSP ochraniają strukturę cytoszkieletu, zabezpieczając głównie włókna aktynowe. Stwierdzono, że zarówno HSP27, jak i  $\alpha$ B-kryształina, nie hamują denaturacji aktyny, ale blokują agregację wcześniej zdenaturowanych cząsteczek stwarzających niebezpieczeństwo dla przeżycia komórek. Nadekspresja HSP27 stabilizuje także proapoptotyczne białko Bid, które bierze udział w uwalnianiu cytochromu c z mitochondriów oraz hamuje aktywność proapoptotycznego czynnika – Smac/DIABLO [54].

Ten małocząsteczkowy polipeptyd ogranicza ponadto poziom ROS, chroniąc komórki przed stresem oksydacyjnym na szlaku inicjowanym przez TNF- $\alpha$  [7]. Natomiast w neuronach, w których właściwości ochronne HSP27 nie wynikają z jego oddziaływań z cytochromem c, a zależą





od stopnia jego fosforylacji; białko to neutralizuje toksyczne skutki oksydacji białek [39,63]. Potwierdzono, że antyapoptotyczna aktywność tego białka zależy od stanu jego oligomeryzacji i poziomu fosforylacji. Wykazano, że tylko oligomery HSP27 o dużej masie cząsteczkowej i nieufosforylowane mogą hamować powstawanie apoptosomu, nie dopuszczając do aktywacji kaspaz [18]. Białko HSP27 wykazuje antyoksydacyjne właściwości, które chronią komórki nerwowe przed uszkodzeniami i zapobiegają wielu chorobom neurodegeneracyjnym. Polipeptyd ten utrzymuje glutatynę w postaci zredukowanej [1], co przyczynia się do spadku wolnych rodników oraz neutralizuje toksyczne skutki utleniania białek.

### Szlak zewnętrzny/receptorowy

Charette i wsp. [13] wykazali, że cząsteczki HSP27 zmniejszają wrażliwość komórek HEK na apoptozę indukowaną przez ligandy rodziny TNF. Po związaniu Fas-L przez receptor Fas, białko adaptorowe Daxx ulega rekrutacji rozpoznając C-końcową domenę wspomnianego receptora, po uprzedniej jego trimeryzacji. Dzięki temu oddziaływaniu Daxx może wiązać i indukować kinazę Ask-1, która następnie aktywuje kinazę JNK. Wykazano, że ufosforylowana postać HSP27 wchodzi w interakcję z Daxx, zapobiegając jego translokacji z jądra komórkowego do cytosolu i wiązaniu z receptorem Fas. Białko Daxx łączy ścieżkę sygnalizacyjną inicjowaną rozpoznaniem FasL/Fas z kinazą Ask1, włączając się w zależną bądź niezależną od kaspaz ścieżkę śmierci programowanej [7,63,67]. Polipeptyd HSP27 aktywuje szlak przeżycia z udziałem czynnika NF- $\kappa$ B, gdyż jego nadekspresja indukuje degradację cząsteczek inhibitora tego czynnika, tj. I $\kappa$ B $\alpha$  [24,38,67]. Ponadto HSP27 może również oddziaływać z białkami regulującymi cykl komórkowy, np. wpływa na degradację p27<sup>KIP1</sup> – inhibitora cyklu komórkowego, co w konsekwencji prowadzi do ciągłej proliferacji komórek i pozwala na szybką ich odbudowę po stresie [52].

Przedstawiciel sHSP –  $\alpha$ B-kryształina, podobnie jak HSP27, wiąże się z prokaspazą 3 i w ten sposób blokuje jej dojrzewanie i fazę wykonawczą apoptozy. Ponadto białko to oddziałuje z Bax i Bcl-Xs w cytoplazmie, hamując ich funkcje.  $\alpha$ B-kryształina może również promować ścieżkę przeżycia poprzez aktywację produktu ekspresji onkogenu *Ras* [37].

