

Białka szoku cieplnego – nowy marker w diagnostyce patomorfologicznej nowotworów gruczołu sutkowego u psów

Anna M. Badowska-Kozakiewicz

z Zakładu Biofizyki i Fizjologii Człowieka Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Jednym z markerów rokowniczych w nowotworach sutka u ludzi są białka szoku cieplnego (1, 2). Białka szoku cieplnego (heat shock proteins – Hsp) odgrywają ważną rolę w utrzymaniu homeostazy komórek zarówno w warunkach fizjologicznych, jak i w stresie. Białka szoku cieplnego należą do najstarszych ewolucyjnie systemów ochrony w komórce. Stanowią one homogenną grupę około 20 białek o konserwatywnej sekwencji aminokwasowej. Stwierdzane są w komórkach organizmów Prokaryota i Eucaryota, znajdują się w cytoplazmie, mają zdolność wiązania się z cytoszkieletem oraz występują w wielu organellach komórkowych (3, 4, 5).

Wykazano, że aktywację genów kodujących Hsp powodują liczne egzogenne i endogenne czynniki, którymi mogą być: analogi aminokwasów, metale ciężkie, alkohole, wolne rodniki, wiele trucizn metabolicznych, zmiana pH środowiska, zakażenia wirusowe i bakteryjne, niedobór glukozy, cytokiny, promieniowanie UV i inne (6, 7). Ponieważ Hsp indukowane są przez różnorodne czynniki, nazwano je białkami stresowymi, a proces, w wyniku którego są syntetyzowane, reakcją stresową (8, 9). Zmiana ekspresji tych białek została po raz pierwszy zaobserwowana przez F.M. Ritossa w 1962 r. w komórkach muszki owocowej *Drosophila melanogaster* (6, 7, 10).

Charakterystyczną cechą tych białek, wręcz niespotykaną w przyrodzie, jest ich uniwersalność (11). Analiza genów kodujących białka stresowe u bakterii, drożdży, muszki owocowej i człowieka pozwoliła wykazać, że są one w wysokim stopniu homologiczne (9). Niektóre geny kodujące Hsp są odczytywane w procesie transkrypcji w warunkach fizjologicznych, ze znacznie jednak mniejszą wydajnością niż w warunkach stresu komórkowego. Białka szoku cieplnego są stale produkowane na poziomie 5–10% wszystkich białek wytwarzanych przez komórkę. Powstają w przebiegu cyklu komórkowego podczas różnicowania, embriogenezy lub przy stymulacji przez komórkowe czynniki wzrostu. Sygnałem informującym komórkę o konieczności pobudzenia ekspresji genów *hsp* mogą być także zmiany właściwości błony cytoplazmatycznej. Białka szoku cieplnego stanowią przypuszczalnie ogniwo alternatywnych szlaków metabolicznych uruchamianych podczas prawidłowych procesów fizjologicznych oraz w stanach patologicznych (12, 13, 14, 15, 16, 17). Białka te łączą komórkę ze światem zewnętrznym, a działanie Hsp jest ściśle

związane z wewnątrzkomórkowym metabolizmem białek. Ich zadaniem jest ochrona innych białek wewnątrzkomórkowych przed proteolizą indukowaną czynnikami stresowymi, takimi jak: podwyższona temperatura, wolne rodniki, niedotlenienie, zakażenia, stres chemiczny i czynniki mechaniczne. Białka szoku cieplnego powstają w mitochondriach i dlatego można je wykazać w cytoplazmie. Pełnią funkcję „opiekuńczą” w stosunku do pozostałych białek komórkowych. Stwierdzono, że Hsp współdziałają z makrofagami, komórkami dendrytycznymi, limfocytami T, indukując uwalnianie cytokin i chemokin oraz odgrywają istotną rolę w dojrzewaniu i migracji komórek dendrytycznych (18, 19, 20, 21). Hsp działają jako adiuwanty, które sprzyjają odpowiedzi cytotoxicznej limfocytów w stosunku do białek i peptydów pozostających z nimi w kompleksach (22, 23, 24, 25).

