

Πρωτεΐνες δερμικού shock

Καπράνος Ν., Κομηνέα Α.

Οι πρωτεΐνες δερμικού shock (*heat shock proteins, Hsp*) αποτελούν μια οικογένεια πρωτεϊνών, η λειτουργία των οποίων είναι να προστατεύουν τα κύτταρα από περιβαλλοντικά ή παθοφυσιολογικά ερεθίσματα, ούτως ώστε να επιβιώνουν σε καταστάσεις ανάγκης και να επανακτούν τη φυσιολογική τους λειτουργικότητα. Εκτός από τα δερμικά ερεθίσματα, η σύνδεση των *Hsp* επάγεται και από άλλα αίτια, όπως η ακτινοβολία, τα χημειοθεραπευτικά φάρμακα, τα βαρέα μέταλλα και παράγωγα αμινοξέων. Ιογενείς ή μικροβιακές λοιμώξεις και καταστάσεις ανοξίας ή έλλειψης γλυκόζης διεγείρουν επίσης την παραγωγή των *Hsp*. Ορισμένες από τις πρωτεΐνες δερμικού shock σχετίζονται με την εμβρυϊκή ανάπτυξη και διαφοροποίηση και εκφράζονται επιλεκτικά σε διάφορες φάσεις του κυτταρικού κύκλου κάτω από τη ρυθμιστική δράση ορμονών και αυξητικών παραγόντων. Ιδιαίτερα σημαντική θεωρείται η συμβολή των *Hsp* στο σχηματισμό τρισδιάστατης δόμησης και στην ενδοκυττάρια μεταφορά διαφόρων πολυπεπτιδικών συμπλεγμάτων, καθώς και στη λειτουργικότητα των υποδοχέων στεροειδών ορμονών. Οι πρωτεΐνες *Hsp* ταξινομούνται σύμφωνα με το μοριακό τους βάρος σε έξι ομάδες: *Hsp27*, *Hsp40*, *Hsp60*, *Hsp70*, *Hsp90* και *Hsp100*. Ορισμένες από τις πρωτεΐνες αυτές παράγονται σε σταθερά επίπεδα ενώ άλλες παράγονται αποκλειστικά ή σε αυξημένα επίπεδα σε καταστάσεις ανάγκης, ανάλογα με τον τύπο του κυττάρου και το είδος του ερεθίσματος. Η ρύθμιση της μεταγραφής των γονιδίων των *Hsp* επιτυγχάνεται με τη βοήθεια ειδικών παραγόντων ελέγχου μεταγραφής επί δερμικού shock (*HSF*), οι οποίοι αλληλεπιδρούν με μια καλά διατηρούμενη περιοχή ελέγχου μεταγραφής των γονιδίων των *HSP*, η οποία περιλαμβάνει πολλαπλά αντίγραφα της αλληλουχίας *AGAA*. Οι πρωτεΐνες *Hsp27* και *Hsp70* σχετίζονται με την παρουσία των υποδοχέων οιστρογόνων και προγεστερόνης σε καρκινώματα μαστού και φαίνεται να έχουν αρνητική προγνωστική σημασία σε αυτά με αρνητικούς μασχαλιαίους λεμφαδένες. Σε μελέτες ανδρώπινων όγκων αλλά και κυτταρικών σειρών έχει βρεθεί ότι οι πρωτεΐνες της ομάδας *Hsp27* και σε μικρότερο βαθμό της ομάδας *Hsp70* έχουν σημασία για την ανταπόκριση σε ορισμένα εκ των χημειοθεραπευτικών φαρμάκων. Οι πρωτεΐνες *Hsp* διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ανοσολογική απάντηση σε όγκους και εμπλέκονται στους προστατευτικούς μηχανισμούς των κυττάρων σε ισχαιμικές και φλεγ-

μονώδεις καταστάσεις. Στο άρθρο αυτό ανασκοπούνται οι λειτουργίες και οι μηχανισμοί ρύθμισης των διαφόρων ομάδων Hsp καθώς και η σημασία τους σε διάφορες κλινικές καταστάσεις.

Λέξεις κλειδιά: Πρωτεΐνες δερμικού shock, Hsp, HSF, δερμοαντοχή, προγνωστικός παράγοντας νεοπλασμάτων, ισχαιμική βλάβη, φαρμακευτική αντίσταση

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι πρωτεΐνες δερμικού shock (heat shock proteins, Hsp) αποτελούν μια οικογένεια πρωτεϊνών, η λειτουργία των οποίων είναι να προστατεύουν τα κύτταρα από περιβαλλοντικά ή παθοφυσιολογικά ερεθίσματα. Οι πρωτεΐνες αυτές, με μηχανισμό που δεν έχει πλήρως διεκρινισθεί, επιτρέπουν στα κύτταρα να επιβιώνουν σε καταστάσεις ανάγκης και να επανακτούν τη φυσιολογική τους λειτουργικότητα. Οι πρώτες παρατηρήσεις σχετικά με την αντίδραση των κυττάρων σε δερμικά ερεθίσματα έγιναν το 1962 από τον Ritossa¹, ο οποίος περιέγραψε το σχηματισμό χρωμοσωμικών διογκώσεων (chromosome puffs) σε κύτταρα σιελόγλουτου αδένο της μύγας των φρούτων *Drosophila bucksi* μετά από επίδραση αυξημένης θερμοκρασίας, σαλικυλικού νατρίου ή δινιτροφαινόλης. Το 1973 οι Tissieres και συν² ανακάλυψαν ότι ταυτόχρονα με τις χρωμοσωμικές διογκώσεις παρατηρείτο σύνδεση μιας ομάδας πρωτεϊνών, τις οποίες ονόμασαν για πρώτη φορά πρωτεΐνες δερμικού shock. Εκτός από τα δερμικά ερεθίσματα η σύνδεση των Hsp επάγεται και από άλλα αίτια όπως η ακτινοβολία, τα χημειοθεραπευτικά φάρμακα, τα βαρέα μέταλλα και παράγωγα αμινοξέων. Παρόμοια επίδραση παρατηρείται και από ιογενείς ή μικροβιακές λοιμώξεις και καταστάσεις ανοξίας ή έλλειψης γλυκόζης. Επιπροσθέτως ορισμένες από τις πρωτεΐνες δερμικού shock σχετίζονται με την εμβρυϊκή ανάπτυξη και διαφοροποίηση και εκφράζονται επιλεκτικά σε διάφορες φάσεις του κυτταρικού κύκλου κάτω από τη ρυθμιστική δράση ορμονών και αυξητικών παραγόντων.

ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΘΕΡΜΙΚΟΥ SHOCK

Οι πρωτεΐνες Hsp ταξινομούνται σύμφωνα με το μοριακό βάρος τους σε έξι ομάδες: Την ομάδα Hsp100 με μοριακό βάρος 100-110 kDa, την ομάδα πρωτεϊνών Hsp90 με μοριακό βά-

ρος 83-90 kDa, την ομάδα Hsp70 με μοριακό βάρος 66-78 kDa, την ομάδα Hsp60, την ομάδα Hsp40 και τη ομάδα Hsp27 με μοριακό βάρος 15-30 kDa. Ορισμένες από τις πρωτεΐνες Hsp παράγονται σε σταθερά επίπεδα και συμμετέχουν σε σημαντικές κυτταρικές λειτουργίες, όπως η ενδοκυττάρια μεταφορά και η τρισδιάστατη δόμηση των πρωτεϊνών, ενώ άλλες παράγονται αποκλειστικά ή σε αυξημένα επίπεδα σε καταστάσεις ανάγκης ανάλογα με τον τύπο του κυττάρου και το είδος του ερεθίσματος³⁻⁵ (Πίνακας 1).

Σημαντική θεωρείται η συμβολή των πρωτεϊνών Hsp στο σχηματισμό τρισδιάστατης δομής των διαφόρων πολυπεπτιδικών συμπλεγμάτων. Τα πολυπεπτιδία θεωρητικά μπορούν να αποκτήσουν τη χωροταξική δομή τους αυτόματα σύμφωνα με την αλληλουχία τους, αυτό όμως στο μη-ιδανικό περιβάλλον του κυττάρου με τις υψηλές συγκεντρώσεις πρωτεϊνών είναι ιδιαίτερα δύσκολο. Για το λόγο αυτό τα κύτταρα έχουν αναπτύξει ένα σύστημα διαφόρων προστατευτικών μορίων (Molecular chaperons), με τη βοήθεια των οποίων επιτυγχάνεται η κατάλληλη τρισδιάστατη πτύκωση και μεταφορά των πρωτεϊνών, καθώς και η αποφυγή μη ειδικών συναδροίσεων των νεοσυντιθέμενων πολυπεπτιδίων⁵. Τα σημαντικότερα από αυτά τα μόρια ανήκουν στην ομάδα των πρωτεϊνών Hsp. Η προστατευτική αυτή λειτουργία των Hsp είναι ιδιαίτερα σημαντική σε υψηλές θερμοκρασίες, όπου ευνοείται η δημιουργία και η συναδροίση αλλοιωμένων πολυπεπτιδίων, και επιτυγχάνεται με την παρεμπόδιση δημιουργίας μη-ειδικών συμπλεγμάτων ή με διάσπαση αυτών και έτσι ελαττώνεται η τελική κυτταρική διαταραχή. Η αλλοίωση της πτύκωσης των πρωτεϊνών, σύμφωνα με πρόσφατες μελέτες, φαίνεται να αποτελεί τη μοριακή διαταραχή διαφόρων ασθενειών όπως της κυστικής ίνωσης, της νόσου των prions και πιθανόν της αμυλοείδωσης⁶.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η αλλη-

Πίνακας 1. Υποκυτταρική εντόπιση και λειτουργία των διαφόρων ομάδων Hsp.

Πρωτεΐνη	Υποκυτταρική εντόπιση	Λειτουργία
Hsp100	Πυρήνιο	Προστασία επί Stress Θερμοαντοχή
Hsp90	Κυτταρόπλασμα	Μεταφορά και στερεοδιάταξη πρωτεϊνών Δέσμευση υποδοχέων στεροειδών ορμονών και πρωτεϊνικών κινασών
Hsp70	Κυτταρόπλασμα/πυρήνας Ενδοπλασματικό δίκτυο	Αποδόμηση πρωτεϊνικών συμπλεγμάτων Σύνδεση ολιγομερών συμπλεγμάτων
Hsp60	Κυτταρόπλασμα	Στερεοδιάταξη πρωτεϊνών
Hsp40	Κυτταρόπλασμα	Στερεοδιάταξη πρωτεϊνών Ρύθμιση λειτουργίας Hsp70
Hsp27	Κυτταρόπλασμα	Σύνδεση /αποδόμηση πρωτεϊνικών συμπλεγμάτων Θερμοαντοχή Δέσμευση στεροειδών ορμονών Κυτταρικός κύκλος

λεπίδραση των Hsp90, Hsp70, Hsp56 και πιθανώς και της Hsp27 με τους υποδοχείς στεροειδών ορμονών. Οι πρωτεΐνες Hsp μπορούν να τροποποιήσουν τη δραστηριότητα των υποδοχέων δεδομένου ότι συνδεόμενες με τους υποδοχείς επιτυγχάνουν τη διατήρησή τους σε ανενεργό κατάσταση⁷⁻⁹. Επιπροσθέτως, πιθανολογείται η συμβολή των Hsp27 και Hsp90 στη μεταφορά των υποδοχέων των στεροειδών ορμονών από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα με τη βοήθεια της ακτίνης, υπόθεση που ενισχύεται από την ανακαλυφθείσα αλληλεπίδραση των Hsp με την ακτίνη⁴.

ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΣΥΝΘΕΣΗΣ ΤΩΝ HSP

3.1 Μεταγραφική ρύθμιση

Για να επιτευχθεί η ταχύτατη επαγωγή των πρωτεϊνών Hsp σε καταστάσεις δερμικού stress, τα κύτταρα έχουν αναπτύξει ευρύτατο σύστημα παραγόντων που δρουν σε μεταγραφικό ή μετα-μεταγραφικό επίπεδο. Κοινοί αποδέκτες όλων των ρυθμιστικών μηχανισμών στα ευκαρυωτικά κύτταρα είναι οι παράγοντες ελέγχου μεταγραφής επί δερμικού shock (HSFs-Heat shock transcription factors), οι οποίοι ρυθμίζουν την έκφραση των γονιδίων δερμικού stress. Οι παράγοντες HSF σε κατάσταση ηρεμίας ευρίσκονται υπό λανθάνουσα μορφή, η οποία

δεν έχει ικανότητα σύνδεσης με το DNA και ενεργοποιούνται με την επίδραση διαφόρων ερεθισμάτων.

Πρόσφατα έγινε δυνατή η κλωνοποίηση του cDNA των HSF και η απομόνωση τους από πολλά είδη οργανισμών, με αποτέλεσμα να διευκρινισθεί ο μηχανισμός δράσης σε ορισμένους από αυτούς. Δύο από αυτούς τους παράγοντες (HSF1 και HSF2) μελετήθηκαν αναλυτικά σε μοριακό επίπεδο στη *Drosophila* και μας δίνουν σημαντικές πληροφορίες για την αντίστοιχη δράση των παραγόντων HSF στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς¹⁰. Συγκεκριμένα οι παράγοντες HSF αλληλεπιδρούν με μια καλά διατηρούμενη περιοχή ελέγχου μεταγραφής των γονιδίων των HSP, η οποία περιλαμβάνει πολλαπλά αντίγραφα της αλληλουχίας AGAA. Οι παράγοντες αυτοί ευρίσκονται σε κατάσταση ηρεμίας υπό αδρανή μορφή μονομερών (HSF1) ή διμερών (HSF2) και υπό την επίδραση ερεθισμάτων δερμικού stress σχηματίζουν ενεργείς τριμερείς μορφές, οι οποίες μεταναστεύουν στον πυρήνα και υπερφωσφορλιούνται σε κατάλοιπα σερίνης. Με τη μορφή αυτή έχουν την ικανότητα να συνδέονται με τις δέσεις ελέγχου μεταγραφής των γονιδίων δερμικού shock και να επάγουν τη σύνδεση των πρωτεϊνών Hsp^{3,10}.

3.2 Ορμονική ρύθμιση

Η Hsp27 αποτελεί χαρακτηριστικό παράδειγμα ορμονικής επίδρασης στη ρύθμιση της παραγωγής της. Η πρωτεΐνη αυτή απομονώθηκε αρχικά σε καλλιέργεια καρκινικών κυττάρων μαστού MCF7 και παρατηρήθηκε ότι η σύνθεση της αυξάνεται όταν τα κύτταρα αυτά εκτεθούν σε οιστρογόνα και μάλιστα με ρυθμό ανάλογο με τη δόση και τη διάρκεια έκθεσης¹¹. Στη μύγα *Drosophila* έχει παρατηρηθεί εξάλλου ότι τα γονίδια των χαμηλού μοριακού βάρους Hsp ενεργοποιούνται σε διάφορα στάδια της εμβρυϊκής ανάπτυξης ανάλογα με τα επίπεδα αύξησης της ορμόνης β-εκδυσόνη¹².

Κλινικές μελέτες που βασίσθηκαν σε βιοψίες ενδομητρίου σε διάφορες φάσεις του εμμηνορυσιακού κύκλου έδειξαν μεγάλες διαφορές στην εντόπιση και τη συγκέντρωση της Hsp27. Ειδικότερα στο επιπολής επιθήλιο του ενδομητρίου η HSP27 εκφραζόταν σε υψηλά επίπεδα κατά τη διάρκεια της εκκριτικής φάσης. Στο αδενικό επιθήλιο παρατηρήθηκε υψηλότερη έκφραση της Hsp27 κατά το μέσον του κύκλου και κατά την προεμμηνορυσιακή φάση. Ακόμη παρατηρήθηκε αυξημένη έκφραση της Hsp27 στις προσεκβολές του επιθηλίου του ενδομητρίου κατά την εμφύτευση του γονιμοποιημένου ωαρίου, εύρημα που υποδηλώνει την πιθανή συμμετοχή της πρωτεΐνης αυτής κατά την προσκόλληση της βλαστοκύστης στο τοίχωμα της μήτρας¹³. Στο επιθήλιο του τραχήλου της μήτρας, αντίθετα, δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στην έκφραση της Hsp27 κατά τις διάφορες φάσεις του κύκλου¹⁴. Επομένως είναι πιθανό ότι οι Hsp ευρίσκονται κάτω από ορμονική ρύθμιση σε ορισμένους ιστούς και κάτω από ορισμένες συνθήκες, ενώ σε άλλους ιστούς ή καταστάσεις, η έκφραση των Hsp δεν επηρεάζεται από την επίδραση των ορμονών.