Podsumowując, białka tej podrodziny mogą oddziaływać z różnymi czynnikami apoptotycznymi, co jest determinowane stanem fosforylacji/oligomeryzacji sHSP. W określonych warunkach nieufosforylowane oligomery mogą hamować aktywność kaspaz. Z kolei niskocząsteczkowe i ufosforylowane białka sHSP są niezbędne do wiązania np. aktywnych białek Daxx [13] i chronią komórki przed neurotoksycznością [1,18].

### HSP60

#### Białko o aktywności pro- i antyapoptotycznej

Cząsteczki HSP60 mogą występować w mitochondriach, w cytosolu i w różny sposób modulować ścieżki apoptotyczne [2,42]. Cytosolowe HSP60 tworzą kompleks z białkiem Bax, przez co promują ścieżkę przeżycia [12,25,27]. Stwierdzono, że w warunkach niedotlenienia cząsteczki HSP60 oddysocjują od Bax. Uwolnione z opisanego

kompleksu białko proapoptotyczne ulega translokacji do błon mitochondriów, w których może formować pory. Wyciszenie ekspresji HSP60 w kardiomiocytach przez antysensowne nukleotydy, wywołuje wzrost ekspresji Bax, obniżenie poziomu Bcl-2 i śmierć tych komórek [36,42].

Okazało się, że cząsteczki HSP60 cechuje antyoksydacyjna aktywność, ważna w obronie komórek przed stresem oksydacyjnym i działaniem wolnych rodników. Mitochondrialne białko HSP60 wpływa na łańcuch oddechowy, syntezę ATP, ograniczenie uwalniania cytochromu c i hamowanie apoptozy [38]. Jednak usytuowane w mitochondriach HSP60 może pełnić również odmienną funkcję, gdyż bierze udział w dojrzewaniu prokaspazy 3 [53]. Proapoptotyczna aktywność HSP60 i pomocniczego białka – HSP10 zostały potwierdzone w dwóch liniach komórek nowotworowych, tj. HeLa i Jurkat, w których jednocześnie z uwolnieniem białek opiekuńczych z mitochondriów odnotowano aktywację prokaspazy 3. Białka HSP60 wiążą się i indukują dojrzewanie zymogenu kaspazy 9 oraz ułatwiają jej wiązanie z cytochromem c w sposób zależny od ATP [2,38].

Dotychczasowe wyniki badań wskazują, że cząsteczki HSP60 mogą wykazywać odmienne właściwości – jako czynniki antyapoptotyczne wiążą się z proapoptotycznymi polipeptydami Bax i Bak, hamując ich działanie; natomiast ich udział w dojrzewaniu prokaspazy 9 i 3 przemawia za ich proapoptotyczną aktywnością [2].

### PODSUMOWANIE

Białka HSP to podstawowe modulatory poznanych dotąd szlaków apoptozy. Ponadto są powszechnie uznanymi molekularnymi biomarkerami nowotworowymi, ze względu na ich udział w regulacji ekspresji genów, replikacji DNA, różnicowaniu, transdukcji sygnału/ów w komórce, starzeniu się czy immortalizacji [33]. Polipeptydy HSP oddziałują z wieloma istotnymi cząsteczkami, uczestniczącymi w przebiegu procesu apoptozy, hamując bądź promując śmierć komórek. Przedstawiciele tej rodziny białek mogą występować w komórce w różnych przedziałach, jak również wywierać przeciwstawne efekty. W wielu przypadkach przeżycie komórek jest wynikiem tzw. „cross-talk” zewnątrz- i wewnątrzkomórkowych sygnałów [37,38].

Te ważne białka funkcjonują jako integratory i koordynatory przepływu informacji i odpowiedzi na otrzymane przez komórkę sygnały. Pełnią funkcję „pomostów” między ważnymi centrami w komórce np. między jądrem komórkowym a mitochondriami. Znaczącą rolę HSP pełnią jako modulatory wiążąc ze sobą apoptotyczne szlaki i regulując proces apoptozy na kolejnych jej etapach. W ten sposób utrzymują równowagę między śmiercią a przeżyciem komórek – promując bądź hamując proces śmierci programowanej.

