

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
2. LÉKAŘSKÁ FAKULTA



# **Humorálna odpoveď na proteíny tepelného šoku u pacientov s juvenilnou idiopatickou artritídou a vo vzťahu ku komplikáciám po transplantácii hematopoetických kmeňových buniek**

Dizertačná práca

Postgraduálne štúdium biomedicíny  
Odborová rada: Imunológia

**Školiteľ: Doc. RNDr. Ilona Hromadníková, PhD.**

Do 03/2007: Laboratórium bunecnej biológie, Pediatrická klinika, 2. LF UK

Od 04/2007: Oddelenie molekulárnej biológie a patológie bunky,  
Gynekologicko - pôrodnicka klinika, 3. LF UK a FNKV

**Praha 2008**

**Mgr. Denisa ZLACKÁ**

## POĎAKOVANIE

Ďakujem svojmu školiteľovi Doc. RNDr. Ilone Hromadníkovej, PhD. za odborné vedenie počas celej doby doktorandského štúdia, za spoluprácu a všestrannú pomoc pri písaní manuskriptov, ako i za cenné rady a hodnotné pripomienky, ktoré mi pomohli pri zostavovaní tejto práce.

Ďakujem všetkým spolupracovníkom lekárskej fakulty, Karlovej Univerzity v Prahe za poskytnutie biologického materiálu a patientskych dát: doc. MUDr. Petr Sedláček, CSc. z Kliniky detskej hematológie a onkológie 2 LF UK a FN Motol; MUDr. Pavla Vavřincová, CSc. z oddelenia Detskej Reumatologie Fakultnej nemocnice Královské Vinohrady a 3 LF UK; Prof. MUDr. Antonín Sosna, DrSc.; Doc. MUDr. Stanislav Popelka, CSc.; Doc. MUDr. Jan Pech, CSc.; MUDr. David Veigl z Ortopedickej kliniky UK 1. LF a FN Motol.

Za priateľské prostredie, pomoc pri prevádzaní experimentov a podnetné diskusie ohľadom riešenej problematiky ďakujem celému kolektívu spolupracovníkov.

Zároveň ďakujem všetkým priateľom a rodine za ich podporu.

**Táto štúdia bola podporovaná:**

- European Commission, the 5<sup>th</sup> Framework:  
TRANS-EUROPE, No. QLRT-2001-01936
- European Commission Marie Curie research grant, the 6<sup>th</sup> Framework:  
TRANS-NET, No. MRTN-CT-2004-512253
- Ministerstvo Zdravotníctva Českej republiky: No. 00064203
- Grantová Agenda Českej republiky: No. 204/06/0771

<b>ZOZNAM TABULIEK.....</b>	<b>VII</b>
<b>ZOZNAM POUŽITÝCH OBRÁZKOV .....</b>	<b>VIII</b>
<b>ZOZNAM SKRATIEK A SYMBOLOV.....</b>	<b>IX</b>
<b>I. ÚVOD.....</b>	<b>1</b>
<b>II. PREHĽAD RIEŠENEJ PROBLEMATIKY .....</b>	<b>2</b>
<b>II.1. História proteínov tepelného šoku.....</b>	<b>2</b>
<b>II.2. Klasifikácia a funkcie proteínov tepelného šoku.....</b>	<b>3</b>
II.2.1. Proteíny tepelného šoku fungujú ako molekulárne chaperony.....	4
II.2.2. Extracelulárna funkcia Hsps .....	4
II.2.3. Úloha proteínov tepelného šoku v antigénnom spracovaní a prezentácii.....	5
II.2.4. Hsps ako inhibítory apoptózy.....	6
II.2.5. Rodina malých proteínov tepelného šoku .....	9
II.2.5.2. Hsp27 .....	10
II.2.5.2.1. Hsp27 a jeho úloha v apoptóze .....	11
II.2.5.3. Hsp32 (Hemoxygenáza).....	12
II.2.6. Rodina Hsp40 a rodina DnaJ.....	13
II.2.7. Rodina Hsp60.....	14
II.2.7.1. Hsp60: štruktúra .....	15
II.2.7.2. Hsp60: funkcia .....	16
II.2.8. Rodina Hsp70.....	17
II.2.8.1. Hsp70: štruktúra a funkcie.....	18
II.2.8.2. Hsp70 a jeho úloha v apoptóze.....	20
II.2.9. Rodina Hsp90.....	22
II.2.9.1. Hsp90: štruktúra a funkcie.....	23
II.2.9.2. Hsp90 a jeho úloha v apoptóze.....	25
II.2.10. Rodina Hsp110.....	26
<b>III. EXTRACELULÁRNE FUNKCIE PROTEÍNOV TEPELNÉHO ŠOKU .....</b>	<b>28</b>
<b>III.1. Hsps sú prítomné v extracelulárnom priestore .....</b>	<b>28</b>
<b>III.2. Imunologická úloha extracelulárnych Hsps .....</b>	<b>28</b>
<b>III.3. Receptory proteínov tepelného šoku .....</b>	<b>30</b>
<b>IV. PROTEÍNY TEPELNÉHO ŠOKU ZA FYZIOLOGICKÝCH PODMIENOK.....</b>	<b>33</b>
<b>V. PROTEÍNY TEPELNÉHO ŠOKU ZA PATOLOGICKÝCH PODMIENOK .....</b>	<b>35</b>
<b>V.1. Proteíny tepelného šoku a infekcie .....</b>	<b>35</b>
<b>V.2. Proteíny tepelného šoku a autoimunitné ochorenia .....</b>	<b>36</b>
V.2.1. Proteíny tepelného šoku a reumatoidná artritída.....	37
V.2.2. Proteíny tepelného šoku a juvenilná idiopatická artritída .....	39

V.2.3. Proteíny tepelného šoku a diabetes mellitus .....	41
V.2.4. Proteíny tepelného šoku a ateroskleróza .....	43
<b>V.3. Proteíny tepelného šoku a Graft versus Host Disease.....</b>	<b>44</b>
<b>V.4. Proteíny tepelného šoku a onkohematologické ochorenia.....</b>	<b>46</b>
V.4.1. Proteíny tepelného šoku a akútna myeloidná leukémia .....	46
V.4.2. Proteíny tepelného šoku a myelodysplastický syndróm .....	48
V.4.3. Proteíny tepelného šoku a nehodgkinské lymfomy (NHLs) .....	49
<b>V.5. Proteíny tepelného šoku a solídne nádory.....</b>	<b>49</b>
V.5. 1. Úloha proteínov tepelného šoku v diagnostike nádorov .....	50
V.5. 2. Úloha proteínov tepelného šoku v prognóze solídnych nádorov .....	53
V.5.3. Úloha proteínov tepelného šoku v predikcii odpovede na protinádorovú liečbu .....	54
<b>VI. PROTEÍNY TEPELNÉHO ŠOKU A ICH POTENCIÁLNY TERAPEUTICKÝ</b>	
<b>VÝZNAM .....</b>	<b>55</b>
<b>VI.1. Úloha proteínov tepelného šoku vo vývoji vakcín proti infekčným ochoreniam .....</b>	<b>55</b>
<b>VI.2. Úloha proteínov tepelného šoku v protinádorovej terapii.....</b>	<b>57</b>
VI.2.1. Využitie proteínov tepelného šoku ako nosičov/adjuvants.....	59
VI.2.1.1. TKD.....	60
<b>VI.3. Úloha proteínov tepelného šoku vo vývoji vakcín proti autoimunitným ochoreniam.....</b>	<b>61</b>
VI.3.1. RA a dna P1.....	61
VI.3.2. Diabetes mellitus I. typu a diaped277.....	61
<b>VII. CIELE PRÁCE.....</b>	<b>62</b>
<b>VIII. VÝSLEDKY A DISKUSIA .....</b>	<b>64</b>
<b>VIII.1. Skúmanie humorálnej odpovede proti proteínom tepelného šoku (rh Hsp60, <i>M. bovis</i> Hsp65 a rh Hsp70) u detských pacientov vo vzťahu ku komplikáciám po alogénnej transplantácii hematopoetických kmeňových/progenitorových buniek (HSCT) .....</b>	<b>64</b>
VIII.1.1. Porovnanie senzitivity a špecifity Western blottingu a ELISA v detekcii protilátok proti proteínom tepelného šoku rh Hsp60, <i>M. bovis</i> Hsp65 a inducibilnej formy rh Hsp70 .....	64
VIII.1.2. Protilátky proti proteínom tepelného šoku Hsp60, 65 a 70 sú prítomné pred, v priebehu prípravného režimu i v celom období po transplantácii hematopoetických kmeňových/progenitorových buniek .....	66
<b>VIII.2. Skúmanie humorálnej odpovede proti proteínom tepelného šoku (rh Hsp60, <i>M. bovis</i> Hsp65 a rh Hsp70) u pacientov s juvenilnou idiopatickou artritídou (JIA).....</b>	<b>69</b>
VIII.2.1. Skríning protilátok proti rh Hsp60, <i>M. bovis</i> Hsp65 and rh Hsp70 v skupine pacientov s JIA a zdravých kontrol – výskyt protilátok anti-Hsp70 (Ig total, IgG a IgM) u JIA pacientov .....	69
VIII.2.2. Vysoké hladiny IgG protilátok proti <i>M. bovis</i> Hsp65 a jeho P180-188 epitopu môžu odrážať najmenej závažné prípady JIA .....	71
<b>VIII.3. Štúdium membránovej expresie inducibilnej formy Hsp70 na synoviálnych bunkách získaných od pacientov s reumatoidnou artritídou a juvenilnou idiopatickou artritídou.....</b>	<b>73</b>
VIII.3.1. Synoviálne bunky získané zo synoviálnych tkanív pacientov s vážnym priebehom RA/JIA sú silne pozitívne na membránovo- vyjadrenú Hsp70.....	73
VIII.3.2. Hsp70 uvoľnený zo zápalového synoviálneho tkaniva môže byť zachytený na bunčnom povrchu synoviálnych buniek z extracelulárneho priestoru cez receptor CD91 .....	75

<b>IX. ZHRNUTIE.....</b>	<b>77</b>
<b>X. ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY .....</b>	<b>80</b>
<b>XI. ZOZNAM PUBLIKÁCIÍ .....</b>	<b>107</b>
<b>XII. PRÍLOHY .....</b>	<b>109</b>

## **Zoznam tabuliek**

Tabuľka 1: Hlavné proteíny tepelného šoku a ich funkcia.....	<b>8</b>
Tabuľka 2: Gény kódujúce jednotlivé proteíny rodiny Hsp70.....	<b>18</b>
Tabuľka 3: Imunitná odpoveď proti Hsps v rôznych infekčných ochoreniach .....	<b>36</b>

## Zoznam použitých obrázkov

<b>Obrázok 1:</b> Fosforylácia proteínu Hsp27 je spojená s jeho funkciou. ....	<b>11</b>
<b>Obrázok 2:</b> Tlmenie apoptotických dráh pomocou Hsp .....	<b>12</b>
<b>Obrázok 3:</b> Kryštalická štruktúra ľudskej Hemoxygenázy-1.....	<b>13</b>
<b>Obrázok 4:</b> Štruktúra chaperoninu 10 a chaperoninu 60 .....	<b>15</b>
<b>Obrázok 5:</b> Substrát viažuca doména Hsp70 v komplexe so substrátovým peptidom .....	<b>19</b>
<b>Obrázok 6:</b> Úloha Hsp70 v apoptóze .....	<b>22</b>
<b>Obrázok 7:</b> Kryštalická štruktúra Hsp90-Sbal uzatvoreného chaperonového komplexu ..	<b>24</b>



## Zoznam skratiek a symbolov

AA	adjuvantná artritída
17-AAG	17-N-Allylamino-17-demethoxygeldanamycin
ADCC	bunečná cytotoxicita závislá na protilátkach
ADP	adenosine diphosphate
AIF	apoptosis- inducing factor
Akt/PKB	proteínová kináza B/Akt, serín/threonínová kináza
AML	akútna myeloidná leukémia
ANA	antinukleárne protilátky
Apaf-1	apoptosis protease- activating factor - 1
APC	antigén prezentujúci bunky
Ask1	apoptosis signal- regulating kinase 1
ATP	adenosine triphosphate
BAG	nucleotide exchange factor
Bax	apoptosis regulating protein
BCG	Bacille Calmette- Guerin
Bid	pro- apoptotický člen Bcl-2 proteínovej rodiny
βME	β- Mercaptoethanol
CCT	chaperonins containing TCP-1
CD	diferenciačný antigén
CHIP	carboxyl- terminus of Hsp70 Interacting Protein
CML	chronická myeloidná leukémia
CMML	chronická myelomonocytárna leukémia
CMV	cytomegalovirus
CTL	cytotoxické T lymfocyty
Daxx	mediátor Fas- indukovanej apoptózy
DCs	dendritické bunky
DNA	deoxyribonukleová kyselina
ELISA	enzyme- linked immunosorbent assay
ER	endoplazmatické retikulum
FAB	Francúzko- Americko- Anglická klasifikácia
FACS	fluorescence activated cell sorting
Fas	člen tumor nekrotizujúci faktor (TNF) receptorovej superodiny

GAD65	glutamic acid decarboxylase
Grp	glukózou regulovaný proteín
GvHD	Graft- <i>versus</i> -Host Disease
Hif1	hypoxia-inducible factor 1
HIV	vírus ľudskej imunodeficiencie
HLA	hlavný ľudský (histokompatibilitný) antigén
HOP	Hsp70/Hsp90 Organizing Protein
HPV	human papillomavirus
HSCT	transplantácia hematopoetických kmeňových/progenitorových buniek
HSE	tepelné šokové elementy
HSF	tepelný šokový faktor
HSPs	proteíny tepelného šoku
HSV	herpes simplex vírus
IFN	interferon
Ig	imunoglobulín
IL	interleukin
ILAR	International League of Associations for Rheumatology
JCA	juvenilná chronická artritída
JIA	juvenilná idiopatická artritída
JNK	c-Jun N-terminal kinase
JRA	juvenilná reumatoidná artritída
kDa	kilodalton
LDL	low density lipoprotein
LPS	lipopolysacharid
MAP-K	mitogénmi aktivovaná proteínkináza
<i>M. bovis</i>	<i>Mycobacterium bovis</i>
MDS	myelodysplastický syndróm
MDS-RA	myelodysplastický syndróm - refraktorná anémia
MHC	hlavný histokompatibilitný komplex
MMP	matrix metalloproteinase
<i>M. tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
NF-kB	nuclear factor-kB
NHLs	nehodgkinské lymfomy

NK	prírodný zabíjači
NOD	neobézny diabetický
OD	optická denzita
PBL	periférne krvné lymfocyty
PBMC	mononukleárne bunky periférnej krvi
PBS	phosphate-buffered saline, fosfátový pufor
RA	reumatoidná artritída
RAEB	refrakterná anémia s excesom (nadbytkom) blastov
RAEB-t	refrakterná anémia s excesom blastov v transformácii
Raf-1	serin/threonin- špecifická kináza
RARS	refrakterná anémia s prstenčítymi sideroblastami
RF	reumatoidný faktor
rh	rekombinantný ľudský
RIP	receptor interacting protein
SC	synoviálne bunky
SDS	sodiumdodecyl sulphate
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis
SF	synoviálna tekutina
sHsps	malé proteíny tepelného šoku
SLE	systemový lupus erythematosus
SR-A	scavengerový receptor triedy A
TCP-1	t-complex polypeptide 1
TGF	transformujúci rastový faktor
TLR	receptory skupiny Toll
TNF	tumor nekrotizujúci faktor
TNFR-1	receptor pre tumor nekrotizujúci faktor
UV	ultrafialové žiarenie
WB	Western blotting

## I. Úvod

Proteíny tepelného šoku (Heat shock proteins, Hsps) patria k evolučne najstarším molekulám vyskytujúcim sa u prokaryot a eukaryot a sú významné v mnohých biologických procesoch. Syntetizujú sa v bunke ako odpoveď na pôsobenie akéhokoľvek stresu. V užšom slova zmysle vymedzuje pojem proteíny tepelného šoku len tie proteíny, ktoré tvoria bunky bezprostredne po vystavení zvýšenej teplote. V literatúre sa však používa označenie proteíny tepelného šoku pre všetky typy stresových proteínov nezávisle od toho, aká forma stresu ich syntézu vyvolala. Sú indukované nielen zvýšenou teplotou, ale i množstvom rôznych stresujúcich situácií ako je zmena pH, osmolarity, pôsobenie infekčných agens, rôznych chemikálií (etanol), ťažkých kovov, ultrafialového žiarenia, oxidačného stresu, toxínov, antibiotík a iné.

Funkcie proteínov tepelného šoku sú veľmi rozmanité. Najčastejšie býva uvádzaná ich funkcia molekulárnych „chaperonov“, teda proteínov, ktoré sú schopné ovplyvňovať terciárnu a kvartérnu štruktúru ostatných proteínov. Ďalej sa uvádza množstvo funkcií, napr. inhibícia apoptózy, regulácia bunecného cyklu, ochrana cytoskeletu a ďalšie.

Na základe ich molekulovej hmotnosti sa delia do niekoľkých skupín. Členovia jednotlivých rodín vykazujú vysokú hladinu sekvenčnej homológie, ktorá je dokonca i medzi eukaryotickými a prokaryotickými členmi. Sú imunologicky dominantnými molekulami.

## II. Prehľad riešenej problematiky

### II.1. História proteínov tepelného šoku

V roku 1962 Ritossa so svojimi spolupracovníkmi po prvýkrát zistil, že vystavenie lariev *Drosophila melanogaster* teplotnému šoku indukuje špecifickú génovú aktiváciu (Ritossa, 1962), ale až v roku 1974 boli prvé produkty týchto génov pomenované **proteíny tepelného šoku** (Tissieres, 1974).

Proteíny tepelného šoku sú prítomné v prokaryotických a eukaryotických bunkách a sú fylogeneticky konzervatívnymi proteínmi (až 50 % sekvenčnej homológie molekúl medzi ľudskými a bakteriálnymi Hsps) (Pockley, 2001). Mikrobiálne proteíny tepelného šoku vystupujú ako silné imunogény.

Za fyziologických podmienok sú proteíny tepelného šoku prítomné v malých koncentráciách a fungujú ako chaperony alebo chaperoníny. Ich expresia je konštitučná pri vývojových procesoch ako je morfogénéza, homeostáza (odstraňovanie poškodených a chybné zložených bielkovín v bunke), bunecný cyklus, stabilizácia proteínov, udržiavanie terciárnej štruktúry, ochrana pred denaturáciou, agregáciou a tým pred stratou funkčnosti, pri účasti pri transporte proteínov medzi intracelulárnymi kompartmentami (ER, lysozom, mitochondrie, atď.) a pri prezentácií peptidov na pozadí MHC molekúl.

Za stresových podmienok je expresia indukovaná. Ako z názvu vyplýva, tieto proteíny sú indukované v bunkách vystavených subletálnemu tepelnému šoku (Kaufmann, 1990). Tepelný šok nie je jediným stimulom, ktorý môže vyvolať zvýšenú syntézu. Expresia proteínov tepelného šoku môže byť výrazne zvýšená rôznymi stresovými podmienkami: **fyzikálne faktory**: osmotický šok, ultrafialové žiarenie, **chemické faktory**: ióny ťažkých kovov, faktory pôsobiace zmeny metabolizmu, toxické chemikálie (etanol), hladovanie, cytokíny, hormóny, antibiotiká, **fyzilogické podnety** (rastové faktory, bunecná diferenciácia) a **patologické vplyvy**: horúčka, zápal, vírusové a mikrobiálne infekcie, nádorové bujnenie, autoimunitné ochorenia (Linguist, 1986 a 1988; Jaattela, 1999).

Proteíny tepelného šoku sa nachádzajú v cytozole, v mitochondriách, endoplazmatickom retikule (ER) a v jadre.

## II.2. Klasifikácia a funkcie proteínov tepelného šoku

Na základe molekulárnej hmotnosti sú proteíny tepelného šoku (Hsps) klasifikované do niekoľkých skupín: rodina malých proteínov tepelného šoku, Hsp60 alebo chaperoníny, Hsp70, Hsp90, Hsp110 (Tabuľka č. 1).

Členovia jednotlivých rodín sú vyjadrení buď konštitučne alebo regulovaní indukčne a sú cieleň na rôzne subcelulárne oddelenia.

Regulácia transkripcie génov proteínov tepelného šoku je sprostredkovaná interakciou transkripčných faktorov (tepelné šokové faktory, HSF) s elementmi tepelného šoku (HSEs). Regulácia expzie Hsps prebieha najmä na úrovni transkripcie. Na špecifické sekvencie v promótorovej oblasti génov (HSEs) sa viažu aktivované špecifické transkripčné faktory HSF a spúšťajú transkripciu génov hsp. (Voellmy, 1994; Morimoto, 1994).

U stavovcov je hlavným predstaviteľom tepelných šokových faktorov HSF1. V nestresovanom stave je prítomný v cytoplazme ako latentná monomerická molekula a nie je schopný viazať sa na DNA. Za stresových podmienok, HSF1 je hyperfosforylovaný proteínkinázami MAPK (mitogén- aktivovaná proteínkináza) (Knauf, 1996; Kim, 1997) a prevedený na fosforylované triméry so schopnosťou viazať sa na DNA. Po aktivácii sa premiestňuje z cytoplazmy do jadra (Morimoto, 1998). HSF2 je aktivovaný počas embryonálneho vývoja a bunečnej diferenciácie (Wu, 1994; Morimoto, 1994). Na rozdiel od HSF1, za stresových podmienok nepodlieha zmenám a existuje len vo forme trimérov. Má význam v diferenciácii multipotentných hematopoetických buniek do prekursorov erytroidnej línie (Pirkkala, 2001).

### **II.2.1. Proteíny tepelného šoku fungujú ako molekulárne chaperony**

Molekulárne chaperony sú definované ako proteíny, ktoré vo všeobecnosti majú schopnosť modifikovať štruktúru a interagovať s ďalšími proteínmi (Beckmann, 1998; Gething, 1992; Freeman, 2002). Asistujú pri správnom nekovalentnom skladaní proteínových štruktúr, ale nie sú ich permanentnými zložkami. Viazu sa k čiastočne zloženým reťazcom a udržiavajú ich v rozvinutej forme pri pohybe cytoplazmou a cez jednotlivé bunecné membrány. Chaperony sú životne dôležité, pretože chránia novosyntetizované proteínové reťazce pred asociáciou s nesprávnymi partnermi (Georgopolis, 1993).

Hsps fungujú ako molekulárne chaperony pre rôzne bunecné proteíny. Hsp27 funguje ako chaperon, pričom zabraňuje agregácii proteínov (Schmitt, 2007), hra významnú úlohu v renaturácii nesprávne alebo čiastočne denaturovaných proteínov (Ehrnsperger, 1997). Hsp70 sa uplatňuje pri zbalení novo- syntetizovaných proteínov, pri znovu zbalení chybné zbalených alebo denaturovaných proteínov, koordinuje transmembránový transport proteínov a degraduje nestabilné a chybné zbalené proteíny (Shi, 1992; Daugaard, 2007). Hsp90 je súčasťou chaperonovej bunecnej siete, ktorá reguluje proteínové zbalenie. Hsp110 sa viaže na nezbalené proteíny a zabraňuje ich agregácii (Oh, 1999).

Porucha v zbalovaní a agregácia proteínov môže viesť k chybné aktivácii rôznych signalizačných dráh.

### **II.2.2. Extracelulárna funkcia Hsps**

Hsps majú dvojitú funkciu v závislosti na ich intracelulárnej alebo extracelulárnej lokalizácii. Intracelulárne Hsps majú protektívnu funkciu a umožňujú bunkám prežiť letálne podmienky.

Na druhej strane, extracelulárne lokalizované alebo membránovo- viazané Hsps sprostredkujú imunologické funkcie. Môžu vyvolať utlmenú imunitnú odpoveď buď pomocou adaptívneho alebo prirodzeného imunitného systému. Hsp 70 sa môže viazať na plazmatickú membránu. Hsp70 alebo Hsp90 sa môžu nachádzať extracelulárnom priestore (Schmitt, 2007).

## **II.2.3. Úloha proteínov tepelného šoku v antigénnom spracovaní a prezentácii**

### **II.2.3.1. Hsps sú zahrnuté v MHC I prezentácii**

Proteíny tepelného šoku dohliadajú na antigénne peptidy, ktoré sú vytvorené vo vnútri bunky. Tento dohľad je pomocou MHC molekúl I. triedy súčasťou endogénnej dráhy antigénnej prezentácie. Navyše peptidy, ktoré sú modifikované proteínmi tepelného šoku alebo sú uvoľnené bunecným stresom, sú pohlcované antigén- prezentujúcimi bunkami a opätovne prezentované MHC molekulami (Li, 2002). Proteíny tepelného šoku, ako Hsp70, Hsp90, Hsp110 interagujú so širokým spektrom peptidov vytvorených vo vnútri buniek (Srivastava, 1998). Tieto peptidy zahrňujú vlastné peptidy (self- peptides), ako aj antigénne peptidy, ktoré môžu byť nádorovými antigénmi (Srivastava, 1998; Ishii, 1999; Castelli, 2001), bakteriálnymi antigénmi (Zügel, 2001), vírovými antigénmi (Blachere, 1993; Suto, 1995) a minoritnými histokompatibilnými antigénmi (Arnold, 1995).

So zreteľom na úlohu Hsp- peptidových komplexov (nachádzajú sa buď vo vnútri bunky, v ktorej sú vytvorené alebo mimo nej) existujú dva návrhy:

1. „*vnútorná udalosť*“ (inside story) – dohľad peptidov proteínmi tepelného šoku (nachádzajú sa v cytozole - Hsp70, Hsp90 a Hsp110 a v ER – grp96) je mechanizmus prebiehajúci na ich ceste k MHC molekulám I. triedy buniek, v ktorých sú Hsp- peptidové komplexy tvorené
2. „*vonkajšia udalosť*“ (outside story) – Hsp- modifikované peptidy sú vystavené na bunecnom povrchu alebo sú v dôsledku stresu, či bunecnej smrti uvoľnené z buniek. Následne sú pohlcované obklopujúcimi antigén- prezentujúcimi bunkami (APC), čo má za následok opätovnú prezentáciu (skríženú prezentáciu) peptidov MHC molekulami I. triedy na APCs (Li, 2002).

### **II.2.3.2. Hsps sú zahrnuté v MHC II prezentácii**

Existuje malé množstvo príkladov, ktoré naznačujú, že rovnako Hsps prostredníctvom MHC molekúl II. triedy zohrávajú úlohu v antigénnej prezentácii. Úloha Hsp70 v MHC II prezentácii bola prvýkrát popísaná deNagelom (1992). Panjwani a kolektív ukázal, že zvýšená expresia konštitučne vyjadrenej Hsc73 v makrofágovej bunecnej línii viedla skrz MHC II k zvýšenej prezentácii exogénneho antigénu (Panjwani,



1999). Zapojenie inducibilnej Hsp70 v MHC II- závislom autoantigénnom spracovaní prezentoval Mycko (2004). Ďalšie štúdie ukázali, že bakteriálny Hsp70 (*Mycobacterium tuberculosis* Hsp70) prostredníctvom MHC II podporoval prezentáciu antigénnych peptidov (Tobian, 2004). Skúmaním potenciálu antigénnych peptidov zvyšovať aktiváciu a proliferáciu ľudských pamäťových CD4+ T buniek sa zaoberal Haug. Zistil, že Hsp70-peptidové komplexy pochádzajúce z toxínu tetanu a hemaglutinínu chrípky a obsahujúce ľudskú stres- inducibilnú Hsp70, amplifikujú proliferáciu antigén- špecifických CD4+ T buniek (Haug, 2005).

### II.2.4. Hsps ako inhibítory apoptózy

Apoptóza (naprogramovaná bunecná smrť) je fyziologický proces, ktorým sú z organizmu odstraňované rôzne typy buniek. Dochádza pri ňom k zmenám bunecnej membrány, k zosieťovaniu cytoplazmatických proteínov, k štiepeniu chromatinu a k rozpadu bunky na tzv. apoptotické telieska. Na rozdiel od smrti nekrotickej, apoptóza nevedie k lýze bunky a k poškodeniu okolitého tkaniva uvoľnenými enzýmami.

Na úplnom začiatku dochádza ku konformačným zmenám povrchových molekúl – apoptotických receptorov s následkom aktivácie ich vnútrobunecných domén, prípadne k aktivácii skupiny špecifických génov a k expresii príslušných proteínov s následkom poškodenia mitochondriálnych membrán. Uvedená počiatočná fáza sa označuje ako fáza **signalizačná** a jej cieľom je vytvorenie alebo aktivácia tzv. adapterových proteínov, teda akejsi vstupnej brány do fázy nasledujúcej, **efektorovej**. Tá je charakteristická postupnou aktiváciou proteolytických enzýmov (kaspáz) a postupným štiepením substrátov prítomných ako v cytoplazme, tak i bunecnom jadre.

**Vonkajšia cesta** indukcie apoptózy je spúšťaná interakciou povrchových receptorových systémov bunky (tzv. rodina receptorov pre TNF $\alpha$  - TNFR-1 /CD120/, Apo/Fas-1 /CD95/, TRAMP, TRAIL-1 a 2) s príslušnými ligandami, čo vedie k aktivácii kaspázy-8 (iniciačná proteínáza kaspázovej kaskády vonkajšej cesty).

Aktivátormi **vnútornej cesty** indukcie apoptózy sú signály z vnútorného prostredia bunky ako napr. bunecné metabolické zmeny, voľné radikály, pôsobenie vírusov a cytostatík. Najčastejšie však na počiatku vnútornej cesty stojí poškodenie DNA a následná aktivácia proteínu p53. Iniciácia vnútornej cesty vedie k poškodeniu mitochondrií, k redukcii mitochondriálneho membránového potenciálu, k zvýšeniu permeability mitochondriálnych membrán, ktoré je spojené s únikom aktívnych zložiek

## Prehľad riešenej problematiky

z mitochondriálnej matrix, resp. z intermembránového priestoru: faktor AIF (Apoptosis Inducing Factor- spojovaný s kondenzáciou chromatinu a fragmentáciou DNA), cytochróm c (kľúčová úloha v aktivácii kaspázy 9 za spolupôsobenia cytozolového proteínu Apaf-1), voľné kyslíkové radikály, kalciové ióny. Dochádza k tvorbe apoptozómu zloženého z cytochrómu c (Apaf-2 – Apoptotic Protease Activating Factor-2), Apaf-1 (Apoptotic Protease Activating Factor-1), dATP a kaspázy-9 (Apaf-3).

Hlavnú efektorovú úlohu v regulácii apoptózy má kaspáza-3, ktorá amplifikuje činnosť iniciačných proteináz a podieľa sa na fragmentácii DNA. Aktivita kaspáz je zodpovedná za štrukturálne zmeny apoptotických buniek (Krejsek, 2004).

Regulácia apoptózy je nevyhnutnou súčasťou signalizačnej a efektorovej fázy. Dôležitú úlohu zohrávajú proteíny tepelného šoku a proteíny z rodiny Bcl2 (B cell lymphoma) (Aghdassi, 2007). Podľa štruktúry sa delia do troch podrodín (podrodina Bcl-2, Bax a BH-3). BCL-2 je proto-onkogén lokalizovaný na chromozóme 18. Gén bol objavený u B- bunčnej leukémie a u B- bunčného lymfomu. Produkt génu, proteín Bcl-2, je v bunke lokalizovaný na vnútornej a vonkajšej membráne mitochondrii, na ER a na jadrovej membráne. Spolu s proteínmi Bcl-XL a Bcl-W tvorí prvú podrodinu (*pro-survival*), pre ktorú je charakteristická schopnosť aktívne zabrániť rozvoju apoptózy (inhibujú únik cytochrómu c a AIF z mitochondrie, regulujú hladinu intracelulárneho kalcia..). Ostávajúce podrodiny (*pro-apoptotic*) Bax (Bax, Bak a Bok) a BH3 (Bad, Bid, Bik, Blk, Hrk) charakteristicky apoptózu akcelerujú (Krejsek, 2004).

Hsp27, stres-inducibilná Hsp70 a Hsp90 pôsobia ako inhibítory apoptózy. Regulujú obe, vnútornú aj vonkajšiu cestu indukcie apoptózy (Schmitt, 2007). Čo sa týka vnútornej (mitochondriálnej) cesty, na mitochondriálnej úrovni, Hsp27 prostredníctvom proteínu Bid a Hsp70 inhibíciou Bax, inhibujú mitochondriálne uvoľnenie pro- apoptotických proteínov. Na post- mitochondriálnej úrovni, sa Hsp27 viaže na cytochróm c, Hsp70 a Hsp90 na Apaf1, vo všetkých prípadoch vedúce k inhibícii tvorby apoptozómov a tým k zabráneniu aktivácie kaspáz a apoptózy.

Čo sa týka vonkajšej cesty, Hsp27 môže interagovať s DAXX (mediátor Fas-indukovanej apoptózy) a inhibovať apoptickú dráhu, zatiaľ čo Hsp70 sa viaže na JNK1, čo vedie k inhibícii aktivácie JNK (c- Jun N- terminal kinase). Hsp90 interaguje s kinázou RIP1 (receptor interacting protein) a Akt (protein kinase), čo v oboch prípadoch vedie k podpore NF-κB- sprostredkovanej inhibície apoptózy (Shmitt, 2007). Úloha jednotlivých Hsps v apoptóze je detailnejšie popísaná v nasledujúcich kapitolách.

Tabuľka 1: Hlavné proteíny tepelného šoku a ich funkcia (Pockley, 2001; van Eden, 2005)

Rodina Hsp a jej členovia	Rodinný členovia v cicavcoch	Bunečná lokalizácia	Funkcia	Typické mikrobiálne homology
<b>Small</b>				
Hsp10	Hsp10 (Cpn10)	mitochondrie	ko-chaperon pre Hsp60	GroES ( <i>E.coli</i> )
$\alpha$ B-crystalin		cytoplazma	cytoskeletálna stabilizácia	
Hsp27		cytoplazma/jadro	aktívová dynamika	
Hemoxygenáza, Hsp32		cytoplazma	hemový katabolizmus, anti-oxidačné vlastnosti	
<b>Hsp40</b>				
Hsp40	HDJ1, HDJ2	cytoplazma	ko-chaperon pre Hsp70	DnaJ ( <i>E.coli</i> ) a Ydj1 ( <i>S. cerevisiae</i> )
<b>Hsp60 alebo chaperoníny</b>				
Hsp60	Hsp60 (Cpn60)	mitochondrie	chaperonová aktivita pri správnom zbaľovaní a tvorba, skladanie multimerických proteínových štruktúr	GroEL ( <i>E.coli</i> )
TCP-1		cytoplazma		
<b>Hsp70</b>				
Hsp70	Hsp70, Hsp70-1 (A alebo B, Hsp72, Hsp70i (inducibilný)	cytoplazma/jadro	chaperony pre vznikajúce polypeptidové reťazce, transport cez subcelulárne organelové membrány, disociuje niektoré oligomery, viaže ATP a vykazuje ATP-ázovú aktivitu, zabraňuje agregácii nezbalených peptidov  Hsp70 je zahrnutý v regulácii činnosti HSF1	DnaK ( <i>E.coli</i> ) a Ssa1, Ssa2, Ssa3, Ssa4 a Kar2 ( <i>S. cerevisiae</i> )
	Hsc70 Hsp70t, Hsp73, Hsp70-2 (konštitučný)	cytoplazma/jadro/ peroxizomy		
	Bip (Grp78) (konštitučný)	ER		
	mtHsp70 (Grp75) (konštitučný)	mitochondrie		
<b>Hsp90</b>				
Hsp90 ( $\alpha$ a $\beta$ )		cytoplazma	viažu sa na ďalšie proteíny, regulujú proteínovú aktivitu, zabraňujú agregácii znova zbalených peptidov, skladanie a zbaľovanie novo nasyntetizovaných peptidov  Hsp90 je za nestresových podmienok zahrnutý v údržbe monomerickeho stavu HSF1, predstavuje 1-2 % z celkového proteínu	
Grp94/gp96/ Hsp100		ER		
Hsp90 N		ER, mitochondrie		
<b>Hsp110</b>				
Hsp110 (ľudský)		jadro/cytoplazma	tepelná tolerancia	
Apg-1 (myši)		cytoplazma	zbaľovanie proteínov	
Hsp105		cytoplazma		

**Skratky:** Apg-1 – proteínová kináza nevyhnutná pre autofágy; BIP - proteín viažuci imunoglobulinový ťažký reťazec; CPN - chaperonín; *E. coli* - *Escherichia coli*; ER - endoplazmatické retikulum; GRP - proteín regulovaný glukózou; HDJ – DnaJ homolog; HSF-1 – tepelný šokový faktor 1; Hsp - (Heat shock protein), proteín tepelného šoku; mtHsp70 - mitochondriálny Hsp70; *S. cerevisiae* – *Saccharomyces cerevisiae*; TCP-1 s– (tailless complex polypeptide), bezchvostý polypeptidový komplex

### II.2.5. Rodina malých proteínov tepelného šoku

Rodina malých proteínov tepelného šoku (sHsps – small Hsps) obsahuje proteíny, ktoré sú medzi triedami vysoko konzervované a ich molekulová hmotnosť sa pohybuje od 15 kDa do 30 kDa. Existujú ako homo- alebo hetero- komplexy dosahujúce veľkosť od malých jednotiek až po veľké multimerické komplexy o veľkosti približne 700 kDa (Beck, 2000).

Doposiaľ je identifikovaných 10 izoforiem sHsps (HspB1 až HspB10). Z nich sa veľmi často vyskytuje  **$\alpha$ A-crystalin** (HspB4) a  **$\alpha$ B-crystalin** (HspB5), Hsps s molekulovou hmotnosťou 25 – 27 kDa (**Hsp27/Hsp25**, HspB1), **Hsps** s molekulovou hmotnosťou 27 kDa (HspB3) a HspB2, ktorý sa tiež nazýva **MKBP** (myosin dystrophy binding protein) (Kappe, 2003). Oba, HspB1 a  $\alpha$ B-crystalin sú konštitučne vyjadrené v rôznych tkanivách, avšak ich expresia je tiež zvýšene regulovaná za podmienok stresu, ako aj pri rôznych ochoreniach.

Členovia rodiny sHsp sa rozdeľujú podľa toho, či obsahujú konzervovaný C-koncový región známy ako  $\alpha$ -crystalinová doména a variabilný N-koncový región.  $\alpha$ -crystalinová doména obsahuje dva anti- paralelné  $\beta$  – listy, ktoré sú dôležité pre tvorbu stabilných dimérov (Kappe, 2003). Aj napriek tomu, že proteíny ako Hsp32/HO-I postrádajú kritickú C-koncovú  $\alpha$ -crystalinovú doménu charakteristickú pre rodinu proteínov tepelného šoku, sú zaradené ako malé proteíny tepelného šoku.

Pre malé proteíny tepelného šoku je charakteristická chaperonova funkcia, zúčastňujú sa inhibície apoptózy a ovplyvňujú organizáciu cytoskeletu (Haslbeck, 2002).