Białka z rodzin Hsp90 i Hsp70

Różnorodność białek stresu pojawiających się w komórkach po szoku termicznym zrodziła ich klasyfikację, przy czym jako kryterium przyjęto masę cząsteczkową. Na tej podstawie wyróżniono kilka rodzin (9, 26, 27): Hsp100 (m.cz. 100–110 kDa), Hsp90 (m.cz. 80–100 kDa), Hsp70 (m.cz. 68–78 kDa) i Hsp20 (m.cz. 18–32 kDa). Białka z rodziny Hsp90 są syntetyzowane zarówno w warunkach prawidłowych, jak i pod wpływem zadziałania czynników stresogennych. W komórkach ssaków Hsp90 występuje w dwóch izoformach – Hsp90 alfa oraz Hsp90 beta, które tworzą oligomeryczne kompleksy. Są one związane z licznymi białkami komórkowymi, w tym z receptorami hormonów steroidowych oraz kinaz fosforylujących podjednostkę alfa eukariotycznego czynnika inicjującego transkrypcję (7, 28, 29, 30, 31). Hsp70 wyróżniają się spośród innych Hsp największą stabilnością ewolucyjną i największym międzygatunkowym podobieństwem (32, 33). Cząsteczki z rodziny Hsp70 wiążą się z niektórymi, nowo syntetyzowanymi białkami i zapobiegają tworzeniu się ich nieprawidłowych konformacji. Ponadto są zaangażowane w rozwijanie białek cytoplazmatycznych i biorą udział w transporcie tych białek do nowych organeli, między innymi mitochondriów i siateczki śródplazmatycznej (34, 35, 36). Ekspresja Hsp70 odgrywa istotną rolę w nabywaniu termotolerancji, czyli oporności komórki na działanie wysokiej, letalnej temperatury. Geny dla Hsp70 są zlokalizowane w obszarze układu zgodności tkanekowej MHC, pomiędzy regionami genów I i II klasy, co pozwala przypuszczać, że cząsteczki te mogą być włączone w proces prezentacji antygenów (37). Wykazano,

że Hsp70 może służyć jako marker uszkodzeń neuronów (38, 39).

Rola białek szoku cieplnego

Białkom szoku cieplnego przypisuje się ważną rolę w procesach apoptozy. Mogą one wykazywać działanie pro- lub antyapoptotyczne. Ponieważ apoptoza i ekspresja białek szoku cieplnego są indukowane przez te same czynniki, zaczęto doszukiwać się korelacji między tymi dwoma procesami. Od pewnego czasu zaczyna się doceniać udział Hsp z rodziny Hsp70 i Hsp90 w ochronie komórek przed działaniem różnych czynników apoptogennych (40, 41, 42, 43), prowadzących m.in. do rozwoju chorób autoimmunologicznych, neurodegeneracyjnych oraz uszkodzeń tkanek wywołanych niedokrwieniem (44). Molekularne zjawiska zachodzące podczas apoptozy opierają się na stałej obecności w komórce białek zdolnych do inicjacji transdukcji sygnału śmierci oraz białek bezpośrednio biorących udział w fazie wykonawczej. Mechanizmy, za pomocą których Hsp modulują proces apoptozy, mogą stanowić rodzaj czasowej inhibicji niektórych genów kodujących te białka, mogą też polegać na zatrzymaniu uszkodzenia komórkowego, osłabieniu sygnału śmierci lub przerwaniu aktywacji lub aktywności sensorów i cząsteczek efektorowych (6, 45, 46). Wykazano antyapoptotyczne działanie Hsp70 po działaniu zarówno szoku termicznego, jak i TNF – alfa, doksorubicyny lub w warunkach nadekspresji kaspazy-3 (42). Hamujący wpływ Hsp70 na apoptozę potwierdziły badania na komórkach nowotworowych z użyciem kwercetyny. Wykazano, że długotrwałe traktowanie komórek nowotworowych kwercetyną powoduje czasowe obniżenie poziomu Hsp70, jak również hamuje późniejszą odpowiedź Hsp70 na szok termiczny, co w rezultacie umożliwia kwercetynie indukcję apoptozy. Jeżeli natomiast komórki nowotworowe najpierw były poddane szokowi i dochodziło w nich do syntezy Hsp70, późniejsze traktowanie kwercetyną nie wywołało śmierci komórki (41, 47). Wykazano, że białko Hsp70 w mitochondriach występuje w kompleksie z prokaspazą-3, uniemożliwiając tym samym jej aktywację. Białka te mogą działać w wielu różnych miejscach szlaków sygnałowych. Stwierdzono, że białka te hamują kinazy JNK, zapobiegają tworzeniu się apoptosomu uniemożliwiając połączenie się cytochromu c z pozostałymi składnikami apoptosomu, nie dopuszczają również do proteolizy prokaspazy 9. Hsp70 neutralizuje też działanie czynnika AIF, który jest odpowiedzialny za apoptozę niezależną od kaspaz (41, 43, 47, 48, 49).