Ponadto zwiększają tolerancję i ochronę komórek w warunkach niedotlenienia (hipoksja), niedokrwienia (ischemia), a także podczas ekspozycji na różne ksenobiotyki [42]. Odgrywają również istotną rolę w patogenezie i przebiegu wielu chorób powodujących uszkodzenia serca czy mózgu. Odnotowano, że wzrost ekspresji HSP75 zmniejsza skutki udaru mózgu; hamuje powstawanie wolnych rodników, wpływa na zmniejszenie utleniania lipidów i wzrost poziomu ATP [70].

Bardzo ważne dla diagnostyki onkologicznej jest to, że białka HSP ulegają dużej ekspresji w komórkach nowotworowych i są czynnikami kojarzonymi ze złą prognozą choroby. Białka HSP27 i 70 odpowiadają za wzrost proliferacji komórek nowotworowych, stąd uważa się, że spadek ich ekspresji może indukować spontaniczną regresję

nowotworu. W wielu typach nowotworów, z nadekspresją HSP, zaobserwowano ograniczenie różnicowania komórek i progresję kliniczną choroby. Przedstawiciele tej rodziny biorą udział w nabywaniu lekooporności, a ich ekspresja wzrasta w istotny sposób podczas osiągnięcia złośliwej postaci choroby nowotworowej [55].

