

Received: 2013.07.07
Accepted: 2015.03.25
Published: 2015.10.19

Białka szoku cieplnego HSP60 i perspektywy ich wykorzystania jako antygenów szczepionkowych*

Heat shock protein HSP60 and the perspective for future using as vaccine antigens

Joanna Bajzert, Tadeusz Stefaniak

Katedra Immunologii, Patofizjologii i Prewencji Weterynaryjnej, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

Streszczenie

Białka szoku cieplnego (heat shock proteins, HSPs) wykazują silny konserwatyzm oraz wysoką zgodność sekwencji, są szeroko rozpowszechnione w naturze, identyfikowane zarówno u *Prokaryota*, jak i *Eucaryota*. Wśród białek szoku cieplnego wyróżnia się dziesięć rodzin, w tym HSP60, których główną funkcją jest fałdowanie nowo syntetyzowanych łańcuchów polipeptydowych oraz zapobieganie ich agregacji. W wielu pracach wykazano, że białka te są ekspozowane na powierzchni komórek, a w przypadku bakterii ekspozycja ma charakter ciągły i wzrasta intensywnie w wyniku działania na nie bodźców stresowych. Udowodniono również, że są one ważnym składnikiem biofilmu. W środowisku zewnątrzkomórkowym białka rodziny HSP60 same lub w połączeniu z białkami własnymi organizmu lub drobnoustrojów mogą stanowić łącznik między poszczególnymi elementami układu immunologicznego, wpływając na jego aktywność. Proteiny te oddziałują na układ immunologiczny w postaci antygenów, nośników innych cząstek oraz ligandów dla określonych receptorów, prowadząc do pobudzenia zarówno elementów komórkowych układu odporności wrodzonej (makrofagów, monocytów, komórek dendrytycznych), jak i nabytej (limfocytów T regulatorowych, naiwnych, efektorowych oraz limfocytów B). Ponieważ HSP są jednym z dominujących, silnie immunogennych antygenów bakteryjnych oraz grzybiczych identyfikowanych podczas zakażeń, istnieją przesłanki, by stosować je jako składniki szczepionek lub ze względu na ich właściwości jako nośniki innych antygenów.

Słowa kluczowe:

białka szoku cieplnego, molekularne chaperony, szczepionki podjednostkowe, bakterie Gram-ujemne

Summary

Heat Shock Proteins (HSPs) are widely spread in nature, highly conserved proteins, found in all prokaryotic and eukaryotic cells. HSPs have been classified in 10 families, one of them is the HSP60 family. HSP60 function in the cytoplasm as ATP-dependent molecular chaperones by assisting the folding of newly synthesised polypeptides and the assembly of multiprotein complexes. There is a large amount of evidence which demonstrate that HSP60 is expressed on the cell surface. Especially in bacteria the expression on the surface occurs constitutively and increases remarkably during host infection. HSP60 also play an important role in biofilm formation. In the extracellular environment, HSP60 alone or with self or microbial proteins can acts not only as a link between immune cells, but also as a coordinator of the immune system activity. This protein could influence the immune system in a different way because they act as an antigen, a carrier of other functional molecules or as a ligand for receptor. They are able to stimulate both cells of the acquired (naïve, effector, regulatory T lymphocyte, B lymphocyte) and

*Publikacja współfinansowana ze środków Krajowego Naukowego Ośrodka Wiodącego (KNOW) na lata 2014-2018 dla Wrocławskiego Centrum Biotechnologii.

Keywords:	the innate (macrophages, monocytes, dendritic cells) immune system. HSPs have been reported to be potent activators of the immune system and they are one of the immunodominant bacterial antigens they could be a good candidate for a subunit vaccine or as an adjuvant. heat shock proteins, molecular chaperonin, subunit vaccines, Gram-negative bacteria
Full-text PDF:	http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=1175008
Word count:	7553
Tables:	1
Figures:	4
References:	120

Adres autorki: dr inż. Joanna Bajzert, Katedra Immunologii, Patofizjologii i Prewencji Weterynaryjnej, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, ul. Norwida 31, 50-375 Wrocław; e-mail: joanna.bajzert@up.wroc.pl

Wykaz skrótów: **AA** – zapalenie stawów indukowane adiuwantem (adjuvant arthritis), **ADP** – adenozyntrifosforan, **APC** – komórka prezentująca antygen (antigen presenting cell), **ATP** – adenozyntrifosforan, **B7-1 (CD86)/B7-2 (CD80)** – cząsteczki obecne na powierzchni APC, wiążą CD28 na limfocytach T, działają jako silne sygnały kostymulujące, **CD** – antygen różnicowania komórkowego (cluster of differentiation), **CD11** – podjednostka α integryn, takich jak LFA1 (CD11a) czy Mac1 (CD11b), podjednostka receptora dopełniacza (CD11c), **CD14** – białko zaangażowane w odpowiedź komórkową na LPS; ekspresjonowane przez monocyty i makrofagi, **CD40** – wiąże CD154, białko kostymulujące obecne na powierzchni limfocytów B, monocytów/makrofagów i folikularnych DC, **CD45** – wspólny antygen limfocytów, obecny na powierzchni limfocytów T, B, NK oraz monocytów/makrofagów, **CD45RA⁺** – fenotyp naiwnych limfocytów T, **CD45RO⁺** – fenotyp efektorowych limfocytów T, **CD69** – transmembranowa lektyna typu C; ekspresjonowana przez zaktivowane limfocyty T i NK, **CD91** – receptor α_2 -makroglobulinowy, **Cd-Hsp60** – *Clostridium difficile* Hsp60, **ch-Hsp60** – chlamydia Hsp60, **Chp-Hsp60** – *Chlamydia pneumoniae* Hsp60, **Cht-Hsp60** – *Chlamydia trachomatis* Hsp60, **CT** – toksyna cholery adiuwant stosowany podczas immunizacji błon śluzowych (cholera toxin), **DCs** – komórki śródbłonna dendrytyczne (dendritic cells), **Ec-Hsp60** – GroEL, *Escherichia coli* Hsp60, **ECs** – komórki śródbłonna (endothelial cells), **FAC** – kompletny adiuwant Freund (Freund's adjuvant complete), **FAI** – niekompletny adiuwant Freund (Freund's adjuvant incomplete), **Ft-Hsp60** – *Francisella tularensis* Hsp60, **GPIC** – sposób namnożenia chlamydii z wykorzystaniem komórek McCoy – linii komórkowej fibroblastów mysich (guinea pig inclusion conjunctivitis), **GroEL** – białko Hsp60 pochodzące od *Prokaryota*, **GroES** – białko Hsp10 pochodzące od *Prokaryota*, **hamHsp60** – chomiche Hsp60 (hamster Hsp60), **Hc-Hsp60** – *Histoplasma capsulatum* Hsp60, **hHsp60** – ludzkie Hsp60 (human Hsp60), **Hp-Hsp60** – *Helicobacter pylori* Hsp60, **HSFs** – czynniki transkrypcyjne regulujące ekspresję genów HSP (heat shocks factors), **Hsp** – białko szoku cieplnego (heat shock protein), **HSP 10, 40, 60, 70, 90, 95, 110** – rodziny białek szoku cieplnego o odmiennej masie cząsteczkowej i pełnionych funkcjach, **i.d.** – śródskórnie (intradermally), **i.m.** – domięśniowo (intradermally), **i.n.** – donosowo (intranasally), **i.p.** – dootrzewnowo (intraperitoneally), **i.t.** – do tchawicy (intratracheally), **i.v.** – dożylnie (intravenously), **ISCOM** – rodzaj adiuwantu/kompleks immunostymulujący, **Li-Hsp70** – *Leishmania infantum* Hsp70, **Lp-Hsp60** – *Legionella pneumophila* Hsp60, **LPS** – lipopolisacharyd, **Mb-Hsp65** – *Mycobacterium bovis* BCG Hsp65, **mHsp60** – mysie Hsp60 (mouse Hsp60), **MI-Hsp65** – *Mycobacterium leprae* Hsp65, **Mt-Hsp65** – *Mycobacterium tuberculosis* Hsp65, **OVA** – Ovalbumina, **p.o.** – doustnie (per os), **Pb-Hsp60** – *Paracoccidioides brasiliensis* Hsp60, **Ps-Hsp60** – *Piscirickettsia salmonis* Hsp60, **rHsp** – rekombinowane białko szoku cieplnego (recombinant heat shock protein), **rtHsp60** – szczurze Hsp60 (rat Hsp60), **s.c.** – podskórnie (subcutaneously), **ST-Hsp60** – *Salmonella enterica* serowar Typhi Hsp60; **TCR** – receptor limfocytów T składający się z dimeru $\alpha\beta$ lub $\gamma\delta$ w powiązaniu z zespołem cząsteczek CD3 (T Cell Receptor), **TLR2** – receptor Toll-podobny; potencjalne ligandy to: peptydoglikan, poryny, lipoarabinomannan, fosfolipomannan (Toll Like Receptor 2), **TLR4** – receptor Toll-podobny, potencjalne ligandy to: LPS, mannan, glikoinozytolofosfolipidy, białka otoczki wirusów, HSP60, HSP70 (Toll Like Receptor 4), **Ye-Hsp60** – *Yersinia enterocolitica* Hsp60.