#### II.2.5.1. Hsp10

Hsp10, rovnako známy ako *chaperonin* 10 (Cpn 10), je ~ 10 kDa cicavčí ekvivalent bakteriálneho génového produktu GroES. Existuje *in vivo* ako oligomér a interaguje s Hsp60, čo je cicavčí homológ bakteriálneho proteínu GroEL. Spolu Hsp10/Hsp60 sa nachádzajú vo vnútri mitochondrií, uľahčujú zbalovanie novo- syntetizovaných proteínov a môžu sa podieľať na znovu zbalení proteínov poškodených stresom. Podobný

chaperónový systém funguje v rastlinách, vo vnútri chloroplastov a je označovaný ako ***Rubisco-binding protein***.

GroEL a GroES sa v baktériách podieľajú na zbaľovaní a skladaní mnohých proteínov.

### II.2.5.2. Hsp27

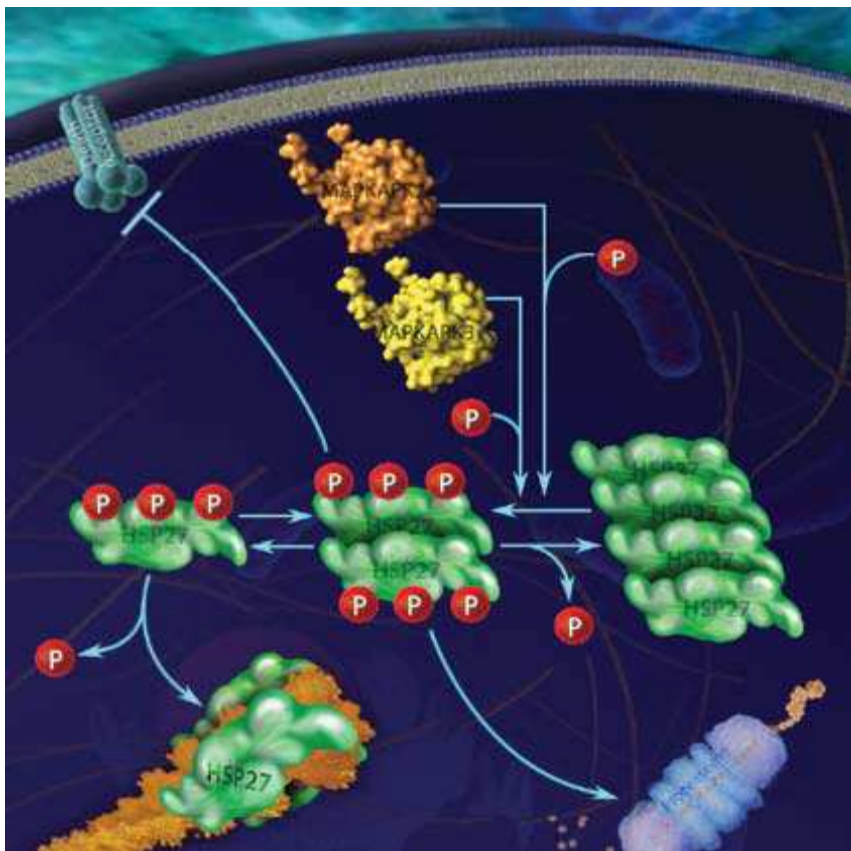
Hsp27 (často označovaný ako Hsp20, Hsp25, Hsp28 alebo nízko molekulárny proteín tepelného šoku) je homológom  $\alpha$ -crystalinových proteínov. Obe rodiny týchto proteínov sú charakterizované oligomericou štruktúrou a sú považované za ATP-nezávislé chaperony. Hsp27 môže vytvárať oligomery až do veľkosti 1000 kDa, pričom oligomerizácia je dynamický proces, ktorý závisí na fosforylačnom stave proteínu (Garrido, 2002).

Vyskytuje sa v mnohých bunčných typoch, hlavne v svalových bunkách. Nachádza sa v cytozole, ale i v endoplazmatickom retikule a v jadre. Zvýšené hladiny proteínu môžeme nájsť v rôznych štádiách bunkovej diferenciácie a vývoja (Garrido, 1998). Ľudský Hsp27 je kódovaný 4-člennou génovou rodinou lokalizovanou na chromozóme 7q, pričom tri gény vlastnia promótor a sú tepelne- indukované, zatiaľ čo jeden je pseudogénom (Hickey, 1986).

Hsp27 hrá významnú úlohu v renaturácii nesprávne alebo čiastočne denaturovaných proteínov (Ehrnsperger, 1997). Táto funkcia je spojená s fosforylačným stavom. Hsp27 je fosforylovaný v odpovedi na rôzne extracelulárne signály zahrnujúce rôzne faktory, mitogény, zápalové cytokíny ako tumor necrosis faktor-  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), IL-1 $\beta$ , ako aj za podmienok tepelného šoku a oxidačného stresu (Charette, 2000; Landry, 1992).

Fosforyláciu umožňuje p38 MAPK (p38- mitogén aktivovaná proteinkináza) a MAPKAPK-2 (mitogén- aktivovaná proteinkináza - aktivovaná proteinkináza). p38 MAPK *in vitro* fosforyluje MAPKAPK-2 na niekoľkých zvyškoch, vrátane threonínu -25, threonínu -222 a threonínu 334, čo vedie k jej aktivácii (Ben-Levy, 1995). Predpokladá sa, že takto aktivovaná MAPKAPK-2 fosforyluje Hsp27 *in vivo*. MAPKAPK-2 rovnako ako MAPKAPK-3 fosforylujú Hsp27 *in vitro* na troch serínových zvyškoch, na seríne-15, seríne-78 a seríne-82 (Landry, 1992; Stokoe, 1992; Obr. č. 1).

**Obrázok 1:** Fosforylácia proteínu Hsp27 je spojená s jeho funkciou.



Hsp27 je prostredníctvom MAPKAPK-2 a rovnako MAPKAPK-3 fosforylovaný na serínových zvyškoch. Fosforylácia je rovnako spojená s dimerizáciou Hsp27 a s jeho funkciou.

Okrem ich chaperonovej úlohy, Hsp27 a  $\alpha$ B-crystalin sprostredkujú štrukturálnu integritu, membránovou stabilitu, ovplyvňujú prechodnú filamentovú organizáciu, aktínovú polymerizáciu (Benndorf, 1994) a blokujú apoptózu (Charette, 2000; Pandey, 2000; Paul, 2002).

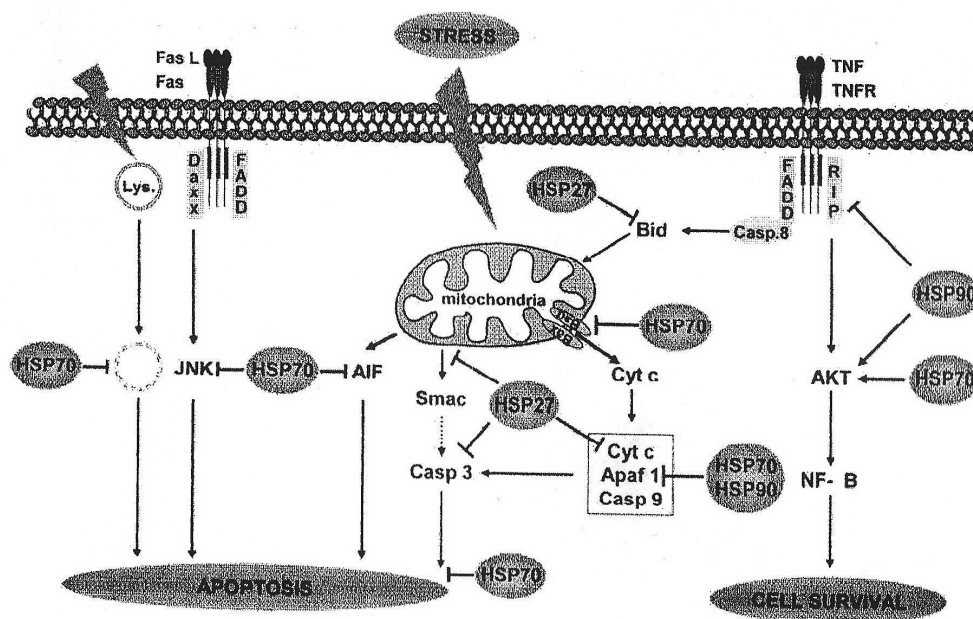
#### **II.2.5.2.1. Hsp27 a jeho úloha v apoptóze**

Hsp27 je definovaný ako anti-apoptotický proteín. Interaguje a inhibuje komponenty oboch apoptotických dráh (obr. 2).

Zvýšená expresia Hsp27 chráni pred apoptotickou bunecnou smrťou vyvolanou rôznymi stimulmi, ako sú hypertermia, oxidačný stres, pôsobenie receptora Fas/Apo-1/CD95 a cytotoxických liečiv (Garrido, 1996; Mehlen, 1996).

Hsp27 sa viaže na anti- apoptotickú kinázu AKT, ktorá ju fosforyluje (Rane, 2003). Fosforylovaná forma interaguje s DAXX (mediátor Fas- indukovanej apoptózy) a zabraňuje asociácii DAXX s Fas a Ask1 (apoptotická signalizačná, regulačná kináza 1) (Charette, 2000). Hsp27 interaguje s vonkajšou mitochondriálnou membránou a blokuje tvorbu apoptozómov, a teda inhibuje aktiváciu kaspázy-9 (Pandey, 2000; Paul, 2002).

**Obrázok 2:** Tlmenie apoptotických dráh pomocou Hsp (Schmitt, 2007)



**Vonkajšia cesta:** Hsp27 môže interagovať s DAXX a inhibovať apoptotickú dráhu, zatiaľ čo Hsp70 sa viaže na JNK1, čo vedie k inhibícii aktivácie JNK (c- Jun N- terminal kinase). Hsp90 interaguje s kinázou RIP1 (receptor interacting protein) a Akt (proteinkináza), čo v oboch prípadoch vedie k podpore NF- $\kappa$ B- sprostredkovanej inhibície apoptózy.

**Vnútorňa cesta:** na mitochondriálnej hladine, Hsp27 prostredníctvom proteínu Bid a Hsp70 inhibíciou Bax, inhibujú mitochondriálne uvoľnenie pro- apoptotických proteínov. Na post- mitochondriálnej hladine, sa Hsp27 viaže na cytochróm c, Hsp70 a Hsp90 na Apaf1, čo vo všetkých prípadoch vedie k inhibícii tvorby apoptozómov a tým k zabráneniu aktivácie kaspáz a apoptózy.

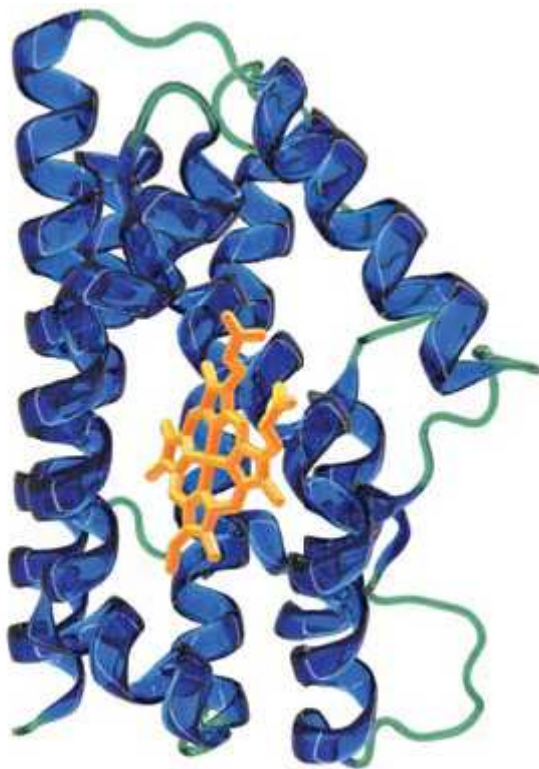
### II.2.5.3. Hsp32 (Hemoxygenáza)

Hemoxygenáza alebo Hsp32 je nevyhnutná zložka v katabolizme hemu, katalyzujúca prvý krok v degradácii hemu na bilirubín. Skladá sa aspoň z troch izoform:

stresom indukovaná (inducibilná) HO-1 (Maines, 1988) a konštitučne vyjadrené HO-2 a HO-3 (Cruse, 1988; Trakshe, 1989; Rotenberg, 1990). Indukcia HO-1 sa vyskytuje v odpovedi na tepelný šok, oxidačný stres, ťažké kovy, zápalové mediátory a určité rastové faktory (Maines, 1988; Levere, 1993; Shibahara, 1987).

Väčšina proteínu je lokalizovaná v endoplazmatickom retikule, avšak proteín môže byť prítomný aj v plazmatickej membráne a v mitochondriách. Produkty vytvorené hemoxygenázou majú dôležité fyziologické účinky: oxid uhoľnatý je účinný vazodilatátor, biliverdín a jeho produkt bilirubín sú antioxidanty (Maines, 1988; Stocker, 1987; Verma, 1993). Zelené farbivo biliverdín, ktoré je ďalej konvertované na žltó-hnedý bilirubín vzniká chemickým rozštiepením červeného krvného farbiva hemoglobínu.

**Obrázok 3:** Kryštalická štruktúra ľudskej Hemoxygenázy-1



Kryštalická štruktúra ľudskej Hemoxygenázy-1 v komplexe s jeho substrátovým hemom. (Schuller, 1999).

### II.2.6. Rodina Hsp40 a rodina DnaJ

Cicavčí Hsp40 (stres-inducibilný), prítomný v cytozole, je jedným z mnohých predstaviteľov tejto rodiny (Cheetham, 1998). Je príbuzný s DnaJ proteínom, prvýkrát popísaným v *E. coli*. Charakteristickou vlastnosťou tejto rodiny je konzervovaná J doména, ktorá je väčšinou lokalizovaná na N- konci proteínov a je zodpovedná za



asociáciu s proteínmi Hsp70 (Fan, 2003; Cheestam, 1998). Členovia rodiny Hsp40/DnaJ spolupracujú v zhode s proteínmi Hsp70/DnaK (*E. coli* Hsp70) a uľahčujú hydrolyzu ATP na ADP. Viažu nezbalené proteíny a zabraňujú ich agregácii (Langer, 1992; Liberek, 1991).

V eukaryotických bunkách, každý z rôznych členov rodiny Hsp70 si vyžaduje pre svoju chaperonovú aktivitu špecifický DnaJ homológ. V kvasinkách bolo identifikovaných viac než 20 génov kódujúcich DnaJ- príbuzné proteíny.

### II.2.7. Rodina Hsp60

Členovia rodiny proteínov tepelného šoku Hsp60 (eukaryotický) a GroEL (bakteriálny) sú jedným z najlepšie charakterizovaných chaperonov. Sú prítomné v baktériách, chloroplastoch, mitochondriách a v cytoplazme (Becker, 1994). Predstavujú približne 15 – 30 % zo všetkých bunčných proteínov (Ranford, 2000).

Cicavčí Hsp60 je lokalizovaný vo vnútri mitochondrií (*mitochondriálny Hsp60*), zatiaľ čo príbuzná forma proteínu, označovaná ako *Rubisco-binding proteín* (ribuloza-1,5 bisfosfát karboxyláza/oxygenáza), funguje vo vnútri rastlinných chloroplastov. *Bakteriálny GroEL* (Hsp60 z *E. coli*) existuje ako homo- oligomerný komplex, ktorý rozpoznáva a viaže sa na nezbalené polypeptidy. V kombinácii s jeho špecifickým ko-faktorom (Hsp10 v eukaryotoch, GroES v baktériách) proteíny Hsp60/GroEL viažu novo-syntetizované polypeptidy a umožňujú ich zbalenie do natívneho stavu. V ďalšej skupine sa nachádzajú proteíny tepelného šoku z mykobaktérií (*Hsp65*; napr. *Mycobacterium bovis* a *Mycobacterium tuberculosis*).

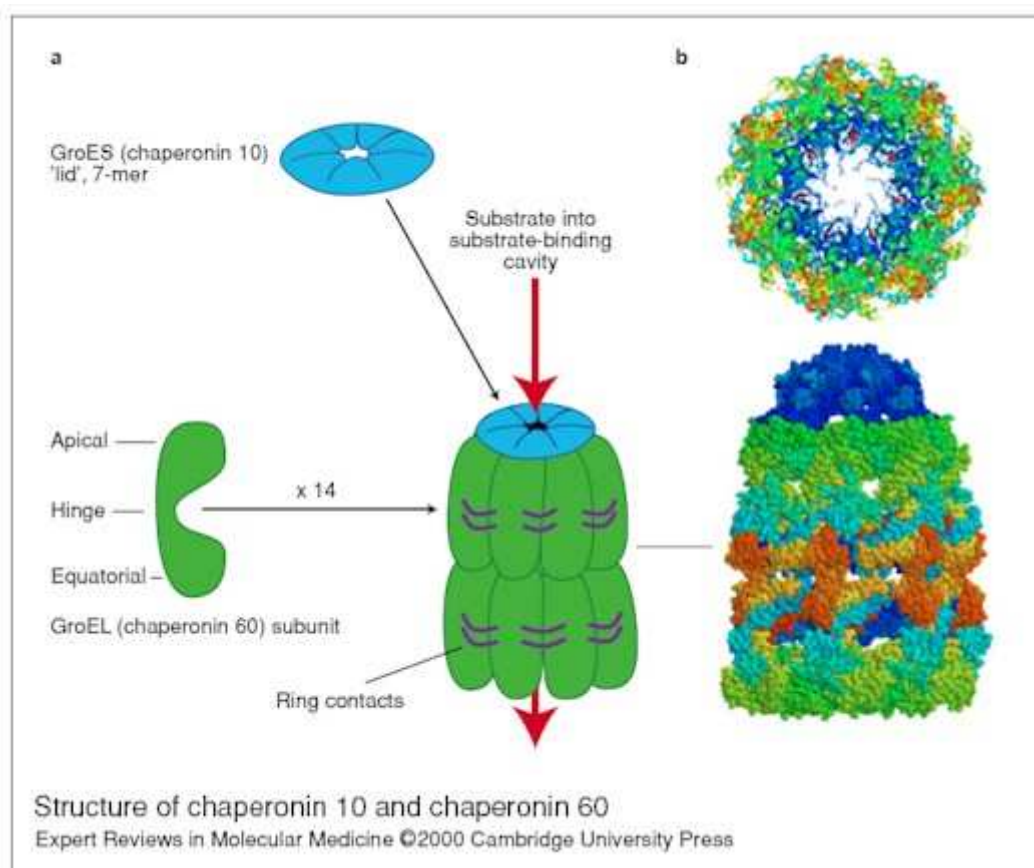
Poslednú skupinu tvoria proteíny označované ako **CCT** (chaperoníny obsahujúce TCP-1- t-complex polypeptid 1) alebo **TRIC** (TCP-1 ring complex), ktoré sa nachádzajú vo vnútri eukaryotického cytozolu a vytvárajú hetero- oligomernú štruktúru. Viažu vybrané proteínové substráty a napomáhajú ich zbaleniu (Yokota, 2000).

Často krát sú GroEL/ES alebo Hsp60/Hsp10 uvádzané ako *chaperoníny*. Okrem ich významnej úlohy molekulárnych chaperonov, sú známe ako vysoko imunogénne proteíny. Chaperoníny Hsp60 a Hsp10 sú kódované génmi HSPD1, respektíve HSPE1, ktoré sú lokalizované na chromozóme 2, oddelené obojsmerným promótorom (Hansen, 2003).

### II.2.7.1. Hsp60: štruktúra

Za normálnych fyziologických podmienok je Hsp60 60 kilodaltonový oligomér, zložený z dvoch monomérov, ktoré tvoria komplex dvoch na seba navrstvených heptamerických prstencov (Cheng, 1990). Táto dvoj- prstencová štruktúra vytvára veľkú centrálnu dutinu, v ktorej sa prostredníctvom hydrofóbnych interakcii viažu nezbalené proteíny (Fenton, 1994). Táto štruktúra je v rovnováhe s jeho jednotlivými komponentmi: monomérmi, heptamérmami a tetradekamérmami (Habich, 2007). Štruktúra proteínu je na obrázku č. 4.

**Obrázok 4:** Štruktúra chaperonínu 10 a chaperonínu 60



(a) Komplex, ktorý je vytvorený medzi GroEL (chaperonín 60, v zelenom) a GroES (chaperonín 10, v modrom). Skladá sa z dvoch heptamerických prstencov GroEL, ktoré majú charakteristickú „dvoj- kruhovitú“ štruktúru a pripojené heptamerické veko GroES  
(b) Centrálna dutina viažuca substrát - vytvorená za použitia programu RasMol z proteínovej databázy (<http://www.rcsb.org/pdb>)

Zdroj: <http://www-ermm.cbcu.cam.ac.uk/00002015h.htm>

Monomerné Hsp60 vytvárajú cylinder štrnástich podjednotiek tvoriacich dva 7-vrstevnaté symetrické prstence, ktoré sa viažu na povrch lineárnych proteínov a v ATP-závislom procese katalyzujú ich zbaľovanie (Itoh, 2002).

Každá podjednotka Hsp60 obsahuje tri domény: apikálnu doménu (tvorí koniec cylindra), ekvatoriálnu doménu a prostrednú doménu (pôsobí ako pánt) (Randford, 2000). Ekvatoriálna doména obsahuje väzbové miesto pre ATP. Prostredná doména súčasne viaže ekvatoriálnu a apikálnu doménu.

Ak je naviazaná ATP, prostredná doména vyvoláva konformačné zmeny, ktoré umožňujú striedanie medzi hydrofilnými a hydrofóbnymi substrátovými väzbovými miestami (Randford, 2000). Proteín je inaktívny, ak je v hydrofóbnom stave. Keď je aktivovaný prostredníctvom ATP, prostredná doména podstupuje konformačné zmeny, ktoré odkrývajú hydrofilný región. To zabezpečuje presnosť v zbaľovaní proteínu. Chaperonín 10 napomáha Hsp60 pri zbaľovaní a pôsobí ako kopulovité veko na ATP-aktívnej forme Hsp60. To spôsobuje zväčšenie centrálnej dutiny a pomáha proteínovému zbaleniu (Randford, 2000).

Predpokladaná štruktúra Hsp60 zahrňuje niekoľko vertikálnych sinusitíd,  $\alpha$ -hélixov,  $\beta$ -listov a 90-stupňových otáčok, ktoré vytvárajú regióny hydrofobicity. Hsp60, ktoré sa nachádzajú v mitochondriách, sa odlišujú od cytoplazmatických proteínov. Vzhľadom na aminokyselinovú sekvenciu, cytoplazmatické Hsp60 majú N-terminálnu signálnu 26-aminokyselinovú sekvenciu, ktorá sa nevyskytuje u mitochondriálnych proteínov (Itoh, 2002). Tie na C-terminálnom konci obsahujú sériu G-opakujúcich sa sekvencií. Štruktúra a funkcia tejto sekvencie nie je celkom jasná, N-terminálny koniec obsahuje vedúcu sekvenciu hydroxylovaných aminokyselín, najmä arginín, lysín, serín a treonín, ktoré slúžia ako líder pre import proteínov do mitochondrií (Gupta, 1995).

### **II.2.7.2. Hsp60: funkcia**

Hsp60 má dôležitú úlohu v transporte a udržiavaní mitochondriálnych proteínov. Katalyzuje zbalenie proteínov určených pre matrix a udržiava proteíny v nezbalenom stave pre transport cez vnútornú membránu mitochondrií (Koll, 1992). Mnoho proteínov je spracovaných v matrixe mitochondrií a odtiaľ exportovaných do ďalších častí bunky. Pre transmembránový transport je hydrofóbnou časťou Hsp60 zodpovedná za udržanie nezbaleného stavu proteínu. Následné zmeny v koncentráciách ATP hydrolyzujú väzby

medzi proteínom a Hsp60, čo signalizuje proteínu opustiť mitochondrie. Vyhľadávaním 15 – 20  $\alpha$ -helikálnych zvyškov v proteínovej sekvencii je Hsp60 schopný rozlišovať medzi proteínmi určenými pre transport a proteínmi určenými k zotrvaní v mitochondriálnom matrice. Prítomnosť tejto sekvencie signalizuje, že proteín je exportovaný, zatiaľ čo absencia signalizuje zotrvanie v mitochondriách (Koll, 1992).

Okrem jeho dôležitej úlohy v proteínovom zbaľovaní, Hsp60 je zapojený do replikácie a translácie mitochondriálnej DNA. Hsp60 sa preferenčne viaže na jednovláknovú (single stranded) templátovú DNA. Tento tetradekamerový komplex interaguje s ďalšími transkripčnými elementmi a slúži ako regulačný mechanizmus pre replikáciu a transláciu mitochondriálnej DNA (Kaufmann 2003).

### II.2.8. Rodina Hsp70

Hsp70 predstavuje jednu z najviac preskúmaných rodín proteínov tepelného šoku. Obsahuje rozmanité homológy o veľkosti od 66 kDa do 77 kDa. Členovia tejto rodiny sú prítomní takmer vo všetkých bunčných oddieloch eukaryotov (jadro, mitochondrie, chloroplasty, ER, cytozol) ako aj v baktériách (Becker, 1994). Za normálnych podmienok fungujú ako ATP- nezávisle molekulárne chaperony asistujúce pri zbalení novo-syntetizovaných polypeptidov, tvorbe multi-proteínových komplexov a transporte proteínov cez bunčné membrány (Shi, 1992).

Jednotliví predstavitelia sa líšia v priestorovej a subcelulárnej distribúcii ako aj v ich expresii za normálnych, nestresových podmienok (Rohde, 2005; Tavaría, 1996): **Hsp70-1A** a **Hsp70-1B** (súhrne nazývané ako Hsp70-1; v normálnych, nestresovaných bunkách sú vyjadrené na relatívne nízkych alebo nedetekovateľných hladinách, avšak ich expresia dramaticky vzrastie za stresových podmienok a je vysoká u niektorých typoch nádorov); **Hsp70-2** (vyjadrené na relatívne nízkych alebo nedetekovateľných hladinách; v placentе, v mozgu, v tenkom a hrubom čreve, v obličkách); **Hsp70-6** (Hsp70B'; indukovaný iba za podmienok extrémneho stresu); **Hsc70** (hojne vyjadrený vo všetkých typoch buniek a pravdepodobne je zodpovedný za udržanie normálnej bunčej funkcie); **Hsp70t** (vysoké hladiny v semenníkoch); ako aj glukózou regulované proteíny **Bip** (Grp78; v ER) a **mtHsp70** (Grp75; v mitochondriálnom matrice) (Daugaard, 2005; Rohde, 2005). V tabuľke č. 2 sa nachádzajú gény kódujúce jednotlivé proteíny tejto rodiny.

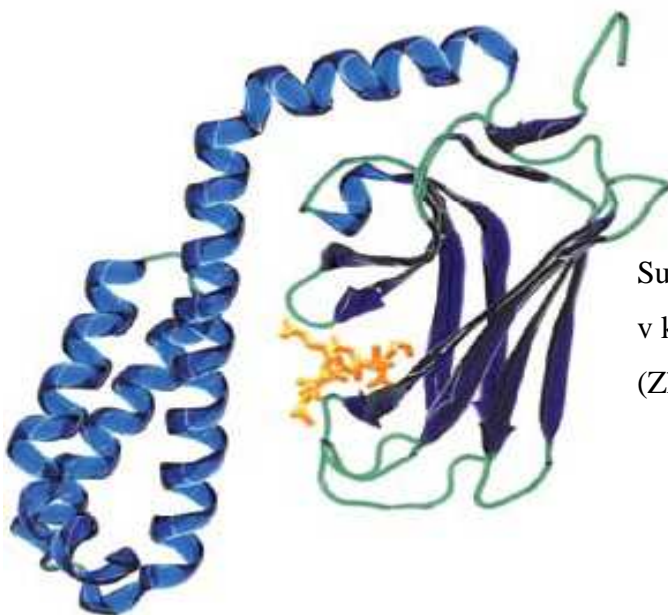
Tabuľka 2: Gény kódujúce jednotlivé proteíny rodiny Hsp70 (Daugaard, 2005)

Lokus	Pozícia	Názov proteínov	Bunečná lokalizácia	Poznámky
HSPA 1A	6p21.3	Hsp70-1 (A), Hsp70, Hsp72, Hsp70i	cytozol, jadro, membrány	lokalizovaný v oblasti MHC; stres- inducibilný; neobsahuje introny
HSPA 1B	6p21.3	Hsp70-1 (B), Hsp70, Hsp72, Hsp70i	cytozol, jadro, membrány	lokalizovaný v oblasti MHC; stres- inducibilný; neobsahuje introny
HSPA 1L	6p21.3	Hsp70t, Hsp70-Hom	cytozol	lokalizovaný v oblasti MHC; konštitučne vyjadrený; vysoké hladiny v semenníkoch - testis; neobsahuje introny
HSPA8	11q23.3 - q25	Hsc70, Hsp73	cytozol, jadro, lyzosomy	house- keeping proteín; konštitučne vyjadrený v mnohých tkanivách
HSPA2	14q24.1	Hsp70-2	cytozol, jadro	konštitučne vyjadrený; vysoké hladiny v semenníkoch – testis a v mozgu; potrebný pre normálnu spermatogézu
HSPA6	1cen – qter	Hsp70-6, Hsp70B'	cytozol, jadro	striktne stres- inducibilný, neobsahuje introny
HSPA5	9q33 – q34.1	Bip, Grp78	endoplazmatické retikulum	house- keeping proteín; konštitučne vyjadrený
HSPA9	5q31.1 PBP74, Mot-2	mtHsp70, Grp75	mitochondrie	house- keeping proteín; konštitučne vyjadrený

### II.2.8.1. Hsp70: štruktúra a funkcie

Všetci predstavitelia rodiny Hsp70 obsahujú vysoko konzervovanú N- terminálnu ATP- ázovú doménu o veľkosti 44 kDa, ktorá za normálnych podmienok udržiava slabú ATP- ázovú aktivitu. U týchto proteínov sa tiež vyskytuje 25 kDa C- terminálny región, ktorý obsahuje 15 kDa konzervovanú hydrofóbnu substrát- viažucu doménu (SBD) a mnoho variabilných  $\alpha$ - helikálnych domén o veľkosti 10 kDa (Bukau, 1998).  $\alpha$ - helikálne domény pôsobia ako "veko" pre SBD a otvárajú sa a zatvárajú v závislosti na ATP/ADP väzbovom stave (Moro, 2005).

**Obrázok 5:** Substrát viažuca doména Hsp70 v komplexe so substrátovým peptidom



Substrát viažuca doména Hsp70 v komplexe so substrátovým peptidom (Zhu, 1996).

Aktivácia Hsp70 je koordinovaná väzbou ATP na N- koniec, spôsobujúca konformačné zmeny, ktoré otvárajú veko a umožňujú interakciu SBD s rozmanitými proteínmi v ich nezbalenom, chybné zbalenom a denaturovanom stave. SBD Hsp70 rozpoznáva hydrofóbnú sekvenciu novo- syntetizovaných proteínov a interaguje s ňou.

V jeho ATP- väzbovom stave, podstupuje C- koniec konformačné zmeny vedúce k otvoreniu  $\alpha$ - helikálnej domény, pričom peptidy sa viažu a uvoľňujú relatívne rýchlo. V jeho ADP- väzbovom stave sa predpokladá, že  $\alpha$ - helikálna doména je uzavretá a peptidy sú pevne viazané na SBD. To znamená, že v prítomnosti ATP, Hsp70 podporuje zbalovanie proteínu, keďže tento dej prebieha s nižšou afinitou a rýchlejšie než v ADP- väzbovom stave (Moro, 2005; Bukau, 1998). Prítomnosť peptidov v SBD stimuluje ATP-ázovu aktivitu Hsp70, zvýšením jeho normálne pomalého stupňa ATP hydrolyzy. ATP-ázova aktivita a funkcia Hsp70 je ovplyvnená interakciami so špecifickými ko-chaperonovými molekulami. Hsp70 ko- chaperony zahrňujú:

- Hsp40, ktorý zvyšuje ATP-ázovú aktivitu Hsp70 v prítomnosti interagujúcich peptidov (Benjamin, 1998)
- Hsc70 interagujúci proteín, Hip (Hsc70 interacting protein), ktorý sa viaže na ATP-ázovú doménu a stimuluje jej aktivitu (Benjamin, 1998)
- Hsc70 uvoľňujúci proteín, Hup (Hsc70 unbinding protein), ktorý napomáha uvoľneniu nezbalených proteínov (Benjamin, 1998)
- Hsp70/Hsp90 organizujúci proteín, Hop (Hsp70/Hsp90 organizing protein), ktorý sa môže súčasne viazať na oba proteíny, slúži ako spojka medzi Hsp70 a Hsp90,

sprostredkováva prenos peptidov z Hsp70 na Hsp90 a napomáha kolobehu ATP/ADP (Benjamin, 1998)

- Hsc70 prídavný proteín Hap (Hsc70 accessory protein; Benjamin, 1998) a Bcl-2 asociované proteíny BAG-1, BAG-2 a BAG-3, ktoré interagujú s ATP-ázovou doménou a blokujú naviazanie nezbalených proteínov (Bimston, 1998; Kanelakis, 1999; Takyama, 1997; Zeiner, 1997)
- Hsp70 sa zúčastňuje pri odstraňovaní poškodených alebo chybných proteínov - interakcia s CHIP (Carboxyl-terminus of Hsp70 Interacting Protein, proteín ovplyvňujúci karboxylový koniec Hsp70), ktorý je pravdepodobne v pravom slova zmysle E3 ubiquitinovou ligázou pomáhajúcou v ubiquitinylácii bunčných proteínov (Ballinger, 1999; Murata, 2001; Kampinga, 2003; Wegele, 2004)

Tieto ko-chaperony kooperujú s Hsp70 pri zbalení novo-syntetizovaných proteínov; pri znovu zbalení chybné zbalených alebo denaturovaných proteínov; koordinujú transmembránový transport proteínov (Shi, 1992); rozkladajú vaky potiahnuté klathrínom (vaky, ktoré pučia z Golgiho aparátu na začiatku sekrečnej dráhy smerujúcej von z bunky a z plazmatickej membrány na začiatku endocytotickej dráhy vedúcej do vnútra bunky a majú na svojej cytozolovej strane špecifický proteínový plášť – klathrín. Ako náhle je pučenie ukončené, vakov stratí svoj plášť a jeho membrána tak môže interagovať s membránou, s ktorou bude fúzovať); inhibujú proteínové zhlukovanie a degradáciu proteínov cez proteazomy (Benjamin, 1998).

Plný stimul zahrňujúci hypertermiu, UV žiarenie a protinádorové agensy indukuje syntézu stres-inducibilnej Hsp70, ktorá zvyšuje schopnosť buniek prežívať tieto inak letálne podmienky.

#### **II.2.8.2. Hsp70 a jeho úloha v apoptóze**

Hsp70 je negatívnym regulátorom mitochondriálnej dráhy apoptózy, ktorý môže blokovať apoptózu na rôznych úrovniach: na pre-mitochondriálnej úrovni môže inhibovať p53 (Wadhwa, 2002) a funguje ako inhibítor stresom aktivovaných kináz napr. c-Jun-N-terminalnej kinázy (JNK-1) (Park, 2001) a p38 (Gabai, 1997); na mitochondriálnej úrovni blokuje translokáciu Bcl-2 proteínu, Bax (apoptózu regulujúci proteín), čím zabraňuje permeabilizácii vonkajšej mitochondriálnej membrány a úniku cytochrómu c z mitochondrií (Stankiewicz, 2005) a nakoniec na post-mitochondriálnej úrovni interaguje

## Prehľad riešenej problematiky

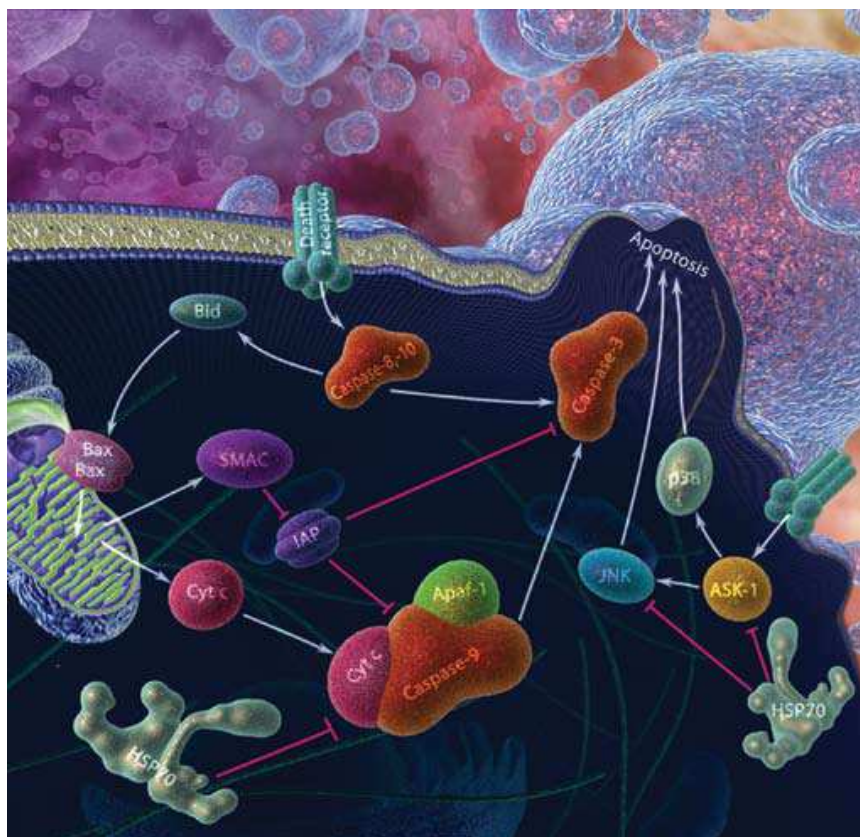
s AIF (apoptosis inducing factor) a Apaf-1 (apoptosis protease-activating factor-1), čím zabraňuje transportu pro-kaspázy 9 do apoptozómu (Beere, 2000). Väzba Hsp70 na AIF vedie ku AIF- indukovanej chromatinovej kondenzácii.

V TNF- indukovanej apoptóze, Hsp70 nemôže zamedziť aktivácii kaspázy-3, ale predchádza morfológickým zmenám, ktoré sú charakteristické pre umierajúce bunky (Jaattela, 1998). Počas finálnej fázy apoptózy, chromozomálna DNA je štiepená enzýmom CAD (Caspase Activated DNase), ktorý je aktivovaný kaspázou- 3. Enzymatická aktivita a správne zbalenie CAD je regulované Hsp70 a jeho ko- chaperonmi Hsp40 a ICAD, inhibítor CAD (Sakahira, 2002).