Heat-shock proteins as a new marker in the diagnosis of mammary gland tumors in bitches

Badowska-Kozakiewicz A.M., Department of Biophysics and Human Physiology, Medical University of Warsaw

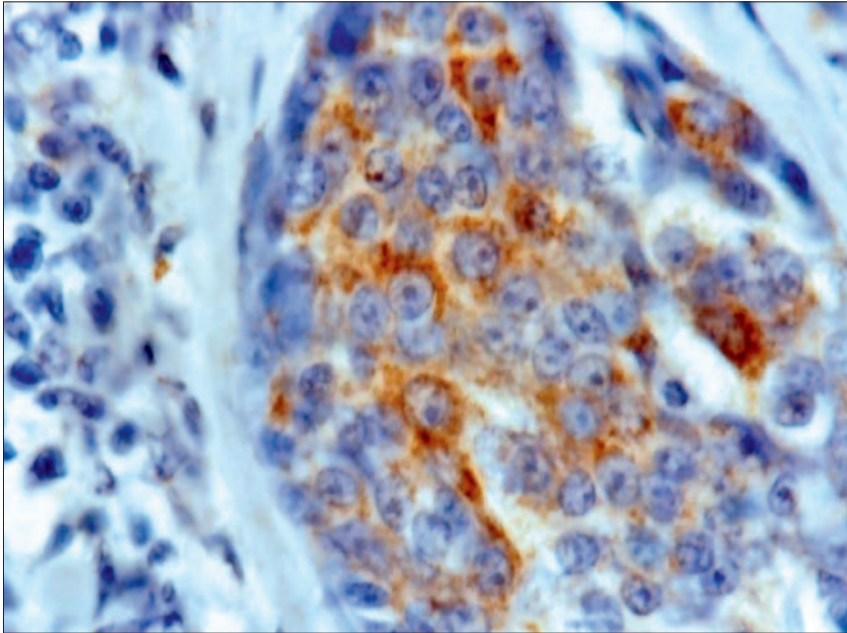
The purpose of this paper was to present a novel approach in pathomorphological diagnosis of mammary gland tumors in bitches. Heat-shock proteins (HSPs), are among new proteins induced in cells under stress conditions. They are also called “stress proteins” and belong to the group of evolutionary most conserved molecules that play a fundamental role in maintaining cellular integrity. Neoplastic cells are subjected to many molecular stressors so HSPs production and their levels are significantly elevated in tumors. The role of these proteins in carcinogenesis however, has not been clearly defined. Studies in humans confirmed that HSPs level may be an important predictor in breast cancer. There are only few data concerning heat shock proteins expression in canine mammary gland tumors. However, increased production of HSPs was found in squamous cell carcinoma and cervical cancer in dogs. Here, the linkage between the expression of HSPs and other neoplastic markers in mammary gland tumors in bitches was discussed.

Keywords: heat-shock proteins, tumors, mammary gland, bitch.

Interesującym zagadnieniem jest oddziaływanie Hsp z białkiem p53. Istnieje przypuszczenie, że podczas działania stresu zlokalizowany w cytoplazmie „dziki” typ p53 (p53wt) może częściowo przeistoczyć w formę zmutowaną (p53mut). „Dziki” typ p53 może być transportowany do jądra w obecności Hsp90, które stabilizuje jego strukturę, natomiast p53mut, który nie wiąże się bezpośrednio z Hsp90, tworzy w cytoplazmie niefunkcjonalne kompleksy. Również wykazano, że Hsp90 stabilizują wiązanie p53 do promotora genu białka P21 (50, 51, 52). Hsp70 i Hsp90 mogą także wykazywać proapoptotyczne działanie w stosunku do czynników inicjujących działanie maszynierii śmierci komórkowej, czyli receptorów śmierci, m.in. FAS/APO-1.