ΚΛΙΝΙΚΗ ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΩΝ HSP

4.1 Hsp και νεοπλασία

Τα νεοπλασματικά κύτταρα σε έναν όγκο εκτίθενται σε διάφορες καταστάσεις βιολογικού stress, όπως π.χ. ανοξία και μεταβολές του pH λόγω ανεπαρκούς αιμάτωσης, με αποτέλεσμα να διεγείρεται η σύνθεση των Hsp. Η υψηλού βαθμού έκφραση ορισμένων από τα μέλη των ομάδων Hsp27, Hsp70 και Hsp90 σε διάφορους τύπους κακοήδων όγκων θα μπορούσε να επιτρέψει στους όγκους αυτούς να

αποκτήσουν μεγαλύτερη ανθεκτικότητα σε διάφορα βλαπτικά για τα κύτταρα ερεθίσματα και επομένως μεγαλύτερη αντίσταση σε χημειοθεραπευτικά φάρμακα καθώς και ταχύτερο ρυθμό αύξησης. Τα φαινόμενα αυτά έχουν ιδιαίτερη κλινική σημασία δεδομένου ότι επηρεάζουν τη βιολογική συμπεριφορά των όγκων αυτών. Επιπροσθέτως, ορισμένα μέλη της ομάδας Hsp70 φαίνεται να αλληλεπιδρούν με τις πρωτεΐνες του ογκογονιδίου c-myc και του ογκοκατασταλτικού γονιδίου p53 και επί αυξημένης έκφρασης τους να συμβάλλουν στην κακοήδη κυτταρική εξαλλαγή¹⁵. Όσον αφορά το γονίδιο p53 έχει περιγραφεί ότι οι μεταλλάξεις του προκαλούν στερεοδομικές μοριακές μεταβολές της παραγόμενης πρωτεΐνης, οι οποίες έχουν ως αποτέλεσμα το σχηματισμό συμπλέγματος με την Hsp70. Αυτό έχει επιβεβαιωθεί και με ανοσοϊστοχημικές μελέτες όπου βρέθηκε σημαντική συσχέτιση της εντόπισης των δύο πρωτεϊνών επί παρουσίας μεταλλάξεων του p53 και αντίστοιχη ανίχνευση του συμπλέγματος τους¹⁶.

4.1.1 Προγνωστική σημασία των Hsp σε κακοήδη νεοπλάσματα

Η προγνωστική σημασία των Hsp και ιδίως των Hsp27 και Hsp70 έχει διερευνηθεί σε διάφορους τύπους κακοήδων όγκων και κυρίως στον καρκίνο του μαστού. Η πρωτεΐνη Hsp27, ανακαλύφθηκε αρχικά στην κυτταρική σειρά του καρκινώματος μαστού MCF-7 ως πρωτεΐνη που εξαρτάται από τη δράση των οιστρογόνων¹¹. Σε μελέτες που ακολούθησαν βρέθηκε ότι η πρωτεΐνη αυτή σχετίζεται σε μεγάλο βαθμό με την παρουσία οιστρογονικών υποδοχέων σε καρκινώματα μαστού και ότι μπορεί να χρησιμεύσει ως προβλεπτικός δείκτης ανταπόκρισης στην ορμονική θεραπεία^{17,18}. Σε άλλες κλινικές μελέτες αναφέρθηκε ότι η υψηλού βαθμού έκφραση της Hsp27 σχετίζεται με βραχύτερη ελεύθερη νόσου επιβίωση σε καρκινώματα μαστού με αρνητικούς μασχαλιαίους λεμφαδένες¹⁸, αλλά όχι σε καρκινώματα με μεταστάσεις στους μασχαλιαίους λεμφαδένες^{18,19}. Αντίθετα σε μελέτη 51 ασθενών με μεταστατικό καρκίνωμα μαστού παρατηρήθηκε ότι οι ασθενείς με όγκους δετικούς στην Hsp27 είχαν καλύτερη ανταπόκριση στη χημειοθεραπεία και σχετικά μεγαλύτερη επιβίωση²⁰. Παρόμοια προγνωστική σημασία έχει και η έκφραση της Hsp70 όπου έχει βρεθεί με τη μέθοδο western

blot ότι οι ασθενείς με καρκίνωμα μαστού χωρίς μεταστάσεις στους μασχαλιαίους λεμφαδένες και υψηλά επίπεδα της πρωτεΐνης είχαν βραχύτερη ελεύθερη νόσου επιβίωση²¹. Στην ίδια μελέτη δημοσιεύθηκε ότι στην ομάδα των ασθενών που υποβλήθηκαν σε χημειοθεραπευτική αγωγή η Hsp70 ήταν ο μοναδικός ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας επιβίωσης.

Στα καρκινώματα του ενδομητρίου η παρουσία Hsp27 έχει βρεθεί ότι σχετίζεται με το βαθμό διαφοροποίησης του όγκου και την παρουσία οιστρογονικών και προγεστερονικών υποδοχέων^{22,23}. Σε υπερπλασίες του ενδομητρίου χωρίς ατυπία παρατηρείται αύξηση έκφρασης της Hsp27, ενώ σε αδενωματώδη και άτυπη υπερπλασία σημειούται ελάττωση των επιπέδων της, εύρημα που υποδηλώνει ότι οι πρώτες είναι ιδιαίτερα ευαίσθητες στη δράση των οιστρογόνων²³. Όσον αφορά τον τράχηλο της μήτρας, η πρωτεΐνη Hsp27 ανιχνεύεται σε ενδοεπιδηλιακές νεοπλασίες χωρίς όμως η έκφραση της να εμφανίζει σχέση με τους διάφορους βαθμούς της νόσου²⁴. Στα πλακώδη καρκινώματα τραχήλου μήτρας, παρόλο που η έκφραση των οιστρογονικών και προγεστερονικών υποδοχέων είναι αρνητική, η έκφραση της Hsp27 είναι συχνή και αποτελεί δείκτη καλής διαφοροποίησης²⁴. Από τις μελέτες αυτές φαίνεται επομένως ότι αν και η Hsp27 σε μεγάλο βαθμό ρυθμίζεται ορμονικά, σε ορισμένους μόνο ιστούς (μαστός, ενδομήτριο) σχετίζεται με τους οιστρογονικούς υποδοχείς και επομένως δεν μπορεί γενικά να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης ορμονικής ανταπόκρισης ή παρουσίας ορμονοϋποδοχέων. Στα καρκινώματα του στομάχου, στα οποία επίσης η παρουσία οιστρογονικών και προγεστερονικών υποδοχέων θεωρείται περιορισμένη²⁵, οι Harrison και συν²⁶ περιέγραψαν την παρουσία της Hsp27 στο 50% περίπου των περιπτώσεων και ανέφεραν ότι η έκφραση της πρωτεΐνης αυτής αποτελεί παράγοντα που σχετίζεται με σημαντικά βραχύτερη επιβίωση.