Vznik chronickej myeloidnej leukémie je spätý s recipročnou translokáciou chromozómov 9 a 22, čím sa k sebe priblíži abl protoonkogén (z dlhého ramienka chromozómu 9, gén Abelsonovej myšej leukémie) a bcr gén (z chromozómu 22, break-point cluster region). Fúzny proteín Bcr-Abl vzniká teda prepisom fúzneho génu na tzv. filadelfskom chromozóme- Ph<sup>1</sup>, produkte translokácie medzi chromozómami 9 a 22. Bcr-abl onkogén kóduje informáciu pre fosfoproteín, ktorý má tyrozínkinázovú aktivitu a stimuluje proliferáciu buniek. Bcr-Abl prispieva k agresívnemu leukemickému správaniu CML v blastickej kríze a akútnych lymfoblastických leukemických buniek (Thijssen, 1999; Deininger, 2000). Endogénna alebo ektopická expresia Bcr-Abl v leukemických bunkách (K562, HL-60/Bcr-Abl, atď.) indukuje rezistenciu na apoptózu následkom anti-leukemických liečiv napr. Ara-C (Cytarabine) a etoposide (Amarande- Mendes, 1998). Bcr-Abl expresia v akútnych leukemických bunkách je asociovaná so zvýšenou expresiou Hsp70 (Nimmanapalli, 2002-2). Ektopicky zvýšená expresia alebo indukované endogénne hladiny Hsp70 inhibujú apoptózu (inhibícia mitochondriálnej dráhy apoptózy blokovaním Apaf-1- sprostredkovanej aktivácie kaspázy-9 a -3, ako aj potlačovaním aktivity kaspázy-3; Gabai, 2002). Zistenie, že Hsp70 je nadmerne vyjadrený v Bcr-Abl – pozitívnych leukemických bunkách podporilo uverejnenie, že Hsp70 hra mechanickú úlohu v sprostredkujúcich anti-apoptotických efektoch Bcr-Abl. Hsp70 prispieva k Bcr-Abl – sprostredkovanej rezistencii na apoptózu v dôsledku anti-leukemických agensov (Ara-C, Etoposide, Apo-2L/TRAIL; Guo, 2005). Hsp70 sa viaže na receptory DR4 a DR5, čím inhibuje TRAIL- indukované naviazanie a aktivitu proteínázového komplexu DISC (Death Inducing Signaling Complex; Guo, 2004).



**Obrázok 6:** Úloha Hsp70 v apoptóze



Hsp70 potláča apoptózu inhibíciou tvorby apoptozómov a blokáciou aktivácie stresom-indukovaných kináz: Ask1 (apoptotická signalizačná, regulačná kináza 1; Park, 2002), p38 a JNK-1.

### II.2.9. Rodina Hsp90

90 kDa chaperonová rodina zahŕňa niekoľko proteínov vrátane 90 kDa proteínu tepelného šoku Hsp90 a 94 kDa glukózou regulovaného proteínu Grp94, ktoré sú hlavnými molekulárnymi chaperonmi v cytozole a endoplazmatickom retikule. Obsahuje inducibilné a konštitučné isoformy, ktoré sú kódované odlišnými génmi.

V cicavčích bunkách sa nachádza **Hsp90 $\alpha$**  (inducibilná isoforma) a **Hsp90 $\beta$**  (konštitučná isoforma), **Grp94** (konštitučne vyjadrený) a **Trap I** (konštitučne vyjadrený), ako aj nedávno identifikovaný variant **Hsp90N** (membránovo- asociovaný variant cytozolickej Hsp90). Zatiaľ čo Hsp90 $\alpha$  a Hsp90 $\beta$  sú prevažne cytozolicke proteíny a predstavujú 1-2 % bunčných proteínov, Grp94 a Trap I sú lokalizované vo vnútri endoplazmatického retikula a v mitochondriách a v porovnaní s ich cytoplazmatickými náprotivkami sú na veľmi nízkych hladinách (Whitesell, 2005). Hsp90N, ktorý postráda

ATP- väzbové miesto, je lokalizovaný v bunenej membráne cez jeho špecifický N-terminálny hydrofóbny región (Grammatikakis, 2002).

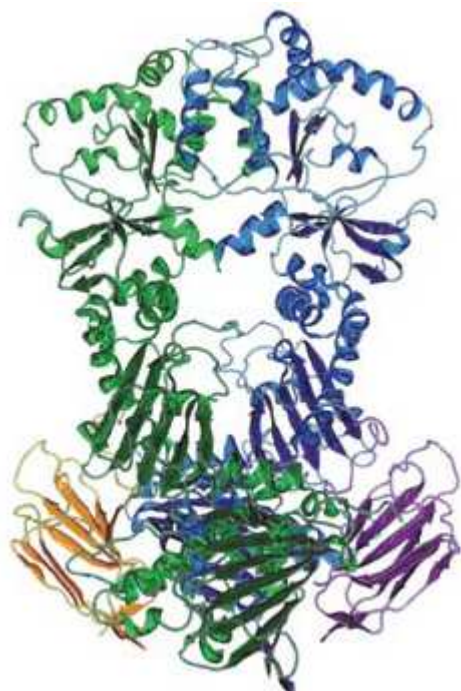
Ľudský gén kódujúci inducibilnú Hsp90 $\alpha$  je lokalizovaný na chromozóme 14q32.3 a pseudogény na chromozómových segmentoch 1q21.2-q22, 4q3.5 a 11p14.1-14.2 (Ozawa, 1992). Konštitučne vyjadrený gén hsp90 $\beta$  je lokalizovaný na chromozóme 6p21 a dva pseudogény na chromozómoch 4q21-q25 a 15pter-q21 (Takahashi, 1994).

### II.2.9.1. Hsp90: štruktúra a funkcie

Všetci známy predstavitelia tejto rodiny obsahujú 3 špecifické domény: N-terminálny väzbový vačok - geldanamycin/ATPázová doména (Chadli, 2000; Prodromou, 1997), strednú doménu, na ktorú sa viažu rôzne ko- chaperony, často Aha1 (Meyer, 2003) a C- terminálnu doménu, ktorá pravdepodobne pôsobí ako sekundárne ATP- väzbové miesto (Garnier, 2002), (Obrázok č. 7). S výnimkou proteínu Trap, ostatné Hsp90 navyše obsahujú nabitý región 55 aminokyselín, ktorý spája N- terminálny väzbový vačok so strednou doménou (Prodromou, 2003).

Členovia tejto rodiny sú vysoko konzervovaní, špeciálne v N- terminálnych a C- terminálnych regiónoch, ktoré obsahujú nezávislé chaperonové miesta s rôznou proteínovou špecifitou. Hsp90 môže existovať buď ako homodimér, heterodimér alebo ako multi-proteínový komplex s ďalšími ko- chaperonmi zahrňujúcimi Hsp40, Hsp70, Hop a p23 (Whitesell, 2005). Na rozdiel od ostatných proteínov tepelného šoku, N- terminálne nukleotidové väzbové miesto je u Hsp90 vysoko jedinečné (Dutta, 2000).

**Obrázok 7:** Kryštalická štruktúra Hsp90-Sbal uzatvoreného chaperonového komplexu



Kryštalická štruktúra Hsp90-Sbal uzatvoreného chaperonového komplexu (Ali MM, 2006).

Z predchádzajúcich štúdií hodnotiacich fosforylačný stav Hsp90 vyplýva, že pre aktivitu je fosforylácia nevyhnutná. Hsp90 bol fosforylovaný na tyrozíne *in vivo* v prípade, že sa nachádzal v komplexe s ďalšími proteínmi (Adinolfi, 2003). Acetylačný stav rovnako ovplyvňuje aktivitu Hsp90. Hyperacetylácia Hsp90 vedie k zníženiu a k strate chaperónovej aktivity (Murphy, 2005). Funkciu Hsp90 tiež ovplyvňuje N - terminálny väzbový stav, ktorý je predmetom štúdia, vzhľadom na jeho úlohu v terapii nádorov. Často sa sleduje vplyv protinádorového a antibakteriálneho liečiva Geldanamycinu (GA). V prípade, že je Geldanamycin naviazaný, funkcia Hsp90 je znížená, čo má za následok posilnenie E3 ubiquitínovej ligázy podporujúcej ubiquitinyláciu a degradáciu proteínu 26S proteasomálnym komplexom (Whitesell, 2005). Viac informácií o Geldamycine sa nachádza v kapitole VI.

Hsp90 je súčasťou chaperonovej bunecnej siete, ktorá reguluje proteínové zbalenie a skladanie a pre svoje funkcie si vyžaduje ATP a ko- chaperony (napr. Hsp70, Hsp40, Hip/Hop; Whitesell, 2005). Ako kľúčový molekulárny ko- chaperon, potrebný pre ATP-ázovú funkciu bol identifikovaný Aha I (aktivátor Hsp90 ATP-ázového homológu I), ktorý asocjuje so strednou doménou Hsp90 (Meyer, 2004).

Hsp90 udržiava konformáciu proteínov, s ktorými sa združujú. V porovnaní s ostatnými proteínmi tepelného šoku, Hsp90 pravdepodobne asociujú s kľúčovými signálnymi molekulami zapojenými do základných bunčných procesov, ako sú hormonálna signalizácia, regulácia bunčného rastu a diferenciácia. Jedným z prvých charakterizovaných proteínov bola tyrozínkináza izolovaná z vírusu Rousovho sarkómu, *v-Src* (Whitesell, 1994; Xu, 1999). Odvtedy sa počet popísaných proteínov, ktoré Hsp90 ovplyvňuje zvýšil, pričom niektoré z nich sú spojené s patogenézou ľudských nádorov. Do tejto skupiny patria serín/treonín a tyrozínové kinázy, transkripčné faktory, steroidné receptory a tiež aj tumor supresorové proteíny (Akt/PKB, ASK I, Bcr- Abl, CFK1, CDK4, ErbB2/Her-2, Hif 1a, mutantný p53, PLK a Raf, cyklín- závislá serínová kináza) (Whitesell, 2005).

Medzi dve kľúčové signálne molekuly patria proteínkináza Akt a tumor supresorový proteín p53. V prípade p53, Hsp90 sa naň viaže a stabilizuje expresiu mutovanej formy tohto proteínu, čo poskytuje mechanizmus vyradenia normálneho typu molekúl p53 z funkcie (Whitesell, 1994). Funkčný p53 existuje ako tetramér. Jedna mutovaná kópia vo vnútri tohto komplexu je schopná poškodzovať normálnu funkciu p53. p53 známy ako tumor supresorový proteín 53, je transkripčným faktorom, ktorý reguluje bunčný cyklus. Je označovaný ako hlavný regulátor ľudského genómu a vyradenie jeho funkcie umožňuje riadenie bunčného cyklu prítomnými onkogénmi.

V prípade Akt, Hsp90 sa viaže s fosforylovanou formou, ktorá je inaktivovaná defosforyláciou proteínfosfatázou (PP)-2A (Sato, 2000). Ak je aktívny, Akt cez rôzne mechanizmy poskytuje anti-apoptotické signály a chráni bunky pred apoptózou. Akt v asociácii s Hsp90 fosforyluje a inhibuje apoptotickú kinázu ASK I, teda blokuje apoptózu (Zhang, 2005).

Hsp90 sa zúčastňuje mnohých kľúčových procesov v onkogenéze, ako je stabilizácia mutantných proteínov, angiogenézy a metastáz. Použitie inhibítorov Hsp90 napr. antibiotika Geldanamycínu a jeho analógu 17-AAG (17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin) má sľubný efekt v klinických experimentoch.

### II.2.9.2. Hsp90 a jeho úloha v apoptóze

Čo sa týka vonkajšej dráhy, Hsp90 interaguje s a stabilizuje receptorový interagujúci proteín (RIP, receptor interacting protein). Po naviazaní na TNFR-1 (tumor necrosis factor receptor-1), RIP-1 podporuje aktiváciu NF- $\kappa$ B (transkripčný faktor - nukleárny faktor

kappa B, nachádza sa vo všetkých bunkách a je zahrnutý v bunečnej odpovedi na rôzne stresové podnety) a JNK (c-Jun N-terminálna kináza). Degradácia RIP-1 v neprítomnosti Hsp90 zabraňuje aktivácii NF- $\kappa$ B sprostredkovanou TNF- $\alpha$  (tumor necrosis faktor) a zvyšuje citlivosť buniek na apoptózu (Lewis, 2000).

Čo sa týka vnútornej dráhy, Hsp90 inhibuje apoptózu ako výsledok negatívneho efektu funkcie Apaf-1 (Apoptotic Protease-Activating Factor 1; Pandey, 2000-2). Hsp90 sa priamo viaže na Apaf-1, inhibuje jeho oligomerizáciu. Anti-apoptotická činnosť Hsp90 odráža jej schopnosť interagovať s fosforylovanými serín/treonínovými kinázami Akt/PKB (proteín, ktorý vytvára signál v odpovedi na stimuláciu rastovým faktorom). Fosforylovaný Akt môže fosforylovať proteín rodiny Bcl-2 Bad a kaspázu-9 (Gardone, 1998), čo vedie k ich inaktivácii a k bunečnému prežitiu (Obr. č. 2).

Ďalšími proteínmi, pomocou ktorých sa môže tento chaperon podieľať v bunečnom prežití, sú transkripčné faktory: Her2 a Hif1a (hypoxia-inducible factor 1) (Hur, 2002; Monster, 2002). Nádorový antigén Her2/neu je homologický s receptorom pre epidermálny rastový faktor. Je vyjadrený na nádorových bunkách karcinómu prs, ovárií a ďalších typoch nádorov s epitelovým pôvodom. Aberantná expresia Her2/neu na nádorových bunkách im poskytuje abnormálne autokrinné rastové signály. Je slabo vyjadrený na normálnych epitelových bunkách.

### II.2.10. Rodina Hsp110

Hsp110 patrí do rodiny veľkých stresových proteínov označovaných ako Hsp110/SSE (yeast stress seventy). Cicavčí Hsp110 vykazuje 30 % aminokyselinovú zhodnosť s jeho vzdialene príbuzným Hsp70, a to najmä v konzervovanej ATP-väzbovej doméne (Lee-Yoon, 1995). Do tejto rodiny patrí **Hsp110** (označovaný aj ako Hsp105 $\alpha$  a Hsp105 $\beta$ ). Hsp105 $\beta$  má o 43 aminokyselín menej než Hsp105 $\alpha$ , čo je pravdepodobne výsledkom alternatívneho splicingu), **APG-1** a **ApG-2** (Easton, 2000). Gén kódujúci Hsp110 je lokalizovaný na chromozóme 13q12.2 – 13.3, zatiaľ čo gény kódujúce APG-1 a APG-2 sú lokalizované na lokuse 4q28 a 5q23.3-q31.1 (Nonoguchi, 1999).

V cicavčích tkanivách je Hsp110 jedným z troch najhojnejších proteínov tepelného šoku. Primárne sa nachádza v cytoplazme a vplyvom tepelného stresu je exprimovaný v jadre. Je prítomný u všetkých stavovcov, ale najlepšie je charakterizovaný u myši a u ľudí; kde sa nachádza aj APG-1 a -2. Hoci tieto proteíny sú hlavne vyjadrené v gonádach, sú tiež vyjadrené na nízkych hladinách vo všetkých tkanivách u myši. APG-1 sa nachádza

## Prehľad riešenej problematiky

vo vysokej koncentrácii v semenníkoch, najmä v zárodočných bunkách, kde nie je tepelne inducibilný. Hladina APG-1 sa zvyšuje s maturáciou zárodočných buniek, čo potvrdzuje zapojenie APG-1 vo vývoji zárodočných buniek. V somatických bunkách je tepelne inducibilný, avšak optimálne podmienky pre indukciu sú rozdielne. Silnejšia indukcia je pozorovaná pri posune z 32 °C na 39 °C, než pri posune z 32 °C na 42 °C alebo pri posune z 37 °C na 42 °C. (Easton, 2000). APG-2 je hojne vyjadrený v tkanivách semenníkov a ovárií myši a v menšej miere v somatických tkanivách. Nie je tepelne inducibilný.

Hsp105 $\beta$  je pozorovaný pri kontinuálnom tepelnom šoku pri teplote 42 °C, zatiaľ čo Hsp105 $\alpha$  po šoku pri teplote 42 °C a vyššie. Hsp110 sa vyskytuje v komplexe s ďalšími chaperonmi (hlavne Hsp70 a Hsp25), zabezpečuje a opravuje zbalovanie proteínu.

### **III. Extracelulárne funkcie proteínov tepelného šoku**

#### **III.1. Hsps sú prítomné v extracelulárnom priestore**

Okrem intracelulárnej úlohy, môžu byť proteíny tepelného šoku uvoľnené do extracelulárneho priestoru alebo môžu byť prítomné na plazmatickej membráne buniek a môžu mať kľúčovú úlohu v imunoregulácii. U ľudí je ich prítomnosť v sére asociovaná so stresovými podmienkami zahŕňajúcimi zápal, bakteriálne a vírusové infekcie (Hightower, 1989; Mambula, 2006).

Hoci imunologická úloha extracelulárnych a membránovo- viazaných Hsps je zrejmá, mechanizmus transportu do plazmatickej membrány, membránové ukotvenie a export zostáva nejasný. Cytozolické Hsps neobsahujú vedúce peptidy umožňujúce membránovú lokalizáciu, avšak jednou z ich hlavných úloh je transport ďalších proteínov cez lipidové membrány. Na základe týchto výsledkov je možné predpokladať, že cytozolické Hsps sú transportované do plazmatickej membrány v zhode s ďalšími proteínmi, ktoré disponujú transmembránovou doménou (Schmitt, 2007).

#### **III.2. Imunologická úloha extracelulárnych Hsps**

Rozmanité buncčné typy (neuronálne bunky, monocyty, makrofágy, B bunky a nádorové bunky epiteliálneho pôvodu) sekretujú stresové proteíny (Robinson, 2005; Clayton, 2005). Extracelulárne stresové proteíny, ako Hsp27, 60, 70, 90, 110 a glukózou regulované proteíny (Grp) 78, 94, 170 a kalretikulín sú dôležitými mediátormi intercelulárnej signalizácie a transportu. Uvoľnenie týchto proteínov z buniek je vyvolané po fyzickej traume, strese, ako aj po vystavení imunologickým „nebezpečným signálom“. Uvoľnenie stresových proteínov sa môže vyskytovať behom fyziologických sekrečných mechanizmov ako aj počas nekrózy alebo po toxickej liečbe (Mambula, 2006; Totryk, 1999).

Po uvoľnení do extracelulárnej tekutiny, Hsps alebo Grp sa môžu naviazať na povrch susedných buniek a iniciovať signálne kaskády, ako aj transport antigénnych peptidov (Caldewood, 2007). Okrem toho, Hsp60 a Hsp70 sú schopné vstupovať do krvného riečišťa (Campisi, 2003). Slúžia ako fyziologický alarm buncčného poškodenia.

Extracelulárne stresové proteíny majú veľký vplyv na imunitnú odpoveď (Srivastava, 2000 a 2001; Caldewood, 2005). Cicavčie bunky po traume alebo po vystavení baktériám alebo bakteriálnym proteínom vyjadrujú endogénne stresové proteíny vo vysokých hladinách. Práve stresové proteíny môžu byť pro- zápalové a vedú k cytokínovej transkripcii (Asea, 2000 a 2002). Navyše, stresové proteíny môžu pôsobiť ako stimulátory prirodzenej imunitnej odpovede skrz ich schopnosť viazať antigénne peptidy počas antigénneho spracovania (Noesser, 2002).

Hsp70 a Hsp90 sú identifikované ako kľúčové regulátory hostiteľského imunitného systému. V prípade, že stresové proteín- peptidové komplexy sú uvoľnené z mŕtvych alebo umierajúcich buniek, viažu sa na receptory APCs a antigény môžu byť dopravené na MHC I molekuly týchto buniek, v procese známom ako *antigénna skrížená prezentácia (cross- presentation)* (Arnold-Schild, 1999; Singh-Jasuja, 2000). Práve tieto interakcie sú základom pre molekulárne chaperony s protinádorovými vakcínami. Po skríženej prezentácii Hsp- peptidovými komplexmi extrahovanými z nádorov je iniciovaná antigén- špecifická CD8+ T bunková odpoveď v nádorovom hostiteľskom ložisku (Srivastava, 1998; Arnold-Schild, 1999; Schild, 1999; Singh-Jasuja, 2000; Wells, 2000). Účinnosť týchto vakcín spočíva v schopnosti stresových proteínov stimulovať prirodzenú a adaptatívnu protinádorovú imunitnú odpoveď (Srivastava, 2001).

Stresové proteíny môžu tiež pôsobiť protizápalovo. Ochorenia ako reumatická artritída (RA) môžu byť spúšťané cross- reaktívnymi T bunkami, ktoré rozpoznávajú spoločné epitopy v cicavčích a vysoko imunogénnych prokaryotických Hsps (van Eden, 2005; Hauet- Broere, 2006). Uvažuje sa, že úzky stupeň sekvenčnej konzervácie týchto stresových proteínov môže spúšťať autoimunitnú odpoveď proti cicavčím stresovým proteínom. Zaujímavé je, že použitie odpovedajúcich cicavčích proteínov potláča pro- zápalové odpovede proti bakteriálnym Hsp epitopom a vedie k remisii zápalového ochorenia (Kingston, 1996). Hsps teda môžu pôsobiť imunostimulačne alebo imunosupresívne v závislosti na rôznych okolnostiach (van Eden, 2005).



### III.3. Receptory proteínov tepelného šoku

Pohltenie Hsp- peptidových komplexov antigén- prezentujúcimi bunkami (APCs) je špecifické, koncentračne závislé (Arnold-Schild, 1999; Habich, 2002; Vabulas, 2001), a preto sa predpokladá existencia Hsp- špecifických receptorov (Binder, 2004). Tie zahŕňujú Toll- like receptory 2 a 4 (**TLR2**, **TLR4**), **CD14** (receptor pre lipopolysacharid - LPS), **CD36** (receptor pre kolagén typu I a trombospondín), **CD40** (receptorová molekula na povrchu B buniek, endoteliálnych a epiteliálnych buniek), **CD91** (známy ako  $\alpha$ -2 makroglobulin/low density lipoproteinový receptor) a predstavitelov scavengerových („upratovacích“) receptorov ako **LOX-1** a **SR-A** (Binder, 2004).

Interakcie Hsp- APC majú dva dôsledky: 1.) Hsp- peptidové komplexy sú pohltené APC a peptidy sú opätovne prezentované na pozadí MHC molekúl (Suto, 1995; Doody, 2004); 2.) Extracelulárne Hsps vyvolávajú sekréciu zápalových cytokínov: TNF $\alpha$  (tumour necrosis factor- $\alpha$ ), IL-1 $\beta$  (interleukin-1 $\beta$ ), IL-12, IL-6 makrofágmi a dendritickými bunkami (DC) (Chen, 1999; Basu, 2000; Singh-Jasuja, 2000-2; Asea, 2000), chemokínov makrofágmi (Panjwani, 2002), NO makrofágmi a DC (Panjwani, 2002), zvýšenie expresie MHC proteínov, kostimulačných molekúl (Basu, 2000; Singh-Jasuja, 2000-2) a migráciu DC do lymfatických uzlín (Binder, 2000).

**Toll- like receptory 2 a 4** (Hsp ligandom je Hsp60, Hsp70, gp96): sú členovia rodiny Toll- like receptorov, ktoré rozpoznávajú celú radu chemických štruktúr charakteristických pre rôzne patogénny- lipopolysacharidy, lipoproteíny, prokaryotické a vírové nukleové kyseliny a hrajú dôležité úlohy v aktivácii prirodzenej imunity. Sú odvodené od receptoru Toll, prvýkrát popísaného u drozofily. TLR2 a TLR4 sú vyjadrené na myelomonocytoch. TLR2 rozpoznáva peptidoglykán z Gram- pozitívnych baktérií, lipoproteíny a lipopeptidy z mnohých baktérií, lipoarabinomanan z mykobaktérií, poríny z neisserie a zymosan z kvasiniek. TLR4 je transmembránový lipopolysacharidový receptor. Aktiváciou týchto receptorov sa spúšťa expresia pro- zápalových cytokínov (napr. IL-1, IL-6, TNF, IL-8) a niektorých adhezívnych a kostimulačných receptorov na povrchu APC. TLR-4 rozpoznáva oligosacharidové fragmenty kyseliny hyaluronovej, fibrinogén, fibronektín, LPS z Gram- negatívnych baktérií (Asea, 2002; Binder, 2004).

**CD14** (Hsp ligandom je Hsp70): povrchový receptor granulocytov a monocytov. Viaže lipopolysacharid, ktorý je v komplexe s plazmatickým proteínom LBP

(lipopolysacharide binding protein). Molekula CD14 je schopná interagovať i s množstvom Gram- pozitívnych a Gram- negatívnych baktérií, čo poukazuje na kľúčovú úlohu molekuly CD14 v prirodzenej imunite; jeho aktivácia spôsobuje uvoľnenie zápalových cytokínov a kostimulačných molekúl. Je to membránový glykoproteín, ktorý je ukotvený glykozylofosfatidylinositolovou kotvou. Je vyjadrený na povrchu monocytov a neutrofilných granulocytov periférnej krvi; granulocytárna expresia je podstatne nižšia v porovnaní s expresiou molekuly na monocytoch. Pri dozrievaní do štádia makrofágov sa denzita expresie molekuly mení. Expresia molekuly nie je konštitučná; expresia CD14 na neutrofilných granulocytoch je zosilnená pôsobením TNF $\alpha$ , G-CSF a LPS a znížená pôsobením IL-4, IL-13 a INF $\alpha$ ,  $\beta$  a TGF $\beta$ . Molekula CD14 asociuje s inými PRR receptormi (pathogen recognition receptors). Jedná sa konkrétne o TLR-4, ktorý sa zapojuje do stimulácie buniek prirodzenej imunity pôsobením LPS (Krejsek, 2004).

Molekulu CD14 je možné nájsť v plazme v solubilnej podobe (sCD14). Menšia forma pravdepodobne vzniká proteolytickým odštiepením membránovej molekuly CD14. Väčšia molekula sCD14 postráda GPI kotvu a je secernovaná priamo z bunky. Solubilná molekula CD14 sa v komplexe s LPS viaže na povrch buniek, ktoré neexprimujú molekulu CD14, napr. na povrchu endotelových buniek a buniek hladkej svaloviny (Asea, 2000).

**CD36** (Hsp ligandom je gp96): receptor pre proteíny extracelulárnej matrix ako je kolagén a trombospondín. Je vyjadrený na monocytoch, krvných doštičkách, endoteliálnych bunkách, ale nie na lymfocytoch a granulocytoch. Je častým markerom erytroidnej diferenciácie. Sprostredkováva adhéziu *Plasmodia falciparum* (Binder, 2004).

**CD40** (Hsp ligandom je Hsp70): receptorová molekula na bunečnom povrchu všetkých maturovaných B lymfocytov, monocytov, dendritických buniek, endoteliálnych a epiteliálnych buniek, a často aj B- bunečných malignít. CD 40 je členom rodiny TNF (tumor necrosis factor). Spolu s ligandom CD40L zabezpečuje diferenciáciu/kostimuláciu B buniek, izotypový prešmyk a zachraňuje B bunky pred apoptózou. Je zahrnutý v zápalových procesoch, ktoré vedú k ateroskleróze a trombóze. Väzba mykobakteriálneho Hsp70 na CD40 sprostredkuje kalcium- závislú bunečnú signalizáciu a uvoľnenie chemokínov a pro-zápalových cytokínov (Panjwani, 2002; Wang, 2001 a 2002; Becker, 2002 ).

**CD91** (Hsp ligandom je Hsp70, Hsp90 a gp96): tiež ako  $\alpha$ -2 makroglobulin/low density lipoproteinový (LDL) receptor. Je exprimovaný na celej rade buniek, v hematopoetickom systéme je vyjadrený na monocytoch. Sprostredkováva endocytózu rôznych ligandov (Basu, 2001; Binder, 2004).

**LOX-1** (Hsp ligandom je Hsp70): oxidovaný LDL receptor, ktorý je hojne vyjadrený na vaskulárnych endoteliálnych bunkách. Viaže a degraduje acetylovaný LDL. Oxidovaný LDL je zapojený do aterosklerózy a glomerulosklerózy (Delneste, 2002; Binder, 2004).

**SR-A** (Hsp ligandom je gp96): sú proteíny na povrchu buniek, ktoré môžu viazať modifikované lipoproteíny, ako acetylovaný alebo oxidovaný LDL. Na základe ich štruktúry sú rozdelené do tried A, B, C. SR-A je vyjadrený na makrofágoch, viaže LPS a lipoteichoovú kyselinu Gram- pozitívnych baktérií, modifikované lipopolysacharidy a ďalšie polyanióny. Má dôležitú úlohu v adhézii a aktivácii buniek, v zápalovej odpovedi, v metabolizme modifikovaných lipoproteínov a v ateroskleróze (Berwin, 2003).

## IV. Proteíny tepelného šoku za fyziologických podmienok

U ľudí často s vekom dochádza k zhoršeniu funkcie imunitného systému, čo môže vyvolať zvýšenie citlivosti na rôzne infekcie, výskyt autoimunitných ochorení a určitých nádorov. Zmeny, ku ktorým dochádza v priebehu starnutia, sú spojené so štrukturálnymi zmenami bielkovín, ktoré môžu nadobúdať charakter autoantigénov.

Zmeny špecifickej imunity v starobe sú v porovnaní so zmenami prirodzenej imunity rozsiahlejšie. Dochádza k posunu v zastúpení funkčne významných populácií T a B lymfocytov. Výrazne zmenené sú i funkčné parametre špecifickej imunity, ktoré súvisia s celkovou adaptačnou reakciou na starnutie organizmu.

Kľúčovými imunokompetentnými bunkami sú T lymfocyty. Thymus, v ktorom dochádza k vyzrievaniu z prekursorových buniek v zrelé T lymfocyty, podlieha od okamihu dosiahnutia sexuálnej zrelosti involúcii. Dochádza k obmedzovaniu aktivity subsetu TH1 T lymfocytov. Dôsledkom je znížená bunkami sprostredkovaná cytotoxicita, vedúca ku zníženej odolnosti starších osôb voči intracelulárne parazitickým mikroorganizmom, napr. mykobaktériám. S pribúdajúcim vekom sa mení pomer medzi CD4+ a CD8+ T lymfocytmi v prospech buniek CD4+.

Zvýšená produkcia IL-4 a IL-6 je dôkazom prevahy subsetu TH2 T lymfocytov. To vo svojom dôsledku vedie ku zvýšenej stimulácii B lymfocytov a k dysregulovanej protilátkovej produkcii vrátane autoprotilátok a monoklonálnych gamapatií (Krejsek, 2004). V prípade humorálnej odpovede, dochádza k proliferácii B lymfocytov subsetu B1, koexprimujúcich molekuly CD19/CD5. Zhruba u 60 % starších ľudí boli objavené protilátky proti jadrovým antigénom (ANF), proti IgG (RF) a proti tyreoglobulínu.

Rôzne typy buniek sekretujú stresové proteíny, ktoré sa môžu vyskytovať za rôznych fyziologických a patologických stavoch. Hsps sú prítomné v krvnom obehú zdravých jedincov (Pockley, 1998 a 1999) a ich hladiny klesajú s vekom (Rea, 2001). V štúdiu, ktorá obsahovala séra zdravých jedincov medzi 20 – 96 rokom, bol vo všetkých sérach detegovaný extracelulárny Hsp60, zatiaľ čo extracelulárny Hsp70 sa vyskytoval iba 77 % analyzovaných vzoriek. Regresná analýza odhalila v závislosti na veku postupný pokles v hladinách extracelulárneho Hsp60 (759 ng/ml < 40 rokov; 294 ng/ml ≥ 90 rokov) a extracelulárneho Hsp70 (400 ng/ml < 40 rokov; 20 ng/ml ≥ 90 rokov). Vo všetkých analyzovaných sérach boli detegované protilátky anti- Hsp60, anti-

## Proteíny tepelného šoku za fyziologických podmienok

Hsp70 a anti-mykobakteriálny Hsp65 a pre hladiny protilátok anti- Hsp60 a anti-Hsp65 sa s vekom nevyskytoval žiadny vzťah. Hladiny protilátok anti- Hsp70 sa s vekom zvyšovali (115 U/ml < 40 rokov; 191 U/ml  $\geq$  90 rokov) (Rea, 2001).

S rastúcim vekom je expresia Hsp70 znížená v teplom- stresovaných pľúcnych bunkách (Fargnoli, 1990), v hepatocytoch a v pečeni (Heydari, 1995; Hall, 2000), v myokarde (Gray, 2000) a splenocytoch (Pahlavani, 1995) a indukovaná v odpovedi na ischémiu (Nitta, 1994). Génová expresia Hsc70 s vekom klesá v sietnici (Berstein, 2000) a rovnako ako teplom- indukovaná expresia Hsp70 v starnúcich alebo v neskôr pasážovaných bunkách, čo poukazuje, že proces starnutia môže byť asociovaný s poklesom produkcie Hsp70 (Luce, 1992; Effros, 1994).

Zvýšený vek je asociovaný so zníženou schopnosťou udržiavať homeostázu vo všetkých fyziologických systémoch, čo môže byť paralelné s postupným poklesom schopnosti produkovať proteíny tepelného šoku. Znížená produkcia proteínov tepelného šoku môže prispievať k zvýšeniu citlivosti na zmeny životného prostredia (Shelton, 1999).

## **V. Proteíny tepelného šoku za patologických podmienok**

Proteíny tepelného šoku, najmä Hsp60 a Hsp70 sú imunodominantnými antigénmi patogénnych mikroorganizmov (Kaufmann, 1990). Vysoký stupeň sekvenčnej homológie medzi cicavčiami a mikrobiálnymi Hsps zvyšuje riziko prelomenia tolerancie a prípadná anti-infekčná odpoveď môže vyprovokovať autoimunitnú chorobu. Predpokladá sa, že proteíny tepelného šoku môžu poskytovať spojenie medzi infekciou a autoimunitou buď vďaka rozpoznávaniu konzervovaných epitopov alebo prostredníctvom molekulárneho mimikry (Lamb, 1989). Na základe rôznych štúdií sú známe dôkazy o spojení medzi proteínovou reaktivitou a patogenézou infekcií, malignít a autoimunitného ochorenia.

### **V.1. Proteíny tepelného šoku a infekcie**

V mnohých infekčných ochoreniach proteíny tepelného šoku indukujú veľmi silné humorálne a bunčné imunitné odpovede. Tie sú pozorované v infekciách spôsobených baktériami, prvokmi, plesňami, hlístami (Cohen, 1991; Kaufmann, 1994; Schoel, 1996; Shinnick, 1991). V tabuľke č. 3 sú znázornené imunitné odpovede proti proteínom tepelného šoku v rôznych infekciách. Prinajmenšom dva faktory prispievajú k tomu, že Hsps sú hlavnými antigénmi: 1.) tieto proteíny sú v patogénoch početné, špeciálne za podmienok stresu 2.) imunologická pamäť pre cross- reaktívne determinanty konzervovaných Hsps je vytvorená počas života, v dôsledku častých re- stimulácií pri náhodných stretnutiach s mikroorganizmami s rozličným stupňom virulencie (Kaufmann, 1994).

Za týchto podmienok umožňuje individuálna infekcia s virulentným patogénom pripraviť imunitný systém k rýchlejšej reakcii pred rozvojom špecifickej imunitnej odpovede.

Tabuľka 3: Imunitná odpoveď proti Hsps v rôznych infekčných ochoreniach (Zügel, 1999-1).

Patogén	Ochorenie	Rodina Hsp
<b>Hlísty (červy)</b>		
<i>Schistosoma mansoni</i>	Schistozomóza	Hsp70, Hsp90
<i>Brugia malayi</i>	Filiarióza	Hsp70
<b>Prvoky</b>		
<i>Plasmodium falciparum</i>	Malária	Hsp70, Hsp90
<i>Trypanosoma cruzi</i>	Chagasovo ochorenie	Hsp70, Hsp90
<i>Leishmania major</i>	Leishmanióza	Hsp70
<i>Leishmania donovani</i>	Leishmanióza	Hsp70
<i>Toxoplasma gondii</i>	Toxoplazmoza	Hsp60
<b>Plesne</b>		
<i>Candida albicans</i>	Kandidóza	Hsp90
<i>Histoplasma capsulatum</i>	Histoplazmóza	Hsp60, Hsp70
<b>Baktérie</b>		
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Tuberkulóza	Hsp60, Hsp70
<i>Mycobacterium leprae</i>	Lepra	Hsp10, Hsp60, Hsp70
<i>Chlamydia trachomatis</i>	Trachoma	Hsp60, Hsp70
<i>Borrelia burgdorferi</i>	Lymeská choroba (borelióza)	Hsp60, Hsp70
<i>Helicobacter pylori</i>	Gastritída	Hsp60
<i>Treponema pallidum</i>	Syfilis	Hsp60
<i>Bordetella pertussis</i>	Čierny kašeľ	Hsp60
<i>Listeria monocytogenes</i>	Listerióza	Hsp60, Hsp70

## V.2. Proteíny tepelného šoku a autoimunitné ochorenia

Proteíny tepelného šoku sú zahrnuté v regulácii niektorých autoimunitných ochorení, ako sú autoimunitná artritída (reumatoidná artritída a juvenilná idiopatická artritída), diabetes mellitus I. typu (inzulín- závislý diabetes), ateroskleróza, roztrúsená

Proteíny tepelného šoku za patologických podmienok

skleróza (skleróza multiplex), systémový lupus erythematosus a ďalšie autoimunitné ochorenia (Raska, 2005).

### **V.2.1. Proteíny tepelného šoku a reumatoidná artritída**

Reumatoidná artritída (RA) je zápalové autoimunitné ochorenie, ktoré sa prejavuje zápalom a bolesivosťou kĺbov a ich postupným poškodením; postihuje však aj ostatné orgány (pľúca, srdce, cievy, periférne nervstvo, tkanivá oka a ďalšie). Ochorenie má multifaktoriálne príčiny vrátane určitej genetickej predispozície a je pre ňu charakteristický chronický zápal, ktorý je iniciovaný a udržiavaný autoimunitnými mechanizmami. Priebeh reumatoidnej artritídy je veľmi variabilný. Akútne exacerbácie môžu byť striedané remisiami, celkovo je však priebeh progresívny a často vedie k invalidite (Pavelka, 2005). Miestom patologického zápalového deja je synoviálna výstelka v kĺboch a šľachách, sekundárne dochádza k patologickým zmenám v synoviálnej tekutine, chrupavke, kosti. Súčasne je postihnutá i cievna zložka, ktorá sa podieľa na mimokĺbových manifestáciách. Synoviálne tkanivo je infiltrované T a B bunkami, plazmocytmi, makrofágmi a žírnymi bunkami. Fibroblastom podobné synoviocyty sú aktivované a nekontrolovane proliferujú. Väčšina infiltrujúcich buniek produkuje zápalové mediátory, ktoré v konečnom dôsledku indukujú tvorbu enzýmov degradujúcich bielkoviny a tie vedú k deštrukcii. V tekutine vnútorného kĺbového puzdra sa nachádza veľké množstvo rôznych cytokínov (IL-1, IL-18, INF $\gamma$ , TNF $\alpha$  a ďalšie), ktoré zápalový proces vyvolávajú a udržiujú (Firestein, 1997).