Białka szoku cieplnego w onkologii weterynaryjnej – obecny stan wiedzy

Z badań prowadzonych u ludzi wynika, że białka szoku cieplnego mogą być ważnym czynnikiem prognostycznym nowotworów sutka (53). Niewiele jest jednak danych dotyczących ekspresji białek szoku cieplnego w nowotworach gruczołu sutkowego u suk, jak również nie została precyzyjnie określona rola tych białek w procesie



Ryc. 1. Gruczolakorak prosty (*adenocarcinoma simplex*), IHC obraz komórek wykazujących ekspresję Hsp70, pow. 100× (rycina z badań własnych)

karcynogenezy. Na podstawie dotychczasowo prowadzonych badań stwierdzono jedynie, że ekspresja białek szoku cieplnego w nowotworach sutka u suk ma miejsce, lecz nie wykazano powiązań tych białek z innymi markerami nowotworowymi.

Seymour (54), który prowadził badania dotyczące raka słuźówki macicy u kobiet stwierdził, że białka szoku cieplnego są przydatnym markerem w diagnostyce tych nowotworów. Ekspresję Hsp27 badano też w raku piersi u kobiet (55) i stwierdzono związek pomiędzy ekspresją tego białka a stopniem zróżnicowania komórek guza. Z badań Storma (56) zaś wynika, że guzy, w których obecna jest ekspresja Hsp27 wykazują wyższy stopień złośliwości niż guzy, gdzie ekspresja tego białka była negatywna. Ekspresję białek Hsp70 i Hsp90 w raku piersi u kobiet badał Kumaraguruparan (57), który stwierdził korelację między ekspresją obu białek a aktywnością proliferacyjną. Wykazał on ponadto, że białka szoku cieplnego są istotnym czynnikiem prognostycznym. Hsp70 wykryto też w prawidłowych tkankach przewodu pokarmowego, ale zwiększoną ekspresję tego białka obserwowano w nowotworach przewodu pokarmowego (58). Przypuszcza się, że Hsp70 odgrywa ważną rolę w stopniu zróżnicowania komórek guza, co może wskazywać, że białko to jest istotnym czynnikiem prognostycznym (58).

W medycynie weterynaryjnej podobne badania są prowadzone, ale na mniejszą skalę. U psów ekspresję białek szoku cieplnego badano w prawidłowej skórze i raku płaskonabłonkowym skóry (59) oraz w zakaźnym guzie wenerycznym (guz Sticker; 60). W raku gruczołu sutkowego u suk

podobne badania prowadziła Rommanucci (61), która stwierdziła ekspresję białek z rodziny Hsp70 i Hsp90 w gruczolakorakach prostych i złożonych oraz litych. Ekspresję tych białek obserwowała w cytoplazmie, ale też w jądrach komórek nowotworowych (ryc.1). Rommanucci (61) w swoich badaniach nad rakami gruczołu sutkowego suk nie podjęła próby sprawdzenia, czy istnieją zależności między białkami szoku cieplnego a innymi markerami nowotworowymi (61). Swoją uwagę skupiła na określeniu stopnia ekspresji białek i ich lokalizacji w komórkach nowotworowych. Ekspresję Hsp90 stwierdziła we wszystkich badanych guzach (raki proste i złożone) i wykazała, że białka te wiążą się ze złą prognozą i biorą udział w karcynogenezie, podobnie jak białko Hsp27. Autorka na podstawie wyników, które uzyskała w badaniach zasugerowała, że białka Hsp mogą odgrywać ważną rolę w procesie karcynogenezy (61). Dane literaturowe (62) świadczą, iż w komórkach raka sutka nadekspresja Hsp70 również wiąże się ze złą prognozą.

Na podstawie przeglądu piśmiennictwa nasuwa się pytanie – czy dotychczasowa wiedza na temat białek szoku cieplnego w nowotworach gruczołu sutkowego u suk jest wystarczająca, aby uznać te białka za nowy marker w diagnostyce tych guzów i włączyć je do rutynowej diagnostyki? Z pewnością wymaga to dalszych badań, które potwierdziłyby dotychczasowe wyniki uzyskane przez badaczy. Wówczas istniałaby możliwość włączenia białek szoku cieplnego w panel dotychczas uznanych czynników rokowniczych i predykcyjnych w nowotworach gruczołu sutkowego u suk, takich jak: indeks mitotyczny, indeks znakowanej tymidyny, ekspresja antygeny

jądrowego Ki-67 i antygeny jądrowego komórek dzielących się PCNA, a także ekspresja receptorów estrogenowych (ER) i progesteronowych (PgR).