4.1.2 Φαρμακευτική αντίσταση νεοπλασμάτων

Σύμφωνα με συνεχώς αυξανόμενα πειραματικά δεδομένα οι πρωτεΐνες δερμικού shock φαίνεται να έχουν μεγάλη σημασία για την αντίσταση των κυττάρων στα χημειοθεραπευτικά φάρμακα. Σε παλαιότερες μελέτες είχε βρεθεί ότι η ταυτόχρονη επίδραση υπερδερμίας και χημειοθεραπευτικών αυξάνει το ρυθμό εξά-

λειψης των νεοπλασματικών κυττάρων. Εν τούτοις, αν πριν από την χορήγηση χημειοθεραπευτικών επιδράσει στα κύτταρα δερμικό έρεθισμα ή έκθεση σε κάδμιο ή αιθανόλη, τότε επάγεται η σύνδεση των Hsp και η δράση των χημειοθεραπευτικών γίνεται λιγότερο αποτελεσματική²⁷.

Σημαντική πειραματική ένδειξη για τη σημασία των Hsp στην φαρμακευτική αντίσταση προέρχεται από τη μελέτη των Huot et al²⁸, οι οποίοι μετέφεραν το ανθρώπινο γονίδιο της Hsp27 σε κύτταρα ωοθήκης ποντικών και παρατήρησαν ότι τα κύτταρα στα οποία υπερεκφράζετο η ομόλογη πρωτεΐνη, παρουσίαζαν αυξημένη αντίσταση στη δοξορουβισίνη, κολχικίνη και βινκριστίνη αλλά όχι στην 5-φθοριοουρακίλη και τις νιτροζουρίες. Σε άλλη μελέτη ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων μαστού βρέθηκε ότι η Hsp27 και σε μικρότερο βαθμό η Hsp70 σχετίζονται με αυξημένη αντίσταση έναντι της δοξορουβισίνης²⁹, η οποία αναστέλλεται όταν στα κύτταρα αυτά εισαχθούν αντιπαράλληλα ολιγονουκλεοτίδια των αντίστοιχων Hsp³⁰. Από τις παρατηρήσεις αυτές φαίνεται επομένως ότι οι Hsp και κυρίως οι Hsp27 εμπλέκονται σε ορισμένες μορφές μη-ανταπόκρισης των όγκων σε χημειοθεραπευτικά σκευάσματα, γεγονός που έχει ιδιαίτερη κλινική σημασία δεδομένου ότι η γνώση της έκφρασης ή μη των παραγόντων αυτών σε διάφορους τύπους όγκων θα μπορούσε να συμβάλλει στην καλύτερη πρόβλεψη της ανταπόκρισης στη φαρμακευτική αγωγή και να επιτρέψει πλέον επιτυχείς θεραπευτικές παρεμβάσεις.

4.1.3 Ανοσολογική απάντηση σε νεοπλάσματα

Αντισώματα έναντι της πρωτεΐνης Hsp90 έχουν ανιχνευθεί με τη μέθοδο ELISA στο 37% γυναικών με καρκίνο μαστού, τα οποία βρέθηκαν ότι σχετίζονται σημαντικά με μεγαλύτερη πιθανότητα μετάστασης ακόμη και σε ασθενείς με αρνητικούς μασχαλιαίους λεμφαδένες³¹. Η παρουσία αντισωμάτων αντι-Hsp90 στον ορό των γυναικών δείχνει ότι η Hsp90 μεταφέρει πεπτιδία στην επιφάνεια των κυττάρων με αποτέλεσμα τη δημιουργία αντισωμάτων έναντι αυτών. Το γεγονός της συχνότερης εμφάνισης μεταστάσεων στις ασθενείς με αντισώματα αντι-Hsp90 πιθανόν να σχετίζεται με την παρουσία περισσότερων νεοπλασματικών κυττάρων με επιφανειακή Hsp90 ή την ανοσολογική ενεργο-

ποίηση του αμυντικού συστήματος κατά τη μετακίνηση των καρκινικών κυττάρων από το μαστό στη θέση μετάστασης.

Σύμφωνα με πρόσφατα πειραματικά δεδομένα έχει παρατηρηθεί παρουσία πρωτεϊνών Hsp70 και Hsp90 στην επιφάνεια των κυττάρων, τόσο σε ανθρώπινους καρκίνους όσο και αντίστοιχες κυτταρικές σειρές³²⁻³⁴. Το εύρημα αυτό δείχνει ότι οι πρωτεΐνες Hsp, με άγνωστο ακόμη μηχανισμό και πιθανόν παθητικά από άλλες συμπλεκόμενες πρωτεΐνες, μεταφέρονται στην επιφάνεια των κυττάρων και επομένως μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως ανοσολογικοί καρκινικοί δείκτες.