Prevalencia sa v európskych populáciách pohybuje okolo 1%. Ochorenie postihuje vo väčšej miere ženy s pomerom 2-4:1 k mužom (Hartzheim, 1998). I keď sa choroba môže začať v každom veku, najčastejšie sa objavuje okolo 50. roku života (Ahern, 1997).

Príčina vzniku RA dodnes nie je známa. Predpokladá sa, že ide o ochorenie, ktoré u geneticky predisponovaných jedincov spúšťa určitý patogén. Na vzniku tohto ochorenia sa môže podieľať niekoľko faktorov: pohlavie, genetická predispozícia, infekčný agens a v neposlednom rade aj proteíny tepelného šoku.

RA sa častejšie vyskytuje u osôb nesúcich niektoré alely HLA-DRB1 lokusu (HLA DRB1\*0404, DRB1\*0401, DRB1\*0101). Reťazce kódované týmito alelami zdieľajú spoločný epitop (shared epitope- SE) tvorený sekvenciou aminokyselín Glu-Lys-Arg-Ala-Ala, Glu-Arg-Arg-Ala-Ala alebo Glu-Arg-Arg-Ala-Ala na pozícii 70 až



74 DR $\beta$  reťazca. Prítomnosť uvedeného úseku je asociovaná jednak s rozvojom RA, tak i s prítomnosťou reumatoidných faktorov a s agresívnejším priebehom ochorenia (Ling, 2007).

Častými vyvolávatelmi tohto ochorenia sú rôzne vírusy a baktérie: parvovirus, Mykoplasma, Mykobaktérie, Yersenia, vírus Epstein-Barrovej (Buch, 2002).

Prvé informácie o úlohe Hsps ako antigénov v zápalových odpovediach poskytli mykobakteriálny Hsp65 v experimentálnom modeli adjuvantnej artritídy (AA), ktorá je značne študovanou formou experimentálnej artritídy s patologickou podobnosťou k reumatoidnej artritíde a juvenilnej idiopatickej artritíde (Hogervorst, 1992; van Eden, 1988; Holoshitz 1984). Toto ochorenie môže byť indukované vo vhodných (Lewis) potkanoch imunizáciou *nekompletného Freudovho adjuvans* obsahujúceho tepelne-usmrtené mykobaktérie (Prakken, 2002) alebo pasívnym transferom T klonu rozpoznávajúceho 180 – 188 aminokyselinovú sekvenciu v *M. bovis* Hsp65 (van Eden, 1988). Tento T bunecný klon je reaktívny s chrupavkovým proteoglykánom, agregátom (van Eden, 1985). Vlastná krížová reaktivita alebo mimikry T buniek založené na sekvenčnej homológii medzi sekvenciou 180-188 *M. bovis* Hsp65 a chrupavkovým proteoglykánom, vyjadruje schopnosť indukovať autoimunitný zápal. A naopak, pre-imunizácia mykobakteriálnym Hsp65 chráni pred indukciou AA (Prakken, 2002; Ulmanky, 2002).

Na základe týchto pozorovaní sa študovala imunitná reaktivita proti Hsps v artritíde u ľudí. Vzorky artritického synoviálneho tkaniva zo zvierat s experimentálne indukovanou artritídou a od pacientov s RA alebo JIA vyjadrovali zvýšené hladiny protilátok Hsp65 (de Graeff- Meeder, 1990; Boog, 1992). T bunky zo synoviálnej tekutiny a krvi pacientov s RA proliferovali v odpovedi na *Mycobacterium bovis* Hsp60 (van Eden, 2005).

U pacientov s RA ľudský Hsp60 poháňal produkciu regulačných cytokínov. V prípade, že Hsp60- reaktívne T bunky (izolované zo synoviálnej tekutiny RA pacientov) boli stimulované ľudským Hsp60, produkovali menej INF $\gamma$  a viac IL-4 než keď boli stimulované bakteriálnym Hsp60. Tieto Hsp60- špecifické T bunky potláčali produkciu TNF autológnyimi mononukleárnymi bunkami periférnej krvi (van Eden, 2005).

## V.2.2. Proteíny tepelného šoku a juvenilná idiopatická artritída

Juvenilná idiopatická artritída (JIA; juvenilná reumatoidná artritída - JRA, juvenilná chronická artritída - JCA) je dlhotrvajúce zápalové ochorenie začínajúce do 16. roku veku, ktoré sa výrazne prejavuje na pohybovom ústrojenstve, ale môže tiež postihnúť rôzne orgány alebo systémy. Je jedným z najčastejších systémových autoimunitných ochorení v detskom veku (Cassidy, 1990). Pri tomto autoimunitnom ochorení autoreaktívne T bunky hrajú dôležitú úlohu v zápale a v deštrukcii kĺbu (Kamphuis, 2000). Na identifikovanie jednotlivých klinických subtypov sa používajú rôzne klasifikačné kritériá (Ravelli, 2007).

Podľa ILAR (International League of Associations for Rheumatology) ide o ochorenie heterogénne, pretrvávajúce viac než 6 týždňov a zahrňujúce niekoľko foriem alebo subtypov (oligoartikulárna, výskyt v 27 - 56 %), polyartikulárna (RF- pozitívna 2 – 7 %; RF- negatívna 11- 28 %) a systémová (4 - 17 %) JIA, ktoré sa od seba líšia klinicky (Petty, 2001; Ravelli, 2007). Klinický obraz je charakterizovaný predovšetkým chronickým zápalom jedného alebo viacerých kĺbov. Prakticky postihnuté môžu byť všetky kĺby horných a dolných končatín. Oligoartikulárna forma má relatívne mierny klinický priebeh, zatiaľ čo polyartikulárna a systémová JIA sú obvyčajne neremitujúce a sú degradujúcimi ochoreniami, často vyžadujúcimi agresívnu imunosupresívnu liečbu.

Začiatok JIA vykazuje dva vrcholy: jeden vo veku 2 – 4 rokov a druhý okolo puberty. Choroba celkovo postihuje častejšie dievčatá než chlapcov, väčšinou v pomere 2 až 3 : 1. Etiológia JIA dodnes nie je známa. V patogenéze sa uvádza úloha pohlavia, veku, dedičná náchylnosť pacienta, očkovanie alebo stres, či už fyzický alebo psychický, ako aj úloha molekulárnych mimikrov (Pavelka, 2003).

Niektoré alely HLA II. triedy sú združené s niektorými formami JIA. U JIA pacientov s oligoartikulárnym začiatkom a konverziou do polyartritídy bola zistená asociácia s HLA antigénmi: HLA-A2, HLA-DRB1\*11 a HLA-DRB1\*08. U polyartikulárnej seropozitívnej JIA bola zistená asociácia s HLA-DR4. U RA-entezitídy bolo 76 % pacientov HLA-B27 pozitívnych. U systémovej artritídy bola zistená asociácia s nukleotidovým polymorfizmom (-174; G/C polymorfizmus) v regulačnom regióne génu pre IL-6 (Ravelli, 2007).

Ak hodnotíme klinický priebeh, JIA je odlišná od RA. Ak sa nelieči, RA sa vždy rozvinie do neremitujúcej, degradujúcej choroby, zatiaľ čo mnoho pacientov s JIA občas spontánne remituje (van Eden, 2005).

Existuje veľmi málo štúdií, ktoré skúmali humorálnu imunitnú odpoveď na proteíny tepelného šoku. Zvýšené hladiny IgG protilátok proti Hsp60 boli v porovnaní so zdravými jedincami detegované u pacientov s cystickou fibrózou, systémovým lupusom a JCA (de Graeff- Meeder, 1993). Ó Nualláin a kolektív zaznamenali IgA, IgG a IgM anti- Hsp70 pozitívne séra u pacientov s JIA. U oligoartikulárnej a polyartikulárnej formy JIA detegovali signifikantne zvýšené hladiny IgM protilátok proti ľudskému Hsp70 (Ó Nualláin, 1993).

Mononukleárne bunky zo synoviálnej tekutiny a periférnej krvi JIA pacientov proliferovali v odpovedi na vlastný- Hsp60 (de Graeff- Meeder, 1991). Rovnako boli u JIA pacientov detegované bunecné odpovede na Hsp40 (*E. coli* DNAJ) (Albani, 1994). Ďalšie práce ukázali, že CD4+ T- bunecné odpovede na ľudský Hsp60 u pacientov s onsetom JIA korelovali s dobrou prognózou a s odpoveďami na mykobakteriálny Hsp60. Tieto nálezy signalizujú, že mikrobiálne- Hsp- skrížené odpovede T buniek na endogénny ľudský Hsp60 môžu mať v priebehu remitujúcej JIA regulačnú úlohu (van Eden, 2005). T bunky izolované od JIA pacientov a rozpoznávajúce vlastný Hsp60 majú nasledujúci regulačný fenotyp: po aktivácii ľudským Hsp60, T bunky od pacientov s remitujúcou JIA vyjadrujú CD25 a CD30 a môžu produkovať regulačné cytokíny ako IL-4, IL-10 a TGF- $\beta$  (de Kleer, 2003).

Počas obdobia aktívnej artritídy, zápal v kĺbe vedie k lokálnemu bunecnému stresu, a teda k zvýšenej regulácii expresie vlastných- Hsp v synoviálnom tkanive. Predpokladá sa, že T bunky rozpoznávajúce tieto vlastné- Hsps môžu byť aktivované v zápalovom kĺbe, čím indukujú aktiváciu niekoľkých regulačných T- bunecných podskupín: T<sub>H2</sub> bunky – produkujú IL-4 a vyjadrujú GATA- viažuci proteín 3 (GATA3); T<sub>H3</sub> – produkujú TGF- $\beta$ ; T<sub>R1</sub> – produkujú IL-10 a CD4+ CD25+ regulačné T (Treg) bunky, ktoré sa vyznačujú expresiou transkripčného faktoru FoxP3 (de Kleer, 2004).

Vo svojej práci de Kleer ukázal, že autológna transplantácia kmeňových buniek (ASCT) u JIA obnovuje imunologickú vlastnú- toleranciu prostredníctvom dvoch mechanizmov: 1.) ASCT indukuje obnovenie hojného výskytu FoxP3 vyjadrujúceho CD4+ CD25<sup>bright</sup> regulačné T bunky (Treg) z redukovaného množstva pred ASCT na normálne hladiny po ASCT. Táto obnova je dôsledkom preferenčnej homeostatickej expanzie CD4+CD25+ regulačných T buniek počas lymfopenickej fázy imunorekonštitúcie, meranej prostredníctvom Ki67 (Ki67 je kľúčový proteín pre bunecné delenie; je vyjadrený bunkami, ktoré sú v bunecnom cykle; Gerdes, 1984)

a expresie CD44. 2.) použitím náhradných APC k špecifickému izolovaniu vlastných–reaktívnych T buniek sa zistilo, že ASCT indukuje autoimunitné bunky k vychýleniu z pro- zápalového fenotypu (mRNA IFN- $\gamma$  a T-bet vysoký [T-bet je člen T-box rodiny transkripčných faktorov]) k tolerančnému fenotypu (mRNA IL-10 a GATA3 vysoký). Tieto informácie ako prvé demonštrujú kvalitatívne imunologické zmeny, ktoré sú zodpovedné za indukciu imunitnej tolerancie prostredníctvom ASCT: obnovenie CD4+ CD25+ imunitnej regulačnej siete a programovanie autoreaktívnych T buniek (de Kleer, 2006).

### V.2.3. Proteíny tepelného šoku a diabetes mellitus

Diabetes mellitus I. typu (diabetes závislý na inzulíne) je dôsledkom progresívnej deštrukcie  $\beta$  buniek Langerhausových ostrovčekov pankreasu. Patologický proces je dlhodobý, trvá väčšinou roky. Hlavnými mechanizmami zodpovednými za poškodenie produkčných buniek pankreasu je bunkami sprostredkovaná autoimunitná imunopatologická reakcia. Infiltrát, ktorý spôsobuje inzultídu Langerhausových ostrovčekov pankreasu, je tvorený T lymfocytmi, makrofágmi, dendritickými bunkami a B lymfocytmi. Autoimunitná imunopatologická reaktivita je namierená proti celej rade aktívnych molekúl, ktoré sa nachádzajú v  $\beta$  bunkách Langerhausových ostrovčekov pankreasu. Jedná sa o inzulín, dekarboxylázu kyseliny glutámovej (GAD), antigén označovaný ako ICA512/IA2, ktorým je transmembránová proteínová tyrozín-fosfatáza, phogrin, stresový proteín Hp65 a karboxypeptidáza H (Krejsek, 2004). GAD je enzým, ktorý je zodpovedný za syntézu inhibičného neurotransmiteru  $\gamma$ - kyseliny aminomaslovej (GABA). Prítomnosť autoprotílátok reagujúcich s GAD je význačným rizikovým faktorom pre rozvoj diabetes mellitus I. typu. Lymfocyty periférnej krvi čerstvo diagnostikovaných pacientov odpovedajú proliferáčnou aktivitou na podnet sprostredkovaný rekombinantným GAD65.

Diabetes mellitus I. typu už nemôže byť považovaný za ochorenie, ktoré je typické pre dospievajúce deti a mladých ľudí. Vyskytovať sa môže v každom veku. Ukazuje sa, že 5 % až 30 % chorých, u ktorých bol pôvodne diagnostikovaný diabetes mellitus II. typu, majú prítomne autoprotílátky proti bunkám Langerhausových ostrovčekov pankreasu a GAD. Pre diabetes mellitus spôsobený autoimunitnou imunopatologickou reakciou sa navrhuje používať termín diabetes mellitus typu 1A. Diabetes mellitus typu 1B je diabetes s ťažkou inzulínovou deficienciou, ktorý je

spôsobený autoimunitnou imunopatologickou reaktivitou. Diagnostika diabetes mellitus I. typu spočíva v stanovení špecifických protilátok namierených proti základným antigénom, t.j. inzulínu, GAD a ICA512/IA2 (Wasserfall, 2006). Diabetes mellitus II. typu je idiopatická forma diabetu s inzulínovou rezistenciou bez ťažkej inzulínovej deficiencie alebo výraznej straty  $\beta$  buniek pankreasu.

Incidencia ochorenia je veľmi rôzna. Vyšší výskyt je zaznamenaný vo Fínsku, v Sardínii a v Taliansku a nižší bol pozorovaný v Ázijských krajinách (Dorman, 2000). Diabetes mellitus I. typu je svojou povahou multifaktoriálne ochorenie. Na jeho vzniku sa značne podieľajú genetické predispozície. Ďalším faktorom sú infekcie, predovšetkým vírové (coxackie vírus typu B), ktoré sa podieľajú na vzniku ochorenia mechanizmom molekulových mimikrov. Menej je jasné pôsobenie potravinových faktorov.

Z rozsiahlych geneticko-epidemiologických štúdií je v kaukazskej populácii známa výrazná asociácia diabetu mellitu I. typu so zvýšenými frekvenciami haplotypov HLA-DRB1\*04-DQA1\*0301-DQB1\*0302 a DRB1\*0301-DQA1\*0501-DQB1\*0201 (Shawkatova, 2000).

V experimentálnom modeli NOD myši (neobézne diabetické myši, non-obese diabetic mouse; unikátny MHC haplotyp [H-2g7, lokalizovaný na chromozóme 17]), u ktorej dochádza k spontánnemu vzniku diabetu mellitu I. typu, je zreteľná polarizácia smerom k TH1 T lymfocytom. Slúžia na skúmanie priebehu diabetu, zabráneniu rozvoja ochorenia alebo na stanovenie terapie. Citlivosť na DM I. typu v NOD myšiach je polygénna a vplyv prostredia zohráva veľkú úlohu. Z environmentálnych faktorov, ktoré sa podieľajú na rozvoji diabetu u myši majú na najväčší význam zdravotný stav, životospráva a prostredie, ktorom žijú. Rozvoj diabetu u myši je charakterizovaný insulitídou a infiltráciou leukocytov do ostrovčiek pankreasu.

U týchto NOD myši má imunizácia mykobakteriálnym Hsp60 (*Mycobacterium tuberculosis*) protektívny charakter, ktorý však závisí na forme podania Hsp. V prípade, že bol mykobakteriálny Hsp60 podávaný vo forme nekompletného Freudovho adjuvans, vyvolával ochorenie a v prípade, že bol podávaný v PBS (phosphate buffer saline), mal protektívny účinok (Elias, 1990). Ďalšia štúdia viedla k identifikácii myšieho Hsp60-odvodeného peptidu, známeho ako p277 (aa 437 – 460), ktorý je efektívny pri ochrane NOD myši proti inzulitíde (Elias, 1994). Quintana (2004) ukázal, že je možné predpokladať rezistenciu na budúcu inzulitídu v NOD myšiach, ktoré majú spontánny rozvoj prirodzených IgG protilátok špecifických pre epitopy vo vnútri Hsp60. To

## Proteíny tepelného šoku za patologických podmienok

znamená, že NOD myši, ktoré vakcinujú samy seba proti Hsp60, sú chránené pred rozvíjajúcou sa chorobou.

Podobne ako u nálezov zvieracích modelov, aj v prípade pacientov s diabetom I. typu je zaznamenaná prítomnosť autoprotilátok IgG a T buniek špecifických pre Hsp60 a Hsp70 (Ozawa, 1996; Horvath, 2002; Qin, 2003; Figueredo, 1996; Weitgasser, 2003; Abulafia-Lapid, 2003). Cohen a jeho kolegovia ukázali, že Hsp60- odvodенý peptid p277 sa môže viazať na ľudské molekuly MHC II. triedy a indukovať u pacientov s diabetom mellitu I. typu proliferatívne T- bunečné odpovede (Cohen, 2002; Abulafia-Lapid, 1999).

### V.2.4. Proteíny tepelného šoku a ateroskleróza

Ateroskleróza je považovaná za chronický zápal, ktorý je výsledkom interakcií medzi chemicky modifikovanými lipoproteínmi a bunkami imunitného systému, najmä makrofágmi, T lymfocytmi a ďalšími bunečnými elementmi, akými sú endotelové bunky, bunky hladkej svaloviny, fibroblasty, mastocyty a trombocyty. Tento zápalový proces vedie k tvorbe aterosklerotického plátu, ktorý zasahuje do cievného lúmenu. Ruptúra plátu a následná trombóza vedie k akútnym klinickým komplikáciám, akými sú akútne koronárne syndrómy (infarkt myokardu, angína pectoris) a mozgová mŕtvica (Krejsek, 2004).

Lipidy z potravy sú transportované chylomikrónmi a endogénne lipidy sú prenášané prostredníctvom VLDL (Very Low Density Lipoproteins), LDL (Low Density Lipoproteins) a HDL (High Density Lipoproteins). Častice VLDL prenášajú masťné kyseliny do tukového tkaniva a svalov. Po odstránení triglyceridov v tkanivách je zvyšok VLDL metabolizovaný na častice LDL. Väčšina cholesterolu v plazme je do tkaniva prenášaná časticami LDL.

Iniciáciu aterosklerotického procesu predstavuje akumulácia LDL v intimálnej vrstve artérii. Objavujú sa aj údaje o úlohe infekcie (CMV, *Chlamydia pneumoniae*) v patogenéze aterosklerózy (Wick, 2001; Boman, 2002; Bason, 2003). Pokiaľ imunitný systém nie je schopný eliminovať infekciu, vedie jeho dlhodobá aktivácia k negatívnym dôsledkom. Infekcia indukuje tvorbu pro-zápalových cytokínov a endotelová dysfunkcia postupne vedie k progresii ochorenia. Infekcia pôsobí na koagulačnú kaskádu a spôsobuje zmeny v metabolizme lipidov (Krejsek, 2004).

Hsp60 môže byť dôležitým autoantigénom v ateroskleróze. Zvieracie modely

aterosklerózy poukázali na úlohu Hsp60 v rozvoji ochorenia a v menšej miere v ochrane proti ochoreniu. Imunizácia mykobakteriálnym Hsp60 u králikov a u myší v prítomnosti genetických podmienok podporujúcich aterosklerózu, zvyšovala výskyt ochorenia (Wick, 2004). Vysoké hladiny autoprotilátok, špecifických pre ľudský Hsp60, sú asociované s kardiovaskulárnymi ochoreniami a srdcovými chorobami (Wick, 2004). U B- bunečného epitopu ľudského Hsp60 bolo zistené, že vytvára homológ s dvoma CMV- kódovanými proteínmi (Bason, 2003). V porovnaní so zdravými jedincami boli u pacientov s ochoreniami srdca objavené protilátky špecifické pre ľudský Hsp60 epitop, ako aj pre homológne virálne peptidy. Infekcia s CMV môže indukovať kaskádu imunitných odpovedí, ktoré cez molekulárne mimikry zahrňujúce Hsp60 vedú k poškodeniu endotelia.

Naproti tomu, vysoké hladiny Hsp70 sú v sére asociované s ochranou proti kardiovaskulárnym ochoreniam (Pockley, 2003; Zhu, 2003). Po orálnom podaní Hsp60 zvieratám alebo v prípade, že hladina Hsp70 bola v sére vysoká, Hsps môžu ochorenie potláčať (van Eden, 2005).

### **V.3. Proteíny tepelného šoku a Graft versus Host Disease**

Reakcia štepu proti hostiteľovi (GvHD) predstavuje z klinického hľadiska najvýznamnejšiu komplikáciu alogénnych transplantácií kmeňových/progenitorových buniek. Príčinou tejto reakcie je buď neúplná zhoda v HLA- systéme alebo nezhoda v antigénoch, ktoré nie sú kódované v hlavnom systéme histokompatibility. Výsledkom je komplexná imunologická reakcia, ktorá vedie k poškodeniu hlavných cieľových orgánov príjemcu, ktorými sú koža, pečeň a sliznice gastrointestinálneho traktu (Jarvis, 2003). Z klinického hľadiska sa odlišuje akútna forma GvHD od formy chronickej.

Akútna GvHD vzniká niekoľko dní až týždňov po transplantácii kmeňových buniek. Podľa závažnosti postihnutia sa delí do štyroch stupňov, kde dochádza k poškodeniu najmä imunitného systému, kože, pečene a čriev. Postihnutie pečene je možné monitorovať zo zvyšujúcej sa hladiny bilirubínu. Za najzávažnejšie je považované postihnutie tráviaceho traktu, ktoré sa prejavuje silnou abdominálnou bolesťou a často výraznými hnačkami (Vaňásek, 1996).

Reakcia GvHD prebieha v troch navzájom prepojených fázach. V patofyziológii akútnej GvHD zohráva kľúčovú úlohu bunkami sprostredkovaná imunita (T lymfocyty

darcu), pro- zápalové cytokíny produkované makrofágmi a NK bunkami darcu a makrofágmi príjemcu (Ferrara, 1999 a 2003). Efektorové subpopulácie darcovských T lymfocytov namierené proti aloantigénom hostiteľa produkujú  $T_H1$  cytokíny (IL-2, IFN- $\gamma$ ), ktoré aktivujú NK bunky a makrofágy. Aktivované makrofágy produkujú pro-zápalové cytokíny (IL-1, IL-6, IL-12), ktoré indukujú aktiváciu T lymfocytov a NK buniek.

V dôsledku toxicity prípravného režimu dochádza k poškodzovaniu buniek a tkanív príjemcu a k uvoľneniu veľkého množstva pro- zápalových cytokínov (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ) a chemokínov. Dlhodobým dôsledkom môže byť zosilnená expresia HLA I. a II. triedy na bunkách príjemcu. V prípade aGvHD je táto cytokínová produkcia mnohonásobne amplifikovaná makrofágmi aktivovanými IFN- $\gamma$  a lokálnymi toxínmi (Ferrara, 1993). Výsledkom je cytokínová búrka spôsobujúca lokálne nekrotické poškodenie tkaniva príjemcu (Hakim, 1997).

Chronická GvHD sa vyvíja po niekoľkých mesiacoch alebo dokonca rokoch po transplantácii. Je charakterizovaná infiltráciou tkaniva  $T_H2$  lymfocytmi, tvorbou aloprotilátok a produkciou cytokínov, ktoré podporujú fibrotizáciu tkaniva. Dochádza k chronickému zápalu ciev, kože a vnútorných orgánov, ktorý vedie k náhrade funkčného tkaniva väzivom, k poruchám prekrvenia, k strate funkcie príslušných orgánov a tkanív.

Navrhovaná úloha Hsps v peptidovej väzbe a v antigénnej prezentácii naznačuje potenciálnu úlohu v aloreaktívnych procesoch, ktoré po transplantácii hematopoetických kmeňových buniek vedú k reakcii štepu proti hostiteľovi.

V lymfatických uzlinách a v slezine F1 potkanov (DA x LEW), u ktorých bola vyvolaná akútna letálna GvHD, boli pozorované zvýšené hladiny indukibilnej a konštitučnej Hsp70 (Goral, 1995 a 1998). V ďalšej práci Goralová (Goral, 2002) potvrdila, že protilátky proti indukibilnej Hsp70 a Hsp90 sú v plazme pacientov po alogenénnej transplantácii kmeňových buniek z periférnej krvi (PBSCT) asociované s akútnou a chronickou GvHD. Hladiny týchto protilátok v plazme korelovali so závažnosťou GvHD príjemcov. Pacienti s akútnou GvHD mali krátko po transplantácii (30 – 90 dní) významne zvýšené hladiny protilátok IgM anti-Hsp70 a/alebo anti-Hsp90. Toto zvýšenie navyše sprevádzalo i chronickú GvHD. U väčšiny pacientov sa hladiny protilátok behom ďalších 400 dní vrátili na normálnu hladinu.

Na in vitro modely kožného explantátu v ľudskom tkanive Jarvis ukázal zvýšenú



expresiu stres- inducibilnej Hsp70, ktorá je bez ohľadu na GvHD profylaxiu signifikantne asociovaná s aGvHD II. – IV. stupňa (Jarvis, 2003). Predpokladá sa, že táto dramatická indukcia Hsp70 môže byť výsledkom protektívnej odpovede.

#### **V.4. Proteíny tepelného šoku a onkohematologické ochorenia**

Normálny vývoj hematopoetických buniek a udržanie tkanivovej homeostázy si vyžaduje pevnú reguláciu proliferácie, diferenciácie a apoptózy. Deregulácia niektorého z týchto procesov môže viesť k onkohematologickým ochoreniam (Thomson, 1995). Abnormálna expresia Hsps je identifikovaná ako jeden z deregulačných faktorov v bunčnom vývoji (Thomas, 2005-1). Mnoho štúdií, týkajúcich sa Hsps, sú prevedené na malígnych bunkách zo solídnych nádorov. Menej je už známa funkcia a expresia Hsps v onkohematologických ochoreniach. Medzi najviac študované modely patrí akútna myeloidná leukémia (AML), myelodysplastický syndróm (MDS) a nehodgkinské lymfomy (NHLs).

##### **V.4.1. Proteíny tepelného šoku a akútna myeloidná leukémia**

Akútna myeloidná leukémia (AML) je ochorenie, ktoré vzniká malígnou transformáciou kmeňovej hematopoetickej bunky. Pre bunky akútnej leukémie je typické ukončenie diferenciácie na úrovni blastov pri zachovanej schopnosti proliferácie. Pokračujúca akumulácia patologických blastických buniek potlačí fyziologickú krvotvorbu a spôsobí anémiu, granulocytopéniu a trombocytopéniu (Adam, 2001). Incidencia sa zvyšuje vekom.

V súčasnosti sa používa Francúzko- americko- anglická klasifikácia (FAB klasifikácia), ktorá rozdeľuje AML do 8 subtypov (M0 až M7) podľa typu buniek, z ktorých sa leukémia vyvíja a podľa ich stupňa zrelosti (Bennett, 1985).

V súčasnej dobe je k dispozícii veľmi málo štúdií, ktoré skúmali účinok intracelulárnej expresie Hsps ako prognostického markeru. Leukemické bunky sú heterogénnym modelom expresie Hsps, medzi rozdielnymi pacientmi, medzi bunkami od jednotlivých pacientov a medzi jednotlivými skúmanými Hsps (Xiao, 1996; Chant, 1995). Intracelulárna expresia proteínov tepelného šoku bola skúmaná na leukemických blastoch získaných z kostnej drene ako aj z periférnej krvi u čerstvo diagnostikovaných AML pacientov. Zistilo sa, že Hsp27 bol vyjadrený v 39 %, Hsp60 v 26 %, Hsp70 v 58

## Proteíny tepelného šoku za patologických podmienok

%, Hsp90 v 41 % a Hsp110 v 30 % prípadoch (Thomas, 2005-2). Vysoká expresia Hsps sa nevzťahuje na špecifický typ akútnej leukémie, avšak Hsp90 a Hsp110 boli prevažne vyjadrené na subtype M5 leukemických buniek. Výsledky naznačujú, že expresia Hsps koreluje so zlou prognózou (korelácia medzi expresiou Hsps a expresiou CD34 na povrchu leukemických buniek), je asociovaná s nízkym stupňom kompletnej remisie (CR) a s krátkou dobou prežitia s AML. To potvrdzuje predchádzajúce výsledky u rakoviny prsníka, v ktorých zvýšené hladiny Hsps korelujú s liekovou rezistenciou (Thomas, 2005-2).

Flandrin a kolektív študovali bunky získané od 65 pacientov s čerstvo diagnostikovanou AML. Rovnako boli hodnotené aj *in vitro* účinky 17-AAG (17-allylamino-demethoxy geldanamycin), selektívneho inhibítora Hsp90. Expresia Hsp90 korelovala s expresiou CD34, p170 a bcl-2 proteínmi, ale nie s počtami bielych buniek, FAB alebo WHO subtypom alebo cytogenetikou. Hladiny Hsp90 boli tiež vysoké vo vzorkách vystavených autonómne rastu v kvapalnej kultúre alebo vo vzorkách tvoriacich spontánne kolónie. Percentá Hsp90-, CD34-, bcl-2- a p170- pozitívnych buniek boli vysoké u pacientov, ktorí nedosiahli kompletnú remisiu. *In vitro* vystavenie leukemických buniek 17-AAG malo za následok inhibíciu rastu v kvapalných a klonogenných kultúrach a apoptózu, pri koncentráciách, ktoré v mnohých prípadoch neboli toxické pre normálne CD-34 pozitívne alebo progenitorové bunky. Táto štúdia opätovne potvrdila, že Hsp90 je nadmerne vyjadrený v AML bunkách so zlou prognózou a hra úlohu v bunečnom prežití a rezistencii na chemoterapiu. Cílená terapia so 17-AAG predstavuje sľubnú anti-leukemickú stratégiu u AML dospelých (Flandrin, 2008).

Ďalšie práce skúmali membránovú expresiu inducibilných členov rodiny Hsp70 na leukemických blastoch získaných z kostnej drene AML pacientov. Zistila sa pozitívna expresia Hsp70, ktorá korelovala s percentom leukemických blastov. Vzhľadom na to, že kostná dreň zdravých jedincov alebo AML pacientov v remisii nevyjadrovala Hsp70 na plazmatickej membráne, Hsp70 môže byť považovaný za nádorovo- selektívnu rozpoznávaciu štruktúru *in vivo* (Hantschel, 2000). Ďalšia štúdia ukázala, že vysoká membránová expresia Hsp70 na leukemických bunkách je asociovaná s horšou prognózou (Steiner, 2006). Hsp70 môže byť využitý pre špecifickú imunoterapiu NK bunkami (Multhoff, 1997 a 1999). Hsp70- odvodенý peptid (TKD, aa 450 – 463) je schopný stimulovať cytotoxickú a proliferačnú aktivitu NK buniek

(Multhoff, 2001). Hsp70- pozitívne leukemické blasty môžu byť zahubené NK bunkami stimulovanými nízkou dávkou IL-2 a peptidu TKD (Gehrmann, 2003).

#### V.4.2. Proteíny tepelného šoku a myelodysplastický syndróm

Myelodysplastický syndróm (MDS) je označenie pre heterogénnu skupinu ochorení s charakteristickou monoklonálnou hematopoézou s normo-, hypo- alebo hyper- celulórnou kostnou dreňou a súčasnou periférnou cytopéniou postihujúcou jednu alebo viac vývojových línií. Príčinou je porucha proliferácie a diferenciácie mutovanej pluripotentnej kmeňovej bunky a možno aj autoimunitné fenomény. MDS je pre-leukemický stav.

Podstatou choroby je defekt mechanizmu opravujúceho DNA v hematopoetických bunkách. Tým vzniká ich genetická nestabilita, ktorá umožňuje postupnú malignizáciu mutovanej kmeňovej hematopoetickej bunky. Defekt mechanizmu je buď vrodený alebo získaný (Adam, 2001).

Podľa FAB klasifikácie rozlišujeme 5 podskupín: Refrakterná anémia (**MDS-RA**); Refrakterná anémia s prstenčítymi sideroblastami (**RARS**); Refrakterná anémia s excesom (nadbytkom) blastov (**RAEB**); Refrakterná anémia s excesom blastov v transformácii (**RAEB-t**); Chronická myelomonocytárna leukémia (**CMMoL**) (Bennett, 1982).

Ako bolo spomínané v kapitole II.2., konštitučne vyjadrený Hsc70 a stres-inducibilné Hsp70 a Hsp27 sú Hsps, ktoré inhibujú apoptózu a vykazujú silnú cytoprotektívnu úlohu. Intracelulárna expresia týchto proteínov bola skúmaná na mononukleárných bunkách kostnej drene získaných od MDS pacientov pred liečbou a pred prijatím transfúzie. V porovnaní so zdravými jedincami, všetky Hsps boli nadmerne vyjadrené na MDS mononukleárných bunkách kostnej drene a expresia Hsp70 korelovala s progresiou ochorenia (Michalopoulou, 2006).

V ďalšej práci, Duval skúmal expresiu Hsps v kostnej dreni u pacientov s čerstvou diagnózou MDS spolu s membránovým diferenciačným antigénom CD34. Zvýšená expresia Hsp27, Hsp60, Hsp70, Hsp90 a Hsp110 sa vyskytovala u pacientov so zlou prognózou MDS. MDS s dobrou prognózou (MDS-RA, RARS) je charakterizovaná nízkou expresiou Hsps, zatiaľ čo RAEB má vysokú expresiu asociovanú so zvýšeným percentom blastov. Expresia všetkých Hsps, okrem Hsp70

Proteíny tepelného šoku za patologických podmienok

korelovala s CD34 (Duval, 2006).

#### **V.4.3. Proteíny tepelného šoku a nehodgkinské lymfomy (NHLs)**

Existuje mnoho odlišných typov nehodgkinských lymfomov (NHLs), ktoré môžeme rozdeliť do dvoch skupín: vysoko agresívne a nízko agresívne a tiež B- buncčné alebo T- buncčné NHLs. Najčastejším prejavom nízko agresívnych lymfomov je lymfadenopatia, splenomegália, menej často hepatomegália, systémové príznaky (horúčka, váhový úbytok, nočné potenie), infiltrácia kostnej drene s následnou cytopéniou, občasný vznik autoprotilátok proti erytrocytárnym a trombocytárnym antigénom a osteolytická deštrukcia skeletu. Prognóza a liečba závisí na štádiu a typu ochorenia (Adam, 2001).

Valbuena a kolektív sa snažili stanoviť intracelulárnu expresiu Hsp90 v rôznych typoch T- a B- buncčných NHLs vzhľadom k potenciálnym inhibítorm Hsp90. Hsp90 je vyjadrená na mnohých typoch NHLs, zahrňujúcich vysoko agresívne a nízko agresívne nádory, ale oveľa častejšie a silnejšie je vyjadrená na vysoko agresívnych nádoroch. Autori potvrdili, že selektívna inhibícia Hsp90 môže byť cieľom výskumu terapie u pacientov NHLs (Valbuena, 2005).

#### **V.5. Proteíny tepelného šoku a solídne nádory**

Proteíny tepelného šoku sú nadmerne vyjadrené v širokom spektre nádorov, sú zapojené do nekontrolovateľnej buncčnej proliferácie, diferenciácie, invázie, metastáz a sú rozpoznávané imunitným systémom. V niektorých tkanivách sú užitočnými biomarkermi karcinogenézy a signalizujú stupeň diferenciácie niektorých nádorov. Cirkulujúce hladiny Hsps a anti-Hsp protilátok môžu byť v diagnostike nádorov u pacientov s rakovinou veľmi užitočné. Navyše niektoré Hsps môžu byť zahrnuté v prognóze špecifických nádorov (Ciocca, 2005).

Zvýšená expresia Hsps v malígnych bunkách zohráva kľúčovú úlohu v ochrane proti spontánnej apoptóze asociovanej so zhubnými nádormi rovnako ako aj proti apoptóze vyvolanej terapiou mechanizmami, ktoré môžu podporovať úlohu Hsps v progresii nádorov a v rezistencii na liečbu (Nylandsted, 2000-1 a 2000-2; Ciocca, 2003; Gyrd-Hansen, 2004). Transkripcia Hsps si vyžaduje aktivovaný transkripčný faktor (HSF1), ktorý je nadmerne vyjadrený v nádoroch a hraje významnú úlohu v

invázii a v metastázach (Hoang, 2000; Wang, 2004).

Je pomerne dosť záhadné, prečo sú Hsps v nádoroch nadmerne vyjadrené. Jednou z hypotéz je, že patofyziologické vlastnosti mikroprostredia nádoru (nízka glukóza, pH a kyslík) inklinujú smerom k Hsp indukcii (Ciocca, 2005). Avšak, ak sú bunky prenesené z tkanivovej kultúry ako xenograft *in vivo*, Hsp expresia markantne poklesne. Keďže zvýšené hladiny Hsps asociovaných so zhubnými nádormi pretrvávali v prípade, že bunky rástli v tkanivovej kultúre, dá sa predpokladať, že môžu súvisieť s genetickými zmenami asociovanými s progresiou nádorov (Tang, 2005).

### V.5. 1. Úloha proteínov tepelného šoku v diagnostike nádorov

Expresia Hsps môže byť analyzovaná vo vzťahu k histopatologickým charakteristikám nádorového tkaniva (typ nádoru, stupeň diferenciácie), k expresii ďalších molekúl (mutovaný p53, estrogénové receptory) a k parametrom pacienta (pohlavie, vek). Keďže Hsps sú nadmerne vyjadrené v širokom spektre malígnych buniek, detekcia Hsps nie je vhodná v *diagnostickej imunopatológii*. V panely imunopatologických protilátok by mohlo byť užitočné použitie detekcie  $\alpha$ B crystalínu na identifikáciu karcinómov obličiek (Pinder, 1994).

Hsps indukované bunečným stresom sú vyjadrené na vysokých hladinách v širokom spektre nádorov a sú asociované so zlou prognózou a rezistenciou na terapiu. Zvýšená transkripcia Hsps v nádorových bunkách je spôsobená stratou funkcie p53 a vysokou expresiou proto-onkogénov Her2 a c- Myc (kóduje proteín, ktorý je kľúčový pre prechod T lymfocytov po stimulácii z fázy G0 do G1) a je kľúčová pre tumorigenézu. Hsps hrajú nepostrádateľné úlohy v raste nádorov, a to prostredníctvom podpory bunečnej proliferácie a pomocou inhibície dráh apoptózy (Calderwood, 2006).