## PIŚMIENNICTWO

- [1] Arrigo A.P., Vivot S., Chaufour S., Firdaus W., Kretz-Remy C., Diaz-Latoud C.: Hsp27 consolidates intracellular redox homeostasis by upholding glutathione in its reduced form and by decreasing iron intracellular levels. *Antioxid Redox Signal.*, 2005; 7: 414–422
- [2] Arya R., Mallik M., Lakhotia S.C.: Heat shock genes – integrating cell survival and death. *J. Biosci.*, 2007; 32: 595–610
- [3] Asea A.: Mechanisms of HSP72 release. *J. Biosci.*, 2007; 32: 579–584
- [4] Basso A.D., Solit D.B., Chiosis G., Giri B., Tsihchlis P., Rosen N.: Akt forms an intracellular complex with heat shock protein 90 (Hsp90) and Cdc37 and is destabilized by inhibitors of Hsp90 function. *J. Biol. Chem.*, 2002; 277: 39858–39866
- [5] 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
- [6] Bednarek J., Kiliańska Z.M.: Białka przestrzeni międzybłonowej mitochondriów uczestniczące w procesie apoptozy. *Postepy Biochem.*, 2005; 51: 447–458
- [7] Beere H.M.: Death versus survival: functional interaction between the apoptotic and stress-inducible heat shock protein pathways. *J. Clin. Invest.*, 2005; 115: 2633–2639
- [8] Beere H.M., Wolf B.B., Cain K., Mosser D.D., Mahboubi A., Kuwana T., Taylor P., Morimoto R.I., Cohen G.M., Green D.R.: Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome. *Nat. Cell Biol.*, 2000; 2: 469–475
- [9] Bidere N., Lorenzo H.K., Carmona S., Laforge M., Harper F., Dumont C., Senik A.: Cathepsin D triggers Bax activation, resulting in selective apoptosis-inducing factor (AIF) relocation in T lymphocytes entering the early commitment phase to apoptosis. *J. Biol. Chem.*, 2003; 278: 31401–31411
- [10] Borner C.: The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions. *Mol. Immunol.*, 2003; 39: 615–647
- [11] Bruey J.M., Ducasse C., Bonniaud P., Ravagnan L., Susin S.A., Diaz-Latoud C., Gurbuxani S., Arrigo A.P., Kroemer G., Solary E., Garrido C.: Hsp27 negatively regulates cell death by interacting with cytochrome c. *Nat. Cell Biol.*, 2000; 2: 645–652
- [12] Chandra D., Choy G., Tang D.G.: Cytosolic accumulation of HSP60 during apoptosis with or without apparent mitochondrial release: evidence that its pro-apoptotic or pro-survival functions involve differential interactions with caspase-3. *J. Biol. Chem.*, 2007; 282: 31289–31301
- [13] Charette S.J., Lavoie J.N., Lambert H., Landry J.: Inhibition of Daxx-mediated apoptosis by heat shock protein 27. *Mol. Cell Biol.*, 2000; 20: 7602–7612
- [14] Chatterjee M., Jain S., Stühmer T., Andrusis M., Ungethüm U., Kuban R.J., Lorentz H., Bommert K., Topp M., Krämer D., Müller-Hermelink H.K., Einsele H., Greiner A., Bargou R.C.: STAT3 and MAPK signaling maintain overexpression of heat shock proteins 90 $\alpha$  and  $\beta$  in multiple myeloma cells, which critically contribute to tumor-cell survival. *Blood*, 2007; 109: 720–728
- [15] Chen G., Cao P., Goeddel D.V.: TNF-induced recruitment and activation of the IKK complex require Cdc37 and Hsp90. *Mol. Cell.*, 2002; 9: 401–410
- [16] Chow A.M., Steel R., Anderson R.L.: Hsp72 chaperone function is dispensable for protection against stress-induced apoptosis. *Cell Stress Chaperones*, 2009; 14: 253–263
- [17] Cohen-Saidon C., Carmi I., Keren A., Razin E.: Antiapoptotic function of Bcl-2 in mast cells is dependent on its association with heat shock protein 90 $\beta$ . *Blood*, 2006; 107: 1413–1420
- [18] Concannon C.G., Gorman A.M., Samali A.: On the role of Hsp27 in regulating apoptosis. *Apoptosis*, 2003; 8: 61–70
- [19] Creagh E.M., Carmody R.J., Cotter T.G.: Heat shock protein 70 inhibits caspase-dependent and -independent apoptosis in Jurkat T cells. *Exp. Cell Res.*, 2000; 257: 58–66