CHARAKTERYSTYKA OGÓLNA BIAŁEK SZOKU CIEPLNEGO

HSPs (heat shock proteins) zwane białkami szoku cieplnego to konserwatywne, szeroko rozpowszechnione w środowisku proteiny, identyfikowane zarówno u *Prokaryota*, jak i *Eucaryota*. Uważa się, że sięgające nawet 50% podobieństwo sekwencji między izolowanymi od ssaków i bakterii białek HSP jest jednym z największych w całej biosferze [28,50,120]. Komórki *Prokaryota* i *Eucaryota* syntetyzują białka szoku cieplnego w sposób konstytutywny (niektóre HSP60, HSP90), w wyniku pojawienia się warunków stresowych (HSP70 i HSP27) [76], w tym środowiskowych (promieniowanie UV, metale ciężkie), patologicznych (infekcje, guzy złośliwe) oraz fizjologicznych (czynniki wzrostu, proces różnicowania komórek) [64].

Niezwykłą cechą HSP jest ich zdolność do oddziaływania z wieloma białkami, co odróżnia je od większości protein wewnątrzkomórkowych wchodzących w interakcje zwykle z jedną lub niewielką liczbą partnerów, co przyczynia się do plejotropowej aktywności białek HSP [61]. Główna rola białek szoku cieplnego obejmuje udział w prawidłowym fałdowaniu oraz translokacji protein, a także tworzeniu i niszczeniu kompleksów białkowych [28]. Udowodniono również, że białka te biorą udział w pobudzeniu układu immunologicznego, w przebiegu programowanej śmierci komórki (działanie proapoptotyczne), ochronie DNA oraz pre-mRNA przed degradacją i uszkodzeniem (działanie antyapoptotyczne) [43,75,83,99]. Jednocześnie mogą się przyczyniać do rozwoju schorzeń na tle autoimmunologicznym, np. reumatoidalnego zapalenia stawów [55], łuszczyca [88], arteriosklerozy, [107], periodontitis [98] czy choroby Behceta [55,63,98]. Istnieją również dowody, że HSP należą do antygenów chroniących komórki przed rozwojem nowotworów z uwzględnieniem różnych modeli guzów [97].

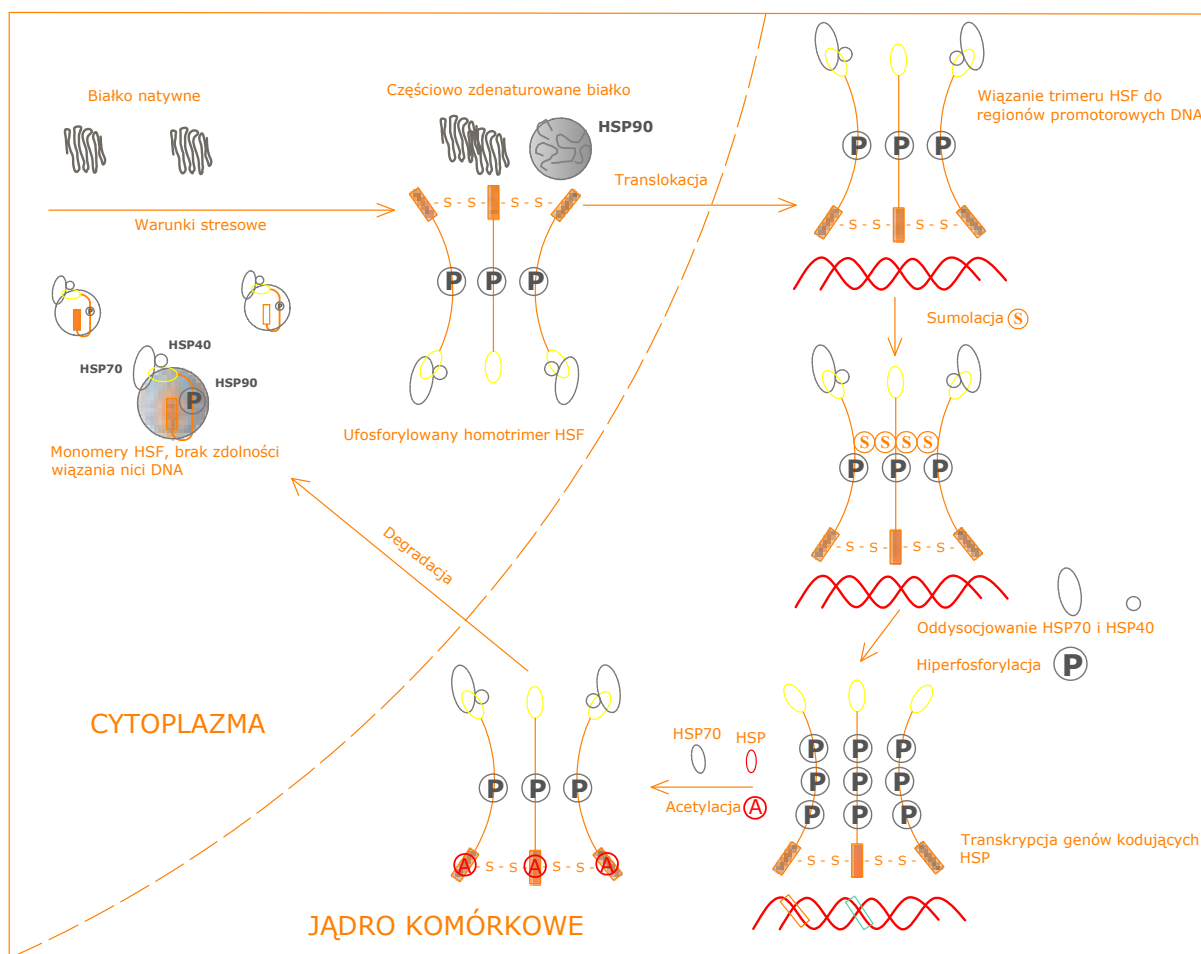
Obecnie są różne propozycje podziału białek szoku cieplnego, m.in. na podstawie jednocześnie pełniowanych funkcji oraz ich masy cząsteczkowej. Według Bolhassani i Rafati wśród tej grupy protein wyróżniono dziesięć rodzin w tym: HSP40, 60, 70, 90, 110, niskocząsteczkowe HSP określane mianem sHSP (small HSP), HSP10, HSP95, GRP170 oraz kalretikulin [10]. Nazwy rodzin białek szoku cieplnego pisane są dużymi literami, np. HSP60, natomiast proteiny należące do poszczególnych rodzin w sposób konwencjonalny, jak nazwy własne, np. Hsp60 [54].