Väčšina nádorov je tvorená postupnou progresiou buniek z transformovaného, ale minimálne pozmeneného stavu, ktorý môže rásť a vytvárať uzlíky alebo polypy (v solitérnych nádoroch) až ku stavu nadmerného bujnenia, ktorý je schopný neobmedzeného rastu, invázie okolitého tkaniva a úniku do cirkulácie a vytvorenie sekundárnych nádorov a metastáz. Práve progresia zahrňuje rôznorodé molekulárne a morfológické zmeny (Calderwood, 2006).

Hanahan a Weinberg (Hanahan, 2000) navrhli organizáciu týchto črt v bunečnej fyziológii do 6 základných zmien: 1.) sebestačnosť v rastových signáloch; 2.) necitlivosť k rastovej inhibícii; 3.) únik pred naprogramovanou bunečnou smrťou; 4.)

neobmedzený replikačný potenciál; 5.) udržiavaná angiogenéza; 6.) tkanivová invázia a metastázy. Výskyt týchto radikálnych zmien, najmä genetických, zmien vo fyziológii, je považované za prinajmenšom závislé na rozvíjajúcej sa nestabilite nádorového genómu (Fishel, 1993 a 1995).

V určitých tkanivách môžu hladiny Hsps naznačiť prítomnosť abnormálnych zmien počas procesu *karcinogenézy*. Napríklad, Hsp27 je nadmerne vyjadrený v hyperplastickom endometriu (proteín je ukazovateľom metaplázie plochých epitelových buniek krčku maternice – uterine cervix); Hsp10 a Hsp60 súvisia s procesom karcinogenézy krčku maternice a hrubého čreva; indukibilný Hsp70 je asociovaný s karcinogézou v ústnom epiteli a je markerom hepatocelulárneho karcinómu (Ciocca, 2005). V esofagiálnych karcinómoch je počas karcinogenézy končiacej v adenokarcinómoch pozorovaný pokles Hsp27, ale zvýšenie v priebehu karcinogenézy končiacej v karcinómoch plochých epitelových buniek. Hsps môžu byť použité ako biomarkery určitých nádorov.

V určitých tkanivách expresia Hsps koreluje so stupňom *diferenciácie*: Hsps asociované s vysokou diferenciáciou: Hsp27 a Hsp90 v endometriálnych karcinómoch; Hsp27 v karcinómoch dlaždicových buniek (krčku maternice, v ústnom epiteli) a Hsp27 ako marker keratinocytovej diferenciácie v koži (Jonak, 2006). Hsps asociované so zlou diferenciáciou nádorov: indukibilný Hsp70 u rakoviny pľúc, vaječníkov a ústneho epitelu; Grp78 v karcinómoch pľúc a Hsp27 v astrocytómoch. Hsp27 je tiež vyjadrený v rôznych stupňoch na normálnych slizniciach a na malígnych bunkách. Normálne, zdravé sliznice vykazujú nízku expresiu Hsp27, zatiaľ čo dobre diferencované karcinómy úst majú zvýšenú expresiu Hsp27 (Muzio, 2004). Mierne alebo horšie diferencované karcinómy majú redukovanú expresiu Hsp27 (Leonardi, 2002). Mese (2002) nenašiel žiadnu koreláciu medzi expresiou Hsp27 a histologickým stupňom. Tieto výsledky naznačujú, že expresia Hsp27 chráni bunky pred apoptózou počas zápalu, zatiaľ čo znížená regulácia v dysplázii môže oslabiť protektívny mechanizmus proti mutagenéze indukovanej environmentálnymi faktormi, a tak zväčšovať transformáciu orálnej epitelovej dysplázie do karcinómov dlaždicových buniek v ústach. Hsp70 súvisí nielen so zlou nádorovou diferenciáciou, ale tiež so zvýšením bunkovej proliferácie (pľúc, krčku maternice, pľúc), s metastázami lymfatických uzlín (pľúc, hrubého čreva), so zväčšením veľkosti nádoru (krček maternice) a s prítomnosťou mutagénnej p53 (pľúc, endometrium) (Ciocca, 2005).

Hsps sú hojne vyjadrené v ľudskej epidermis a sú spájané s funkciami v bunecnej diferenciácii a fotobiológii. Mnoho prác sa v súčasnosti zameriava na Hsp27 a Hsp72, ktoré sú konštitučne vyjadrené v ľudských keratinocytoch. Expresia Hsp27 v epidermálnych keratinocytoch *in situ* a v kultúre koreluje s diferenciáciou. Z tohto dôvodu je Hsp27 uvádzaný ako marker keratinocytovej diferenciácie v koži. Zmeny v expresii a v inducibilite Hsps sú spojené so starnutím. Malé proteíny tepelného šoku hrajú kľúčovú úlohu v ochrane buniek proti starnutiu (Hsu, 2003). Súčasný údaje naznačujú, že expresia Hsp72 v koži pozoruhodne zostáva stabilná so starnutím na rozdiel od hladín Hsp27, ktoré sú zvýšené u vekovo- staršej kože a naznačujú spojenie medzi expresiou Hsp27 a vekom- závislými epidermálnymi zmenami. Regulácia Hsps môže byť modifikovaná farmakologickými zásahmi (Jonak, 2006).

Koža je jeden z orgánov obsahujúcich v dospelosti a počas embryonálneho vývoja vysoké hladiny Hsp27. V smere od dermis je epidermis zložená z piatich vrstiev buniek produkujúcich keratín (keratinocyty): *stratum basale* (bazálna vrstva), *stratum spinosum*, *stratum granulosum*, *stratum lucidum* a *stratum corneum*. Stupeň diferenciácie sa zvyšuje od spodnej membrány k vonkajšej. Expresia Hsp27 koreluje s keratinocytovou diferenciáciou a zvyšuje sa z bazálnej vrstvy na stratum granulosum (Traudinger, 1995). Charakter syntézy Hsp27 v maturovanej i vo vyvíjajúcej sa koži u ľudí bol popísaný Traudingerom (1995) a Jantschitschom (1998) a naznačuje, že tieto malé proteíny tepelného šoku sú zahrnuté v konečnej diferenciácii (Duverger, 2005). Hsp27 bol detegovaný v ľudskej epidermis od 14. týždňa gestácie, kde sa epitel skladá z bazálnej vrstvy, prostrednej vrstvy a z peridermu (počas embryonálneho vývoja je epidermis tvorená z ektodermy a je zložená z jednej bunecnej vrstvy (Byrne, 2002). Tento jednoduchý epitel vytvára druhú vrstvu – periderm, ktorá je degradovaná na konci gestácie). V tomto štádiu, Hsp27 bol obmedzený na periderm. Po úvodnej keratinizácii bol Hsp27 produkovaný v suprabazálnych vrstvách epidermis.

Ako i v ostatných skúmaných tkanivách, expresia Hsps na ľudskej koži je stimulovaná za stresových podmienok. Na rozdiel od ostatných buniek, keratinocyty vykazujú signifikantnú expresiu Hsp72 i bez predchádzajúceho stresu (Traudinger, 1993). Hsp72 je vyjadrený na všetkých vrstvách epidermis zahrňujúce vlasové folikuly a potné žľazy. Melanocyty, fibroblasty a ďalšie (epi)dermálne bunky sú negatívne na Hsp72 v imunohistochemickom farbení. Tepelný šok *ex vivo* a *in vitro* vedie k "superindukcii" Hsp72 v keratinocytoch a k *de novo* expresii v dermálnych bunkách.

Hoci Hsp27 bol popísaný ako proteín, ktorý má významnú úlohu v termoregulácii, tieto výsledky podporujú hypotézu, že v epidermis je Hsp27 zahrnutý najmä do regulácie bunecného rastu, diferenciácie a tumorigenicity (Welsh, 1998).

Určité Hsps môžu byť signifikantne asociované s ďalšími molekulami. Napr. Hsp27 je asociovaný s estrogenovým receptorom ER $\alpha$  v karcinómoch prs u žien a s endometriálnymi karcinómami, ale tento proteín nie je asociovaný s týmto receptorom v karcinómoch prs u mužov, cervikálnymi a hepatocelulárnymi karcinómami (Ciocca, 2005). Hsp70 bol popísaný ako dôležitá molekula v spájaní a v migrácii steroidných receptorov a v rakovine prs môže byť asociovaný s ER $\alpha$  (Takahashi, 1994- 2). Navyše, Hsp70 môže byť asociovaný s mutantným p53 v rakovinových bunecných líniách (Lehmann, 1991).

## V.5. 2. Úloha proteínov tepelného šoku v prognóze solídnych nádorov

Určenie prognózy jednotlivých nádorov je v klinike veľmi dôležité z dôvodu individualizácie liečby, plánovania vyšetrení a informovania pacientov. Zvýšená terapia cytotoxickými liekmi môže byť zrušená u pacientov s dobrou prognózou a naopak.

Zvýšená expresia **Hsp27** je asociovaná so **zlou prognózou** u rakoviny prs, ale aj u karcinómov vaječníkov, žalúdka, pečene, prostaty a osteosarkómov (Ciocca, 2005). Čiastočne to môže byť spôsobené pôsobením Hsp27 na cytoskelet. Tento proteín má významnú úlohu v regulácii činnosti metaloproteinázy (MMP-2) v matrice u buniek rakoviny prostaty (Xu, 2006). Na druhej strane, zvýšená expresia Hsp27 je asociovaná s **dobrou prognózou** v endometriálnych adenokarcinómoch a u rakoviny pažeráku (Ciocca, 2005). Fortin (2001) zistil, že zvýšená expresia Hsp27 je asociovaná s dobrou prognózou u orofaryngeálnych karcinómov a Kawanishi (1999) popísal rovnaké výsledky pre ezogafagiálne karcinómy. Mese a Muzio oznámili, že zvýšená expresia Hsp27 u karcinómov dlaždicových buniek v ústach (Mese, 2002; Muzio, 2004) je asociovaná s dobrou prognózou. Hsp27 nemá prognostický význam v nádoroch močového mechúra a obličiek.

Zvýšená expresia inducibilnej **Hsp70** koreluje so **zlou prognózou** u pacientov s rakovinou prs, krčku maternice, endometria, čo je zhodné s asociáciou Hsp70 so zlou diferenciáciou nádorov, s metastázami do lymfatických uzlín, so zvýšením bunecnej proliferácie a s blokovaním apoptózy (Ciocca, 2005). Vysoká expresia Hsp70 koreluje s **dobrou prognózou** u rakoviny pažeráku, pankreasu, obličiek a melanómov. Expresia



Hsp70 neukázala žiaden vzťah s prognózou u rakoviny vaječníkov, ústnej dutiny, žalúdka a prostaty (Ciocca, 2005).

Vysoká expresia **Hsp90** a prítomnosť autoprotiátok proti Hsp90 koreluje so **zlou prognózou** u rakoviny pľs. Zvýšená expresia Hsp90 je asociovaná s **dobrou prognózou** u rakoviny endometria. Hsp90 nemá prognostický význam u rakoviny vaječníkov a ústnej dutiny (Ciocca, 2005). Pri porovnaní chorého tkaniva s normálnym okolitým materiálom existujú presvedčivé dôkazy, že Hsp90 v kontexte s karcinómom existuje v „hyperaktívnom stave“ (Kamal, 2003). V tomto vysoko aktívnom stave, Hsp90 môže teoreticky ovplyvňovať kľúčové vzťahy, čo môže prispievať k patogenéze ochorenia. Na základe jedinečnosti N-terminálneho nukleotidového miesta, rozdielov v biologickej aktivite medzi nádorovým a normálnym tkanivom a názorov, že Hsp90 stabilizuje kľúčové onkogénne proteíny, Hsp90 slúži ako excelentný cieľ pre terapeuticky zásah (Bagatell, 2004; Kamal, 2004; Workman, 2004).

### **V.5.3. Úloha proteínov tepelného šoku v predikcii odpovede na protinádorovú liečbu**

Zvýšená expresia Hsps môže tiež predikovať odpoveď na niektorú protinádorovú terapiu. Napríklad u pacientov s pokročilým štádiom rakoviny pľs, ktorí podstúpili chemoterapeutickú liečbu, zvýšená expresia Hsp27 korelovala s krátkym obdobím bez príznakov ochorenia. Úloha expresie Hsp27 v rezistencii na chemoterapiu bola pozorovaná u rakoviny vaječníkov a pažeráku. Hsp27 nemá význam v predikcii na chemoterapiu u rektálnych nádorov, u malígnych histiocytomov a u nádorov CNS. Nádory mozgu sú rezistentné na rádiochemoterapiu a u týchto nádorov je pozorovaná vysoká expresia Hsp27, ako aj ďalších proteínov tepelného šoku (Ciocca, 2005).

Hsp70 sú zahrnuté v rezistencii na chemoterapiu u rakoviny pľs. Navyše vysoké hladiny Hsp70 predikujú nízku odpoveď na rádiáciu a hypertermiu (Ciocca, 2005).

Význam Hsps v progresii nádoru a v odpovedi na terapiu vedie k ich úspešnej aplikácii v terapii prostredníctvom dvoch hlavných stratégií: 1.) farmakologická modifikácia expresie Hsp alebo molekulárnej chaperonovej aktivity; 2.) použitie Hsps v protinádorových vakcínach, využívajúcich ich schopnosť pôsobiť ako imunologické adjuvants.

## **VI. Proteíny tepelného šoku a ich potenciálny terapeutický význam**

Existuje mnoho prác, v ktorých proteíny tepelného šoku môžu mať terapeutický význam. Mnoho štúdií skúmalo ich schopnosť regulovať zápalové odpovede v autoimunitných ochoreniach alebo ich schopnosť indukovať peptid-špecifické imunitné odpovede proti nádorom a patogénnym organizmom.

### **VI.1. Úloha proteínov tepelného šoku vo vývoji vakcín proti infekčným ochoreniam**

Pri vývoji vakcín proti infekčným ochoreniam môžu mať Hsps dvojakú úlohu: Hsps odvodené od patogénov sa môžu využívať buď ako vakcínové antigény alebo ako adjuvants. Vzhľadom na to, že Hsps môžu byť v imunitnej odpovedi proti patogénnom cieľmi, slúžia ako antigény pre rozvoj vakcín (Zügel, 1999-2). Keďže Hsps stimulujú prirodzené a antigén-špecifické dráhy, môžu byť pre široké spektrum patogénov sľubnými vakcínovými adjuvants. Patogény s dlhotrvajúcou intracelulárnou perzistenciou (mykobaktérie a niektoré vírusy) sú terčom pre vakcíny, ktoré sú zamerané na rozšírenie bunečnej imunity (Cassadevall, 2003). Vakcíny obsahujúce Hsps si vyberajú za cieľ rozmanité prirodzené i antigénmi-poháňané dráhy a tento prístup je atraktívny ako pre intracelulárne tak i extracelulárne patogény (Segal, 2006).

Hostiteľská obrana proti mykobaktériám závisí na bunečnej imunitě. Napríklad tuberkulóza je zodpovedná za 2 milióny úmrtí ročne, kde veľké percento pripadá na HIV pozitívnych ľudí. Proti tuberkulóze sa očkuje BCG vakcínou (Bacille Calmette-Guérin), ktorá obsahuje atenuovaný živý bacilus tuberkulosis, *Mycobacterium bovis*. V súčasnosti sa pomerne často diskutuje o používaní BCG vakcín, ktoré majú odlišné výsledky v klinických experimentoch, pričom sa zdôrazňuje potreba viac efektívnych vakcín a viac spoľahlivých imunologických náhrad (napr. používanie nových adjuvants a DNA vakcinácia).

V niekoľkých modeloch experimentálnej tuberkulózy sú veľmi efektívne vakcíny založené na Hsps. Vakcinácia BCG peptidmi v komplexe s Hsps indukovala Th1 odpoveď a mala protektívny účinok v modely pľúcnej tuberkulózy u myší (Colaco,

2004). DNA vakcinácia založená na géne *Mycobacterium leprae* Hsp65 má obojakú ochranu, ako profylaxia a terapia v myšom modeli tuberkulózy (Bonato, 2004). DNA vektory obsahujúce *Mycobacterium tuberculosis* alanín- prolín- bohatý antigén (Apa), mykobakteriálne antigény Hsp65 a Hsp70 kombinované s BCG, navodili masívnu imunitu a potvrdili väčšiu protekciu než samotný BCG v tuberkulóze u C57BL/6 a BALB/c myši (Ferraz, 2004). DNA vakcína obsahujúca *Mycobacterium tuberculosis* Hsp65 a IL-12 mala protektívnu úlohu v modeli opičej tuberkulózy (Kita, 2005).

Hsps v komplexe s vírovými antigénmi môžu zvyšovať protiinfekčnú imunitu (zahŕňujúcu aktivitu NK buniek, cytotoxickú reakciu závislú na protilátkach a CTL aktivitu; Brenner, 2001). Masívne CD4<sup>+</sup> a CD8<sup>+</sup> T- bunečné odpovede sú považované za dôležité imunitné zložky kontroly HIV infekcie; príprava a expandovanie týchto odpovedí je pravdepodobne kritické pre rozvoj efektívnych HIV vakcín. Gp96 v komplexe s HIV-1 Gag-p24 peptidom je vhodný k indukovaniu efektívnej CTL pamäte, za súčasného poskytnutia CD4<sup>+</sup> T- bunečnej pomoci (SenGupta, 2004). Gag-p24 je kapsidový proteín. Bogers použil novú vakcínovú stratégiu, v ktorej Hsp70 bol kovalentne spojený s CCR5 peptidmi, s HIV gp120 (ľudský HIV-1 glykoproteín) a SIV (opičí imunodeficientný vírus) p27 kapsidovým proteínom. Imunizácia makaka týmto komplexom viedla k indukcii C – C chemokínov a protilátok, ktoré blokujú CCR5 (Bogers, 2004). HIV- 1 je schopný infikovať bunky, ktoré exprimujú molekuly CD4 a ako ko-receptory pre vstup vírusu HIV-1 slúžia receptory pre chemokíny. V počiatočných štádiách infekcie vírusom HIV-1 zohráva kľúčovú úlohu ko-receptor CCR5 (receptor pre chemokíny CCL3, CCL4 a CCL5), pretože pohlavnou cestou prenosu, ktorou začína väčšina infekcií, sú prenášané kmene HIV-1 s tropizmom pre makrofágy. Gén pre CCR5 je lokalizovaný na krátkom ramene chromozómu 3, medzi skupinou génov, ktoré kódujú rozmanité chemokínové receptory. Znalosť úlohy chemokínových receptorov pre infekciu HIV-1 umožňuje vysvetliť situácie, kedy určitý počet ľudí, ktorí boli masívne exponovaní HIV infekciou, nejavia laboratórne známky infekcie HIV-1. Tieto osoby majú deléciu 32 nukleotidových báz v géne pre receptor CCR5 (CCR5 $\Delta$ 32). Táto delécia spôsobí, že vzniká proteínový reťazec receptoru CCR5, ktorý zostane v cytoplazme a nie je exportovaný na povrch leukocytov. Na makrofágoch týchto osôb sa teda nenachádza kľúčový ko-receptor pre vstup HIV-1 a infekcia sa neuskutoční. Delécia sa vyskytuje iba u kaukazskej populácie (Krejsek, 2004).

## VI.2. Úloha proteínov tepelného šoku v protinádorovej terapii

Použitie Hsps v protinádorovej terapii môže byť dvojaké: Hsps alebo HSFs môžu byť cieľom liečiv (napr. lieky blokujúce Hsp90; Necker, 2003-1) alebo zvýšené hladiny Hsps môžu poskytovať lákavý cieľ pre imunoterapeutické protokoly, pretože sú schopné dohliadať na nádorové antigény a vystupujú ako biologické adjuvants, ktoré prelomujú toleranciu nádorových antigénov a vyvolávajú imunitné poškodenie cytotoxickými CTL a regresiu tumoru (Arnold-Schild, 1999; Manjili, 2002; Srivastava, 2002; Castelli, 2004; Daniels, 2004).

Pre prežitie niektorých nádorov je nevyhnutná konštitučne vysoká expresia Hsps. Neutralizácia Hsps je preto lákavou stratégiou protinádorovej terapie. Doposiaľ sú pre klinické testovanie prístupné iba inhibítory Hsp90. To je prípad antibiotika **Geldanamycínu** (benzoquinone ansamycin, GA) – prirodzene sa vyskytujúceho liečiva produkovaného mikroorganizmami a jeho menej toxického analógu **17-AAG** (17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin; Chiosis, 2003). Benzoquinoidové ansamycínové antibiotiká prvýkrát izolované z aktinomycety, *Streptomyces hygroscopicus var. geldanus var. nova* (DeBoer, 1970) zahrňujú **Geldanamycín** a jeho semi- syntetické deriváty, **17-AAG** a viac vo vode rozpustný **17- DMAG** (17-dimethylaminoethylkamino- 17- demethoxygeldanamycin. Tieto malé molekuly inhibujúce chaperonovú funkciu aktuálne podstupujú I. a II. fázu klinických experimentov (Banerji, 2005; Necker, 2005).

Mechanizmus funkcie Hsp90 bol popísaný v kapitole II. Geldanamycín patrí do skupiny liečiv schopných ovplyvňovať rozmanité ciele v signálnej dráhe zahrňujúce proliferáciu a prežitie. Cieľom týchto liečiv je nukleotidové väzbové miesto v N-terminálnej doméne Hsp90, rovnaké ako ATP- väzbové miesto, čo spôsobuje inhibíciu väzby Hsp90 na proteíny (Workman, 2002). Väzba GA vyvoláva konformačnú zmenu z ATP na ADP väzbovej konformácie Hsp90. Inhibícia funkcie Hsp90 má za následok disociáciu proteínov ako sú HER2, Raf, mutovaný p53, CDK4, Src, Akt, NFκB (Goetz, 2003; Neckers, 2002; Workman, 2003) vedúce k ich degradácii. Väzba GA a jeho analógov na Hsp90 tiež indukuje stresovú odpoveď, ktorá je manifestovaná čiastočne zvýšením hladín ko-chaperonov a ďalších stresových proteínov, napr. Hsp70 (Whitesell, 2003). 17-AAG reprezentuje skupinu liekov schopných ovplyvňovať rozmanité proteíny v signálnych transdukčných dráhach zahrnutých v proliferácii nádorov.

Farmakologické cielenie Hsp90 so špecifickými chemickými inhibítormi vedie k

degradácii proteínov a k inhibícii nádorového rastu pozastavením G1 a k aktivácii apoptózy (Caldewood, 2006; Workmann, 2004). Skutočnosť, že Geldanamycín a 17-AAG selektívne zabíjajú nádorové bunky, môže byť zdôvodnená len za predpokladu, že nádorové bunky, v porovnaní so zdravými, vykazujú stresovaný fenotyp so zvýšenou závislosťou na cytoprotektívnej činnosti Hsp90.

Nádorová špecifita inhibítorov Hsp90 je zabezpečená neobvyklým mechanizmom (Kamal, 2003). V malígnych bunkách, Hsp90 vytvára multichaperonové komplexy s vysokou ATP-ázovou aktivitou, zatiaľ čo v normálnych tkanivách je prezentovaná v nezloženom, latentnom stave (Neekers, 2003-2; Kamal, 2003). 17-AAG sa viaže na nádorovo-špecifickú multichaperonovú formu Hsp90 so 100-násobne vyššou afinitou než na latentnú formu Hsp90 (Kamal, 2003) a zvyšuje možnosť, že Hsp90 funguje ako nádorovo-selektívny katalyzátor konvertujúci geldanamycínové deriváty na ich aktívne konformácie (Lee, 2004). Inhibítory Hsp90 sú nepriamo namierené na rôzne proteíny potrebné pre malígy bunecný rast a v experimentoch ukazujú značný prísľub (Workmann, 2004; Banderji, 2005). Aj keď sú toxické, toxicita 17-AAG je regulovateľná (Ciocca, 2005). Oba, Geldanamycín a 17-AAG môžu byť metabolizované prostredníctvom NADH chinónovej oxidoreduktázy I, ktorá umocňuje protinádorovú aktivitu stabilizovaním tumor supresorového proteínu p53. NADH chinónová oxidoreduktáza I môže byť dôležitým faktorom, ktorý tiež prispieva k vysvetleniu, prečo inhibítory Hsp90 nie sú spravidla toxické pre pacientov, ako by sme očakávali z pleiotropických úloh Hsp90 inhibovaných nimi. (Vilenchik, 2004).

Kombinácia terapií používajúcich nízku dávku inhibítorov Hsp90 spolu s tradičnou chemoterapeutickou liečbou zdá sa byť efektívna v rôznych nádoroch. Napríklad, v prípade Bcr-Abl vyjadrených leukémií, nízka dávka Geldanamycínu je vhodná na senzitivizovanie týchto buniek k apoptóze v prítomnosti neúčinnnej koncentrácie doxorubicínu (Blagosklonny, 2001). Ďalšou možnosťou je kombinácia 17-AAG s angiogénnymi inhibítormi, kde bola zistená vysoká úspešnosť u nádorov pŕs (de Candia, 2003).

Pacienti s pokročilými malignitami (melanómy, sarkómy, karcinómy pŕs, hrubého čreva, vaječníkov a obličiek), kde tradičná liečba bola neúspešná, boli v prvej fáze klinických pokusoch liečení 17-AAG. Hladina podávanej dávky, pri ktorej má 17-AAG ešte znesiteľnú toxicitu bola stanovená na 450 mg/m<sup>2</sup>/týždeň. U niektorých pacientov 17-AAG stabilizoval ochorenie, zvýšil apoptózu a znížil proliferáciu nádorov, ale s menšou účinnosťou než je u rádioterapie alebo chemoterapie (Banerji, 2005). V ďalšej

práci Goetz (2005) skúmal toxicitu a maximum tolerovanej dávky (MTD) 17-AAG, ktorý bol podávaný v týždenných infúziách (v dňoch 1, 8, 15, 28 – dňového cyklu) u pacientov s pokročilými solídnymi nádormi. Maximum tolerovanej dávky bolo stanovené na 308 mg/m<sup>2</sup>/týždeň. Pečeňová toxicita pri MTD nebola pozorovaná. U pacienta s hepatómom pri dávke 431 mg/m<sup>2</sup>/týždeň (dávka limitujúca toxicitu) bolo pozorované prechodné zvýšenie AST a bilirubínu a u ďalšieho pacienta prítomnosť nauzei, anorexie a dehydratácie.

Inhibítory Hsp90 sú jedinečné v tom, že i keď sú namierené smerom k špecifickému molekulárnemu cieľu, súčasne inhibujú rôznorodé signálne dráhy. Prostredníctvom inhibície uzlových bodov v rôznorodých prekrývajúcich sa dráhach využívaných nádorovými bunkami, kombinácia inhibítorov Hsp90 so štandardnými chemoterapeutickými agensmi môže dramaticky *in vivo* zvýšiť účinnosť štandardných agensov. Inhibítory Hsp90 môžu obísť charakteristickú genetickú plasticitu, ktorá umožňuje nádorovým bunkám eventuálne obchádzať toxické efekty mnohých molekulárne cielených agensov. Pretože inhibítory Hsp90 tiež indukujú HSF-1 – závislú expresiu Hsp70 a tiež pretože určité mutované proteíny asociované s Hsp90 sú neurotoxické, tieto liečivá vykazujú zlepšujúce vlastnosti u niektorých neurodegeneratívnych modeloch ochorenia, čo poukazuje na novú úlohu pre inhibítory Hsp90 v liečbe rôznorodých patológií zahŕňajúcich neurodegenerácie (Neckers, 2007).

Hsp27, Hsp70 a grp78 sú tiež cieľmi protinádorovej terapie, avšak tieto prístupy sú v preklinických štádiách.

### VI.2.1. Využitie proteínov tepelného šoku ako nosičov/adjuvants

Mnoho imunoterapeutických protinádorových prístupov, založených na Hsps, využíva ich nosičovú funkciu (Suto, 1995; Janetzki, 2000). Peptidové komplexy Hsp70 a gp96 purifikované z nádorov pacientov sú používané ako vakcíny na liečbu a prevenciu rakoviny, na rozdiel od Hsps získaných z normálneho tkaniva, ktoré neindukujú protinádorovú imunitnú odpoveď. V prípade, že sú aplikované ako terapeutické vakcíny, Hsps interagujú s receptormi na profesionálnych APC (makrofágy, dendritické bunky). Tieto bunky predkladajú nádorové antigény na pozadí MHC I. a II. triedy, indukujú špecifickú cytotoxickú a pomocnú T lymfocytovú odpoveď a produkciu pro- zápalových cytokínov (Srivastava, 1998).

Ďalším prístupom je použitie rekombinantných Hsps s onkoproteínmi, ako je

## Proteíny tepelného šoku a ich potenciálny terapeutický význam

Her2/neu alebo proteínov z onkogénnych vírusov, ako E7 HPV (Human papillomavirus). Nádorovo- odvođené auto- vakcíny, založené na Hsps alebo rekombinantných Hsp fúzných proteínov, indukujú cytokíny a kostimulačné molekuly s aktiváciou CD8+ a CD4+ T buniek a NK buniek, ktoré zabíjajú nádorové bunky (Rivoltini, 2003). Tieto vakcíny prejavujú minimálnu toxicitu.

### VI.2.1.1. TKD

Hsp70- odvođený peptid (TKD) bol skúmaný pre možné využitie v liečbe Hsp70- membránovo pozitívnych nádorov. Membránovo- viazaná Hsp70 slúži ako nádorovo- selektívna cieľová štruktúra, pretože Hsp70 je často prezentovaný na plazmatickej membráne nádorových buniek, ale nie na normálnych tkanivách. Hsp70- odvođený peptid (TKD, aa 450 - 463) bol schopný stimulovať *in vitro* cytotoxickú a proliferačnú aktivitu NK buniek, podobne ako celý proteín Hsp70 (Multhoff, 2001). Inkubácia periférnych krvných lymfocytov s TKD peptidom a nízkou dávkou IL-2 spúšťa cytotoxickú a migračnú kapacitu NK buniek voči Hsp70- membránovo pozitívnym nádorovým bunkám *in vitro* (Schmitt, 2007).

Na základe týchto povzbudivých výsledkov bola prvá fáza klinických pokusov prevedená u pacientov s metastázujúcimi kolorektálnymi a pľúcnymi nádormi rezistentnými na terapiu. *Ex vivo* stimulovaný IL-2/TKD leukaferézny produkt bol intravenózne aplikovaný späť pacientovi. Terapia bola bezpečná a nemala žiadne vedľajšie účinky. Desať z dvanástich pacientov ukázalo signifikantné imunologické odpovede zahŕňajúce zvýšenú cytotoxickú aktivitu proti Hsp70- membránovo pozitívnym nádorom a zvýšenie v bunečnej povrchovej denzite aktivačných receptorov NK buniek (lektínový receptor C- typu, CD94). Tieto výsledky sú veľmi prekvapivé, vzhľadom na to, že všetci pacienti mali v priebehu poslednej chemoterapie progresívne nádorové ochorenie (Kraus, 2004).

### **VI.3. Úloha proteínov tepelného šoku vo vývoji vakcín proti autoimunitným ochoreniam**

#### **VI.3.1. RA a dna P1**

V prvej fáze štúdia bol orálne podávaný peptid odvodený z *E. coli* ko-chaperonu dnaJ (Hsp40), dnaJP1 (QKRAAYDQYGHAAFE), zdieľajúci sekvenčnú homológiu so zdieľaným epitopom medzi RA- asociovanými alelami HLA systému. Pacienti s aktívnou RA boli podľa množstva podávanej dávky rozdelení do troch skupín (0.25; 2.5 a 25 mg denne). Analýza antigénnej odpovede ukázala, že i napriek tomu, že po liečbe neboli pozorované celkové zmeny v počte antigén- špecifických buniek, bolo pozorované signifikantné zvýšenie T- buniek produkujúcich IL-4 a IL-10 a zníženie INF- $\gamma$  a TNF- $\alpha$  (Prakken, 2004). Tieto výsledky odrážajú indukciu regulačných T buniek.

#### **VI.3.2. Diabetes mellitus I. typu a diapep277**

Čerstvo diagnostikovým pacientom s DM I. typu bol subkutánne podávaný 1 mg peptidu diapep277 (na začiatku štúdia, 1 mesiac a 6 mesiacov). Tento peptid obsahuje sekvenciu 437 – 460 ľudského proteínu Hsp60. Po 10 mesiacoch u pacientov v liečenej skupine T- bunky produkovali viac IL-10 a IL-13 a ukazovali moduláciu smerom k T<sub>H</sub>2- regulačnému fenotypu (Raz, 2001).



## VII. Ciele práce

Predchádzajúca teoretická časť tejto dizertačnej práce obsahuje súčasný pohľad na postavenie a význam proteínov tepelného šoku, ktoré môžu byť zahrnuté v infekčnej etiológii a patogenéze rôznych autoimunitných a malígnych ochorení.

Hsps majú dvojitú funkciu v závislosti na ich intracelulárnej alebo extracelulárnej lokalizácii. Intracelulárne Hsps majú protektívnu funkciu a umožňujú bunkám prežiť letálne podmienky. Na druhej strane, extracelulárne lokalizované alebo membránovo-viazané Hsps môžu mať dôležitú úlohu v imunoregulácii.

Účasť Hsps v patogenéze autoimunitných ochorení (RA/JIA), ako aj v komplikáciách vyskytujúcich sa po transplantácii hematopoetických kmeňových/progenitorových buniek (GvHD, závažné infekcie) nie je úplne zrejmá.

Problematiku, ktorá je riešená v tejto dizertačnej práci, môžeme zhrnúť do troch bodov.

- 1.) **Skúmanie humorálnej odpovede proti proteínom tepelného šoku (rh Hsp60, *M. bovis* Hsp65 a rh Hsp70) u detských pacientov vo vzťahu ku komplikáciám po alogénnej transplantácii hematopoetických kmeňových/progenitorových buniek (HSCT)**
  
- 2.) **Skúmanie humorálnej odpovede proti proteínom tepelného šoku (rh Hsp60, *M. bovis* Hsp65 a rh Hsp70) u pacientov s juvenilnou idiopatickou artritídou (JIA)**

Skrížená reaktivita medzi mikrobiálnymi a ľudskými proteínmi tepelného šoku vedie k návrhu, že Hsps môžu byť zapojené v patogenéze autoimunitných chorôb. Pomocou dvoch metód (Western blotting – WB a Enzyme-linked Immunosorbent Assay - ELISA) sme detegovali hladiny protilátok anti-Hsp60, anti-Hsp65 a anti-Hsp70 u pacientov s JIA a rovnako aj u detských pacientov indikovaných k alogénnej transplantácii hematopoetických kmeňových/progenitorových buniek. U týchto pacientov sme monitorovali hladiny anti- Hsp protilátok pred transplantáciou, v priebehu a po transplantácii a vo vzťahu k jednotlivým komplikáciám. Zamerali sme sa najmä na akútnu GvHD a závažné infekcie.

## Ciele práce

U JIA pacientov sme študovali vzťah medzi hladinami anti- Hsp protilátok a prítomnosťou reumatoidného faktora (RF), antinukleárných protilátok (ANA), HLA B27 a dĺžkou ochorenia. Rovnako sme u pacientov s JIA skúmali hladiny protilátok proti *M. bovis* Hsp65 a syntetickému peptidu odvodeného od *M. bovis* Hsp65 (P180-188).

### **3.) Štúdium membránovej expresie inducibilnej formy Hsp70 na synoviálnych bunkách získaných od pacientov s reumatoidnou artritídou a juvenilnou idiopatickou artritídou**

Pomocou prietokovej cytometrie (FACS) sme pre štúdium membránovej expresie inducibilnej formy Hsp70 analyzovali fibroblast-like synoviálne bunky získané zo synoviálnych tkanív RA/JIA pacientov.

Ďalej sme skúmali expresiu receptorov proteínov tepelného šoku: TLR2, TLR4, CD14, CD36, CD40 a CD91. Ako negatívnu kontrolu sme použili autológne kožné fibroblasty získané z operačnej rany.

## VIII. Výsledky a diskusia

### VIII.1. Skúmanie humorálnej odpovede proti proteínom tepelného šoku (rh Hsp60, *M. bovis* Hsp65 a rh Hsp70) u detských pacientov vo vzťahu ku komplikáciám po alogénnej transplantácii hematopoetických kmeňových/progenitorových buniek (HSCT)

Alogénna transplantácia buniek krvotvorby sa používa predovšetkým k liečbe malígnych ochorení (Vaňásek, 1996). Najčastejšími indikáciami sú akútne leukémie: AML a ALL; chronické leukémie: CML a CLL; lymfomy: Hodgkinová choroba, Non-hodgkinský lymfom (NHL); MDS. Transplantácia kmeňových hematopoetických buniek je indikovaná i u nemalígnych chorôb spojených s útlmom krvotvorby či s defektmi štruktúry a syntézy hemoglobínu, u vrodených imunodeficiencií a dedičných porúch metabolizmu.

Hlavnou komplikáciou po alogénnej transplantácii hematopoetických kmeňových buniek (HSCT) je reakcia štepu proti hostiteľovi (GvHD). Príčinou tejto komplikácie je buď neúplná zhoda v HLA- systéme darcu a príjemcu alebo nezhoda v antigénoch, ktoré nie sú kódované hlavným systémom histokompatibility.

#### VIII.1.1. Porovnanie senzitivity a špecificity Western blottingu a ELISA v detekcii protilátok proti proteínom tepelného šoku rh Hsp60, *M. bovis* Hsp65 a inducibilnej formy rh Hsp70

*(Publikované: Nguyen TTH, Zlacka D, Vavrincova P, Sedlacek P, Hromadnikova I. Detection of antibodies against 60-, 65- and 70-kDa heat shock proteins in paediatric patients with various disorder using Western blotting and ELISA. Clin Chem Lab Med 2006; 44: 44 – 9.)*

Simultánne dvoma metódami (WB, ELISA) sme detegovali hladiny IgG protilátok proti proteínom tepelného šoku v sérach pacientov s juvenilnou idiopatickou artritídou (JIA), pediatrických pacientov indikovaných k alogénnej HSCT a zdravých kontrol. U pediatrických pacientov sme detegovali hladiny protilátok pred zahájením, v priebehu a po prípravnom režime, ako aj v celom období po transplantácii.

## Výsledky a diskusia

Pomocou WB s využitím klasickej SDS-PAGE elektroforézy (sodium dodecylsulphate polyacrylamide gel electrophoresis) sme vo všetkých testovaných sérach detegovali hladiny anti-Hsp60 a anti-Hsp65 protilátok, ale pri detekcii anti-Hsp70 protilátok sme boli neúspešní. Všetky testované séra boli vybrané na základe vysokých hodnôt optickej denzity. Pravdepodobne chemikálie používané v SDS-PAGE elektroforéze ( $\beta$ -merkaptóetanol, sodium dodecylsulphate) majú vplyv na proteín Hsp70. Pri WB s využitím natívnej PAGE elektroforézy si proteíny udržiavajú svoju štruktúru. Táto metóda gélovej elektroforézy umožňuje separovať natívne proteíny na základe ich rozdielnej molekulovej hmotnosti a náboja.