- [20] 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
- [21] Czarnecka A.M., Golik P., Bartnik E.: Mitochondria jako integratory apoptozy. *Postepy Biol. Kom.*, 2006; 33: 525–541
- [22] Feng X., Bonni S., Riabowol K.: HSP70 induction by ING proteins sensitizes cells to tumor necrosis factor  $\alpha$  receptor-mediated apoptosis. *Mol. Cell Biol.*, 2006; 26: 9244–9255
- [23] Gabai V.L., Mabuchi K., Mosser D.D., Sherman M.Y.: Hsp72 and stress kinase c-jun N-terminal kinase regulate the bid-dependent pathway in tumor necrosis factor-induced apoptosis. *Mol. Cell Biol.*, 2002; 22: 3415–3424
- [24] 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
- [25] Ghosh J.C., Dohi T., Kang B.H., Altieri D.C.: Hsp60 regulation of tumor cell apoptosis. *J. Biol. Chem.*, 2008; 283: 5188–5194
- [26] Guo F., Sigua C., Bali P., George P., Fiskus W., Scuto A., Annaravuru S., Mouttaki A., Sondarva G., Wei S., Wu J., Djeu J., Bhalla K.: Mechanistic role of heat shock protein 70 in Bcr-Abl-mediated resistance to apoptosis in human acute leukemia cells. *Blood*, 2005; 105: 1246–1255
- [27] Gupta S., Knowlton A.A.: Cytosolic heat shock protein 60, hypoxia, and apoptosis. *Circulation*, 2002; 106: 2727–2733
- [28] Gurbuxani S., Schmitt E., Cande C., Parcellier A., Hammann A., Daugas E., Kouranti I., Spahr C., Pance A., Kroemer G., Garrido C.: Heat shock protein 70 binding inhibits the nuclear import of apoptosis-inducing factor. *Oncogene*, 2003; 22: 6669–6678
- [29] Gyrd-Hansen M., Farkas T., Fehrenbacher N., Bastholm L., Hoyer-Hansen M., Elling F., Wallach D., Flavell R., Kroemer G., Nylandsted J., Jäättelä M.: Apoptosome-independent activation of the lysosomal cell death pathway by caspase-9. *Mol. Cell Biol.*, 2006; 26: 7880–7891
- [30] Jiang B., Wang K., Liang P., Xiao W., Wang H., Xiao X.: ATP-binding domain of heat shock protein 70 is essential for its effects on the inhibition of the release of the second mitochondria-derived activator of caspase and apoptosis in C2C12 cells. *FEBS J.*, 2009; 276: 2615–2624
- [31] Kalinowska M., Garncarz 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
- [32] Kamada M., So A., Muramaki M., Rocchi P., Beraldi E., Gleave M.: Hsp27 knockdown using nucleotide-based therapies inhibit tumor growth and enhance chemotherapy in human bladder cancer cells. *Mol. Cancer Ther.*, 2007; 6: 299–308
- [33] Kaźmierczuk A., Kiliańska Z.M.: Plejotropowa aktywność białek szoku cieplnego. *Postepy Hig. Med. Dosw.*, 2009; 63: 502–521
- [34] Kiliańska Z.M.: Apoptoza organizmów zwierzęcych. W: *Cytobiochemia*, red. Kłyszajko-Stefanowicz L., Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 2002; 772–815, 919–930
- [35] Kiliańska Z.M., Miśkiewicz A.: Kaspazy kręgowców i ich rola w przebiegu apoptozy. *Postepy Biol. Kom.*, 2003; 30: 129–152
- [36] Kirchhoff S.R., Gupta S., Knowlton A.A.: Cytosolic heat shock protein 60, apoptosis, and myocardial injury. *Circulation*, 2002; 105: 2899–2904
- [37] 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
- [38] Lanneau D., de Thonel A., Maurel S., Didelot C., Garrido C.: Apoptosis versus cell differentiation: role of heat shock proteins HSP90, HSP70 and HSP27. *Prion*, 2007; 1: 53–60
- [39] Laskowska E.: Małe białka szoku termicznego – rola w apoptozie, karcenogenezie i chorobach związanych z agregacją białek. *Postepy Biochem.*, 2007; 53: 19–26
- [40] Lee J.S., Lee J.J., Seo J.S.: HSP70 deficiency results in activation of c-Jun N-terminal Kinase, extracellular signal-regulated kinase, and caspase-3 in hyperosmolarity-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.*, 2005; 280: 6634–6641