4.2 Ισχαιμία μυοκαρδίου

Η ισχαιμία του μυοκαρδίου έχει ως συνέπεια σοβαρό stress στα μυϊκά κύτταρα λόγω της προκαλούμενης ανοξίας, ελάττωσης της ATP και της γλυκόζης, αύξησης της εισροής ιόντων ασβεστίου, ελάττωσης του pH και συσσώρευσης τοξικών μεταβολιτών. Μερικές από αυτές τις διαταραχές έχουν ως συνέπεια την επαγωγή της έκφρασης των Hsp, ώστε τα κύτταρα να προσπαθήσουν να επανορθώσουν και να περιορίσουν τις προκαλούμενες μοριακές αλλοιώσεις. Η άποψη αυτή ενισχύεται από πειραματικές μελέτες στις οποίες η αύξηση της θερμοκρασίας του σώματος στους 42° C για 15 min προ της προκλήσεως ισχαιμίας είχε ως αποτέλεσμα αυξημένη προστασία του μυοκαρδίου έναντι των συνεπειών της ισχαιμίας³⁵. Παρόμοια προστατευτική δράση είχε και η πρόκληση μικρής χρονικής διάρκειας ισχαιμικών επεισοδίων πριν την επίδραση παρατεταμένης ισχαιμίας³⁶.

Από τις διάφορες ομάδες πρωτεϊνών Hsp στην προστασία του μυοκαρδίου έναντι της ισχαιμίας, μεγαλύτερη σημασία φαίνεται να έχει η Hsp70. Σε καλλιέργειες μυοκυττάρων καρδιάς ποντικού έχει παρατηρηθεί ότι τα μυοκύτταρα που υπερεκφράζουν Hsp70 έχουν μεγαλύτερη ικανότητα επιβίωσης στην επίδραση ισχαιμίας³⁷. Σε διαγονιδιακά ποντίκια τα οποία είχαν διεγερθεί να παράγουν υψηλά επίπεδα Hsp70 παρατηρήθηκε επίσης αυξημένη ικανότητα αντιμετώπισης προκλητών ισχαιμικών επεισοδίων χωρίς καμία επίπτωση στην γενική κατάσταση και ανάπτυξη των οργανισμών αυτών³⁸. Αν και από τα παραπάνω πειραματικά δεδομένα καθίσταται φανερό ότι οι αντιϊσχαιμικές ιδιότητες της Hsp70 ενδέχεται να έχουν θεραπευτικές εφαρμογές, δεν έχουν διευκρινι-

σθεί οι μηχανισμοί μέσω των οποίων επιτυγχάνεται η προστατευτική δράση της σε ισχαιμικές καταστάσεις. Κατά την επικρατέστερη υπόθεση η Hsp70 συμβάλλει αφ' ενός στην επαναδιάταξη των αλλοιωμένων και ανωμάλως συσσωρευμένων πρωτεϊνών και αφ' ετέρου αλληλεπιδρά με διάφορα στοιχεία του κυτταροσκελετού και εμποδίζει την καταστροφή του από την επίδραση της ισχαιμίας.

4.3 Φλεγμονώδεις αντιδράσεις

Η φλεγμονώδης αντίδραση των ιστών σε περιπτώσεις κυτταρικής ή ιστικής βλάβης βασίζεται στην ενεργοποίηση του αραχιδονικού οξέος και των μεταβολιτών του, η οποία οδηγεί στην παραγωγή διαφόρων πρωτεϊνών της οξείας φάσης και κυτταροκινινών. Οι πρωτεΐνες Hsp συσχετίσθηκαν αρχικά με τη μεταβολική οδό του αραχιδονικού οξέος από μελέτες που έδειξαν ότι οι προσταγλανδίνες A₁, A₂, και J₂, οι οποίες είναι μεταβολικά παράγωγα του αραχιδονικού οξέος, επάγουν τη σύνδεση των πρωτεϊνών δερμικού shock³⁹. Σε μελέτες που ακολούθησαν διευκρινίσθηκε ο μηχανισμός δράσης των προσταγλανδινών σύμφωνα με τον οποίο οι ουσίες αυτές ενεργοποιούν τον παράγοντα μεταγραφής HSF1⁴⁰.

Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι ορισμένα αντιφλεγμονώδη φάρμακα, όπως το σαλικυλικό νάτριο και η ινδομεθακίνη, μπορούν να αυξάνουν την ικανότητα σύνδεσης του παράγοντα HSF1 με το DNA χωρίς όμως να εκλύουν πλήρη αντίδραση δερμικού stress⁴¹. Όταν όμως τα αντιφλεγμονώδη φάρμακα συνδυασθούν με την επίδραση ελαφρά αυξημένης θερμοκρασίας τότε προκαλείται πλήρης ενεργοποίηση και φωσφορυλίωση του παράγοντα HSF1 και ολοκληρωμένη αντίδραση έναντι του δερμικού ερεθίσματος. Επίσης έχει παρατηρηθεί ότι η ασπιρίνη (οξικό σαλικυλικό οξύ) όταν χορηγηθεί κατά ή μετά την επίδραση δερμικού ερεθίσματος ενισχύει το αποτέλεσμα της υπερθερμίας αυξάνοντας το χρόνο μεταγραφής του γονιδίου της Hsp70 από τον ενεργοποιημένο από τη δράση της παράγοντα HSF1⁴². Επομένως τα μη-στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα μπορούν, κάτω από ορισμένες παθοφυσιολογικές καταστάσεις όπως πυρετός, φλεγμονές και ισχαιμία, να ενισχύσουν σημαντικά τον προστατευτικό για τα κύτταρα ρόλο των πρωτεϊνών δερμικού shock, γεγονός ιδιαίτερης θεραπευτικής αξίας.