REGULACJA TRANSKRYPCJI GENÓW KODUJĄCYCH HSP

Biosynteza HSP jest regulowana przez czynniki transkrypcyjne znane jako HSFs (heat-shock factors), które rozpoznają swoiste fragmenty DNA, tzw. HSEs (heat-shock elements) złożone z wielokrotnych przylegających do siebie powtórzeń pentamerowych sekwencji 5' nGAAn3' umiejscowionych w obszarze promotorowym docelowych genów [7,106]. Po związaniu czynnika transkrypcyjnego do HSEs możliwe jest przyłączenie się kompleksu polimerazy II do wybranego genu kodują-

cego HSP i rozpoczęcie procesu transkrypcji. U większości kręgowców oraz roślin identyfikuje się cztery różne czynniki HSF (HSF1-4).

W warunkach stresowych, przy wzroście niestabilności nowo syntetyzowanych polipeptydów, dochodzi do aktywacji czynnika HSF1, obecnego w cytoplazmie w postaci monomerycznych cząsteczek, niezdolnych do wiązania DNA. Aktywność transkrypcyjna HSF1 w warunkach fizjologicznych znajduje się pod ścisłą kontrolą tworzonych przez monomer HSF1 oraz białka HSP90 i/lub Hsp70, Hsp40 heterokompleksów (ryc. 1). W przypadku kompleksu tworzego przez białko Hsp70 oraz HSF regulacja ekspresji genów HSP polega na wiązaniu transaktywnej domeny czynnika transkrypcyjnego. Interakcje te nie mają wpływu na zdolność wiązania przez czynnik HSF1 cząsteczki DNA, jak również zależnej od warunków stresowych fosforylacji, uniemożliwiają jednak aktywację procesu transkrypcji. Inhibicja czynnika transkrypcyjnego prowadząca do hamowania powinowactwa HSF1 do nici DNA jest możliwa przez oddziaływanie cząsteczek HSBP1 (heat shock protein binding factor 1) z aktywną trimeryczną postacią HSF1/Hsp70. Proces oddysocjowania czynnika transkrypcyjnego od heterokompleksu (HSF/Hsp90/Hsp70/Hsp40) w warunkach stresowych, prowadzący do jego aktywacji, nie został jeszcze wyjaśniony [7,56,78,79]. Wiadomo jednak, że do pełnej aktywacji czynnika HSF1 niezbędny jest proces jego trymerzacji oraz modyfikacji polegającej na jego sumolacji i hiperfosforylacji (ryc. 1). Proces trymerzacji zachodzi w cytoplazmie komórki, natomiast proces fosforylacji wydaje się bardziej skomplikowanym i może się odbywać zarówno w cytoplazmie, jak i jądrze komórkowym. Aktywacja czynników transkrypcyjnych HSF polega na ich hiperfosforylacji przeprowadzanej przez białka należące do podrodziny kinaz MAPK (kinaz białkowych aktywowanych mitogenem), takich jak ERK1, JNK/SAPK, kinazy białkowej p38 [56,78]. Miejsca konstytutywnej fosforylacji czynnika HSF1 obejmujące Ser³⁰³, Ser³⁰⁷, Ser³⁶³ odgrywają istotną rolę w represji aktywności transkrypcyjnej HSF1, podczas gdy miejsca indukowanej fosforylacji, takie jak Ser²³⁰, Ser³²⁶, Ser⁴¹⁹ promują jego aktywność. Regulacja ekspresji HSP zależy więc z dużym prawdopodobieństwem od równowagi aktywności kinaz i fosfataz oddziałujących z HSF1 [56,106]. Częściowo ufosforylowany trimer, zbudowany z podjednostek HSF1, ulega translokacji do jądra komórkowego, gdzie po jego hiperfosforylacji indukuje transkrypcję różnych genów HSP, w tym Hsp70 oraz Hsp90. Wzrastający poziom tych chaperonów może następnie wywołać inaktywację HSF1 przez wiązanie jego formy monomerycznej oraz trimerycznej [78,79,80]. Wraz ze starzeniem się komórek coraz więcej monomerycznych form HSF1 jest identyfikowanych we frakcji jądrowej, a komórki takie poddane szokowi cieplnemu znacznie rzadziej w porównaniu do komórek młodych tworzą trimeryczne formy HSF1. Sugeruje się, że zmiany te przyczyniają się do osłabienia aktywności białek szoku cieplnego w przypadku starzenia się komórek [54].



Ryc. 1. Regulacja transkrypcji genów kodujących HSP. W warunkach stresowych dla komórki dochodzi do aktywacji czynnika HSF1, którego aktywność transkrypcyjna w warunkach fizjologicznych znajduje się pod ścisłą kontrolą białek HSP90 i/lub Hsp70 oraz Hsp40 (obszar cytoplazmy). Do pełnej aktywacji czynnika HSF1 jest niezbędny proces jego trymeryzacji (częściowo ufosforylowany trimer, ulega translokacji do jądra komórkowego), jak również proces modyfikacji polegającej na jego sumolacji (S - obszar jądra komórkowego), a następnie hiperfosforylacji (P - obszar jądra komórkowego). Zaktywowany czynnik HSF1 indukuje transkrypcję różnych genów HSP w tym Hsp70 oraz Hsp90. Wzrastający poziom tych chaperonów może następnie doprowadzić do inaktywacji HSF1 poprzez wiązanie jego postaci monomerycznej, jak i trimerycznej

BIAŁKA SZOKU CIEPLNEGO O MASIE 60kDa JAKO MOLEKULARNE CHAPERONY

Komórki izolowane od ssaków są zdolne do ekspresji około 10 000 różnych białek. Syntetyzowane z udziałem rybosomów peptydy mogą być zbudowane nawet z kilku tysięcy aminokwasów. Aby polipeptydowe łańcuchy mogły w sposób prawidłowy funkcjonować w organizmie, muszą ulec procesowi fałdowania i przyjąć postać natywną białka [4]. Powstałe, natywne białko w celu zachowania funkcjonalności musi utrzymać swoją konformację w środowisku fizjologicznym, natomiast przyjęta struktura musi być w minimalnym stopniu korzystna termodynamicznie. Jak dowiodły badania dotyczące eksperymentalnego fałdowania białek w warunkach *in vitro*, sekwencja aminokwasowa kodowana przez DNA zawiera wszystkie niezbędne informacje dotyczące jego trzeciorzędowej struktury [21]. Należy podkreślić, że pro-

ces fałdowania polipeptydowych łańcuchów w komórce najczęściej nie jest procesem spontanicznym i w przypadku wielu protein wymaga obecności molekularnych chaperonów oraz nakładu energii [48]. Białka opiekuńcze chronią łańcuchy peptydowe przed nieprawidłowym fałdowaniem, nie dostarczają jednak żadnej informacji dotyczącej konformacji przyjmowanej w zachodzącym z ich udziałem procesie [50]. Oprócz kontroli procesu zwijania łańcuchów polipeptydowych chaperony mogą również zapobiegać ich agregacji. Zachodzący proces agregacji nieodwracalnie usuwa białka ze ścieżki fałdowania, co w szczególnych warunkach może prowadzić do tworzenia się fibrylarnych struktur zwanych amyloidami, których obecność może się przyczyniać do rozwoju choroby Alzheimera oraz Huntingтона [85]. Niewątpliwie więc kontrolowanie jakości powstałych protein oraz utrzymanie homeostazy proteomu wydaje się podstawowe dla prawidłowego funkcyjono-

wania komórki oraz całego organizmu. Jest to możliwe dzięki istniejącej w komórce zintegrowanej sieci kilku-
set białek, takich jak molekularne chaperony i ich białka
regulatorowe, system ubiquityna – proteasom UPS (ubi-
quitin – proteasome system) oraz procesowi autofago-
cytozy [49].