- [41] Lewis J., Devin A., Miller A., Lin Y., Rodriguez Y., Neckers L., Liu Z.G.: Disruption of hsp90 function results in degradation of the death domain kinase, receptor-interacting protein (RIP), and blockage of tumor necrosis factor-induced nuclear factor- $\kappa$ B activation. *J. Biol. Chem.*, 2000; 275: 10519–10526
- [42] Lin K.M., Lin B., Lian I.Y., Mestril R., Scheffler I.E., Dillmann W.H.: Combined and individual mitochondrial HSP60 and HSP10 expression in cardiac myocytes protects mitochondrial function and prevents apoptotic cell deaths induced by simulated ischemia-reoxygenation. *Circulation*, 2001; 103: 1787–1792
- [43] Lui J.C., Kong S.K.: Heat shock protein 70 inhibits the nuclear import of apoptosis-inducing factor to avoid DNA fragmentation in TF-1 cells during erythropoiesis. *FEBS Lett.*, 2007; 581: 109–117
- [44] Matsumori Y., Hong S.M., Aoyama K., Fan Y., Kayama T., Sheldon R.A., Vexler Z.S., Ferriero D.M., Weinstein P.R., Liu J.: Hsp70 overexpression sequesters AIF and reduces neonatal hypoxic/ischemic brain injury. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 2005; 25: 899–910
- [45] Mosser D.D., Morimoto R.L.: Molecular chaperones and the stress of oncogenesis. *Oncogene*, 2004; 23: 2907–2918
- [46] 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 downstream of 17-AAG-mediated down regulation of Akt, Raf-1, and Src kinases. *Blood*, 2003; 102: 269–275
- [47] Nylandsted J., Gyrd-Hansen M., Danielewicz A., Fehrenbacher N., Lademann U., Hoyer-Hansen M., Weber E., Multhoff G., Rohde M., Jäättelä M.: Heat shock protein 70 promotes cell survival by inhibiting lysosomal membrane permeabilization. *J. Exp. Med.*, 2004; 200: 425–435
- [48] Nylandsted J., Rohde M., Brand K., Bastholm L., Elling F., Jäättelä M.: Selective depletion of heat shock protein 70 (Hsp70) activates a tumor-specific death program that is independent of caspases and bypasses Bcl-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2000; 97: 7871–7876
- [49] Orrenius S., Zhivotovsky B., Nicotera P.: Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2003; 4: 552–565
- [50] Padmini E., Vijaya Geetha B.: Modulation of ASK1 expression during overexpression of Trx and HSP70 in stressed fish liver mitochondria. *Cell Stress Chaperones*, 2009; 14: 459–467
- [51] Pandey P., Saleh A., Nakazawa A., Kumar S., Srinivasula S.M., Kumar V., Weichselbaum R., Nalin C., Alnemri E.S., Kufe D., Kharbanda S.: Negative regulation of cytochrome c-mediated oligomerization of Apaf-1 and activation of procaspase-9 by heat shock protein 90. *EMBO J.*, 2000; 19: 4310–4322
- [52] Parcellier A., Brunet M., Schmitt E., Col E., Didelot C., Hammann A., Nakayama K., Nakayama K.I., Khochbin S., Solary E., Garrido C.: HSP27 favors ubiquitination and proteasomal degradation of p27Kip1 and helps S-phase re-entry in stressed cells. *FASEB J.*, 2006; 20: 1179–1181
- [53] Parcellier A., Gurbuxani S., Schmitt E., Solary E., Garrido C.: Heat shock proteins, cellular chaperones that modulate mitochondrial cell death pathways. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2003; 304: 505–512
- [54] Paul C., Manero F., Gonin S., Kretz-Remy C., Viroit S., Arrigo A.P.: Hsp27 as a negative regulator of cytochrome C release. *Mol. Cell. Biol.*, 2002; 22: 816–834
- [55] Powers M.V., Clarke P.A., Workman P.: Death by chaperone: HSP90, HSP70 or both? *Cell Cycle*, 2009; 8: 518–526
- [56] Powers M.V., Workman P.: Targeting of multiple signaling pathways by heat shock protein 90 molecular chaperone inhibitors. *Endocr. Relat. Cancer*, 2006; 13: 125–135
- [57] Ran R., Lu A., Zhang L., Tang Y., Zhu H., Xu I.I., Feng Y., Han C., Zhou G., Rigby A.C., Sharp F.R.: Hsp70 promotes TNF-mediated apoptosis by binding IKK  $\gamma$  and impairing NF- $\kappa$ B survival signaling. *Genes Dev.*, 2004; 18: 1466–1481