Potwierdzenie dotychczasowych wyników badań pozwoliłoby na uznanie białek szoku cieplnego za nowy marker w ocenie immunohistochemicznej nowotworów gruczołu sutkowego u suk, jak również na stosowanie białek szoku cieplnego w rutynowej diagnostyce patomorfologicznej.

Mechanizmy ochronnego działania Hsp w apoptozie nie są jeszcze w pełni poznane, lecz, wykorzystując wysoką immunogenność białek szoku cieplnego, czynione są próby z zastosowaniem ich do produkcji szczepionek, które w przyszłości mogą odegrać ważną rolę w transplantologii, w zapobieganiu i leczeniu chorób autoimmunologicznych, zakaźnych i nowotworów.

Piśmiennictwo

- Niwińska A.: Nowe czynniki prognostyczne u chorych na raka sutka. *Nowotwory* 1995, **45**, 459-469.
- Olszewski W.: Wybrane zagadnienia z patomorfologii raka sutka. *Nowotwory* 1994, **44**, (supl 2), 10-16.
- Hendrick J.P., Hart F.U.: Molecular chaperone functions of heat-shock proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 1993, **62**, 349-384.
- Hart F.U.: Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* 1996, **381**, 571-580.
- Pratt W.B.: The role of heat shock proteins in regulating the function, folding, and trafficking of the glucocorticoid receptor. *J. Biol. Chem.* 1993, **268**, 21455-21458.
- Jäättelä M.: Heat shock proteins as cellular lifeguards. *Ann Med* 1999, **31**, 261-271.
- Jakubowicz-Gil J., Gawron A.: Rozmieszczenie i rola białek szoku termicznego w komórce zwierzęcej. *Post. Biol. Kom.* 1999, **26**, 267-283.
- Schlesinger M.J.: Heat shock proteins. *J. Biol. Chem.* 1990, **265**, 12111-12114.
- Welch W.J.: Mammalian stress response: Cell physiology, structure/function of stress proteins and implication for medicine and disease. *Physiol. Rev.* 1992, **72**, 1063-1081.
- Ritossa F.M., von Borstel R.C.: Chromosome puffs in *Drosophila* induced by ribonuclease. *Science*. 1964, **145**, 513-514.
- Kaufmann H.E.: Heat-shock protein and pathogenesis of bacterial infections. *Springer Semin. Immunopathol.* 1991, **13**, 25-35.
- Ang D., Liberek K., Skowrya D., Żylicz M.: Biological role and regulation of the universally conserved heat shock protein. *J. Biol. Chem.* 1991, **266**, 24233-24236.
- Beresford P.J., Jaju M., Friedman R.S., Yoon M., Lieberman J.: A role of heat shock protein 27 in CTL-mediated cell death. *J. Immunol.* 1998, **161**, 161-167.
- Ciocca D.R., Oesterreich S., Chamness C., Mcguire W.L., Fuqua S.A.: Biological and clinical implications of heat shock protein 27000 (Hsp27): a Review. *J. Natl. Cancer Inst.* 1993, **85**, 1558-1570.
- Guzik K., Bzowska M., Dobrucki J., Pryjma J.: Heat-shocked monocytes are resistant to *Staphylococcus aureus* - induced apoptotic DNA fragmentation due to expression of Hsp27. *Infect. Immun.* 1999, **67**, 4216-4222.
- Menoret A., Chandawarkar R.Y., Srivastava P.K.: Natural autoantibodies against heat-shock proteins hsp70 and gp96: implications for immunotherapy using heat - shock proteins. *Immunology* 2000, **101**, 364-370.
- Russel A.D.: Lethal effects of heat on bacterial physiology and structure. *Science Progress* 2003, **86**, 115-137.
- Sargent C.A., Dunham I., Trowsdale J., Campbell R.D.: Human major histocompatibility complex contains genes for the major heat shock protein Hsp70. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1989, **86**, 1968-1972.
- Shinnick T.M.: Heat shock proteins as antigens of bacterial and parasitic pathogens. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2001, **167**, 145-160.
- Todryk S.M., Melcher A.A., Dalgleish A.G., Vile R.G.: Heat shock proteins refine the danger theory. *Immunology* 2000, **99**, 334-337.