Na szczególną uwagę, wśród zaangażowanych w procesy
utrzymania homeostazy proteomu rodzin białek szoku
cieplnego, zasługują: sHSP, α -krystaliny, HSP40, HSP60,
HSP70, HSP90, HSP100 oraz kalretikulina [28,49]. Wię-
kszość z wymienionych chaperonów wchodzi w interak-
cje z peptydami przez rozpoznanie reszt hydrofobowych
i/lub nieustrukturyzowanych fragmentów szkieleto-
wych substratu [50]. Sposób oddziaływania chaperonów
oraz ich udział w procesie fałdowania będzie omówiony
na przykładzie białek szoku cieplnego o masie 60 kDa.

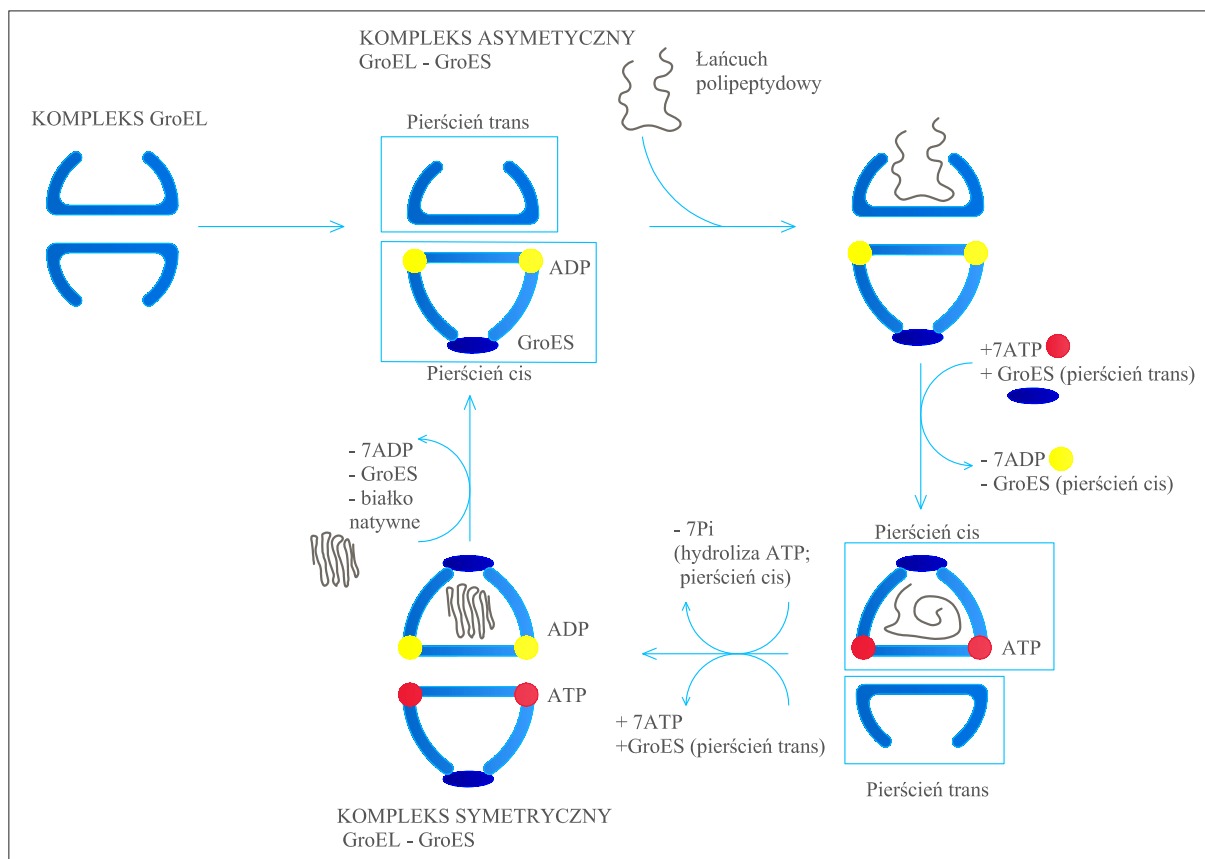
Chaperony należące do tej rodziny to duże kompleksy
zbudowane z dwóch pierścieni (double-rings complex)
~ 800-900 kDa, które łączą się w sposób umożliwiający
utworzenie wewnętrznego kanału. Wśród nich wyróżnia
się dwie grupy. Grupa I, znana jako Hsp60s u *Eucaryota*
oraz GroEL u *Procarvota*, jest identyfikowana wyłącznie
u eubakterii oraz w organellach pochodzenia endosym-
biotycznego, takich jak mitochondria i chloroplasty.
Białka te kooperują z kofaktorami, do których należą
Hsp10 u *Eucaryota* oraz GroES u *Procarvota*. Grupę II iden-
tyfikuje się u archeonów oraz w cytosolu *Eucaryota*,
gdzie są znane jako TrIC (TCP-1 Ring Complex) lub CCT
(chaperonin containing the T-complex polypeptide-1).
Białka te w przeciwieństwie do grupy I funkcjonują nie-
zależnie od kofaktorów [28,49,50].

Chaperonowy system GroEL-GroES u *Escherichia coli*
należy do najdokładniej opisanych spośród wszystkich
układów związanych z białkami szoku cieplnego [28]. Jak
wykazały badania GroEL ma zdolność do oddziaływania
z ponad 250 różnymi białkami cytoplazmatycznymi.
Rozmiar większości z nich mieści się w przedziale 20-50
kDa, a ich budowa obejmuje domeny α/β lub $\alpha+\beta$ [32].
GroEL tworzą dwa heptameryczne pierścienie *cis* i *trans*
zbudowane z siedmiu podjednostek o masie 57 kDa
każda. Pierścienie łączą się ze sobą w układzie zwanym
back-to-back, czyli tymi samymi fragmentami łańcu-
chów. Każdy z pierścieni jest zbudowany z trzech domen:
apikalnej, pośredniej oraz ekwatorialnej. Domena api-
kalna GroEL wspomaga proces otwierania cylindra oraz
eksponuje do wnętrza kanału hydrofobowe reszty ami-
nokwasowe umożliwiając wiązanie substratu wewnątrz
pierścieni. Domena pośrednia łączy się zawiasowo
z domeną apikalną i jest wysunięta na zewnątrz pier-
ścienia, natomiast domena ekwatorialna ma aktywność
ATP-azy i stabilizuje strukturę kanału. Hydrofobowa
powierzchnia eksponowana przez domenę apikalną obu
pierścieni wiąże hydrofobowe reszty aminokwasowe
substratu, który zostaje umieszczony w elastycznym
rowku między dwiema amfipatycznymi helisami tej
domeny. Aby mógł zająć proces fałdowania peptydu nie-
zbędna jest obecność energii w postaci ATP oraz białka

GroES. GroES to homoheptameryczny pierścień złożony
z podjednostek o masie ~10 kDa, który może się cyklicz-
nie przyłączać i odłączać od GroEL, w procesie zależnym
od ATP. Podjednostki GroES zawierają w swej sekwen-
cji mobilne/ruchome pętle, które oddziałują z miej-
scem wiążącym substrat w domenie apikalnej, a także
pośredniczą w procesie dysocjacji substratu. Przyłącze-
nie białka GroES do GroEL prowadzi do istotnych zmian
konformacyjnych w jego strukturze, co umożliwia for-
mowanie klatki z silnie hydrofilową, naładowaną ujem-
nie powierzchnią ścian kanału i jednocześnie znacznie
zwiększa jego wewnętrzną powierzchnię [49,50].