Na základe týchto skutočností sme natívnou PAGE opätovne detegovali hladiny anti-Hsp protilátok. Protilátky proti proteínom tepelného šoku Hsp60, Hsp65 boli detegovateľné oboma metódami, avšak protilátky proti Hsp70 boli prítomné iba v jednom prípade u pacienta s JIA.

Na záver môžeme zhrnúť, že WB s SDS-PAGE/natívnou PAGE je vhodná na detekciu prítomnosti protilátok proti proteínom tepelného šoku *rh* Hsp60, *M. bovis* Hsp65, ale nie je dostatočne senzitívna na detekciu protilátok proti inducibilnej forme *rh* Hsp70. ELISA detegovala prítomnosť protilátok proti všetkým proteínom tepelného šoku, a preto bola použitá v nasledujúcich štúdiách.

### **VIII.1.2. Protilátky proti proteínom tepelného šoku Hsp60, 65 a 70 sú prítomné pred, v priebehu prípravného režimu i v celom období po transplantácii hematopoetických kmeňových/progenitorových buniek**

(Publikované: **Zlacka D**, Sedlacek P, Prucha M, Hromadnikova I. *Antibodies to 60, 65 and 70 kDa heat shock proteins in pediatric allogeneic stem cell transplant recipients. Pediatr Transplantation* 2006; 10: 794 – 804.)

(a: Nguyen TTH, **Zlacka D**, Vavrincova P, Sedlacek P, Hromadnikova I. *Detection of antibodies against 60-, 65- and 70-kDa heat shock proteins in paediatric patients with various disorder using Western blotting and ELISA. Clin Chem Lab Med* 2006; 44: 44 – 9.)

ELISA je kvantitatívna metóda, ktorá sa používa na detekciu antigénov alebo protilátok v kvapalných vzorkách. Pomocou tejto metódy sme v sérach pacientov detegovali hladiny protilátok [celkového imunoglobulínu a v jednotlivých triedach (IgG a IgM)] proti rekombinantnému ľudskému (rh) Hsp60, *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*) Hsp65 a rekombinantnej inducibilnej forme Hsp70. Assay bola vyvinutá za použitia špecifických monoklonálnych a polyklonálnych protilátok proti týmto proteínom tepelného šoku a sér s vysokou pozitivitou na proteíny tepelného šoku od pacientov s akútnou infekciou (sepsou) spôsobenou *Toxoplasma gondii*, *Borrelia burgdorferi* a *Klebsiella pneumoniae*. Absorbancia OD (Optical density) všetkých týchto pozitívnych kontrol bola vyššia než 1.00.

Pozadie assay (hodnoty optických denzit získané z jamiek s naviazaným proteínom tepelného šoku, v ktorých boli komerčné protilátky a/alebo patientske séra nahradené 1% BSA/PBST) dosahovalo hodnôt OD do 0.05. Hodnoty optických denzit negatívnych kontrol (monoklonálne a polyklonálne protilátky proti inému proteínu tepelného šoku, než ten, ktorý bol naviazaný na platni) rovnako nepresahovali hodnotu OD 0.05.

V sérach pacientov sme detegovali protilátky proti proteínom tepelného šoku Hsp60, Hsp65 a Hsp70 pred zahájením a v priebehu prípravného režimu a i v celom období po transplantácii. Okrem toho, sme kvantifikovali hladiny protilátok proti Hsps a skúmali ich vzťah k transplantačným komplikáciám (venookluzívna choroba - VOD, hemoragická cystitída, akútna GvHD, ezofagitída, capillary leakage syndróm-postihnutie kapilár) a k infekciám, ktoré sa vyskytovali v študovanom súbore pacientov.

Navyše, porovnávali sme hladiny anti- Hsp protilátok medzi jednotlivými skupinami pacientov: 1.) pacienti, u ktorých sa počas celého študovaného obdobia akútna GvHD nevyskytovala; 2.) pacienti s onsetom GvHD; 3.) tretiu skupinu tvorili pacienti so súčasným výskytom akútnej GvHD a infekcie.

Štatistická analýza odhalila, že hladiny protilátok proti proteínom tepelného šoku zostali po transplantácii v mnohých prípadoch u pacientov bez GvHD a u pacientov s onsetom GvHD na pre- transplantačných hladinách alebo po transplantácii signifikantne poklesli. Dôvodom je pravdepodobne vplyv prípravného režimu alebo imunosupresívnej terapie po transplantácii. Napriek tomu boli po transplantácii zvýšené protilátky IgM anti-Hsp60, anti-Hsp65 a anti-Hsp70 u pacientov, u ktorých sa objavila závažná infekcia v potransplantačnom období. Avšak iba zvýšenie protilátok IgM anti-Hsp65 dosiahlo štatistickú signifikanciu ( $p = 0.05$ ).

Nenašli sme žiaden vzťah medzi protilátkami proti proteínom tepelného šoku Hsp60, Hsp65, Hsp70, výskytom a závažnosťou akútnej GvHD a/alebo ďalšími potransplantačnými komplikáciami. V rozpore s našimi výsledkami, Goralova (2002) ukázala, že rozvoj akútnej a/alebo chronickej GvHD po myeloablatívnom prípravnom režime u dospelých pacientov s vysokým rizikom hematologických malignít sprevádzalo zvýšenie hladín protilátok anti-Hsp70 a anti-Hsp90. Okrem porovnania hladín anti- Hsp protilátok medzi jednotlivými skupinami, sme tiež monitorovali hladiny anti- Hsp protilátok u každého pacienta individuálne a sledovali sme ich hladiny v závislosti na výskyte transplantačných komplikácií vrátane infekcie. Goralova výhradne porovnávala hladiny anti- Hsp protilátok medzi skupinami pacientov, u ktorých sa akútna GvHD nevyskytovala a u pacientov s onsetom GvHD, avšak nie sú k dispozícii údaje o výskyte infekcií pred alebo počas manifestácie GvHD. GvHD je často spúšťaná infekciou alebo naopak, infekcia môže nasledovať GvHD, a preto sa domnievame, že interpretácia týchto dát je veľmi dôležitá.

Proteíny tepelného šoku sú dominantnými antigénmi mnohých patogénov a indukujú veľmi silné humorálne a bunčné imunitné odpovede (Zügel, 1999). Zvýšené hladiny protilátok IgG a IgM anti-Hsp60, anti-Hsp65 a anti-Hsp70 boli pozorované u pacientov s bakteriálnou a plesňovou infekciou v závislosti na etiologickom agens. Pacienti, u ktorých sa v rannom alebo v neskoršom období po transplantácii rozvinula ťažká infekcia alebo septikémia, mali navzdory pokračujúcej imunosupresívnej liečbe zvýšené hladiny protilátok. V našej štúdii sme demonštrovali *de novo* humorálnu odpoveď proti proteínom tepelného šoku Hsp60, Hsp65 a Hsp70 v súbore pacientov

## Výsledky a diskusia

s aktuálnou infekciou spôsobenou *Klebsiella pneumoniae* (anti-Hsp60, anti-Hsp65 a anti-Hsp70), *Pseudomonas aeruginosa* (anti-Hsp60, anti-Hsp70) a *Aspergillus fumigatus* (anti-Hsp65).

Hsps mikroorganizmov predstavujú hlavné ciele pre prirodzený a adaptívny imunitný systém hostiteľa. Z dôvodu vysokej medzidruhovej sekvenčnej homológie Hsps, vlastné anti- Hsp protilátky sa môžu vyskytovať ako výsledok molekulárneho mimikry medzi infekčnými agensmi a hostiteľským tkanivom.

V predchádzajúcich štúdiách sme rovnako demonštrovali signifikantne zvýšenú proliferatívnu odpoveď na rh-Hsp60 ako aj na *M. bovis* Hsp65 u pacientov s anamnestickou/alebo aktuálnou infekciou (*E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*) pred transplantáciou v porovnaní s pacientmi bez infekcie alebo zdravými kontrolami. Avšak nižšia proliferatívna odpoveď proti všetkým testovaným Hsps bola pozorovaná u pacientov s GvHD, čo môže byť vysvetlené stres- indukovanou reguláciou syntézy vlastných Hsp, ktorá môže viesť k inhibícii vlastnej-Hsp - reaktívnej T- bunečnej odpovede a následne k inhibícii B- bunečnej odpovede. Van Eden vypracoval „pracovnú hypotézu“ ako by Hsps mohli kontrolovať rovnováhu T- bunečnej regulácie (van Eden, 1998). Periférne T- bunečné odpovede na vlastné Hsps sú početné, pretože vlastné- Hsp- špecifické T bunky unikli negatívnej selekcii a podprahová expresia vedie k indukcii periférnej tolerancie. Zápalové procesy, ktoré vyplývajú z GvHD, budú v mieste zápalu viesť k stres- indukovanej regulácii syntézy (Jarvis, 2003).

Reorganizácia B- bunečného repertoáru je proces, ktorý závisí na mnohých faktoroch a je medzi pacientmi rozdielny (Omazic, 2005; Maury, 2001). Diferenciácia B- buniek po transplantácii opakuje normálnu B- bunečnú ontogenézu (Storek, 1993). U väčšiny pacientov sa počet cirkulujúcich CD20+ B buniek normalizuje do štyroch mesiacoch po transplantácii. Pacientske B bunky izolované v priebehu prvého roka po transplantácii produkujú predovšetkým IgM protilátky a minimum IgG protilátok (Smal, 1990). Naše výsledky detekcie protilátok proti celkovému imunoglobulínu, IgG a IgM podporujú hypotézu Omazica, ktorý až do 12 mesiacov po transplantácii demonštroval v sérach pacientoch prítomnosť protilátok odvodených od príjemcu napriek tomu, že šlo o 100% darcovskú krvotvorbu a 100 % darcovský B- bunečný chimerizmus (Omazic, 2005).

## **VIII.2. Skúmanie humorálnej odpovede proti proteínom tepelného šoku (rh Hsp60, *M. bovis* Hsp65 a rh Hsp70) u pacientov s juvenilnou idiopatickou artritídou (JIA)**

### **VIII.2.1. Skrining protilátok proti rh Hsp60, *M. bovis* Hsp65 and rh Hsp70 v skupine pacientov s JIA a zdravých kontrol – výskyt protilátok anti-Hsp70 (Ig total, IgG a IgM) u JIA pacientov**

*(Publikované: Zlacka D, Vavrincova P, Hien Nguyen TT, Hromadnikova I. Frequency of anti-hsp60, -65 and -70 antibodies in sera of patients with juvenile idiopathic arthritis. J Autoimmun 2006; 27: 81-8.)*

Cieľom našej štúdie bol skrining protilátok proti rekombinantnému ľudskému Hsp60, rekombinantnému *M. bovis* BCG Hsp65 a rekombinantnej ľudskej inducibilnej forme Hsp70 u pacientov s JIA a ich porovnanie so zdravými kontrolami. Rovnako sme analyzovali vzťah medzi hladinami protilátok a prítomnosťou reumatoidného faktora (RF), antinukleárnymi protilátkami (ANA), HLA B27 a dĺžkou ochorenia (menej než 2 roky x viac než 2 roky). Za pozitívne séra boli považované tie, ktorých hodnoty optických denzit prevyšovali priemernú hodnotu optických denzit zdravých kontrol plus 2 SD (štandardná odchýlka) – cut off.

Protilátky proti Hsp60 ani u jedného pacienta nepresiahli hladinu zdravých kontrol. V porovnaní so zdravými kontrolami, boli celkové hladiny protilátok Ig total anti-Hsp60 v celej skupine JIA pacientov ( $P < 0.001$ ), ako aj v jednotlivých podskupinách (oligoartritída  $P < 0.00$ ; polyartritída  $P < 0.001$ ; systémová artritída  $P < 0.001$ ) signifikantne nižšie. Počet JIA pacientov (16/209; 7.6%), u ktorých boli zvýšené celkové protilátky (Ig total) proti Hsp65, zahrňujúcich JIA polyartritídu (10/109; 9.2 %) a systémové ochorenie (6/17; 35.3 %), bol rovnaký ako počet zdravých kontrol (4/50; 8 %). V porovnaní so zdravými kontrolami boli pozorované signifikantne nižšie hladiny protilátok Ig total anti-Hsp65 v celej skupine JIA pacientov ( $P < 0.001$ ), ako aj u pacientov s oligoartritídou ( $P < 0.001$ ) a polyartritídou ( $P = 0.001$ ). Avšak signifikantne vyššie hladiny protilátok Ig total anti-Hsp65 sa nachádzali u JIA systémového ochorenia ( $P < 0.001$ ). V porovnaní so zdravými kontrolami (1/50; 2 %) boli pozorované signifikantne zvýšené hladiny celkových protilátok proti Hsp70 v celej



## Výsledky a diskusia

skupine JIA pacientov (77/209; 36.8 %;  $P < 0.001$ ), ktorá zahrňovala pacientov s oligoartritídou (35/83; 42.2 %;  $P < 0.001$ ) a polyartritídou (42/109; 38.5 %;  $P < 0.001$ ).

Na základe týchto výsledkov sme skúmali hladiny protilátok anti-Hsp70 v triede IgG a IgM. IgG protilátky proti stres- indukibilnej Hsp70 prekročili cut off v skupine JIA pacientov (59/109; 28.2 %;  $P < 0.001$ ) zahrňujúce JIA polyartritídu (42/109; 38.5 %;  $P < 0.001$ ) a systémové ochorenie (17/17; 100 %;  $P < 0.001$ ). Avšak signifikantne nižšie hladiny protilátok IgG anti-Hsp70 boli detegované u JIA oligoartritídy ( $P < 0.001$ ). Signifikantne zvýšené hladiny protilátok IgM anti-Hsp70 boli pozorované v celej skupine JIA pacientov (120/209; 57.4 %;  $P < 0.001$ ), ktorá zahrňovala pacientov s oligoartritídou (29/83; 34.9 %;  $P < 0.001$ ) a polyartritídou (91/109; 83.4 %;  $P < 0.001$ ). Detailná analýza odhalila zvýšené hladiny protilátok anti-Hsp70 u RF- pozitívnych pacientov.

Hladiny protilátok anti-Hsp70 v triede IgG a IgM korelovali so závažnosťou ochorenia hodnotenou na základe Steinbrockovej funkčnej klasifikácie a rtg nálezu. Predpokladáme, že tieto protilátky môžu tiež odrážať aktuálnu aktivitu ochorenia. Nízke hladiny IgM a vysoké hladiny IgG protilátok u mnohých pacientov so systémovým ochorením môžu vyjadrovať ústup charakteristických systémových vlastností v priebehu času a silnú sekundárnu alebo pamäťovú odpoveď, pretože anamnestické protilátky môžu pretrvávajú mesiace, roky alebo po celý život. Signifikantné zvýšenie IgG protilátok môže byť navyše spôsobené exacerbáciou ochorenia. V prípade pacientov s polyartritídou, rast protilátok IgM anti- Hsp70 bol doprevádzaný vysokou produkciou protilátok IgG. A naopak, neprítomnosť IgM bola asociovaná s nedostatkom IgG protilátok. Výskyt protilátok IgM anti- Hsp70 a neprítomnosť IgG môže odrážať primárnu imunitnú odpoveď.

Nezistili sme žiadnu asociáciu medzi hladinami protilátok anti-Hsp70 a ANA, HLA B27 a dĺžkou ochorenia (menej než 2 roky x viac než 2 roky), okrem protilátok anti-Hsp70 v triede IgM, ktoré boli výrazne zvýšené u HLA B27- pozitívnych pacientov.

Výskyt protilátok anti-Hsp70 je oveľa vyšší u pacientov s JIA, než u zdravých kontrol a naznačuje ich možnú úlohu v patogenéze ochorenia.

### **VIII.2.2. Vysoké hladiny IgG protilátok proti *M. bovis* Hsp65 a jeho P180-188 epitopu môžu odrážať najmenej závažné prípady JIA**

(Publikované: **Zlacka D, Velek J, Vavrincova P, Hromadnikova I.** *Antibodies against M. Bovis 65 KDa heat shock protein and its P180-188 epitope in sera of patients with juvenile idiopathic arthritis. IJBS 1007; 3: 188-93.*)

Ako bolo spomínané v predchádzajúcich kapitolách, mykobakteriálny Hsp65 má kľúčový význam v experimentálnom modeli adjuvantnej artritídy. Táto artritída môže byť indukovaná u susceptibilných potkanov imunizáciou nekompletného Freudovho adjuvans obsahujúceho tepelne- usmrtené mykobaktérie alebo pasívnym transferom špecifických T buniek rozpoznávajúcich 180 – 188 aminokyselinovú sekvenciu v *M. bovis* Hsp65. Tento T bunecný klon je reaktívny s chrupavkovým proteoglykánom, agregátom (van Eden, 1985). Vysokomolekulárny agregát je hlavnou nekolagénovou zložkou medzibunecnej hmoty chrupavky. Molekulárny komplex agregátu (molekulová hmotnosť 1 – 3.5 MDa) sa skladá z centrálného proteínu (CP), keratansulfátovej domény (KS), dvoch chondroitinsulfátových domén (CS 1, CS 2), väzbovej domény pre kyselinu hyaluronovú (G1), domény G2 a G3 a ďalších menších úsekov. Z funkčného hľadiska sú najdôležitejšie chondroitinsulfátové domény, ktoré obsahujú veľké množstvo negatívne nabitých glykosaminoglykánových reťazcov chondroitinsulfátu. Agregátové komplexy predstavujú dôležitú štruktúrne - funkčnú jednotku, ktorej kľúčovou úlohou je akumulácia negatívneho náboja a vytvorenie vysokého osmotického tlaku v tkanive, ktorý vŕahuje vodu a viaže ju v tkanive chrupavky. Tento komplex tvorí 50 – 85 % z celovej váhy proteoglykánov. Vlastná krížová reaktivita alebo mimikry T buniek založené na sekvenčnej homológii medzi sekvenciou 180-188 *M. bovis* Hsp65 a chrupavkovým proteoglykánom, vyjadruje schopnosť indukovať autoimunitný zápal.

V tejto štúdii sme u JIA pacientov skúmali a porovnávali hladiny protilátok proti *M. bovis* Hsp65 a syntetickému peptidu P180 – 188 odvodeného od *M. bovis* Hsp65. Rovnako sme študovali vzťah medzi hladinami anti-Hsp protilátok a prítomnosťou reumatoidného faktora (RF), antinukleárných protilátok (ANA), HLA B27 a dĺžkou ochorenia (menej než 2 roky x viac než 2 roky) a závažnosťou ochorenia hodnotenou na základe Steinbrockovej funkčnej klasifikácie and rtg nálezu.

U pacientov s juvenilnou idiopatickou artritídou bola väčšina protilátok anti-Hsp65 IgG izotypu (54.2 %), pričom protilátky IgM anti-Hsp65 boli zvýšené v menšej miere (13.9 %). V porovnaní so zdravými kontrolami boli protilátky proti *M. bovis* Hsp65 (P < 0.001) a 180-188 epitopu (P < 0.001) v triede IgG signifikantne zvýšené vo všetkých troch typoch onsetu ochorenia (JIA polyartritída, oligoartritída a systémové ochorenie). Signifikantne zvýšené hladiny IgM protilátok proti *M. bovis* Hsp65 boli pozorované u systémového ochorenia. Pacienti s oligoartritídou postrádali produkciu IgM protilátok proti *M. bovis* Hsp65. Tieto dáta sú čiastočne zhodné s tými, ktoré zaznamenal Ó Nualláin (1993), kde pozoroval zvýšené hladiny protilátok IgM a IgG anti-Hsp65 vo všetkých JCA skupinách. A obrátene, pacienti so systémovým ochorením ukázali slabú protilátkovú odpoveď na peptid 180 – 188.

Porovnaním hladín protilátok proti *M. bovis* Hsp65 a 180-188 epitopu v rámci populácie pacientov a zdravých kontrol, sme u JIA pacientov a zdravých kontrol zistili signifikantne vyššie hladiny IgG a IgM protilátok anti-Hsp65.

Najvyššie hladiny IgG protilátok proti *M. bovis* Hsp65 a jeho epitopu boli pozorované u pacientov s oligoartritídou ako aj u pacientov bez rtg zmien a funkčného obmedzenia, zatiaľ čo najnižšie hladiny protilátok boli detegované u pacientov s mnohými ťažkými štádiami kĺbového poškodenia, ktoré u dlhotrvajúcej artritídy alebo artritídy v konečnom štádiu môže byť spôsobené oslabenou a/alebo zníženou reaktivitou imunitných buniek a protilátok.

Tieto nálezy môžu naznačovať, že vysoké hladiny IgG protilátok proti *M. bovis* Hsp65 a jeho P180-188 epitopu môžu odrážať najmenej závažné prípady JIA. Pretože IgM protilátky proti *M. bovis* Hsp65 a epitopu P180-188 *M. bovis* Hsp65 prekročili hladiny zdravých kontrol iba u malého množstva JIA pacientov, predpokladáme, že nehrajú úlohu v patogenéze JIA.

Táto štúdia tiež poukázala na zvýšenú humorálnu odpoveď proti *M. bovis* Hsp65 u RF pozitívnych pacientov, avšak na žiadnu asociáciu medzi hladinami protilátok proti 180-188 sekvencii *M. bovis* Hsp65 a prítomnosťou RF. Nenašli sme žiadnu asociáciu medzi hladinami protilátok proti *M. bovis* Hsp65 a jeho epitopu a prítomnosťou ANA, HLA B27 a dĺžkou ochorenia.

### **VIII.3. Štúdium membránovej expresie inducibilnej formy Hsp70 na synoviálnych bunkách získaných od pacientov s reumatoidnou artritídou a juvenilnou idiopatickou artritídou**

Použitím rôznych metód sa zistilo, že rôzne Hsps a chaperony (napr. ľudský Hsp60, BiP, ľudské homológy bakteriálneho DnaJ chaperonu) sú intracelulárne nadmerne vyjadrené na artritckej synoviálnej membráne, aby chránili bunky pred apoptózou. Hsps chránia bunky pred rôznymi toxickými podmienkami charakteristickými pre zápalové reumatické kĺby zahrňujúce hypoxiu, produkciu veľkého množstva reaktívnych kyslíkových radikálov a zápalových cytokínov ako TNF $\alpha$  a IL-1 (van Eden, 2003).

#### **VIII.3.1. Synoviálne bunky získané zo synoviálnych tkanív pacientov s vážnym priebehom RA/JIA sú silne pozitívne na membránovo- vyjadrenú Hsp70**

*(Publikované: Nguyen TT, Gehrman M, Zlacka D, Sosna A, Vavrincova P, Multhoff G, Hromadnikova I. Heat shock protein 70 membrane expression on fibroblast-like synovial cells derived from synovial tissue of patients with rheumatoid and juvenile idiopathic arthritis. Scand J Rheumatol 2006; 3: 447-53.)*

Použitím prietokovej cytometrie (FACS) sme analyzovali synoviálne bunky fibroblastoidného typu (fibroblast-like synovial cells) získané kultiváciou synoviálneho tkaniva od pacientov s JIA a RA, ktorí podstúpili synovektómiu a skúmali sme membránovú expresiu inducibilnej formy Hsp70. Rovnako sme skúmali membránovú expresiu inducibilnej formy Hsp70 na kožných fibroblastoch získaných z operačnej rany a periférnych krvných mononukleárných buniek (PBMC). Ako negatívne kontroly sme použili kožné fibroblasty a periférne krvné lymfocyty (PBL) zdravých kontrol.

Signifikantne vyššie percento membránovej expresie Hsp70 bolo pozorované na synoviálnych bunkách fibroblastoidného typu získaných z kĺbov postihnutých artritídou u RA pacientov (priemer 47.7 %) v porovnaní s autológnyimi kožnými fibroblastami (priemer 9.5 %,  $p < 0.001$ ), kontrolnými kožnými fibroblastami (priemer 5.6 %,  $p <$

0.001), autológnymi periférnymi krvnými lymfocytmi (priemer CD45/Hsp70-positive 10.4 %,  $p < 0.001$ ) a kontrolnými periférnymi krvnými lymfocytmi (priemer CD45/Hsp70-positive 7.7 %,  $p < 0.001$ ). Rovnako sme pozorovali vysoké percento membránovej expresie Hsp70 na synoviálnych bunkách fibroblastoidného typu získaných od JIA pacientov (priemer 35.2 %) v porovnaní s autológnymi PBL (priemer CD45/Hsp70-positive 10.4 %). Synoviálne bunky fibroblastoidného typu získané od RA pacienta z kĺbov nepostihnutých artritídou, ktorý podstúpil synovektómiu pre trauma, vykazovali nízku expresiu Hsp70 (10.9 %).

Táto štúdia je prvým dôkazom membránovej expresie Hsp70 na synoviálnych bunkách fibroblastoidného typu získaných od pacientov s JIA a RA. Podobne ako Martin (2003) v prípade myeloidných dendritických buniek v synoviálnej tekutine RA pacientov uvažujeme, že v odpovedi na trvalý stres môže byť Hsp70 premiestnený z cytozolu na bunecný povrch a/alebo Hsp70 môže byť cez receptory proteínov tepelného šoku zachytený z extracelulárneho priestoru na bunecnom povrchu.

Hsp70 môže viazať autoantigény uvoľnené z chronicky postihnutého synoviálneho tkaniva a prispievať u JIA a RA pacientov k autoantigénnemu spracovaniu. Hsp70– autoantigénne peptidové komplexy uvoľnené zo stresovaných alebo mŕtvych buniek môžu byť cez väzbu na receptory proteínov tepelného šoku (CD14, CD91) endocytizované APC (DC synovialnej tekutiny) a prezentované MHC molekulami.

### **VIII.3.2. Hsp70 uvoľnený zo zápalového synoviálneho tkaniva môže byť zachytený na bunčnom povrchu synoviálnych buniek z extracelulárneho priestoru cez receptor CD91**

(Publikované: Hromadnikova I, Nguyen TTH, **Zlacka D**, Sedlackova L, Popelka S, Veigl D, Pech J, Vavrinčova P, Sosna A *Expression of HSP receptors on fibroblast-like synovial cells derived from rheumatoid arthritis - affected joints. Rheumatol Int* 2008; 28: 837-44.)

FACS analýzou sme skúmali membránovú expresiu inducibilnej formy Hsp70 a Hsp receptorov: Toll-like receptor (TLR) 2 a 4, CD14 (receptor pre lipopolysacharid - LPS), CD36 (receptor pre kolagén typu I a trombospondín), CD40 (receptorová molekula na povrchu B buniek, endoteliálnych a epiteliálnych buniek), CD91 (známy ako  $\alpha$ -2 makroglobulin/low density lipoproteínový receptor) na synoviálnych bunkách fibroblastoidného typu (SC) získaných kultiváciou zo synoviálneho tkaniva od RA pacientov podstupujúcich synovektómiu a na autológnych kožných fibroblastoch (SF) získaných z operačnej rany.

Podobne ako v našej predchádzajúcej štúdií, pozorovali sme signifikantne vyššie percento membránovej expresie Hsp70 na synoviálnych bunkách fibroblastoidného typu získaných z kĺbov postihnutých artritídou, než na autológnych kožných fibroblastoch (medián SC: 21.4 % x SF 5.0 %,  $p < 0.001$ ). Oba, synoviálne bunky ako aj kožné fibroblasty, vyjadrovali relatívne vysoké hladiny povrchovej CD91 (medián SC: 80.2 % x SF 79.2 %), avšak žiadne alebo nízke hladiny CD14, CD36, CD40, TLR2, TLR4. Okrem toho sme na RA synoviálnych bunkách fibroblastoidného typu pozorovali vysokú membránovú ko-expresiu CD91 a Hsp70 (medián 18.6 %), zatiaľ čo autológne kožné fibroblasty vykazovali iba veľmi nízku expresiu Hsp70 (medián 3.9 %,  $p < 0.001$ ).

Súčasne sme skúmali hladiny inducibilnej formy Hsp70 v synoviálnych tekutinách, v sérach RA pacientov a v sérach zdravých kontrol, ktoré boli zahrnuté ako negatívne kontroly. Pozitivita na Hsp70 bola detegovaná v 100 % RA synoviálnej tekutiny (v rozsahu 474.5 – 1078.9, priemer 713.0, medián 550.1 ng/ml), zatiaľ čo séra zdravých kontrol (v rozsahu 8.0 - 53.4, priemer 18.2, medián 15.8 ng/ml;  $p < 0.001$ ) a séra RA pacientov (v rozsahu 12.0 - 44.6, priemer 24.5, medián 27.7 ng/ml;  $p < 0.001$ ) boli negatívne. Za pozitívne vzorky boli považované tie, ktorých hodnoty optických

denzit prevyšovali priemernú hodnotu optických denzit sér zdravých kontrol plus 2 SD (štandardná odchýlka) – tzv. cut off.

Opakovane sme pozorovali vysoké percento membránovej expresie Hsp70 na bunečnom povrchu synoviálnych buniek fibroblastoidného typu získaných od RA pacientov. Hsp70 chráni bunky pred rôznymi toxickými podmienkami ako sú oxidačný stres, tepelný šok, ťažké kovy, ischemia. Navyše, zvýšená expresia Hsp70 má protektívnu úlohu proti apoptóze.

Ako sme spomínali v kapitole III., extracelulárne stresové proteíny vrátane Hsps a glukózou regulovaných proteínov (Grp) sú dôležitými mediátormi intracelulárnej signalizácie a transportu. Majú silný vplyv na imunitnú odpoveď (Srivastava, 2000 a 2001; Calderwood, 2005). Uvoľnenie týchto proteínov z buniek je vyvolané fyzickou traumou, stresom, ako aj po vystavení imunologickým „nebezpečným signálom“. Po uvoľnení do extracelulárnej tekutiny, Hsps alebo Grp sa môžu naviazať na povrchy susedných buniek a iniciovať signálne kaskády, ako aj transport antigénnych peptidov (Calderwood, 2007). Mnoho účinkov extracelulárnych stresových proteínov je práve sprostredkovaných cez bunečné povrchové receptory.

Vzhľadom na to, že sme simultánne demonštrovali vysokú prevahu inducibilnej formy Hsp70 v synoviálnych tekutinách RA pacientov a vysokú membránovú expresiu Hsp70 na RA synoviálnych bunkách fibroblastoidného typu, domnievame sa, že Hsp70 uvoľnený zo zápalového synoviálneho tkaniva môže byť z extracelulárneho priestoru zachytený na bunečnom povrchu synoviálnych buniek cez receptor CD91. Zaujímavé je, že kožné fibroblasty vyjadrujúce relatívne vysoké hladiny povrchovej CD91, kultivované za rovnakých podmienok, sú negatívne na membránovo-viazanú Hsp70. V porovnaní so synoviálnou tekutinou, v sére RA pacientov boli detegované minimálne hladiny inducibilnej Hsp70.

Význam interakcie Hsp70 so synoviálnymi bunkami skrz povrchový receptor CD91 zostáva neurčený, ale môže sprostredkovať ďalšie neimunitné zámery ako napr. rozvoj rezistencie na stres- indukovanú apoptózu (Guzhova, 2001).

## IX. Zhrnutie

Proteíny tepelného šoku sú imunodominantnými antigénmi mnohých patogénov. Vysoký stupeň sekvenčnej homológie hostiteľských a patogénnych Hsps zvyšuje riziko prelomenia tolerancie a prípadná anti-infekčná odpoveď môže vyprovokovať autoimunitný zápal u geneticky predisponovaných jedincov.

V našich prácach sme sa zamerali na štúdium úlohy rekombinantného ľudského Hsp60, rekombinantného *M. bovis* BCG Hsp65 a rekombinantnej ľudskej inducibilnej formy Hsp70 v patogenéze juvenilnej idiopatickej artritídy a reumatoidnej artritídy. V štúdiu humorálnej odpovede proti proteínom tepelného šoku (rh Hsp60, *M. bovis* Hsp65 a rh Hsp70) u pacientov s juvenilnou idiopatickou artritídou (JIA) sme v porovnaní so zdravými kontrolami našli signifikantne zvýšené hladiny celkových protilátok proti inducibilnej forme Hsp70 v celej skupine JIA pacientov. Tieto protilátky boli hlavne triedy IgG u systémového ochorenia, IgM u pacientov s oligoartritídou a v oboch triedach u pacientov s polyartritídou. Detailná analýza odhalila zvýšené hladiny protilátok anti-Hsp70 u RF- pozitívnych pacientov.

Hladiny protilátok anti-Hsp70 v triede IgG a IgM korelovali so závažnosťou ochorenia hodnotenou na základe Steinbrockovej funkčnej klasifikácie a rtg nálezu. Predpokladáme, že tieto protilátky môžu tiež odrážať aktuálnu aktivitu ochorenia. Nezistili sme žiadnu asociáciu medzi hladinami protilátok anti-Hsp70 a ANA, HLA B27 a dĺžkou ochorenia (menej než 2 roky x viac než 2 roky), okrem protilátok anti-Hsp70 v triede IgM, ktoré boli výrazne zvýšené u HLA B27- pozitívnych pacientov.

Výskyt protilátok anti-Hsp70 je oveľa vyšší u pacientov s JIA, než u zdravých kontrol a naznačuje ich možnú úlohu v patogenéze ochorenia.

Rovnako sme u pacientov s JIA skúmali a porovnávali hladiny protilátok proti *M. bovis* Hsp65 a syntetickému peptidu P180 – 188 odvodeného od *M. bovis* Hsp65. Väčšina protilátok bola anti-Hsp65 IgG izotypu, pričom protilátky IgM anti-Hsp65 boli zvýšené v menšej miere. V porovnaní so zdravými kontrolami boli protilátky proti *M. bovis* Hsp65 a 180-188 epitopu v triede IgG signifikantne zvýšené vo všetkých troch typoch onsetu ochorenia.

Vysoké hladiny IgG protilátok proti *M. bovis* Hsp65 a jeho epitopu boli pozorované u pacientov s oligoartritídou ako aj u pacientov bez rtg zmien a funkčného obmedzenia, zatiaľ čo nízke hladiny protilátok boli detegované u pacientov s mnohými



## Zhrnutie

ťažkými štádiami kĺbového poškodenia. Porovnaním hladín protilátok proti *M. bovis* Hsp65 a 180-188 epitopu v rámci populácie pacientov a zdravých kontrol sme u JIA pacientov a zdravých kontrol zistili signifikantne vyššie hladiny IgG a IgM protilátok anti-Hsp65.

Tieto nálezy môžu naznačovať, že vysoké hladiny IgG protilátok proti *M. bovis* Hsp65 a jeho P180-188 epitopu môžu odrážať najmenej závažné prípady JIA. Pretože IgM protilátky proti *M. bovis* Hsp65 a epitopu P180-188 *M. bovis* Hsp65 prekročili hladiny zdravých kontrol iba u malého množstva JIA pacientov, predpokladáme, že nehrajú úlohu v patogenéze JIA.

V štúdiu membránovej expresie inducibilnej formy Hsp70 sme detegovali vysokú membránovú expresiu Hsp70 na synoviálnych bunkách fibroblastoidného typu získaných zo synoviálnych tkanív postihnutých autoimunitným zápalom. Uvažujeme, že v odpovedi na trvalý stres môže byť Hsp70 premiestnený z cytozolu na bunecný povrch a/alebo Hsp70 môže byť cez receptory proteínov tepelného šoku zachytený z extracelulárneho priestoru na bunecnom povrchu. V ďalšej práci sme analyzovali prítomnosť receptorov proteínov tepelného šoku (TLR2 a TLR4, CD14, CD36, CD40 a CD91) na synoviálnych bunkách fibroblastoidného typu u RA pacientov. Synoviálne bunky ako aj kožné fibroblasty vyjadrovali relatívne vysoké hladiny povrchovej CD91, avšak žiadne alebo nízke hladiny ostatných receptorov. Okrem toho sme na synoviálnych bunkách fibroblastoidného typu pozorovali vysokú ko-expresiu CD91 a Hsp70 a zároveň sme u JIA/RA pacientov detegovali vysoké hladiny inducibilnej Hsp70 v synoviálnej tekutine.

Domnievame sa, že inducibilná Hsp70 uvoľnená zo zápalového synoviálneho tkaniva môže byť z extracelulárneho priestoru zachytená na bunecnom povrchu synoviálnych buniek cez receptor CD91.

V štúdiu humorálnej odpovede proti proteínom tepelného šoku vo vzťahu k potransplantačným komplikáciám po alogénnej transplantácii hematopoetických kmeňových/progenitorových buniek (HSCT) sme zistili, že protilátky proti proteínom tepelného šoku Hsp60, Hsp65 a Hsp70 (celkový imunoglobulín, IgG a IgM) boli detegované pred zahájením a v priebehu prípravného režimu a i v celom období po transplantácii. Nenašli sme žiaden vzťah medzi protilátkami proti proteínom tepelného šoku Hsp60, Hsp65, Hsp70, výskytom a závažnosťou akútnej GvHD a/alebo ďalšími potransplantačnými komplikáciami.

Štatistická analýza odhalila, že hladiny protilátok proti proteínom tepelného šoku

## Zhrnutie

zostali po transplantácii v mnohých prípadoch u pacientov bez GvHD a u pacientov s onsetom GvHD na pre- transplantačných hladinách alebo po transplantácii významne poklesli. Dôvodom je pravdepodobne vplyv prípravného režimu alebo imunosupresívnej terapie po transplantácii. Napriek tomu boli po transplantácii zvýšené protilátky IgM anti-Hsp60, anti-Hsp65 a anti- Hsp70 u pacientov, u ktorých sa objavila závažná infekcia v potransplantačnom období.

Zvýšené hladiny protilátok IgG a IgM anti-Hsp60, anti-Hsp65 a anti-Hsp70 boli pozorované u pacientov s bakteriálnou a plesňovou infekciou v závislosti na etiologickom agens. Pacienti, u ktorých sa v rannom alebo v neskoršom období po transplantácii rozvinula ťažká infekcia alebo septikémia, mali navzdory pokračujúcej imunosupresívnej liečbe zvýšené hladiny protilátok. V našej štúdii sme demonštrovali *de novo* humorálnu odpoveď proti proteínom tepelného šoku Hsp60, Hsp65 a Hsp70 v súbore pacientov s aktuálnou infekciou spôsobenou *Klebsiella pneumoniae* (anti-Hsp60, anti-Hsp65 a anti-Hsp70), *Pseudomonas aeruginosa* (anti-Hsp60, anti-Hsp70) a *Aspergillus fumigatus* (anti-Hsp65).

Na záver môžeme zhrnúť, že protilátky proti proteínom tepelného šoku by mohli byť produkované po alogénnej transplantácii hematopoetických kmeňových/progenitorových buniek vo vzťahu k infekcii v závislosti na etiologickom agens; avšak potransplantačné komplikácie samy o sebe majú malý vplyv.