21. Udono H., Srivastava P.K.: Heat shock proteins 70-associated peptides elicit specific cancer immunity. *J. Exp. Med.* 1993, **178**, 1391-1396.
22. Chen Y., Lin-Shiau S., Lian J.: Involvement of heat shock protein 70 and p53 protein. Attenuation of UVC-Induced apoptosis by thermal stress in hepatocellular carcinoma cells. *Photochem. Photobiol.* 1999, **70**, 78-86.
23. Denagel D.C., Pierce S.K.: A case for chaperones in antigen processing. *Immunol. Today* 1992, **13**, 86-89.
24. Mycko M.P., Ćwiklińska H., Szymański J., Kudła G., Kilianek L., Selmaj K.W.: Inducible heat shock protein 70 promotes myelin autoantigen presentation by the HLA Class III. *J. Immunol.* 2004, **172**, 202-213.
25. Tamura Y., Peng P., Liu K., Daou M., Srivastava P.K.: Immunotherapy of tumors with autologous tumor-derived heat shock proteins preparations. *Science* 1999, **284**, 819-822.
26. Lipińska B.: Rola białek szoku termicznego. *Post. Bioch.* 1990, **1-2**, 32-42.
27. Schirmer E.C., Glover J.R., Singer M.A., Lindquist S.: Hsp100/ Clp proteins: a common mechanism explains diverse functions. *TIBS* 1996, **21**, 289-296.
28. Duina A., Chang H., Marsh J., Lindquist S.: A cyclophilin function in Hsp90-dependent signal transduction. *Science* 1996, **274**, 1713-1717.
29. Jacob U.: Hsp90-news from the front. *Frontiers in Bioscience* 1996, **1**, 309-317.
30. Kuhl N.M., Rensing L.: Heat shock effects on cell cycle progression. *Cell. Mol. Life Sci.* 2000, **57**, 450-463.
31. Xanthoudakis S., Nicholson D.: Heat shock proteins as death determinants. *Nature Cell Biol.* 2000, **2**, 163-165.
32. Mannick J.B.: The antiviral role of nitric oxide. *Res. Immunol.* 1995, **146**, 693-707.
33. Somersan S., Larsson M., Fonteneau J.F., Basu S., Srivastava P., Bhardwaj N.: Primary tumor tissue lysates are enriched in heat shock proteins and induce the maturation of human dendritic cells. *J. Immunol.* 2001, **167**, 4844-4852.
34. Polla B.: A role for heat shock proteins in inflammation. *Immunol. Today* 1988, **9**, 134-137.
35. Renkawek K., Stege G.J.J., Bosman G.J.: Dementia, gliosis and expression of the small heat shock proteins hsp27 and alphaB-crystallin in Parkinson's disease. *NeuroReport* 1999, **10**, 2273-2276.
36. Liberek K., Marszałek J., Ang D., Żylicz M.: *Escherichia Coli* DnaJ and GrpE heat shock proteins jointly stimulate ATPase activity of DnaK. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1991, **88**, 2874-2878.
37. Santoro M.G.: Heat shock factors and the control of the stress response. *Bioch. Pharmacol.* 2000, **59**, 55-63.
38. Porankiewicz J., Gwóźdź E.A.: Białka szoku termicznego i ich rola w komórkach roślinnych. *Post. Biol. Kom.* 1993, **20**, 155-170.
39. Quintana F.J., Rotem A., Carmi P., Cohen I.R.: Vaccination with empty plasmid DNA or CpG oligonucleotide inhibits diabetes in nonobese diabetic mice: modulation of spontaneous 60-kDa heat shock protein autoimmunity. *J. Immunol.* 2000, **165**, 6148-6155.
40. Galea-Lauri J., Richardson A.J., Latchman D.S., Katz D.R.: Increased heat shock protein 90 (hsp90) expression leads to increased apoptosis in the monoblastoid cell line U937 following induction with TNF-alpha and cycloheximide. *J. Immunol.* 1996, **157**, 4109-4118.
41. Gerrido C., Gurbuxani S., Ravagnani L., Kroemer G.: Heat shock protein: endogenous modulators of apoptotic cell death. *Bioch. Bioph. Comm.* 2001, **286**, 433-442.
42. Grzelakowska-Sztaber B.: Apoptoza i nowotwory. *Post. Biol. Kom.* 2000, **27**, 9-43.
43. Jolly C., Morimoto R.L.: Role of the heat shock response and molecular chaperones in oncogenesis and cell death. *J. Natl. Cancer Inst.* 2000, **92**: 1564-1572.