Według modelu klatki Anfiksena proces fałdowania
polipeptydu rozpoczyna się od jego przyłączenia do
wolnej domeny apikalnej GroEL-GroES, czyli do pierście-
nia *trans*. Zakłada się, że kompleks GroEL-GroES może
przyjmować postać symetryczną oraz niesymetryczną.
W przypadku kompleksu asymetrycznego pierścieni
GroEL, który przyłączył białko GroES jest nazywany pier-
ścieniem *cis*, natomiast drugi, czyli dystalny, pierście-
niem *trans* (ryc. 2). Bezpośrednio po związaniu substratu
następuje przyłączenie cząsteczki GroES oraz siedmiu
cząsteczek ATP przez białko GroEL, co skutkuje prze-
sunięciem substratu do wnętrza kanału. Jednocześnie
obserwuje się oddysocjowanie siedmiu cząsteczek ADP
oraz GroES od istniejącego przed związaniem substratu
kompleksu *cis*. Proces fałdowania trwa około 10 s i jest to
czas niezbędny do hydrolizy ATP przez pierścień wiążący
substrat, nazywany teraz pierścieniem *cis*. Hydroliza ATP
osłabia wiązanie między GroEL a GroES z jednoczesnym
wiązaniem siedmiu nowych cząsteczek ATP przez drugi
z pierścieni – *trans*. Przyłączenie cząsteczek ATP oraz
GroES przez pierścień *trans* powoduje otwarcie „klatki”
(powstałej w obrębie pierścienia *cis*). Substrat opuszcza
klatkę po oddysocjowaniu GroES od pierścienia *cis*, na
skutek allosterycznych zmian zachodzących przez zwią-
zanie ATP przez pierścień *trans*. W procesie tym są uwol-
nione polipeptydy, które uzyskały postać natywną i te,
które nie uległy procesowi fałdowania (ryc. 2). Substrat,
który nie uległ jeszcze pełnemu procesowi fałdowania
może być natychmiast powtórnie wiązany przez GroEL
[28,49,50].

Do drugiej grupy białek HSP60 należy kompleks TCP-1
(T-complex polypeptide-1) identyfikowany w cyto-
solu *Eucaryota*. Jest to heterooligomeryczny kompleks
o masie 970 kDa zbudowany z różnorodnych podjedno-
stek o masach 52-65 kDa. Podjednostki te tworzą pier-
ścień ułożone w strukturę przypominającą białko
GroEL [31]. W warunkach *in vitro* białko funkcjonuje nie-
zależnie od kofaktorów, a jego domeny apikalne zawie-
rają w swej strukturze α -helikalny segment w kształcie
palca, który tworzy swoiste wieczo funkcjonujące ana-
logicznie jak GroES. Fragment ten umożliwia enkapsula-
cję białka przez zamykanie oraz otwieranie w procesie
zależnym od ATP wejścia do kanału tworzonego przez
pierścień, podobnie jak w kompleksie GroEL-GroES
[22]. Najprawdopodobniej reakcja fałdowania białek
z udziałem TrIC jest znacznie wolniejsza w porówna-



Ryc. 2. Schemat fałdowania białka z udziałem kompleksu GroEL-GroES. Proces fałdowania polipeptydu rozpoczyna się od jego przyłączenia do wolnej domeny apikalnej kompleksu GroEL-GroES, czyli do pierścienia *trans*. Bezpośrednio po związaniu substratu następuje przyłączenie przez białko GroEL cząsteczki GroES oraz siedmiu cząsteczek ATP, co skutkuje przesunięciem substratu do wnętrza kanału. Jednocześnie obserwuje się oddysocjowanie siedmiu cząsteczek ADP oraz GroES od istniejącego przed związaniem substratu kompleksu *cis*. Następująca w obrębie powstałego pierścienia *cis* hydroliza ATP osłabia wiązanie pomiędzy GroEL a GroES. Przyłączenie cząsteczek ATP oraz GroES przez pierścien *trans* powoduje otwarcie „klatki” (powstałej w obrębie pierścienia *cis*). Substrat opuszcza klatkę po oddysocjowaniu od pierścienia *cis* cząsteczki GroES, wskutek allosterycznych zmian zachodzących przez związanie ATP przez pierścien *trans*.

niu z kompleksem GroEL-GroES [92]. Białko to bierze udział w fałdowaniu wielu protein cytoplazmatycznych, zakłada się, że oddziałuje z około 10% nowo syntetyzowanych białek cytosolowych, w tym z aktyną i tubuliną [69].

AKTYWACJA KOMÓREK UKŁADU ODPORNOŚCI NIESWOISTEJ PRZEZ BIAŁKA HSP60

W środowisku zewnątrzkomórkowym białka HSP60 samodzielnie lub w połączeniu z białkami własnymi organizmu lub drobnoustrojów mogą stanowić łącznik między poszczególnymi elementami układu immunologicznego, wpływając na jego aktywność. Proteiny te oddziałują na układ immunologiczny w zróżnicowany sposób, w tym jako antygen własny, antygen obcy, nośnik innych cząsteczek oraz ligand określonych receptorów [83]. Od wielu lat trwają badania dotyczące wpływu preparatów Hsp60 pochodzących z różnych źródeł, w tym oczyszczonych bezpośrednio z preparatów bakteryjnych, uzyskiwanych od ssaków oraz ich rekombinowanych odpowiedników, na aktywację systemu odporności

nieswoistej. Wiele doniesień wskazuje na potencjalną zdolność HSP60 do aktywacji komórek wrodzonego układu immunologicznego, takich jak makrofagi, monocyty czy komórki dendrytyczne (DCs) [15,43,46,62,93]. W badaniach dotyczących stymulacji makrofagów otrzewnowych (uzyskanych od myszy szczepu BALB/c) białkiem Hsp60 pochodzenia bakteryjnego (*Legionella pneumophila* Hsp60: Lp-Hsp60, *Escherichia coli* Hsp60: Ec-Hsp60, *Mycobacterium leprae* Hsp65: Ml-Hsp65, *Mycobacterium bovis* BCG Hsp65: Mb-Hsp65) wykazano wzrost ilości transkryptów mRNA dla IL-1 α , IL-1 β , IL-6, TNF- α , GM-CSF oraz zwiększoną sekrecję IL-1 β [93]. Stymulacja mysich makrofagowych linii komórkowych J774.1 i RAW264.7 wybranymi rekombinowanymi białkami szoku cieplnego pochodzącymi od ssaków (hHsp60, mysie Hsp60: mHsp60, szczurze Hsp60: rtHsp60, chomiche Hsp60: hamHsp60) oraz bakterii (*Chlamydia pneumoniae* Hsp60: Chp-Hsp60; Mb-Hsp65, Ec-Hsp60) prowadziła zaś do sekrecji TNF- α w stopniu zależnym od zastosowanej dawki antygeny [46]. W przypadku hHsp60 maksymalny poziom wyrzutu cytokiny obserwowano po 24-godzinnej inkubacji [15].