## X. Zoznam použitej literatúry

- Abulafia-Lapid R, Elias D, Raz I, Keren-Zur Y, Atlan H et al. 1999. T cell proliferative responses of type 1 diabetes patients and healthy individuals to human hsp60 and its peptides. *J Immunol* 12: 121-9.
- Abulafia-Lapid R, Gillis D, Yosef O, Atlan H, Cohen IR. 2003. T cells and autoantibodies to human HSP70 in type 1 diabetes in children. *J Autoimmun* 20: 313-21.
- Adam, Z, Vorlíček J. 2001. Hematologie II. Grada. Česká republika.
- GradaAdinolfi E, Kim M, Young MT, Di Virgilio F, Surprenant A. 2003. Tyrosine phosphorylation of HSP90 within the P2X7 receptor complex negatively regulates P2X7 receptors. *J Biol Chem* 278: 37344-51.
- Aghdassi A, Phillips P, Dudeja V, Dhaulakhandi D, Sharif R et al. 2007. Heat shock protein 70 increases tumorigenicity and inhibits apoptosis in pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Res* 67: 616-25.
- Ahern MJ, Smith MD. 1997. Rheumatoid arthritis. *Med J Aust* 166: 156-61 Arnold-Schild D, Hanau D, Spehner D, Schmid C, Rammensee HG et al. 1999. Cutting edge: receptor-mediated endocytosis of heat shock proteins by professional antigen-presenting cells. *J Immunol* 162: 3757-60.
- Albani S, Ravelli A, Massa M, De Benedetti F, Andree G, Roudier J, Martini A, Carson DA. 1994. Immune responses to the Escherichia coli dnaJ heat shock protein in juvenile rheumatoid arthritis and their correlation with disease activity. *J Pediatr* 124: 561-5.
- Ali MM, 2006. Crystal structure of an Hsp90–nucleotide–p23/Sba1 closed chaperone complex. *Nature* 440:1013-7.
- Amarante-Mendes GP, Naekyung Kim C, Liu L, Huang Y, Perkins CL, Green DR, Bhalla K. 1998. Bcr-Abl exerts its antiapoptotic effect against diverse apoptotic stimuli through blockage of mitochondrial release of cytochrome C and activation of caspase-3. *Blood* 91: 1700-5.
- Arnold D, Faath S, Rammensee H, Schild H. 1995. Cross-priming of minor histocompatibility antigen-specific cytotoxic T cells upon immunization with the heat shock protein gp96. *J Exp Med* 182: 885-9.
- Arnold-Schild D, Hanau D, Spehner D, Schmid C, Rammensee HG, de la Salle H, Schild H. 1999. Cutting edge: receptor-mediated endocytosis of heat shock proteins by professional antigen-presenting cells. *J Immunol* 162: 3757-60.

## Zoznam použitej literatúry

- Asea A, Kraeft SK, Kurt-Jones EA, Stevenson MA, Chen LB et al. 2000. HSP70 stimulates cytokine production through a CD14-dependant pathway, demonstrating its dual role as a chaperone and cytokine. *Nat Med* 6: 435-4.2.
- Asea A, Rehli M, Kabingu E, Boch JA, Bare O et al. 2002. Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70: role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4. *J Biol Chem* 277: 15028-34.
- Bagatell R, Whitesell L. 2004. Altered Hsp90 function in cancer: a unique therapeutic opportunity. *Mol Cancer Ther* 3: 1021-30. Review.
- Banerji U, O'Donnell A, Scurr M, Pacey S, Stapleton S et al. 2005. Phase I pharmacokinetic and pharmacodynamic study of 17-allylamino, 17-demethoxygeldanamycin in patients with advanced malignancies. *J Clin Oncol* 23: 4152-61.
- Ballinger CA, Connell P, Wu Y, Hu Z, Thompson LJ, Yin LY, Patterson C. 1999. Identification of CHIP, a novel tetratricopeptide repeat-containing protein that interacts with heat shock proteins and negatively regulates chaperone functions. *Mol Cell Biol* 19: 4535-4545.
- Bason C, Corrocher R, Lunardi C, Puccetti P, Olivieri O et al. 2003. Interaction of antibodies against cytomegalovirus with heat-shock protein 60 in pathogenesis of atherosclerosis. *Lancet* 362: 1971-7.
- Basu S, Binder RJ, Suto R, Anderson KM, Srivastava PK. 2000. Necrotic but not apoptotic cell death releases heat shock proteins, which deliver a partial maturation signal to dendritic cells and activate the NF-kappa B pathway. *Int Immunol* 12: 1539-46.
- Basu S, Binder RJ, Ramalingam T, Srivastava PK. 2001. CD91 is a common receptor for heat shock proteins gp96, hsp90, hsp70, and calreticulin. *Immunity* 14: 303-13.
- Beck FX, Neuhofer W, Muller E. 2000. Molecular chaperones in the kidney: distribution, putative roles, and regulation. *Am J Physiol Renal Physiol* 279: 203-215.
- Becker J and Craig EA. 1994. Heat-shock proteins as molecular chaperones. *Eur J Biochem* 219: 11-23.
- Becker T, Hartl FU, Wieland F. 2002. CD40, an extracellular receptor for binding and uptake of Hsp70-peptide complexes. *J Cell Biol* 158: 1277-85.
- Beckmann RP, Mizzen LA, Welch WJ. 1990. Interaction of HSP70 with newly synthesized proteins: implications for protein folding and assembly. *Science* 248: 850 – 854.
- Beere HM, Wolf BB, Cain K, Mosser DD, Mahboubi A, Kuwana T, Taylor P, Morimoto RI, Cohen GM, Green DR. 2000. Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by

## Zoznam použitej literatúry

- preventing recruitment of procaspase- 9 to the Apaf-1 apoptosome. *Nat Cell Biol* 2: 469-475.
- Benjamin IJ, McMillan DR. 1998. Stress (heat shock) proteins: molecular chaperones in cardiovascular biology and disease. *Circ Res* 83: 117-132.
- Ben-Levy R, Leighton IA, Doza YN, Attwood P, Morrice N, Marshall CJ, Cohen P. 1995. Identification of novel phosphorylation sites required for activation of MAPKAP kinase-2. *EMBO J* Dec 14:5920-5930.
- Benndorf R, Hayess K, Ryazantsev S, Wieske M, Behlke J, Lutsch G. 1994. Phosphorylation and supramolecular organization of murine small heat shock protein HSP25 abolish its actin polymerization- inhibiting activity. *J Biol Chem* 269: 20780-20784.
- Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, Sultan C. 1982. Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes *Br J Haematol* 51: 189-99.
- Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, Sultan C. 1985. Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. A report of the French-American-British Cooperative Group. *Ann Intern Med* 103: 620-5.
- Bernstein SL, Liu AM, Hansen BC, Somiari RI. 2000. Heat shock cognate-70 gene expression declines during normal aging of the primate retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41: 2857-62.
- Berwin B, Hart JP, Rice S, Gass C, Pizzo SV et al. 2003. Scavenger receptor-A mediates gp96/GRP94 and calreticulin internalization by antigen-presenting cells. *EMBO J* 22: 6127-36.
- Binder RJ, Anderson KM, Basu S, Srivastava PK. 2000. Cutting edge: heat shock protein gp96 induces maturation and migration of CD11c+ cells in vivo. *J Immunol* 165: 6029-35.
- Binder RJ, Vatner R, Srivastava P. 2004. The heat-shock protein receptors: some answers and more questions. *Tissue Antigens* 64: 442-451.
- Bimston D, Song J, Winchester D, Takayama S, Reed JC, Morimoto RI. 1998. BAG-1, a negative regulator of Hsp70 chaperone activity, uncouples nucleotide hydrolysis from substrate release. *EMBO J* 17: 6871-6878.
- Blachere NE, Udono H, Janetzki S, Li Z, Heike M, Srivastava PK 1993. Heat shock protein vaccines against cancer. *J Immunother Emphasis Tumor Immunol* 14: 352-6.
- Blagosklonny MV, Fojo T, Bhalla KN, Kim JS, Trepel JB, Figg WD, Rivera Y, Neckers LM. 2001. The Hsp90 inhibitor geldanamycin selectively sensitizes Bcr-Abl-expressing leukemia cells to cytotoxic chemotherapy. *Leukemia* 15: 1537-43.

## Zoznam použitej literatúry

- Bogers WM, Bergmeier LA, Oostermeijer H, ten Haaf P, Wang Y et al. 2004. CCR5 targeted SIV vaccination strategy preventing or inhibiting SIV infection. *Vaccine* 22: 2974-84.
- Bogers WM, Bergmeier LA, Ma J, Oostermeijer H, Wang Y et al. 2004. A novel HIV-CCR5 receptor vaccine strategy in the control of mucosal SIV/HIV infection. *AIDS* 18: 25-36.
- Boman J, Hammerschlag MR. 2002. Chlamydia pneumoniae and atherosclerosis: critical assessment of diagnostic methods and relevance to treatment studies. *Clin Microbiol Rev* 15: 1-20.
- Bonato VL, Goncalves ED, Soares EG, Santos Junior RR, Sartori A et al. 2004. Immune regulatory effect of pHSP65 DNA therapy in pulmonary tuberculosis: activation of CD8+ cells, interferon-gamma recovery and reduction of lung injury. *Immunology* 113: 130-8.
- Boog CJ, de Graeff-Meeder ER, Lucassen MA, van der Zee R, Voorhorst-Ogink MM, van Kooten PJ, Geuze HJ, van Eden W. 1992. Two monoclonal antibodies generated against human hsp60 show reactivity with synovial membranes of patients with juvenile chronic arthritis. *J Exp Med* 175:1805-10.
- Brenner BG, Wainberg Z. 2001. Heat shock proteins: novel therapeutic tools for HIV-infection? *Expert Opin Biol. Ther.* 1: 67-77.
- Buch M, Emery P. 2002. The aetiology and pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Hospital pharmacist* 9: 5-10.
- Bukau B, Horwich AL. 1998. The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell.* 92: 351-366.
- Byrne C, Hardman M. 2002. Integumentary structures. In: *Mouse Development*, ed. Rosant J, Tam PPL: Academic Press, London, UK, 567- 589.
- Calderwood SK, Theriault JR, Gong J. 2005. Message in a bottle: role of the 70-kDa heat shock protein family in anti-tumor immunity. *Eur J Immunol* 35: 2518-27. Review.
- Calderwood SK, Khaleque MA, Sawyer DB, Ciocca DR. 2006. Heat shock proteins in cancer: chaperones of tumorigenesis. *Trends Biochem Sci* 31: 164-72.
- Calderwood SK, Mambula SS, Gray PJ Jr, Theriault JR. 2007. Extracellular heat shock proteins in cell signaling. *FEBS Lett* 581: 3689-94.
- Campisi J and Fleshner M. 2003. Role of extracellular HSP72 in acute stress-induced potentiation of innate immunity in active rats, *J. Appl. Physiol* 94: 43-52.
- Cassadevall A. 2003. Antibody-mediated immunity against intracellular pathogens: two-dimensional thinking comes full circle. *Infect Immun* 71: 4225-8.

## Zoznam použitej literatúry

- Cassidy JT, Petty RE. 1990. Textbook of Pediatric Rheumatology, Churchill Livingstone, New York.
- Castelli C, Ciupitu AM, Rini F, Rivoltini L, Mazzocchi A, Kiessling R, Parmiani G. 2001. Human heat shock protein 70 peptide complexes specifically activate antimelanoma T cells. *Cancer Res* 61:222-7.
- Castelli C, Rivoltini L, Rini F et al. 2004. Heat shock proteins: biological functions and clinical application as personalized vaccines for human cancer. *Cancer Immunol Immunother* 53: 227-33.
- Chadli A, Bouhouche I, Sullivan W, Stensgard B, McMahon N, Catelli MG, Toft DO. 2000. Dimerization and N-terminal domain proximity underlie the function of the molecular chaperone heat shock protein 90. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 12524-12529.
- Chant ID, Rose PE, Morris AG. 1995. Analysis of heat-shock protein expression in myeloid leukaemia cells by flow cytometry. *Br J Haematol* 90: 163-8.
- Charette SJ, Lavoie JN, Lambert H, Landry J. 2000. Inhibition of Daxx-mediated apoptosis by heat shock protein 27. *Mol Cell Biol* 20: 7602-12.
- Cheetham ME, Caplan AJ. 1998. Structure, function and evolution of DnaJ: conservation and adaptation of chaperone function. *Cell Stress Chaperones* 3 :28-36.
- Chen W, Syldath U, Bellmann K, Burkart V, Kolb H. 1999. Human 60-kDa heatshock protein: a danger signal to the innate immune system. *J Immunol* 162: 3212-9.
- Cheng MY, Hartl FU, Horwich AL. 1990. The mitochondrial chaperonin hsp60 is required for its own assembly. *Nature* 348: 455-8.
- Chiosis G, Huezo H, Rosen N, Mimnaugh E, Whitesell L, Neckers L. 2003. 17AAG: low target binding affinity and potent cell activity--finding an explanation. *Mol Cancer Ther* 2: 123-9.
- Ciocca DR, Rozados VR, Cuello Carrion FD, Gervasoni SI, Matar P, Scharovsky OG. 2003. Hsp25 and Hsp70 in rodent tumors treated with doxorubicin and lovastatin. *Cell Stress Chaperones* 8: 26-36.
- Ciocca DR and Calderwood SK. 2005. Heat shock proteins in cancer: diagnostic, prognostic, predictive, and treatment implications. *Cell Stress Chaperones* 10: 86-103.
- Clayton A, Turkes A, Navabi H, Mason MD, Tabi Z. 2005. Induction of heat shock proteins in B-cell exosomes, *J. Cell Sci* 118: 3631–38.
- Cohen IR, Young DB. 1991. Autoimmunity, microbial immunity and the immunological homunculus. *Immunol Today* 2: 105 – 110.

## Zoznam použitej literatúry

- Cohen IR. 2002. Peptide therapy for Type I diabetes: the immunological homunculus and the rationale for vaccination. *Diabetologia* 45: 1468-74.
- Colaco CA, Bailey CR, Keeble J, Walker KB. 2004. BCG (Bacille Calmette-Guerin) HspCs (heat-shock protein-peptide complexes) induce T-helper 1 responses and protect against live challenge in a murine aerosol challenge model of pulmonary tuberculosis. *Biochem Soc Trans* 32: 626-8.
- Cruse I, Maines MD. 1988. Evidence suggesting that the two forms of heme oxygenase are the products of different genes. *J Biol Chem* 263:3348-3353.
- Daniels GA et al. 2004. A simple method to cure established tumors by inflammatory killing of normal cells. *Nat Biotechnol* 22: 1125-32.
- Daugaard M, Jaattela M, Rohde M. 2005. Hsp70-2 is required for tumor cell growth and survival. *Cell Cycle* 4: 877-80.
- Daugaard M, Rohde M, Jaattela M. 2007. The heat shock protein 70 family: Highly homologous proteins with overlapping and distinct functions. *FEBS Lett* 581: 3702-10.
- Deininger M, Goldman J, Melo J. 2000. The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood* 96:3343-3356.
- DeBoer C, Meulman PA, Wnuk RJ, Peterson DH. 1970. Geldanamycin, a new antibiotic. *J Antibiot* 23: 442-7.
- De Candia P, Solit DB, Giri D, Brogi E, Siegel PM, Olshen AB, Muller WJ, Rosen N, Benezra R. 2003. Angiogenesis impairment in Id-deficient mice cooperates with an Hsp90 inhibitor to completely suppress HER2/neu-dependent breast tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 12337-42.
- De Graeff-Meeder ER, Voorhorst M, van Eden W, Schuurman HJ, Huber J, Barkley D, Maini RN, Kuis W, Rijkers GT, Zegers BJ. 1990. Antibodies to the mycobacterial 65-kd heat-shock protein are reactive with synovial tissue of adjuvant arthritic rats and patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Am J Pathol* 137: 1013-7.
- De Graeff-Meeder ER, van der Zee R, Rijkers GT, Schuurman HJ, Kuis W, Bijlsma JW, Zegers BJ, van Eden W. 1991. Recognition of human 60 kD heat shock protein by mononuclear cells from patients with juvenile chronic arthritis. *Lancet* 337: 1368-72.
- De Graeff-Meeder ER, Rijkers GT, Voorhorst-Ogink MM, Kuis W, van der Zee R et al. 1993. Antibodies to human HSP60 in patients with juvenile chronic arthritis, diabetes mellitus, and cystic fibrosis. *Pediatr Res* 34: 424-8.
- De Kleer IM, Kamphuis SM, Rijkers GT, Scholtens L, Gordon G, De Jager W, Häfner R, van de Zee R, van Eden W, Kuis W, Prakken BJ. 2003. The spontaneous remission of juvenile idiopathic arthritis is characterized by CD30+ T cells directed



## Zoznam použitej literatúry

- to human heat-shock protein 60 capable of producing the regulatory cytokine interleukin-10. *Arthritis Rheum.* 48: 2001-10.
- De Kleer IM, Wedderburn LR, Taams LS, Patel A, Varsani H, Klein M, de Jager W, Pugayung G, Giannoni F, Rijkers G, Albani S, Kuis W, Prakken B. 2004. CD4+CD25bright regulatory T cells actively regulate inflammation in the joints of patients with the remitting form of juvenile idiopathic arthritis. *J Immunol.* 172: 6435-43.
- De Kleer I, Vastert B, Klein M, Teklenburg G, Arkesteijn G, Yung GP, Albani S, Kuis W, Wulffraat N, Prakken B. 2006. Autologous stem cell transplantation for autoimmunity induces immunologic self-tolerance by reprogramming autoreactive T cells and restoring the CD4+CD25+ immune regulatory network. *Blood* 107: 1696-702.
- Delneste Y, Magistrelli G, Gauchat J, Haeuw J, Aubry J et al. 2002. Involvement of LOX-1 in dendritic cell-mediated antigen cross-presentation. *Immunity* 17: 353-62.
- DeNagel DC and Pierce SK. 1992. A case for chaperones in antigen processing. *Immunol Today* 13: 86-9.
- Doody AD, Kovalchin JT, Mihalyo MA, Hagymasi AT, Drake CG et al. 2004. 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* 172: 6087-92.
- Dorman JS, Bunker CH. 2000. HLA-DQ locus of the human leukocyte antigen complex and type 1 diabetes mellitus: a HuGE review. *Epidemiol Rev* 22: 218-27.
- Duval A, Olaru D, Campos L, Flandrin P, Nadal N, Guyotat D. 2006. Expression and prognostic significance of heat-shock proteins in myelodysplastic syndromes. *Haematologica* 91: 713-4.
- Duverger O, Morange M. 2005. Heat shock protein 25 plays multiple roles during mouse skin development. *Cell Stress Chaperones* 10: 268-77.
- Dutta R, Inouye M. 2000. GHKL, an emergent ATPase/kinase superfamily. *Trends Biochem Sci* 25: 24-8.
- Easton DP, Kaneko Y, Subject JR. 2000. The hsp110 and Grp1 70 stress proteins: newly recognized relatives of the Hsp70s. *Cell Stress Chaperones* 5: 276-90
- Effros RB, Zhu X, Walford RL. 1994. Stress response of senescent T lymphocytes: reduced hsp70 is independent of the proliferative block. *J Gerontol* 49: B65-70.
- Effros RB, Zhu X, Walford RL. 1994. Stress response of senescent T lymphocytes: reduced hsp70 is independent of the proliferative block. *J Gerontol* 49: B65-70.
- Ehrnsperger M, Gräber S, Gaestel M, Buchner J. 1997. Binding of non-native protein to Hsp25 during heat shock creates a reservoir of folding intermediates for reactivation. *EMBO J* 15: 221-9.

## Zoznam použitej literatúry

- Elias D, Markovits D, Reshef T, van der Zee R, Cohen IR. 1990. Induction and therapy of autoimmune diabetes in the non-obese diabetic (NOD/Lt) mouse by a 65-kDa heat shock protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 87(4):1576-80.
- Elias D, Cohen IR. 1994. Peptide therapy for diabetes in NOD mice. *Lancet* 343:704-6.
- Fan CY, Lee S, Cyr DM. 2003. Mechanisms for regulation of Hsp70 function by Hsp40. *Cell Stress Chaperones* 8:309-16.
- Fargnoli J, Kunisada T, Fornace AJ Jr, Schneider EL, Holbrook NJ. 1990. Decreased expression of heat shock protein 70 mRNA and protein after heat treatment in cells of aged rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 846-50.
- Fenton WA, Kashi Y, Furtak K, Horwich AL. 1994. Residues in chaperonin GroEL required for polypeptide binding and release. *Nature* 371: 14-9.
- Ferraz JC, Stavropoulos E, Yang M, Coade S, Espitia C et al. 2004. A heterologous DNA priming-Mycobacterium bovis BCG boosting immunization strategy using mycobacterial Hsp70, Hsp65, and Apa antigens improves protection against tuberculosis in mice. *Infect Immun* 72: 6945-50.
- Ferrara JL. 1993. Cytokine dysregulation as a mechanism of graft versus host disease. *Curr Opin Immunol* 5: 794-9. Review.
- Ferrara JL, Levy R, Chao NJ. 1999. Pathophysiologic mechanisms of acute graft-vs.-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant* 5: 347-56. Review.
- Ferrara JL, Cooke KR, Teshima T. 2003. The pathophysiology of acute graft-versus-host disease. *Int J Hematol* 78:181-7. Review.
- Figueredo A, Ibarra JL, Rodriguez A, Molino AM, Gomez-de la Concha E, Fernandez-Cruz A, Patiño R. 1996. Increased serum levels of IgA antibodies to hsp70 protein in patients with diabetes mellitus: their relationship with vascular complications. *Clin Immunol Immunopathol*. 79: 252-5.
- Firestein G.S. 1997. Etiology rheumatoid arthritis. In: *Textbook of Rheumatology*. Kelley WN, Harris ED, Ruddy S, Sledge CB, Saunders WB eds., Comp. 5th edition Philadelphia 851-897.
- Fishel R, Lescoe MK, Rao MR, Copeland NG, Jenkins NA, Garber J, Kane M, Kolodner R. 1993. The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. *Cell* 75: 1027-38. Erratum in: *Cell*. 1994; 77: 167.
- Fishel R, Kolodner RD. 1995. Identification of mismatch repair genes and their role in the development of cancer. *Curr Opin Genet Dev* 5: 382-95.

## Zoznam použitej literatúry

- Flandrin P, Guyotat D, Duval A, Cornillon J, Tavernier E, Nadal N, Campos L. 2008. Significance of heat-shock protein (HSP: ) 90 expression in acute myeloid leukemia cells. *Cell Stress Chaperones* 13: 357-64.
- Freeman BC, Yamamoto KR. 2002. Disassembly of transcriptional regulatory complexes by molecular chaperones. *Science* 296: 2232-5.
- Fortin A, Raybaud-Diogène H, Têtu B, Huot J, Blondeau L, Landry J. 2001. Markers of neck failure in oral cavity and oropharyngeal carcinomas treated with radiotherapy. *Head Neck* 23: 87-93.
- Gabai VL, Meriin AB, Mosser DD, Caron AW, Rits S, Shifrin VI, Sherman MY. 1997. Hsp70 prevents activation of stress kinases. A novel pathway of cellular thermotolerance. *J Biol Chem* 272: 18033-18037.
- Gabai VL, Mabuchi K, Mosser DD, Sherman MY. 2002. Hsp72 and stress kinase c-jun N-terminal kinase regulate the bid-dependent pathway in tumor necrosis factor-induced apoptosis. *Mol Cell Biol* 22: 3415-24.
- Cardone MH, Roy N, Stennicke HR, Salvesen GS, Franke TF, Stanbridge E, Frisch S, Reed JC. 1998. Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science* 282:1318-21.
- Garnier C, Lafitte D, Tsvetkov PO, Barbier P, Leclerc-Devin J, Millot JM, Briand C, Makarov AA, Catelli MG, Peyrot V. 2002. Binding of ATP to heat shock protein 90: evidence for an ATP-binding site in the C-terminal domain. *J Biol Chem* 277: 12208-14.
- Garrido C, Mehlen P, Fromentin A, Hammann A, Assem M, Arrigo AP, Chauffert B. 1996. Inconstant association between 27-kDa heat-shock protein (Hsp27) content and doxorubicin resistance in human colon cancer cells. The doxorubicin-protecting effect of Hsp27. *Eur J Biochem* 237: 653-9.
- Garrido C, Fromentin A, Bonnotte B, Favre N, Moutet M, Arrigo AP, Mehlen P, Solary E. 1998. Heat shock protein 27 enhances the tumorigenicity of immunogenic rat colon carcinoma cell clones. *Cancer Res* 58: 5495-9.
- Garrido C. 2002. Size matters: of the small HSP27 and its large oligomers. *Cell Death Differ* 9: 483-5.
- Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H. 1984. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol* 133:1710-5.
- Georgopolis J, Welch WJ. 1993. Role of the major heat shock proteins as molecular chaperones. *Annu Rev Cell Biol* 9: 601 – 634.
- Gething MJ, Sambrook J. 1992. Protein folding in the cell. *Nature* 355: 33.

## Zoznam použitej literatúry

- Goetz MP, Toft DO, Ames MM, Erlichman C. 2003. The Hsp90 chaperone complex as a novel target for cancer therapy. *Ann Oncol* 14: 1169-76.
- Goetz MP, Toft D, Reid J, Ames M, Stensgard B, Safgren S, Adjei AA, Sloan J, Atherton P, Vasile V, Salazaar S, Adjei A, Croghan G, Erlichman C. 2005. Phase I trial of 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin in patients with advanced cancer. *J Clin Oncol* 23: 1078-87.
- Goral J, Mathews HL, Clancy JJr. 1995. Antibodies specific for the 70-kDa heat shock protein parallel the development of acute graft-versus-host disease in (DA x LEW)F1 rats. *Clin Immunol Immunopathol* 75: 147-53.
- Goral J, Mathews HL, Clancy JJr. 1998. Expression of 70-kDa heat-shock protein during acute graft-versus-host disease. *Clin Immunol Immunopathol* 86: 252-8.
- Goral J, Shenoy S, Mohanakumar T, Clancy JJr. 2002. Antibodies to 70 kD and 90 Kd heat shock proteins are associated with graft-versus-host disease in peripheral blood stem cell transplant recipients. *Clin Exp Immunol* 127: 553-9.
- Grammatikakis N, Vultur A, Ramana CV, Siganou A, Schweinfest CW. 2002. The role of Hsp90N, a new member of the Hsp90 family, in signal transduction and neoplastic transformation. *J Biol Chem* 277: 8312-20.
- Gray CC, Amrani M, Smolenski RT, Taylor GL, Yacoub MH. 2000. Age dependence of heat stress mediated cardioprotection. *Ann Thorac Surg* 70: 621-6.
- Gupta RS. 1995. Evolution of the chaperonin families (Hsp60, Hsp10 and Tcp-1) of proteins and the origin of eukaryotic cells. *Mol Microbiol* 15: 1-11.
- Guo F, Sigua C, Bali P, George P, Fiskus W, Scuto A, Annavarapu S, Mouttaki A, Sondarva G, Wei S, Wu J, Djeu J, Bhalla K. 2005. Mechanistic role of heat shock protein 70 in Bcr-Abl-mediated resistance to apoptosis in human acute leukemia cells. *Blood* 105: 1246-55.
- Guo JS, Chau JF, Shen XZ, Cho CH, Luk JM, Koo MW 2004. Over-expression of inducible heat shock protein 70 in the gastric mucosa of partially sleep-deprived rats. *Scand J Gastroenterol* 39: 510-5.
- Guo F, Sigua C, Bali P, George P, Fiskus W, Scuto A, Annavarapu S, Mouttaki A, Sondarva G, Wei S, Wu J, Djeu J, Bhalla K. 2005. Mechanistic role of heat shock protein 70 in Bcr-Abl-mediated resistance to apoptosis in human acute leukemia cells. *Blood* 105:1246-55.
- Guzhova I, Kislyakova K, Moskaliova O, Fridlanskaya I, Tytell M, Cheetham M et al. 2001. In vitro studies show that Hsp70 can be released by glia and that exogenous Hsp70 can enhance neuronal stress tolerance. *Brain Res* 914: 66-73.
- Jonak C, Klosner G, Trautinger F. 2006. Heat shock proteins in the skin. *Int J Cosmet Sci.* 28: 233-41.

## Zoznam použitej literatúry

- Habich C, Baumgart K, Kolb H, Burkart V. 2002. The receptor for heat shock protein 60 on macrophages is saturable, specific, and distinct from receptors for other heat shock proteins. *J Immunol* 168: 569-76.
- Habich C, Burkart V. 2007. Heat shock protein 60: regulatory role on innate immune cells. *Cell Mol Life Sci* 64: 742-51.
- Hakim FT, Mackall CL. The immune system: effector and target of graft-versus host disease. In: FERRARA JLM, DEEG HJ, BURAKOFF SJ, eds. *Graft-vs.-Host Disease*, 2nd edn. New York: Marcel Dekker, Inc., 1997: pp. 257-89.
- Hall DM, Xu L, Drake VJ, Oberley LW, Oberley TD et al. 2000. Aging reduces adaptive capacity and stress protein expression in the liver after heat stress. *J Appl Physiol* 89: 749-59.
- Hanahan D, Weinberg RA. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell* 100: 57-70. Review.
- Hansen JJ, Bross P, Westergaard M, Nielsen MN, Eiberg H et al. 2003. Genomic structure of the human mitochondrial chaperonin genes: HSP60 and HSP10 are localised head to head on chromosome 2 separated by a bidirectional promoter. *Hum Genet* 112: 71-7.
- Hantschel M, Pfister K, Jordan A, Scholz R, Andreesen R et al. 2000. Hsp70 plasma membrane expression on primary tumor biopsy material and bone marrow of leukemic patients. *Cell Stress Chaperones* 5: 438-42.
- Hartzheim LA and Goss GL. 1998. Rheumatoid arthritis: a case study. *Nurs Clin North Am* 33: 595-602.
- Haslbeck M. 2002. sHsps and their role in the chaperone network. *Cell Mol Life Sci* 59: 1649-57.
- Hauet-Broere F, Wieten L, Guichelaar T, Berlo S, R. van der Zee, Van Eden W. 2006. Heat shock proteins induce T cell regulation of chronic inflammation. *Ann Rheum Dis* 65: iii65– 68.
- Haug M, Dannecker L, Schepp CP, Kwok WW, Wernet D et al. 2005. The heat shock protein Hsp70 enhances antigen-specific proliferation of human CD4+ memory T cells. *Eur J Immunol* 35: 3163-72.
- Heydari AR, Conrad CC, Richardson A. 1995. Expression of heat shock genes in hepatocytes is affected by age and food restriction in rats. *J Nutr* 125: 410-8.
- Hickey E, Brandon SE, Potter R, Stein G, Stein J, Weber LA, 1986. Sequence and organization of genes encoding the human 27 kDa heat shock protein. *Nucleic Acids Res* 14:4127-45.
- Hightower LE, Guidon PT Jr. 1989. Selective release from cultured mammalian cells of heat-shock (stress) proteins that resemble glia-axon transfer proteins. *J Cell Physiol* 138:257-66.

## Zoznam použitej literatúry

- Hoang AT, Huang J, Rudra-Ganguly N, Zheng J, Powell WC et al. 2000. A novel association between the human heat shock transcription factor 1 (HSF1) and prostate adenocarcinoma. *Am J Pathol* 156: 857-864.
- Hogervorst EJ, Wagenaar JP, Boog CJ, van der Zee R, van Embden JD, van Eden W. 1992. Adjuvant arthritis and immunity to the mycobacterial 65 kDa heat shock protein. *Int Immunol* 4: 719-27.
- Holoshitz J, Matitau A, Cohen IR. 1984. Arthritis induced in rats by cloned T lymphocytes response to mycobacteria but not collagen type II. *J Clin Inv* 73: 211 – 215.
- Horvath L, Cervenak L, Oroszlan M, Prohaszka Z, Uray K et al. 2002. Antibodies against different epitopes of heat-shock protein 60 in children with type 1 diabetes mellitus. *Immunol Lett* 80: 155-62.
- Hur E, Kim HH, Choi SM, Kim JH, Yim S, Kwon HJ, Choi Y, Kim DK, Lee MO, Park H. 2002. Reduction of hypoxia-induced transcription through the repression of hypoxia-inducible factor-1alpha/aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator DNA binding by the 90-kDa heat-shock protein inhibitor radicicol. *Mol Pharmacol* 62: 975-82.
- Hsu AL, Murphy CT, Kenyon C. 2003. Regulation of aging and age-related disease by DAF-16 and heat-shock factor. *Science* 300: 1142-5.
- Ishii T, Udono H, Yamano T, Ohta H, Uenaka A, Ono T, Hizuta A, Tanaka N, Srivastava PK, Nakayama E. 1999. Isolation of MHC class I-restricted tumor antigen peptide and its precursors associated with heat shock proteins hsp70, hsp90, and gp96. *J Immunol* 162:1303-9.
- Itoh H, Komatsuda A, Ohtani H, Wakui H, Imai H, Sawada K, Otaka M, Ogura M, Suzuki A, Hamada F. 2002. Mammalian HSP60 is quickly sorted into the mitochondria under conditions of dehydration. *Eur J Biochem* 269: 5931-8.
- Jäättelä M, Wissing D, Kokholm K, Kallunki T, Egeblad M. 1998. Hsp70 exerts its anti-apoptotic function downstream of caspase-3-like proteases. *EMBO J* 17: 6124-34.
- Jäättelä M. 1999. Heat shock proteins as cellular lifeguards. *Ann Med* 31: 261-71.
- Janetzki S, Palla D, Rosenhauer V, Lochs H, Lewis JJ, Srivastava PK. 2000. Immunization of cancer patients with autologous cancer-derived heat shock protein gp96 preparations: a pilot study. *Int J Cancer* 88: 232-8.
- Jantschitsch C, Kindas-Mügge I, Metze D, Amann G, Micksche M, Trautinger F. 1998. Expression of the small heat shock protein HSP 27 in developing human skin. *Br J Dermatol* 139: 247-53.

## Zoznam použitej literatúry

- Jarvis M, Marzolini M, Wang XN, Jackson G, Sviland L et al. 2003. Heat shock protein 70: correlation of expression with degree of graft-versus-host response and clinical graft-versus-host disease. *Transplantation* 76: 849-53.
- Kamal A, Thao L, Sensintaffar J, Zhang L, Boehm MF, Fritz LC, Burrows FJ. 2003. A high-affinity conformation of Hsp90 confers tumour selectivity on Hsp90 inhibitors. *Nature* 425: 407-10.
- Kamal A, Boehm MF, Burrows FJ. 2004. Therapeutic and diagnostic implications of Hsp90 activation. *Trends Mol Med* 10: 283-90. Review.
- Kampinga HH, Kanon B, Salomons FA, Kabakov AE, Patterson C. 2003. Overexpression of the cochaperone CHIP enhances Hsp70-dependent folding activity in mammalian cells. *Mol Cell Biol* 23: 4948-4958.
- Kamphuis SSM, van Bilsen JHM, Haverkamp M. 2000. Identification of joint inflammation-specific T cell responses in juvenile idiopathic arthritis: Potential targets for immunotherapy. *Immunobiology* 203: 358-359.
- Kanelakis KC, Morishima Y, Dittmar KD, Galigniana MD, Takayama S, Reed JC, Pratt WB. 1999. Differential effects of the hsp70-binding protein BAG-1 on glucocorticoid receptor folding by the hsp90-based chaperone machinery. *J Biol Chem* 274: 34134-34140.
- Kaufmann SH. 1990. Heat shock proteins and the immune response. *Immunol Today* 11: 129-36.
- Kaufmann SHE, Schoel B. 1994. Heat shock proteins as antigens in immunity against infection and self, p. 495 – 531. In Morimoto RI, Tissieres A, Georgopoulos C (eds.) *The biology of heat shock proteins and molecular chaperones*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Spring Harbor, N. Y.
- Kaufman BA, Kolesar JE, Perlman PS, Butow RA. 2003. A function for the mitochondrial chaperonin Hsp60 in the structure and transmission of mitochondrial DNA nucleoids in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* 163: 457-61.
- Kappe G, Franck E, Verschuure P, Boelens WC, Leunissen JA, de Jong WW. 2003. The human genome encodes 10 a-crystallin-related small heat shock proteins: HspB1-10. *Cell Stress Chaperones* 8:53-61.
- Kawanishi K, Shiozaki H, Doki Y, Sakita I, Inoue M, Yano M, Tsujinaka T, Shamma A, Monden M. 1999. Prognostic significance of heat shock proteins 27 and 70 in patients with squamous cell carcinoma of the esophagus. *Cancer* 85: 1649-57.
- Kim J, Nueda A, Meng YH, Dynan WS, Mivechi NF. 1997. Analysis of the phosphorylation of human heat shock transcription factor-1 by MAP kinase family members. *J Cell Biochem.* 67:43-54.

## Zoznam použitej literatúry

- Kingston AE, Hicks CA, Colston MJ, Billingham ME. 1996. A 71-kD heat shock protein (hsp) from *Mycobacterium tuberculosis* has modulatory effects on experimental rat arthritis. *Clin Exp Immunol* 103: 77-82.
- Kita Y, Tanaka T, Yoshida S, Ohara N, Kaneda Y et al. 2005. Novel recombinant BCG and DNA-vaccination against tuberculosis in a cynomolgus monkey model. *Vaccine* 23: 2132-5.
- Knauf U, Newton EM, Kyriakis J, Kingston RE. 1996. Repression of human heat shock factor 1 activity at control temperature by phosphorylation. *Genes Dev* 10: 2782-93.
- Koll H, Guiard B, Rassow J, Ostermann J, Horwich A et al. 1992. Antifolding Activity of HSP60 Couples Protein Import into the Mitochondrial Matrix with Export to the Intermembrane Space. *Cell* 68: 1163-75.
- Krause SW, Gastpar R, Andreesen R, Gross C, Ullrich H et al. 2004. Treatment of colon and lung cancer patients with ex vivo heat shock protein 70-peptide-activated, autologous natural killer cells: a clinical phase I trial. *Clin Cancer Res* 10: 3699-707.
- Krejsek J, Kopecky O. 2004. *Klinická Immunologie*. Nucleus HK. Česká republika.
- Lamb JR, Bal V, Mendez-Samperio P, Mehlert A, So A et al. 1989. Stress proteins may provide a link between the immune response to infection and autoimmunity. *Int Immunol* 1: 191-6.
- Landry J, Lambert H, Zhou M, Lavoie JN, Hickey E, Weber LA, Anderson CW. 1992. Human HSP27 is phosphorylated at serines 78 and 82 by heat shock and mitogen-activated kinases that recognize the same amino acid motif as S6 kinase II. *J Biol Chem*. 1992 Jan 15;267(2):794-803.
- Langer T, Lu C, Echols H, Flanagan J, Hayer MK, Hartl FU. 1992. Successive action of DnaK, DnaJ and GroEL along the pathway of chaperone-mediated protein folding. *Nature* 356: 683-9.
- Lee YS, Marcu MG, Neckers L. 2004. Quantum chemical calculations and mutational analysis suggest heat shock protein 90 catalyzes trans-cis isomerization of geldanamycin. *Chem Biol* 11: 991-8.
- Lee-Yoon D, Easton D, Murawski M, Burd R, Subject JR. 1995. Identification of a major subfamily of large hsp70-like proteins through the cloning of the mammalian 110-kDa heat shock protein. *J Biol Chem* 270: 15725-33.
- Lehmann TA, Bennet WP, Metcalf RA. 1991. P53 mutations, ras mutations and p53-heat shock protein complexes in human lung carcinoma cell lines. *Cancer Res* 51: 4090-4096.
- Leonardi R, Pannone G, Magro G, Kudo Y, Takata T, Lo Muzio L. 2002. Differential expression of heat shock protein 27 in normal oral mucosa, oral epithelial dysplasia and squamous cell carcinoma. *Oncol Rep* 9: 261-6.