- [58] Rane M.J., Pan Y., Singh S., Powell D.W., Wu R., Cummins T., Chen Q., McLeish K.R., Klein J.B.: Heat shock protein 27 controls apoptosis by regulating Akt activation. *J. Biol. Chem.*, 2003; 278: 27828–27835
- [59] Ribeil J.A., Zermati Y., Vandekerckhove J., Cathelin S., Kersual J., Dussiot M., Coulon S., Moura I.C., Zeuner A., Kirkegaard-Sorensen T., Varet B., Solary E., Garrido C., Hermine O.: Hsp70 regulates erythropoiesis by preventing caspase-3-mediated cleavage of GATA-1. *Nature*. 2007; 445: 102–105
- [60] Rocchi P., Beraldi E., Ettinger S., Fazli L., Vessella R.L., Nelson C., Gleave M.: Increased Hsp27 after androgen ablation facilitates androgen-independent progression in prostate cancer via signal transducers and activators of transcription 3-mediated suppression of apoptosis. *Cancer Res.*, 2005; 65: 11083–11093
- [61] Ruchalski K., Mao H., Li Z., Wang Z., Gillers S., Wang Y., Mosser D.D., Gabai V., Schwartz J.H., Borkan S.C.: Distinct hsp70 domains mediate apoptosis-inducing factor release and nuclear accumulation. *J. Biol. Chem.*, 2006; 281: 7873–7880
- [62] Sato S., Fujita N., Tsuruo T.: Modulation of Akt kinase activity by binding to Hsp90. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2000; 97: 10832–10837
- [63] 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
- [64] Stankiewicz A.R., Lachapelle G., Foo C.P., Radicioni S.M., Mosser D.: Hsp70 inhibits heat-induced apoptosis upstream of mitochondria by preventing Bax translocation. *J. Biol. Chem.*, 2005; 280: 38729–38739
- [65] Stankiewicz A.R., Livingstone A.M., Mohseni N., Mosser D.D.: Regulation of heat-induced apoptosis by Mcl-1 degradation and its inhibition by Hsp70. *Cell Death Differ.*, 2009; 16: 638–647
- [66] Steel R., Doherty J.P., Buzzard K., Clemons N., Hawkins C.J., Anderson R.L.: Hsp72 inhibits apoptosis upstream of the mitochondria and not through interactions with Apaf-1. *J. Biol. Chem.*, 2004; 279: 51490–51499
- [67] Takayama S., Reed J.C., Homma S.: Heat-shock proteins as regulators of apoptosis. *Oncogene*, 2003; 22: 9041–9047
- [68] Twiddy D., Brown D.G., Adrain C., Jukes R., Martin S.J., Cohen G.M., MacFarlane M., Cain K.: Pro-apoptotic proteins released from the mitochondria regulate the protein composition and caspase-processing activity of the native Apaf-1/caspase-9 apoptosome complex. *J. Biol. Chem.*, 2004; 279: 19665–19682
- [69] van Gurp M., Festjens N., van Loo G., Saelens X., Vandenabeele P.: Mitochondrial intermembrane proteins in cell death. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2003; 304: 487–497
- [70] Xu L., Voloboueva L.A., Ouyang Y., Emery J.F., Giffard R.G.: Overexpression of mitochondrial Hsp70/Hsp75 in rat brain protects mitochondria, reduces oxidative stress, and protects from focal ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 2009; 29: 365–374
- [71] Zhao C., Wang E.: Heat shock protein 90 suppresses tumor necrosis factor  $\alpha$  induced apoptosis by preventing the cleavage of Bid in NIH3T3 fibroblasts. *Cell. Signal.*, 2004; 16: 313–321
- [72] Zhuang H., Jiang W., Cheng W., Qian K., Dong W., Cao L., Huang Q., Li S., Dou F., Chiu J.F., Fang X.X., Lu M., Hua Z.C.: Down-regulation of HSP27 sensitizes TRAIL-resistant tumor cell to TRAIL-induced apoptosis. *Lung Cancer*, 2010; 68: 27–38
- [73] Zou H., Li Y., Liu X., Wang X.: An APAF-1 cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J. Biol. Chem.*, 1999; 274: 11549–11556
- [74] Żylicz M., King F.W., Wawrzynow A.: Hsp70 interactions with the p53 tumour suppressor protein. *EMBO J.*, 2001; 20: 4634–4638

Autorki deklaruja brak potencjalnych konfliktow interesow.