Cytokinowa funkcja HSP w porównaniu z ich funkcją białek opiekuńczych wydaje się zjawiskiem unikatowym, gdyż nie wymaga wiązania z peptydami, hydrolizy ATP, kofaktorów ani tworzenia kompleksów białkowych, stąd pomysł nadania białkom HSP miana chaperokin, która odzwierciedliłaby ich dwojaką naturę [99]. Wpływ HSP60 pochodzących zarówno od ssaków, jak też bakterii na elementy układu odporności wrodzonej przedstawiono na ryc. 3.

Istnieją poważne obawy, że obserwowany wpływ HSP na komórki wrodzonego układu immunologicznego to raczej skutek zanieczyszczeń preparatów, a nie rezultat działania samego białka. Podejrzenia wzbudza to, że wszystkie białka szoku cieplnego o różnej masie cząsteczkowej i pełniących w komórce funkcjach wywołują podobny efekt cytokinowy. Po drugie obserwowany wynik wydaje się bardzo podobny do tego wywołanego przez wzorce molekularne związane z patogenami (PAMP), szczególnie LPS i bakteryjne lipoproteiny. Należy podkreślić, że obecnie większość stosowanych w doświadczeniach preparatów Hsp60 to białka rekombinowane wytworzone za pomocą ekspresyjnych szczepów *Escherichia coli*, w których obecność zanieczyszczeń pochodzenia bakteryjnego jest bardzo prawdopodobna. Po trzecie przypuszcza się, że komórka docelowa rozpoznaje HSP60 z udziałem receptorów TLR2 i/lub TLR4, które są głównymi receptorami rozpoznającymi LPS, a nie jest prawdopodobne, by tak wyspecjalizowane receptory nie potrafiły w prawidłowy sposób rozróżnić od siebie tych dwóch cząsteczek [100].

W wielu próbach mających na celu zniesienie potencjalnego wpływu zanieczyszczeń preparatów HSP na komórki układu immunologicznego, przyjęto dwa kryteria: pierwsze – LPS jest oporny na inaktywację cieplną oraz drugie – skutek wpływu LPS może być wykluczony przez dodatek polimyksyny B (PmB) [15,62,93]. W innych przypadkach zastosowano przeciwciała anti-Hsp [16,116,117], proteinazę K [29,47] lub inhibitory LPS, takie jak lipid IVA [1], lipid A z *Rhodopseudomonas spheroides* [23] oraz maganin II amidu (C114H181N31O28S) [16]. Zaobserwowano, że oddziaływanie HSP zależy od temperatury, ponieważ białko to jest inaktywowane podczas ogrzewania (1h 95°C [93]; 10 min 100°C [47]; 20 min 100°C [19,62]), tracąc przez to właściwości stymulacyjne, podczas gdy w przypadku preparatów LPS efekt stymulacyjny jest proteazo- i temperaturowo niezależny [47]. Biologiczne działanie HSP nie jest hamowane lub częściowo znoszone przez polimyksynę B (PmB), podczas gdy stymulacja komórek LPS jest zjawiskiem PmB-zależnym [15,47,62]. Oddziaływanie nie jest również ograniczane przez inne inhibitory LPS, lecz hamowane w obecności przeciwciał anti-Hsp. Doniesienia te mogą być dowodem, że działanie cytokinowe jest bezpośrednio zależne od białek szoku cieplnego. Wallin i wsp. wskazali, że wysoce oczyszczone preparaty Hsp70 uzyskane z mysiej wątroby nie stymulują mysich DCs nawet przy koncentracji 200–300 µg/ml, natomiast preparaty nieoczyszczone mają zdolność do ich aktywacji już przy

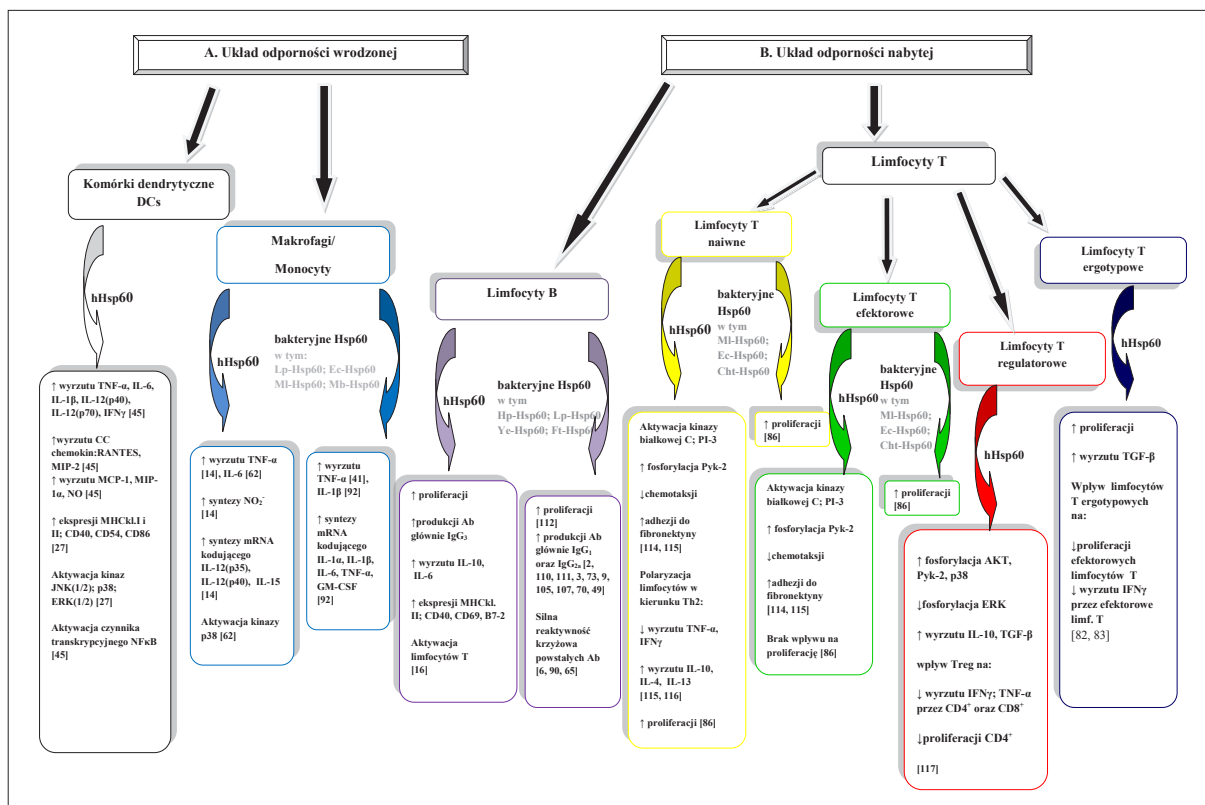
stężeniu 50–100 ng/ml, a uzyskany wynik jest zależny od temperatury i nie jest hamowany przez PmB [101]. Intrygujące wydają się również doniesienia Gao i Tsana, przeczące brakowi wrażliwości LPS na temperaturę, w którym wykazano, że ogrzewanie preparatu LPS (4 ng/ml; 1h 100°C) powoduje nie tylko spadek aktywności endotoksyny (określone z użyciem lisztu *Limulus amebo-cyte*), ale również zahamowanie wyrzutu TNF-α podczas stymulacji mysich makrofagów ogrzanym preparatem [35]. Większość badań nie uwzględnia doniesień związanych z wrażliwością LPS na ogrzewanie oraz ignoruje to, że stężenie LPS rzędu 0,1–0,2 [34], a nawet 0,05 ng/ml [35] może powodować wyrzut TNF-α przez mysie makrofagi. W większości badań używane do aktywacji komórek stężenie LPS wynosi 10–500 ng/ml [15,46,62,93]. Przy takich stężeniach, nawet jeśli proces ogrzewania spowoduje inaktywację 99% LPS, pozostanie wystarczająca liczba jego łańcuchów, by aktywować proces wytwarzania TNF-α i jednocześnie skłaniać do stwierdzenia, że LPS jest oporny na ogrzewanie. Poza LPS czynnikami mogącymi indukować aktywność cytokinową mogą być również inne zanieczyszczenia. Gao i Tsan wskazali, że 50% wytworzonego przez stymulowane komórki TNF-α było skutkiem zanieczyszczenia komercyjnie dostępnego preparatu rhHsp60 (Stress-Gen) związkami innymi niż LPS, które okazały się wrażliwe na temperaturę, a ich aktywności nie hamowała polimyksyna B [35]. Możliwe, że właśnie to zjawisko potwierdza doniesienia dotyczące braku lub jedynie częściowego hamowania aktywności cytokinowej przez polimyksynę B.