ΕΠΙΛΟΓΟΣ

Οι πρωτεΐνες δερμικού shock αποτελούν σημαντικά μόρια για τη λειτουργία των οργανισμών, γι' αυτό και συγκαταλλέγονται στις εξελικτικά καλλίτερα διατηρούμενες πρωτεΐνες, με μεγάλη ομολογία δομής μεταξύ προκαρυωτικών και ευκαρυωτικών οργανισμών. Οι πρωτεΐνες αυτές εκφράζονται επιλεκτικά ως προστατευτικά μόρια σε καταστάσεις ανάγκης, ενώ ορισμένες από αυτές συντίθενται σταθερά και εμπλέκονται ως δορυφορικά μόρια στην τρισδιάστατη δόμηση πολυπεπτιδίων. Οι πολλαπλές λειτουργίες στις οποίες συμμετέχουν εκτείνονται από την εμβρυϊκή ανάπτυξη και διαφο-

ροποίηση μέχρι τη λειτουργικότητα των υποδοχέων στεροειδών ορμονών και τον κυτταρικό κύκλο, ενώ φαίνεται να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο σε ισχαμικές και φλεγμονώδεις καταστάσεις, στην ανοσολογική απάντηση, φαρμακευτική αντίσταση και πρόγνωση των νεοπλασμάτων. Για το λόγο αυτό αναμένεται ιδιαίτερα ενδιαφέρουσα η εκτεταμένη πειραματική και κλινική έρευνα που διεξάγεται διεθνώς, ιδιαίτερα στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης των πρωτεϊνών αυτών, που μπορεί να αποτελέσει τη βάση για μια επιτυχή γονιδιακή θεραπευτική παρέμβαση.

SUMMARY

Heat shock proteins Kapranos N., Kominea A.

Department of Pathology Aegion General Hospital

Heat shock proteins (Hsps) are a family of proteins whose function is to protect the cells from environmental or pathophysiologic stimuli. Apart from thermal stimuli Hsps are activated by other causes such as irradiation, heavy metals, toxins and oxidants. Viral and bacterial infections, ischemia and glucose starvation also stimulate Hsps' response. Several of the Hsps participate in the cell cycle and are also involved in different stages of development and differentiation under the regulation by hormones and growth factors. Hsps function as molecular chaperones regulating the correct folding and intracellular translocation of polypeptides and play a critical role in the maintenance of hormone receptors in the inactive state. Hsps are classified according to their molecular weight in six groups: Hsp27, Hsp40, Hsp60, Hsp70, Hsp90 and Hsp100. Some of these proteins are constitutively expressed, whereas others are induced by stresses depending on the type of cell and stress stimulus. Hsps' synthesis is regulated by heat shock transcription factors (HSFs) which act through a highly conserved upstream response element of the promoter region of Hsp genes characterized by multiple inverted repeats of AGAAn sequence. Hsp27 and Hsp70 have been associated with the presence of estrogen and progesterone receptors in breast carcinomas and they have been found to have negative prognostic significance in node-negative breast cancer patients. In human cancer and cell lines it has been reported that Hsp27 and Hsp70 play an important role to the resistance in some of the chemotherapeutic drugs. Hsps are also involved in the immune response in cancer and in the cellular protective mechanisms in ischemic and inflammatory conditions. The functions, the mechanisms of transcriptional regulation and the clinical significance of Hsps are summarized in this review.

Key words: *Heat shock proteins, Hsp, HSF, thermotolerance, tumor prognostic factors, ischemic injury, drug resistance*

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Ritossa F. A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in drosophila. *Experientia* 18: 571-573, 1962.
2. Tissieres A, Mitchell HK, Tracey UM. Protein synthesis in salivary glands of *D. melanogaster*. Relation to chromosome puffs. *J Mol Biol* 84: 389-398, 1974.
3. Leppa S, Sistonen L. Heat shock response - Pathophysiological implications. *Ann Med* 29: 73-78, 1997.
4. Ciocca DR, Oesterreich S, Chamness GC, McGuire WL, Fuqua S.A.W. Biological and clinical implications of heat shock protein 27000 (Hsp27): a review. *J Natl Cancer Inst* 85: 1558-1570, 1993.
5. Hartl FU. Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* 381: 571-580, 1996.
6. Thomas PJ, Qu BH, Pedersen PL. Defective protein folding as a basis of human disease. *Trends Biochem Sci* 20: 456-459, 1995.
7. Sherrer LC, Dalman FC, Massa E, et al. Structural and functional reconstitution of the glucocorticoid receptor-hsp90 complex. *J Biol Chem* 265: 21397-21400, 1990
8. Pratt WB. Interaction of hsp90 with steroid receptors: organizing some diverse observations and presentation of the newest concepts. *Mol Cell Endocrinol* 74: C69-C76, 1990
9. Kontogeorgos G, Kovacs K, Asa SL. Heat-Shock stress-response proteins in Endocrine Pathology. *Endocr Pathol* 6: 3-11, 1995
10. Wu C. Heat shock transcription factors: structure and regulation. *Annu Rev Cell Dev Biol* 11: 441-469, 1995.
11. Edwards DP, Adams DJ, McGuire WL. Estradiol stimulates synthesis of a major intracellular protein in human breast cancer cell line (MCF-7). *Breast Cancer Res Treat* 1: 209-223, 1981.
12. Thomas SR, Lengyel JA. Ecdysteroid regulated heat shock gene expression during *Drosophila melanogaster* development. *Dev Biol* 115: 434-438, 1986.
13. Ciocca DR, Asch RH, Adams DJ et al. Evidence for modulation of a 24K protein in human endometrium during the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 57: 496-499, 1983.
14. Ciocca DR, Puy LA, Lo Castro G. Localization of an estrogen-responsive protein in human cervix during menstrual cycle, pregnancy, and menopause and in abnormal cervical epithelia without atypia. *Am J Obstetr Gynecol* 155: 1090-1096, 1986.
15. Pinhasi-Kihmi O, Michalowitz D, Ben-Zeev A, and Oren M. Specific interactions between the p53 cellular tumor antigen and major heat shock proteins. *Nature* 320: 182-185, 1986.
16. Iwaya K, Hitoshi T, Fujita S, Suzuki M, and Hirohashi S. Natural state of mutant p53 protein and hsp70 in breast cancer tissues. *Lab Invest* 72: 707-714, 1995.
17. Ciocca DR, Stati AO, Amprino De Castro MM. Colocalization of estrogen and progesterone receptors with an estrogen-regulated heat shock protein in paraffin sections of human breast and endometrial cancer tissue. *Breast Cancer Res Treat* 16: 243-251, 1990.
18. Love S and King RJB. A 27 kDa heat shock protein that has anomalous prognostic powers in early and advanced breast cancer. *Br J Cancer* 69: 743-748, 1994.
19. Tetu B, Brisson J, Landry J, Huot J. Prognostic significance of heat-shock protein-27 in node-positive breast carcinoma: an immunohistochemical study. *Breast Cancer Res Treat* 36: 93-97, 1995.
20. Seymour L, Bezwoda WR, Meyer K. Tumor factors predicting for prognosis in metastatic breast cancer. The presence of p24 predicts for response to treatment and duration of survival. *Cancer* 66: 2390-2394, 1990.
21. Ciocca DR, Clark GM, Tandon AT, Fuqua SAW, Welch WJ, McGuire WL. Heat shock protein hsp70 in patients with axillary lymph node-negative breast cancer: prognostic implications. *J Natl Cancer Inst* 85: 570-574, 1993.
22. McGuire WL, Dressler LG, Sledge GW, et al. An estrogen-regulated protein in normal and malignant endometrium. *J Steroid Biochem* 24: 155-159, 1986.
23. Ciocca DR, Puy LA, Edwards DP et al. The presence of an estrogen-regulated protein detected by monoclonal antibody in abnormal human endometrium. *J Clin Endocrinol Metab* 60:137-143, 1985.
24. Puy LA, Lo Castro G, Olcese JE, et al. Analysis of a 24 kDa protein in the human uterine cervix during abnormal growth. *Cancer* 64: 1067-1073, 1989.
25. Singh S, Poulson R, Wright NA, Sheppard MC, Langman MJS. Differential expression of oestrogen receptor and oestrogen inducible genes in gastric mucosa and cancer. *Gut* 40: 516-520, 1997.
26. Harrison JD, Jones JA, Ellis IO, Morris DL. Oestrogen receptor D5 antibody is an independent negative prognostic factor in gastric cancer. *Br J Cancer* 78: 334-336, 1991.
27. Wallner K, Li GC. Adriamycin resistance, heat resistance and radiation response in Chinese hamster fibroblasts. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 12: 829-833, 1986.
28. Huot J, Roy G, Lambert H, Chrelien P, Landry J. Increased survival after treatments with