44. Srivastava P.K.: Peptide-binding heat shock protein in the endoplasmic reticulum: Role in immune response to cancer and in antigen presentation. *Adv. Cancer Res.* 1993, **62**, 153-177.
45. Beere H.M., Wolf B.B., Cain K., Mosser A., Mahboubi A., Kuwana T., Pankaj T., Morimoto R.L., Cohen G.M., Green D.R.: Heat shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome. *Nature Cell Biol.* 2000, **2**, 469-475.
46. Beere H.: Stressed to death: Regulation of apoptotic signaling pathways by the heat shock proteins. *Science* 2001, **93**: RE1.
47. Creagh E.M., Carmody R.J., Cotter T.G.: Heat shock protein 70 inhibits caspase-dependent and-independent apoptosis in Jurkat T Cell. *Exp. Cell. Res.* 2000, **257**, 58-66.
48. Willem van Eden: Stress proteins as target anti-inflammatory therapies. *Therapeutic Focus* 2000, **5**, 114-120.
49. Ravagnan L., Gurbuxani S., Susin S.A., Maisee C., Daugas E., Zamzami N., Mak T., Jäättelä M., Penninger J.M., Garrido C., Kroemer G.: Heat-shock protein 70 antagonizes apoptosis-inducing factor. *Nature Cell Biol.* 2001, **3**, 839-843.
50. Agoff S.N., Daniel J.H., Wu L.B.: Regulation of the human hsp70 promoter by p53. *Science* 1993, **259**, 84-87.
51. Panjwani N.N., Popova L., Srivastava P.K.: Heat shock proteins gp96 and hsp70 activate the release of nitric oxide by APCs. *J. Immunol.* 2002, **168**, 2997-3003.
52. Zugel U., Kaufmann S.: Immune response against heat shock protein in infectious diseases. *Immunobiol.* 1999, **201**, 22-35.
53. Morino M., Tsuzuki T., Ishikawa, Y., Shirakami, T., Yoshimura, M., Kiyosuke, Y., Matsunaga, K., Yosikumi, C., Sa-ji, N.: Specific expression of HSP27 in human tumor cell lines in vitro. *In Vivo* 1997, **11**, 179-184.
54. Saymour L. Bezwoda W.R., 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* 1990, **66**, 2390-2394.
55. Ciocca, D.R., Stati, A.O., Ampriso de Castro M.M.: 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. Ther.* 1990, **16**, 243-54.
56. Storm F.K., Mahvi D.M., Gilchrist K.W. Heat shock protein 27 overexpression in breast cancer lymph node metastasis. *Ann. Surg. Oncol.* 1993, **3**, 570-573.
57. Kumaraguruparan R., Kurunagarani D., Balachandran C., Manohar B.M., Nagini S.: Of humans and canines: a comparative evaluation of heat shock and apoptosis-associated proteins in mammary tumors. *Clin. Chim. Acta* 2006, **365**, 168-176.
58. Isomoto H., Oka M., Yano Y., Kanazawa Y., Soda H., Terada R., Yasutake T., Nakayama T., Shikuwa S., Takeshima F., Udano H., Murata I., Ohtsuka K., Kohno S.: Expression of heat shock protein Hsp70 and Hsp40 in gastric cancer. *Cancer Lett.* 2003, **198**, 219-228.
59. Romanucci M., Bongiovanni L., Marruchella G., Maria M., di Guardo G., Preziosi R., Della Salda L.: Heat shock proteins expression in canine intrauterine squamous epithelioma and squamous cell carcinoma. *Vet. Dermatol.* 2005, **16**, 108-116.
60. Chu R.M., Sun T.J., Yang H.Y., Wang P.G., Liao K.W., Chuang T.F., Lin C.H. Lee W.C.: Heat shock proteins in canine transmissible venereal tumor. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2001, **82**, 9-21.
61. Romanucci M., Marinelli A., Giuseppe S., Dell Salda L.: Heat shock protein expression in canine malignant mammary tumours. *BMC Cancer* 2006, **6**, 171-183.
62. Chen D., Androlewicz M.J.: Heat shock protein70 moderately enhances peptide binding and transport by the transporter associated with antigen processing. *Immunol. Lett.* 2001, **75**, 143-148.

Dr Anna M. Badowska-Kozakiewicz, Zakład Biofizyki i Fizjologii Człowieka, Warszawski Uniwersytet Medyczny, e-mail: abadowska@op.pl