RECEPTORY SWOISTE DLA BIAŁEK SZOKU CIEPLNEGO (HSP60)

Podobnie jak w przypadku zanieczyszczeń preparatów HSP endotoksyną, znaczne kontrowersje wzbudza określenie receptorów, dzięki którym komórki wrodzonego układu immunologicznego rozpoznają docelowy ligand w postaci Hsp60. Wśród receptorów, które zostały opisane jako zaangażowane w rozpoznanie HSP, w tym HSP60, HSP70 oraz gp96 wymienia się molekułę CD14 [1,62,72] oraz cząsteczki należące do rodziny TLR, w tym TLR2 i TLR4 [19,29]. W przeprowadzonych doświadczeniach, dotyczących zdolności wiązania znakowanego hHsp60 przez makrofagi, DCs oraz ECs (endothelial cells – komórki śródbłonna), wykazano, że wiązanie to ma charakter typowy dla oddziaływania typu ligand-receptor [43]. Inkubacja komórek z omawianym białkiem w temperaturze fizjologicznej (37°C), optymalnej dla endocytozy potwierdziła z użyciem cytometrii przepływowej jego wchłanianie z udziałem tego procesu [42]. Wykazano, że wiązanie Hsp60 jest zjawiskiem specyficznym, a charakter wiązania podobny dla wszystkich komórek [42,43,46]. Dotychczas jednoznacznie nie określono, które z receptorów są odpowiedzialne za reakcje z HSP60. Badania polegające na inkubacji mysiej linii makrofagowej J774.1 z przeciwciałami anti-CD14 oraz anti-TLR nie potwierdziły blokowania reakcji makrofagów ze znakowanym hHsp60 [43]. W doświadczeniach z wykorzystaniem ludzkich komórek linii gwiaździstaka (astrocytoma) U373 oraz fibroblastycznej linii komór-

kowej CHO-K1 (chinese hamster ovary – K1 fibroblast) transfekowanych plazmidem kodującym sekwencję ludzkiego CD14 cDNA wykazano, że obecność cząsteczki CD14 jest niezbędna, lecz w wybranych przypadkach (jak linia CHO-K1) może być niewystarczająca do aktywacji komórek z udziałem zarówno eukariotycznego, jak i prokariotycznego Hsp60 (hHsp60 oraz chHsp60-chlamydia Hsp60). Uzyskane wyniki sugerują, że w przeciwieństwie do komórek uzyskanych od chomików komórki linii ludzkiej ekspresjonują niezbędny koreceptor wspomagający przekazywanie sygnału. Wykazano, że komórki linii CHO-K1 mają mutacje w genie kodującym TLR2, dlatego ekspresjonują afunkcyjne białko. Komórki te są zdolne do rozpoznania LPS (poprzez receptor TLR4), nie rozpoznają jednak innych PAMP, takich jak peptydoglikany, stąd przypuszczenie, że to TLR2 może stanowić poszukiwany koreceptor [62]. W badaniach z wykorzystaniem linii komórkowej VSMC (ludzka fibroblastyczna linia komórkowa) wykazano, że użycie przeciwciał anty-TLR hamuje ich proliferację pod wpływem stymulacji hHsp60 [19]. W przypadku DCs, izolowanych ze szpiku kostnego myszy szczepu C3H/HeJ (szczep z ekspresją afunkcyjnego receptora TLR4), udowodniono, że ich inkubacja z hHsp60/chHsp60 hamuje lub w znacznym stopniu ogranicza sekrecję cytokin (IL-1 β , TNF- α) oraz nieznacznie zwiększa ekspozycję cząsteczek kostymulujących CD86 i CD40 na ich powierzchni [29]. Wykazano jednak, że makrofagi uzyskane ze szpiku kostnego myszy szczepu C57BL/10ScCr (szczepu nieekspresjonującego

TLR4) wiążą hHsp60 na poziomie kontroli [42]. Dalsze badania nad zdolnością wiązania Hsp60 przez makrofagi (linia komórkowa J774.1, RAW264.7) oraz populację komórek CD11b⁺ uzyskanych ze szpiku kostnego myszy C57BL/6J, z wykorzystaniem metody konkurencyjnej, wykazały, że mHsp60 oraz rtHsp60, nie zaś Mb-Hsp60, Ec-Hsp60, Chp-Hsp60 przyczyniają się do osłabienia wiązania hHsp60 przez te komórki [45,46], a oddziaływania te są niezależne od receptora TLR4 [42]. Zaobserwowano jednak różnicę we właściwościach hamHsp60, które w przypadku linii komórkowej J774.1 nie miało wpływu na wiązanie hHsp60 [46], ale wykazywało te zdolności w przypadku populacji komórek CD11b⁺ [45]. Wyniki przeprowadzonych badań wskazały, że oddziaływanie Hsp60 *Eucaryota* z komórkami układu immunologicznego ma inny charakter niż w przypadku białka izolowanego od *Prokaryota* i biorą w nim udział odmienne struktury powierzchniowe. Wydaje się, że różnica w wiązaniu własnego oraz obcego Hsp60 przez komórki wrodzonego układu immunologicznego jest momentem krytycznym pozwalającym na utrzymanie immunologicznej homeostazy, ponieważ oba prokariotyczne oraz eukariotyczne Hsp60 występują w surowicy i mają silny potencjał immunoregulatorowy. Przypuszcza się, że Hsp60 w reakcjach z komórkami immunologicznymi mogą wykorzystywać odmienne miejsce wiązania, odmienne receptory. Mimo że homologia między białkami Hsp60 ssaków i bakterii wynosi 50%, natomiast u różnych gatunków ssaków osiąga wartość 95%, istnieje prawdopodobieństwo



Ryc. 3. Wpływ Hsp60 pochodzenia ludzkiego, jak i bakteryjnego na elementy układu odporności wrodzonej oraz nabytej

stwo, że nawet najmniejsze różnice w sekwencji białka przyczyniają się do zniesienia krzyżowego rozpoznania antygeny [45,46].