- anticancer agents of Chinese Hamster expressing the human Mr 27,000 heat shock protein. *Cancer Res* 51: 245-252, 1991.
29. Ciocca DR, Fuqua SAW, Lock-Lim S, Toft DO, Welch WJ, McGuire WL. Response of human breast cancer cells to heat shock and chemotherapeutic drugs. *Cancer Res* 52: 3648-3654, 1992.
 30. Oestereich S, Weng CN, Qiu M, Hilsenbeck SG, Osbourne CK, and Fuqua SAW. The small heat shock protein Hsp27 is correlated with growth and drug resistance in human breast cancer cell lines. *Cancer Res* 53: 4443-4448, 1993.
 31. Conroy SE, Gibson SL, Brunstrom G, Isenberg D, Luqmani Y, Latchman DS. Autoantibodies to the 90 KD heat shock protein in sera of breast cancer patients. *Lancet* 345: 126-127, 1995.
 32. Ferrarini M, Heltai S, Zocchi MR, Rugarli C. Unusual expression and localization of heat shock proteins in human tumor cells. *Int J Cancer* 51: 613-619, 1992.
 33. Tsuboi N, Ishikawa M, Tamura Y, Takayama S, Tobioka H, Matsuura A, Hirayoshi K, Nagata K, Sato N, Kikuchi K. Monoclonal antibody specifically reacting against 73-kilodalton heat shock cognate protein: possible expression on mammalian cell surface. *Hybridoma* 13: 373-381, 1994.
 34. Multhoff G, Botzler C, Wiesnet M, Maller E, Meier T, Wilmanns W. A stress-inducible 72-kDa heat shock protein (Hsp72) is expressed on the surface of human tumors but not in normal cells. *Int J Cancer* 61: 272-279, 1995.
 35. Donnelly TJ, Sievers RE, Vissern FLJ, Welch WJ, Wolfe CL. Heat shock protein induction in rat hearts. A role for improved myocardial salvage after ischemia and reperfusion? *Circulation* 85: 769-778, 1992.
 36. Marber MS, Latchman DS, Walker JM, Yellon DM. Cardiac stress protein elevation 24 h after brief ischemia or heat stress is associated with resistance to myocardial infarction. *Circulation* 88: 1264-1272, 1993.
 37. Mestril R, Chi SH, Sayen MR, O' Reilly K, Dillmann WH. Expression of inducible stress protein 70 in rat heart myogenic cells confers protection against simulated ischemia-induced injury. *J Clin Invest* 93: 759-767, 1994.
 38. Plumier JCL, Ross BM, Currie RW, et al. Transgenic mice expressing the human heat shock protein 70 have improved post-ischemic myocardial recovery. *J Clin Invest* 95: 1854-1860, 1995.
 39. Santoro MG, Garaci E, Amici C. Prostaglandins with antiproliferative activity induce the synthesis of a heat shock protein in human cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 8407-8411, 1989.
 40. Amici C, Sistonen L, Santoro MG, Morimoto RI. Antiproliferative prostaglandins activate heat shock transcription factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 6227-6231, 1992.
 41. Juvirich DA, Sistonen L, Kroes RA, Morimoto RI. Effect of sodium salicylate on the human heat shock response. *Science* 255: 1243-1245, 1992.
 42. Amici C, Rossi A, Santoro MG. Aspirin enhances thermotolerance in human erythroleukemic cells: an effect associated with the modulation of the heat shock response. *Cancer Res* 55: 4452-4457, 1995.