## Zoznam použitej literatúry

- Levere RD, Staudinger R, Loewy G, Kappas A, Shibahara S, Abraham NG. 1993. Elevated levels of heme oxygenase-1 activity and mRNA in peripheral blood adherent cells of acquired immunodeficiency syndrome patients. *Am J Hematol* 43:19-23.
- Lewis J, Devin A, Miller A, Lin Y, Rodriguez Y, Neckers L, Liu ZG. 2000. 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-kappaB activation. *J Biol Chem* 275: 10519-26.
- Li Z, Menoret A, Srivastava P. 2002. Roles of heat-shock proteins in antigen presentation and cross-presentation. *Curr Opin Immunol* 14: 45-51.
- Liberek K, Marszalek J, Ang D, Georgopoulos C, Zylicz M. 1991. Escherichia coli DnaJ and GrpE heat shock proteins jointly stimulate ATPase activity of DnaK. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:2874-8.
- Lindquist S and Craig EA. 1988. The heat-shock proteins. *Annu Rev Genet* 22: 631-77.
- Lindquist S. 1986. The heat shock response. *Ann Rev Biochem* 55: 1951– 91.
- Ling S, Li Z, Borschukova O, Xiao L, Pumpens P, Holoshitz J. 2007. The rheumatoid arthritis shared epitope increases cellular susceptibility to oxidative stress by antagonizing an adenosine-mediated anti-oxidative pathway. *Arthritis Res Ther* 9: R5.
- Luce MC and Cristofalo VJ. 1992. Reduction in heat shock gene expression correlates with increased thermosensitivity in senescent human fibroblasts. *Exp Cell Res* 202: 9-16.
- Maines MD. 1998. Heme oxygenase: function, multiplicity, regulatory mechanisms, and clinical applications. *FASEB J* 2:2557-2568.
- Mambula SS, Calderwood SK. 2006. Heat shock protein 70 is secreted from tumor cells by a nonclassical pathway involving lysosomal endosomes. *J Immunol* 177: 7849-57.
- Manjili MH, Henderson R, Wang XY, Chen X, Li Y et al. 2002. Development of a recombinant HSP110-HER-2/neu vaccine using the chaperoning properties of HSP110. *Cancer Res* 62: 1737-42.
- Martin CA, Carsons SE, Kowalewski R, Bernstein D, Valentino M et al. 2003. Aberrant extracellular and dendritic cell (DC) surface expression of Heat shock protein (hsp)70 in the rheumatoid joint: possible mechanisms of hsp/DC-mediated cross-priming. *J Immunol* 171: 5736-42.
- Maury S, Mary JY, Rabian C, et al. 2001. Prolonged immune deficiency following allogeneic stem cell transplantation: Risk factors and complications in adult patients. *Br J Haematol* 115: 630–641.

## Zoznam použitej literatúry

- Mese H, Sasaki A, Nakayama S, Yoshioka N, Yoshihama Y, Kishimoto K, Matsumura T. 2002. Prognostic significance of heat shock protein 27 (HSP27) in patients with oral squamous cell carcinoma. *Oncol Rep* 9: 341-4.
- Meyer P, Prodromou C, Hu B, Vaughan C, Roe SM, Panaretou B, Piper PW, Pearl LH. 2003. Structural and functional analysis of the middle segment of hsp90: implications for ATP hydrolysis and client protein and cochaperone interactions. *Mol Cell* 11: 647-58.
- Meyer P, Prodromou C, Liao C, Hu B, Mark Roe S, Vaughan CK, Vlastic I, Panaretou B, Piper PW, Pearl LH. 2004. Structural basis for recruitment of the ATPase activator Aha1 to the Hsp90 chaperone machinery. *EMBO J* 23: 511-9.
- Mehlen P, Schulze-Osthoff K, Arrigo AP. 1996. Small stress proteins as novel regulators of apoptosis. Heat shock protein 27 blocks Fas/APO-1- and staurosporine-induced cell death. *J Biol Chem* 271: 16510-4.
- Michalopoulou S, Micheva I, Karakantza M, Kouraklis-Symeonidis A, Mouzaki A, Zoumbos NC. 2006. Expression and inducibility of cytoprotective heat shock proteins in the bone marrow of patients with myelodysplastic syndrome: correlation with disease progression. *Haematologica* 91: 1714-6.
- Morimoto RI. 1998. Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators. *Genes Dev.* 12: 3788-96. Review.
- Morimoto RI, Jurivich DA, Kroeger PE, Mathur SK et al. 1994. Regulation of heat shock gene transcription by a family of heat shock factors. In *The Biology of Heat Shock Proteins and Molecular Chaperones* (Morimoto R, Tissières A, Georgopolous C., eds) pp. 417- 455, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, USA.
- Moro F, Fernandez-Saiz V, Slutsky O, Azem A, Muga A. 2005. Conformational properties of bacterial DnaK and yeast mitochondrial Hsp70. Role of the divergent C-terminal  $\alpha$ -helical subdomain. *FEBS J* 272: 3184-3196.
- Multhoff G, Botzler C, Jennen L, Schmidt J, Ellwart J, Issels R. 1997. Heat shock protein 72 on tumor cells: a recognition structure for natural killer cells. *J Immunol* 158: 4341-50.
- Multhoff G, Mizzen L, Winchester CC, Milner CM, Wenk S et al. 1999. Heat shock protein 70 (Hsp70) stimulates proliferation and cytolytic activity of natural killer cells. *Exp Hematol* 27: 1627-36.
- Multhoff G, Pfister K, Gehrman M, Hantschel M, Gross C et al. 2001. A 14-mer Hsp70 peptide stimulates natural killer (NK) cell activity. *Cell Stress Chaperones* 6: 337-44.
- Münster PN, Marchion DC, Basso AD, Rosen N. 2002. Degradation of HER2 by ansamycins induces growth arrest and apoptosis in cells with HER2 overexpression

## Zoznam použitej literatúry

- via a HER3, phosphatidylinositol 3'-kinase-AKT-dependent pathway. *Cancer Res* 62:3132-7.
- Murata S, Minami Y, Minami M, Chiba T, Tanaka K. 2001. CHIP is a chaperone-dependent E3 ligase that ubiquitylates unfolded protein. *EMBO Rep* 2: 1133-1138.
- Murphy PJ, Morishima Y, Kovacs JJ, Yao TP, Pratt WB. 2005. Regulation of the dynamics of hsp90 action on the glucocorticoid receptor by acetylation/deacetylation of the chaperone. *J Biol Chem* 280: 33792-9.
- Muzio L, Leonardi R, Mariggiò MA, Mignogna MD, Rubini C, Vinella A, Pannone G, Giannetti L, Serpico R, Testa NF, De Rosa G, Staibano S. 2004. HSP 27 as possible prognostic factor in patients with oral squamous cell carcinoma. *Histol Histopathol* 19: 119-28.
- Mycko MP, Cwiklinska H, Szymanski J, Szymanska B, Kudla G et al. 2004. Inducible heat shock protein 70 promotes myelin autoantigen presentation by the HLA class II. *J Immunol* 172: 202-13.
- Neckers L. 2002. Hsp90 inhibitors as novel cancer chemotherapeutic agents. *Trends Mol Med* 8 (4 Suppl):S55-61. Review.
- Neckers L, Ivy SP. 2003 -1. Heat shock protein 90. *Curr Opin Oncol* 15: 419-24.
- Neckers L, Lee YS. 2003-2. Cancer: the rules of attraction. *Nature* 425: 357-9.
- Neckers L, Neckers K. 2005. Heat-shock protein 90 inhibitors as novel cancer chemotherapeutics - an update. *Expert Opin Emerg Drugs* 10: 137-49. Review.
- Neckers L. 2007. Heat shock protein 90: the cancer chaperone. *J Bioscib* 32: 517-30.
- Nimmanapalli R, O'Bryan E, Huang M. 2002. Molecular characterization and sensitivity of STI-571(imatinib mesylate, Gleevec)-resistant, Bcr- Abl-positive, human acute leukemia cells retain sensitivity to SRC kinase inhibitor PD180970 and 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin (17-AAG). *Cancer Res* 62: 5761-5769.
- Nimmanapalli R, Bhalla K. 2002-2. Mechanisms of resistance to imatinib mesylate in Bcr-Abl-positive leukemias. *Curr Opin Oncol* 4: 616-20. Review.
- Nitta Y, Abe K, Aoki M, Ohno I, Itoyama S. 1994. Diminished heat shock protein 70 mRNA induction in aged rat hearts after ischemia. *Am J Physiol* 267: H1795-803.
- Noessner E et al. 2002. Tumor-derived heat shock protein 70 peptide complexes are cross-presented by human dendritic cells. *J Immunol* 169: 5424-32.
- Nonoguchi K, Itoh K, Xue JH, Tokuchi H, Nishiyama H. 1999. Cloning of human cDNAs for Apg-1 and Apg-2, members of the Hsp110 family, and chromosomal assignment of their genes. *Gene* 237: 21-8.

## Zoznam použitej literatúry

- Nylandsted J, Brand K, Jaattela M. 2000-1. Heat shock protein 70 is required for the survival of cancer cells. *Ann N Y Acad Sci* 926: 122-5.
- Nylandsted J, Rohde M, Brand K, Bastholm L, Elling F, Jaattela M. 2000-2. 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 U S A* 97: 7871-6.
- Nylandsted J, Gyrd-Hansen M, Danielewicz A, Fehrenbacher N, Lademann U, Høyer-Hansen M, Weber E, Multhoff G, Rohde M, Jäättelä M. 2004. Heat shock protein 70 promotes cell survival by inhibiting lysosomal membrane permeabilization. *J Exp Med* 200: 425-35.
- Oh HJ, Easton D, Murawski M, Kaneko Y, Subject JR. 1999. The chaperoning activity of hsp110. Identification of functional domains by use of targeted deletions. *J Biol Chem* 274: 15712-8.
- Omazic B, Hentschke P, Nasman-Bjork I, et al. 2005. Reconstitution of the Ig heavy chain CDR3 repertoire after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation with myeloablative or reduced-intensity conditioning regimens. *Scand J Immunol* 61: 72-81.
- Ó Nualláin EM, Monaghan H, Reen DJ. 1993. Antibody response of restricted isotype to heat shock proteins in juvenile chronic arthritis. *Scand J Immunol* 38: 83 – 88.
- Ozawa K, Murakami Y, Eki T, Soeda E, Yokoyama K. 1992. Mapping of the gene family for human heat-shock protein 90 alpha to chromosomes 1, 4, 11, and 14. *Genomics* 12: 214-20.
- Ozawa Y, Kasuga A, Nomaguchi H, Maruyama T, Kasatani T et al. 1996. Detection of autoantibodies to the pancreatic islet heat shock protein 60 in insulin-dependent diabetes mellitus. *J Autoimmun* 9: 517-24.
- Pahlavani MA, Harris MD, Moore SA, Weindruch R, Richardson A. 1995. The expression of heat shock protein 70 decreases with age in lymphocytes from rats and rhesus monkeys. *Exp Cell Res* 218: 310-8.
- Pandey P, Farber R, Nakazawa A, Kumar S, Bharti A, Nalin C, Weichselbaum R, Kufe D, Kharbanda S. 2000. Hsp27 functions as a negative regulator of cytochrome c-dependent activation of procaspase-3. *Oncogene* 19: 1975-1981.
- Pandey P, Saleh A, Nakazawa A, Kumar S, Srinivasula SM, Kumar V, Weichselbaum R, Nalin C, Alnemri ES, Kufe D, Kharbanda S. 2000 -2. Negative regulation of cytochrome c-mediated oligomerization of Apaf-1 and activation of procaspase-9 by heat shock protein 90. *EMBO J* 19:4310-22.
- Panjwani N, Akbari O, Garcia S, Brazil M, Stockinger B. 1999. The HSC73 molecular chaperone: involvement in MHC class II antigen presentation. *J Immunol* 163: 1936-42.

## Zoznam použitej literatúry

- Panjwani NN, Popova L, Srivastava PK. 2002. Heat shock proteins gp96 and hsp70 activate the release of nitric oxide by APCs. *J Immunol* 168: 2997-3003.
- Park HS, Lee JS, Huh SH, Seo JS, Choi EJ. 2001. Hsp72 functions as a natural inhibitory protein of c-Jun N-terminal kinase. *EMBO J* 20: 446-456.
- Park HS, Cho SG, Kim CK, Hwang HS, Noh KT, Kim MS, Huh SH, Kim MJ, Ryoo K, Kim EK, Kang WJ, Lee JS, Seo JS, Ko YG, Kim S, Choi EJ. 2002. Heat shock protein hsp72 is a negative regulator of apoptosis signal-regulating kinase 1. *Mol Cell Biol* 22: 7721-7730.
- Paul C, Manero F, Gonin S, Kretz-Remy C, Viroit S, Arrigo AP. 2002. Hsp27 as negative regulator of cytochrome C release. *Mol Cell Biol* 22: 816-834.
- Pavelka K, Rovenky J. 2003. *Klinická revmatologie*. Galen. Česká republika
- Petty RE. 2001. Growing pains: the ILAR classification of juvenile idiopathic arthritis. *J Rheumatol* 28:927-8.
- Pinder SE, Balsitis M, Ellis IO, Landon M, Mayer RJ, Lowe J. 1994. The expression of alpha B-crystallin in epithelial tumours: a useful tumour marker? *J Pathol* 174: 209-15.
- Pirkkala L, Nykänen P, Sistonen L. 2001. Roles of the heat shock transcription factors in regulation of the heat shock response and beyond. *FASEB J* 15: 1118-31.
- Pockley AG, Shepherd J, Corton JM. 1998. Detection of heat shock protein 70 (Hsp70) and anti-Hsp70 antibodies in the serum of normal individuals. *Immunol Invest* 27: 367-77.
- Pockley AG, Bulmer J, Hanks BM, Wright BH. 1999. Identification of human heat shock protein 60 (Hsp60) and anti-Hsp60 antibodies in the peripheral circulation of normal individuals. *Cell Stress Chaperones* 4: 29-35.
- Pockley AG. 2001. Heat shock proteins in health and disease: therapeutic targets or therapeutic agents? *Expert Rev Mol Med* 21: 1-21.
- Pockley AG, Georgiades A, Thulin T, de Faire U, Frostegard J. 2003. Serum heat shock protein 70 levels predict the development of atherosclerosis in subjects with established hypertension. *Hypertension* 42: 235-8.
- Prakken B, Kuis W, van Eden W. 2002. Heat shock proteins in juvenile chronic arthritis: Keys for understanding remitting arthritis and candidate antigens for immune therapy. *Current Rheumatology Reports* 4: 466- 473.
- Prakken BJ, Samodal R, Le TD, Giannoni F, Yung GP et al. 2004. Epitope-specific immunotherapy induces immune deviation of proinflammatory T cells in rheumatoid arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 4228-33.

## Zoznam použitej literatúry

- Prodromou C, Roe SM, O'Brien R, Ladbury JE, Piper PW et al. 1997. Identification and structural characterization of the ATP/ADP-binding site in the Hsp90 molecular chaperone. *Cell* 90: 65-75.
- Prodromou C, Pearl LH. 2003. Structure and functional relationships of Hsp90. *Curr Cancer Drug Targets* 3: 301-23.
- Rane MJ, Pan Y, Singh S, Powell DW, Wu R, Cummins T, Chen Q, McLeish KR, Klein JB. 2003. Heat shock protein 27 controls apoptosis by regulating Akt activation. *J Biol Chem* 278: 27828-27835.
- Ranford JC, Coates AR, Henderson B. 2000. Chaperonins are cell-signalling proteins: the unfolding biology of molecular chaperones. *Expert Rev Mol Med* 2000: 1-17.
- Raska M, Weigl E. 2005. Heat shock proteins in autoimmune diseases. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 149: 243-9.
- Ravelli A and Martini A. 2007. Juvenile idiopathic arthritis. *Lancet* 369: 767-78.
- Raz I, Elias D, Avron A, Tamir M, Metzger M, Cohen IR. 2001. Beta-cell function in new-onset type 1 diabetes and immunomodulation with a heat-shock protein peptide (DiaPep277): a randomised, double-blind, phase II trial. *Lancet* 358:1749-53.
- Rea IM, McNerlan S, Pockley AG. 2001. Serum heat shock protein and anti-heat shock protein antibody levels in aging. *Exp Gerontol* 36: 341-52.
- Ritossa, FA. 1962. A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia* 18: 571-3.
- Rivoltini L, Castelli C, and Carrabba M. et al. 2003. Human tumor-derived heat shock protein 96 mediates in vitro activation and in vivo expansion of melanoma- and colon carcinoma-specific T cells. *J Immunol* 171: 3467-74.
- Robinson MB, Tidwell JL, Gould T, Taylor AR, Newbern JM et al. 2005. Extracellular heat shock protein 70: a critical component for motoneuron survival, *J. Neurosci* 25: 9735-45.
- Rohde M, Dugaard M, Jensen MH, Helin K, Nylandsted J, Jaattela M. 2005. Members of the heatshock protein 70 family promote cancer cell growth by distinct mechanisms. *Genes Dev* 19: 570-582.
- Rotenberg MO, Maines MD. 1990. Isolation, characterization and expression in *Escherichia coli* of a cDNA encoding rat heme oxygenase-2. *J Biol Chem* 265: 7501-7506.
- Qin HY, Mahon JL, Atkinson MA, Chaturvedi P, Lee-Chan E, Singh B. 2003. Type 1 diabetes alters anti-hsp90 autoantibody isotype. *J Autoimmun* 20:237-45.
- Quintana FJ, Carmi P, Mor F, Cohen IR. 2004. Inhibition of adjuvant-induced arthritis by DNA vaccination with the 70-kd or the 90-kd human heat-shock protein:

## Zoznam použitej literatúry

- immune cross-regulation with the 60-kd heat-shock protein. *Arthritis Rheum* 50: 3712-20.
- Sakahira H, Nagata S. 2002. Co-translational folding of caspase-activated DNase with Hsp70, Hsp40, and inhibitor of caspase-activated DNase. *J Biol Chem* 277: 3364-70.
- Sato S, Fujita N, Tsuruo T. 2000. Modulation of Akt kinase activity by binding to Hsp90. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 10832-7.
- Schild H, Arnold-Schild D, Lammert E, Rammensee HG. 1999. Stress proteins and immunity mediated by cytotoxic T lymphocytes. *Curr Opin Immunol* 11: 109-13. Review.
- Schmitt E, Gehrman M, Brunet M, Multhoff G, Garrido C. 2007. Intracellular and extracellular functions of heat shock proteins: repercussions in cancer therapy. *J Leukoc Biol* 81: 15-27.
- Schoel B, Kaufmann SHE. 1991. The unique role of heat shock proteins in infections, p. 27 – 53. *In* van Eden W, Young DB. (eds.), *Stress proteins in medicine*. Marcel Dekker Inc., New York, N.Y.
- Schuller DJ, Wilks A, Ortiz de Montellano PR, Poulos TL. 1999. Crystal structure of human heme oxygenase-1. *Nature Structural Biology* 6, 860 – 867.
- Segal BH, Wang XY, Dennis CG, Youn R, Repasky EA, Manjili MH, Subjeck JR. 2006. Heat shock proteins as vaccine adjuvants in infections and cancer. *Drug Discov Today* 11: 534-40. Review.
- SenGupta D, Norris PJ, Suscovich TJ, Hassan-Zahraee M, Moffett HF et al. 2004. Heat shock protein-mediated cross-presentation of exogenous HIV antigen on HLA class I and class II. *J Immunol* : 1987-93.
- Shawkatova I, Fazekasova H, Michalkova D, Martinka E. 2000. Association of type I diabetes mellitus with HLA alleles Bratisl Lek Listy 101:624-5.
- Shelton DN, Chang E, Whittier PS, Choi D, Funk WD. 1999. Microarray analysis of replicative senescence. *Curr Biol* 9: 939-45.
- Shi Y, Thomas JO. 1992. The transport of proteins into the nucleus requires the 70-kilodalton heat shock protein or its cytosolic cognate. *Mol Cell Biol* 12:2186-92.
- Shibahara S, Moller RM, Taguchi H. 1987. Transcriptional control of rat heme oxygenase by heat shock. *J Biol Chem* 262:12889-12892.
- Shinnick TM. 1991. Heat shock proteins as antigens of bacterial and parasitic pathogens. *Curr Top Microbiol Immunol* 167: 145 – 160.

## Zoznam použitej literatúry

- Singh-Jasuja H, Toes RE, Spee P, Munz C, Hilf N et al. 2000-1. Cross-presentation of glycoprotein 96-associated antigens on major histocompatibility complex class I molecules requires receptor-mediated endocytosis. *J Exp Med* 191: 1965-74.
- Singh-Jasuja H, Scherer HU, Hilf N, Arnold-Schild D, Rammensee HG et al. 2000- 2. The heat shock protein gp96 induces maturation of dendritic cells and downregulation of its receptor. *Eur J Immunol* 30: 2211-5.
- Small TN, Keever CA, Weiner-Fedus S, Heller G, O'Reilly RJ, Flomenberg N. 1990. B cell differentiation following autologous, conventional, or T-cell depleted bone marrow transplantation: Recapitulation of B-cell ontogeny. *Blood* 76: 1647–1656.
- Söti C, Nagy E, Giricz Z, Víggh L, Csermely P, Ferdinandy P. 2005. Heat shock proteins as emerging therapeutic targets. *Br J Pharmacol* 146: 769-80.
- Srivastava PK, Menoret A, Basu S, Binder RJ, McQuade KL. 1998. Heat shock proteins come of age: primitive functions acquire new roles in an adaptive world. *Immunity* 8: 657- 65. Review.
- Srivastava PK. 2000. Heat shock protein-based novel immunotherapies. *Drug News Perspect.* 13: 517-22.
- Srivastava PK and Amato RJ. 2001. Heat shock proteins: the 'Swiss Army Knife' vaccines against cancers and infectious agents. *Vaccine* 19: 2590-7.
- Srivastava P. 2002. Interaction of heat shock proteins with peptides and antigen presenting cells: chaperoning of the innate and adaptive immune responses. *Annu Rev Immuno* : 395-425.
- Stankiewicz AR, Lachapelle G, Foo CP, Radicioni SM, Mosser DD. 2005. Hsp70 inhibits heatinduced apoptosis upstream of mitochondria by preventing Bax translocation. *J Biol Chem* 280: 38729-38739.
- Steiner K, Graf M, Hecht K, Reif S, Rossbacher L. 2006. High HSP70-membrane expression on leukemic cells from patients with acute myeloid leukemia is associated with worse prognosis. *Leukemia* 20: 2076-9.
- Stocker R, Yamamoto Y, McDonagh AF, Glazer AN, Ames BN. 1987. Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. *Science* 235:1043- 1046.
- Stokoe D, Engel K, Campbell DG, Cohen P, Gaestel M.1992. Identification of MAPKAP kinase 2 as a major enzyme responsible for the phosphorylation of the small mammalian heat shock proteins. *FEBS Lett* 313: 307-313.
- Storek J, Ferrara S, Ku N, Giorgi JV, Champlin RE, Saxon A. 1993. B cell reconstitution after human bone marrow transplantation: Recapitulation of ontogeny? *Bone Marrow Transplant* 12: 387–398.
- Suto R, Srivastava PK. 1995. A mechanism for the specific immunogenicity of heat shock protein-chaperoned peptides. *Science* 269: 1585-8.



## Zoznam použitej literatúry

- Takahashi I, Tanuma R, Hirata M, Hashimoto K. 1994. A cosmid clone at the D6S182 locus on human chromosome 6p12 contains the 90-kDa heat shock protein beta gene (HSP90 beta). *Mamm Genome* 5:121-2.
- Takahashi S, Mikami T, Watanabe Y, et al. 1994- 2. Correlation of heat shock protein 70 expression with estrogen receptor levels in invasive human breast cancer. *Am J Clin Pathol* 101: 519–525.
- Takayama S, Bimston DN, Matsuzawa S, Freeman BC, Aime-Sempe C, Xie Z, Morimoto RI, Reed JC. 1997. BAG-1 modulates the chaperone activity of Hsp70/Hsc70. *EMBO J* 6: 4887-4896.
- Tang D, Khaleque MA, Jones EL, Theriault JR, Li C, Wong WH, Stevenson MA, Calderwood SK. 2005. Expression of heat shock proteins and heat shock protein messenger ribonucleic acid in human prostate carcinoma in vitro and in tumors in vivo. *Cell Stress Chaperone* 10: 46-58.
- Tavaria M, Gabriele T, Kola I, Anderson RL. 1996. A hitchhiker's guide to the human Hsp70 family. *Cell Stress Chaperones* 1:23-28.
- Thijssen SFT, Schuurhuis GJ, van Oostveen JW, Ossenkoppele GJ. 1999. Chronic myeloid leukemia from basic to bedside. *Leukemia* 13: 1646- 1674.
- Thomas X, Campos L, Le QH, Guyotat D. 2005-1. Heat shock proteins and acute leukemias. *Hematology* 10: 225-35.
- Thomas X, Campos L, Mounier C, Cornillon J, Flandrin P et al. 2005-2. Expression of heat-shock proteins is associated with major adverse prognostic factors in acute myeloid leukemia. *Leuk Res* 29: 1049-58.
- Thompson CB. 1995. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 267: 1456-62. Review.
- Tissieres A, Mitchell HK, Tracy UM. 1974. Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: relation to chromosome puffs. *J Mol Biol* 84: 389-98.
- Tobian AA, Canaday DH, Harding CV. 2004. Bacterial heat shock proteins enhance class II MHC antigen processing and presentation of chaperoned peptides to CD4+ T cells. *J Immunol* 173: 5130-7.
- Todryk S, Melcher AA, Hardwick N, Linardakis E, Bateman A et al. 1999. Heat shock protein 70 induced during tumor cell killing induces Th1 cytokines and targets immature dendritic cell precursors to enhance antigen uptake, *J. Immunol* 163: 1398-1408.
- Trakshel GM, Maines MD. 1989. Multiplicity of heme oxygenase isozymes. HO-1 and HO-2 are different molecular species in rat and rabbit. *J Biol Chem* 264: 1323-1328.

## Zoznam použitej literatúry

- Trautinger F, Trautinger I, Kindas-Mügge I, Metze D, Luger TA. 1993. Human keratinocytes in vivo and in vitro constitutively express the 72-kD heat shock protein. *J Invest Dermatol* 101: 334-8.
- Trautinger F, Kindas-Mügge I, Dekrout B, Knobler RM, Metze D. 1995. Expression of the 27-kDa heat shock protein in human epidermis and in epidermal neoplasms: an immunohistological study. *Br J Dermatol* 133: 194-202.
- Ulmansky R, Cohen CJ, Szafer F, 2002. Resistance to adjuvant arthritis is due to protective antibodies against heat shock protein surface epitopes and the induction of IL10 secretion. *J Immunol* 168: 6463 – 6469.
- Vabulas RM, Ahmad-Nejad P, da Costa C, Miethke T, Kirschning CJ, Häcker H, Wagner H. 2001. 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* 276: 31332-9.
- Valbuena JR, Rassidakis GZ, Lin P, Atwell C, Georgakis GV et al. 2005. Expression of heat-shock protein-90 in non-Hodgkin's lymphomas. *Mod Pathol* 18: 1343-9.
- Van Eden W, Holoshitz J, Nevo Z, Frenkel A, Klajman A, Cohen IR. 1985. Arthritis induced by a T-lymphocyte clone that responds to *Mycobacterium tuberculosis* and to cartilage proteoglycans. *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 5117-20.
- Van Eden W, Thole JER, van der Zee R. 1988. Cloning of the mycobacterial epitope recognized by T lymphocytes in adjuvant arthritis. *Nature* 331: 171 – 173.
- Van Eden W, van der Zee R, Paul AG, Prakken BJ, Wendling U, Anderton SM, Wauben MH. 1998. Do heat shock proteins control the balance of T-cell regulation in inflammatory diseases? *Immunol Today* 19: 303-7. Review.
- Van Eden W. 2003. Heat shock proteins and inflammation. In Panayj GS, Corrigan VM, editors. *Heat shock proteins and rheumatoid arthritis*. Basel–Boston–Berlin: Birkhauser Verlag : 109–12.
- Van Eden W, van der Zee R, Prakken B. 2005. Heat-shock proteins induce T-cell regulation of chronic inflammation. *Nat Rev Immunol* 5: 318-30.
- Vaňásek J., Starý J., kavan P., Vaňásek J. jr. 1996. *Transplantace kostní dřeně*. Galén, Česká republika.
- Verma A, Hirsch DJ, Glatt CE, Ronnett GV, Snyder SH. 1993. Carbon monoxide: a putative neural messenger. *Science* 259:381-384.
- Vilenchik M, Solit D, Basso A, Huezio H, Lucas B, He H, Rosen N, Spampinato C, Modrich P, Chiosis G. 2004. Targeting wide-range oncogenic transformation via PU24FCl, a specific inhibitor of tumor Hsp90. *Chem Biol* 11: 787 – 97.

## Zoznam použitej literatúry

- Voellmy R. 1994. Transduction of the stress signal and mechanism of transcriptional regulation of heat shock/stress protein gene expression in higher eukaryotes. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 4, 357- 401.
- Wadhwa R, Yaguchi T, Hasan MK, Mitsui Y, Reddel RR, Kaul SC. 2002. Hsp70 family member, mot-2/mthsp70/GRP75, binds to the cytoplasmic sequestration domain of the p53 protein. *Exp Cell Res* 274: 246-53.
- Wang Y, Kelly CG, Karttunen JT, Whittall T, Lehner PJ et al. 2001. CD40 is a cellular receptor mediating mycobacterial heat shock protein 70 stimulation of CC-chemokines. *Immunity* 15: 971-83.
- Wang Y, Kelly CG, Singh M, McGowan EG, Carrara AS, Bergmeier LA, Lehner T. 2002. 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* 169: 2422-9.
- Wang Y, Theriault JR, He H, Gong J, Calderwood SK. 2004. Expression of a dominant negative heat shock factor-1 construct inhibits aneuploidy in prostate carcinoma cells. *Biol Chem* 279: 32651-9.
- Wasserfall CH, Atkinson MA. 2006. Autoantibody markers for the diagnosis and prediction of type 1 diabetes. *Autoimmun Rev* 5: 424-8.
- Wegele H, Muller L, Buchner J. 2004. Hsp70 and Hsp90-a relay team for protein folding. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 151:1-44.
- Weitgasser R, Lechleitner M, Koch T, Galvan G, Muhlmann J, Steiner K, Hoppichler F. 2003. Antibodies to heat-shock protein 65 and neopterin levels in patients with type 1 diabetes mellitus. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 111: 127-31.
- Wells AD, Malkovsky M. 2000. Heat shock proteins, tumor immunogenicity and antigen presentation: an integrated view. *Immunol Today* 21: 129-32. Review.
- Welsh MJ, Gaestel M. 1998. Small heat-shock protein family: function in health and disease. *Ann N Y Acad Sci.* 1998 Jun 30;851:28-35. Review.
- Whitesell L, Mimnaugh EG, De Costa B, Myers CE, Neckers LM. 1994. Inhibition of heat shock protein HSP90-pp60v-src heteroprotein complex formation by benzoquinone ansamycins: essential role for stress proteins in oncogenic transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91: 8324-8328.
- Whitesell L, Sutphin PD, Pulcini EJ, Martinez JD, Cook PH. 1998. The physical association of multiple molecular chaperone proteins with mutant p53 is altered by geldanamycin, an hsp90- binding agent. *Mol Cell Biol* 18: 1517-24.
- Whitesell L, Bagatell R, Falsey R. 2003. The stress response: implications for the clinical development of hsp90 inhibitors. *Curr Cancer Drug Targets* 3: 349-58.

## Zoznam použitej literatúry

- Whitesell L, Lindquist SL. 2005. HSP90 and the chaperoning of cancer. *Nat Rev Cancer* 5: 761-72.
- Wick G, Perschinka H, Millonig G. 2001. Atherosclerosis as an autoimmune disease: an update. *Trends Immunol* 22: 665-9. Review.
- Wick G, Knoflach M, Xu Q. 2004. Autoimmune and inflammatory mechanisms in atherosclerosis. *Annu Rev Immunol* 22: 361-403.
- Workman P. 2002. Pharmacogenomics in cancer drug discovery and development: inhibitors of the Hsp90 molecular chaperone. *Cancer Detect Prev* 26: 405-10.
- Workman P. 2003. Overview: translating Hsp90 biology into Hsp90 drugs. *Curr Cancer Drug Targets* 3: 297-300. Review.
- Workman P. 2004. Altered states: selectively drugging the Hsp90 cancer chaperone. *Trends Mol Med* 10: 47-51.
- Wu C, Clos J, Giorgi G, Haroun RI. 1994. Structure and regulation of heat shock transcription factor. In *The Biology of Heat Shock Proteins and Molecular Chaperones* (Morimoto R, Tissieres A, Georgopolous C., eds) pp. 395 - 416, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, USA.
- Xiao K, Liu W, Qu S, Sun H, Tang J. 1996. Study of heat shock protein HSP90 alpha, HSP70, HSP27 mRNA expression in human acute leukemia cells. *J Tongji Med Univ* 16: 212-6.
- Xu Y, Singer MA, Lindquist S. 1999. Maturation of the tyrosine kinase c-src as a kinase and as a substrate depends on the molecular chaperone Hsp90. *Proc Natl Acad Sci U S A* ;96: 109-14.
- Xu L, Chen S, Bergan RC. 2006. MAPKAPK2 and HSP27 are downstream effectors of p38 MAP kinase-mediated matrix metalloproteinase type 2 activation and cell invasion in human prostate cancer. *Oncogene* 25: 2987-98.
- Yokota SI, Hirata D, Minota S, Higashiyama T, Kurimoto M et al. 2000. Autoantibodies against chaperonin CCT in human sera with rheumatic autoimmune diseases: comparison with antibodies against other Hsp60 family proteins. *Cell Stress Chaperones* 5: 337-46.
- Zeiner M, Gebauer M, Gehring U. 1997. Mammalian protein RAP46: an interaction partner and modulator of 70 kDa heat shock proteins. *EMBO J* 16: 5483-5490.
- Zhang R, Luo D, Miao R, Bai L, Ge Q, Sessa WC, Min W. 2005. Hsp90-Akt phosphorylates ASK1 and inhibits ASK1-mediated apoptosis. *Oncogene* 24: 3954-63.
- Zhu J, Quyyumi AA, Wu H, Csako G, Rott D et al. 2003. Increased serum levels of heat shock protein 70 are associated with low risk of coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23: 1055-9.

## Zoznam použitej literatúry

Zhu X, Zhao X, Burkholder WF, Gragerov A, Ogata CM, Gottesman ME, Hendrickson WA. 1996. Structural analysis of substrate binding by the molecular chaperone DnaK. *Science* 272: 1606-1614.

Zügel U, Kaufmann SHE. 1999. Role of Heat shock proteins in protection from and pathogenesis of infectious diseases. *Clinical Microbiology reviews* 12: 19 – 39.

Zügel U, Kaufmann SH. 1999-2. Immune response against heat shock proteins in infectious diseases. *Immunobiology* 201: 22-35. Review.

Zügel U, Sponaas AM, Neckermann J, Schoel B, Kaufmann SH. 2001. gp96-peptide vaccination of mice against intracellular bacteria. *Infect Immun.* 69 :4164-7.

## XI. Zoznam publikácií

1. Lechin F, van der Dijs B, Lechin AE, Multhoff G, Pfister K, Hromadnikova I, **Zlacka D**. Natural killer cells activity and neuroimmunological treatment of cancer. *Clin Cancer Res*. 2004;10: 8120; author reply 8120-1. **IF = 5.623**
2. **Zlacka D**, Sedlacek P, Prucha M, Hromadnikova I. Antibodies to 60, 65 and 70 kDa heat shock proteins in pediatric allogeneic stem cell transplant recipients. *Pediatr Transplantation* 2006; 10: 794–804. **IF = 2.004**
3. Nguyen TTH, **Zlacka D**, Vavrincova P, Sedlacek P, Hromadnikova I. Detection of antibodies against 60-, 65- and 70-kDa heat shock proteins in paediatric patients with various disorder using Western blotting and ELISA. *Clin Chem Lab Med* 2006; 44: 44 –9. **IF = 1.72**
4. **Zlacka D**, Vavrincova P, Hien Nguyen TT, Hromadnikova I. Frequency of anti-hsp60, -65 and -70 antibodies in sera of patients with juvenile idiopathic arthritis. *J Autoimmun* 2006; 27: 81-8. **IF = 2.15**
5. Nguyen TT, Gehrman M, **Zlacka D**, Sosna A, Vavrincova P, Multhoff G, Hromadnikova I Heat shock protein 70 membrane expression on fibroblast-like synovial cells derived from synovial tissue of patients with rheumatoid and juvenile idiopathic arthritis. *Scand J Rheumatol* 2006;35 :447-53. **IF = 2.27**
6. **Zlacka D**, Velek J, Vavrincova P, Hromadnikova I. Antibodies against M. Bovis 65 KDa heat shock protein and its P180-188 epitope in sera of patients with juvenile idiopathic arthritis. *IJBS* 2007; 3: 188-93. **Čaká na pridelenie IF**
7. Hromadnikova I, Nguyen TTH, **Zlacka D**, Sedlackova L, Popelka S, Veigl D, Pech J, Vavrincova P, Sosna A Expression of heat shock protein (HSP) receptors on fibroblast-like synovial cells derived from rheumatoid arthritis - affected joints. *Rheumatol Int*. 2008; 28: 837-44. **IF (2007) = 1. 27**

8. Hromadnikova I, **Zlacka D**, Hien Nguyen TT, Sedlackova L, Zejskova L, Sosna A. Fetal cells of mesenchymal origin in cultures derived from synovial tissue and skin of patients with rheumatoid arthritis. *Joint Bone Spine* 2008. **IF (2007) = 1.659**
  
9. Sedlackova L, Nguyen TT, **Zlacka D**, Sosna A, Hromadnikova I. Cell surface and relative mRNA expression of heat shock protein 70 in human synovial cells. *Autoimmunity*. 2008. **IF (2007) = 2.88**

Prílohy

## **XII. Prílohy**