EPITOPY HSP60 ZAANGAŻOWANE W AKTYWACJĘ WRODZONEGO UKŁADU IMMUNOLOGICZNEGO

Przeprowadzono wiele badań mających na celu określenie sekwencji potencjalnych epitopów białek Hsp60. Model 3D hHsp60 oparty na *Escherichia coli* GroEL pozwolił zidentyfikować regiony będące epitopami tego białka w jego domenie apikalnej (aa 241-260), domenie pośredniej (aa 391-410) oraz w domenie ekwatorialnej (aa 461-480 i 481-500). Przypuszcza się, że regiony te uczestniczą w oddziaływaniu z receptorami zarówno gdy białko przybiera formę monomeryczną, jak i oligomeru i są zaangażowane w reakcje z komórkami układu immunologicznego [43]. Przeprowadzone doświadczenia, w których wykorzystano zbiór różnorodnych 20aa oligopeptydów, kodujących łącznie całą sekwencję hHsp60 oraz trzy mutanty delecyjne *E. coli* wytwarzające C-terminalne regiony białka Hsp60 (aa138-573, aa244-573 oraz aa360-573), potwierdziły przypuszczenia dotyczące wskazanych epitopów. Fragmentem oddziałującym z mysią makrofagową linią komórkową J774.1 okazał się region mieszczący się na C-końcu białka, a dokładniej aa481-500 [44]. W przypadku makrofagów izolowanych ze szpiku kostnego myszy szczepu C57BL/6J najintensywniejsze wiązanie zaobserwowano dla oligopeptydów kodujących odmienne niż dla linii J774.1 fragmenty białka (aa241-260, aa391-410, aa461-480) oraz peptydu kodującego fragment hHsp60 aa138-573. Uzyskane wyniki skłoniły do stwierdzenia, że różne komórki wiążą Hsp60 za pomocą odmiennych receptorów, swoistych dla różnych fragmentów tego białka [45].

Szczegółowa analiza sekwencji hHsp60 wykazała, że w domenie szczytowej (apikalnej) znajduje się swoisty region stanowiący miejsce wiązania LPS (aa 354-365) [43]. W celu udowodnienia potencjalnej zdolności białek Hsp60 do wiązania lipopolisacharydu, hHsp60 oraz mHsp60 inkubowano ze znakowanym radioaktywnie LPS ($[^3\text{H}]\text{LPS}$) i wykazano, że wiązanie to ma charakter specyficzny i może być blokowane przez preinkubację komórek z nieznakowanym LPS lub przez dodanie przeciwciał anty-Hsp60 klon 4B9 [47,72]. Zastosowanie przeciwciał monoklonalnych klon 24 (aa1-200), 4B9 (aa335-366), LK1 (aa383-447) skierowanych przeciwko hHsp60 oraz swoistym oligopeptydom Hsp60 pomogło zidentyfikować region epitopowy odpowiedzialny za wiązanie LPS i był nim fragment aa354-365. Dalsza analiza tego fragmentu wskazała, że zawiera motyw LKGG, który jest określany jako niezbędny podczas wiązania LPS, co więcej, motyw ten odpowiada za wiązanie LPS przez czynnik C pochodzący od *Limulus polyphemus* [47]. Fragment ten występuje jedynie w Hsp60 ssaków, dlatego sugeruje się, że za aktywację komórek układu immunologicznego w przypadku stymulacji hHsp60, działanie prozapalne wywołuje swoiście wiązany przez tę molekułę LPS, nie zaś samo białko.

AKTYWACJA KOMÓREK UKŁADU ODPORNOŚCI SWOISTEJ PRZES HSP60

Wpływ HSP60 na elementy nabytego układu immunologicznego należy postrzegać w dwojaki sposób. Białko to może być sygnałem prozapalnym dla organizmu, prowadząc do aktywacji limfocytów B oraz efektorowych limfocytów T, a sygnałem przeciwzapalnym przez swoiste oddziaływanie z limfocytami B oraz limfocytami regulatorowymi, w tym antyergotypowymi limfocytami T. Wpływ HSP60 na układ immunologiczny zależy głównie od koncentracji, rozpoznawanego epitopu Hsp60 oraz miejsca rozpoznania antygeny. Przyjmuje się, że małe stężenie HSP60 identyfikowane we krwi w sposób konstytutywny, którego źródłem jest aktywność chaperonowa białek w komórkach, przyczynia się do utrzymania immunologicznej równowagi przez promowanie aktywności limfocytów T regulatorowych (Treg) i jednocześnie obniżanie aktywności efektorowych limfocytów T. Odmienne zjawiska są obserwowane podczas podwyższonego stężenia HSP60 towarzyszącego uszkodzeniu tkanek, procesowi nowotworowemu czy infekcji. Duża koncentracja białka we krwi przyczynia się do pobudzenia makrofagów i komórek dendrytycznych, prowadząc do promowania odpowiedzi prozapalnej monocytów i aktywacji efektorowych limfocytów T, a w przypadku limfocytów B stymulacji w kierunku proliferacji. Gdy stres środowiskowy ulega zmniejszeniu, koncentracja HSP60 maleje i głównymi komórkami odpowiadającymi na to białko stają się ponownie limfocyty Treg (ryc. 3) [83].

INTERAKCJE Hsp60 Z LIMFOCYTAMI B

Hsp60 zarówno własne (self), jak i obce (non-self) stanowi dla limfocytów B potencjalny antygen, co potwierdza duże stężenie przeciwciał anty-Hsp60 w surowicach osobników zakażonych bakteriami lub poddanych szczepieniom (Hsp60 to powszechny antygen bakteryjny), jak również u osób chorych na wybrane schorzenia na tle autoimmunologicznym [2,5]. Zaskakująca wydaje się obecność przeciwciał anty-Hsp60 u osobników zdrowych, u których wysoki poziom przeciwciał klasy IgM wiążących Hsp60 wykrywa się już we krwi pępowinowej. W surowicy dorosłych, zdrowych osób identyfikuje się również przeciwciała autologiczne klasy IgM oraz IgG wiążące Hsp60, jednak w tym przypadku stężenie przeciwciał jest znacznie niższe niż u osób ze schorzeniami autoimmunologicznymi [67]. Istnieją przypuszczenia, że jednoczesna aktywacja receptorów TLR4 oraz BCR limfocytów B swoistych dla Hsp60 przyczynia się do rozpoznania, aktywacji i powstania przeciwciał niezależnie od limfocytów T (grasicznie niezależnie) [83]. W doświadczeniach przeprowadzonych z użyciem naiwnych mysich limfocytów B (B2) izolowanych od myszy szczepu C57BL/6J wykazano, że hHsp60, w procesie zależnym od receptorów TLR4/MyD88 przyczynia się do ich aktywacji, podwyższając stopień proliferacji, zwiększając sekrecję IL-10 i IL-6, a także ekspozycję MHC II oraz cząsteczek kostymulujących CD69, CD40, B7-2 na powierzchni tych komórek. W odpowiedzi na hHsp60 limfocyty B wytwa-

rzają głównie poliklonalne przeciwciała podklasy IgG₃ [16]. Wrodzona zdolność limfocytów B do rozpoznania Hsp60 ssaków prawdopodobnie nie jest równoznaczna z rozpoznaniem Hsp60 *Procarvota*. Yi i wsp. wykazali, że immunizacja myszy mHsp60 pobudza limfocyty B i powoduje wytwarzanie swoistych przeciwciał IgG na poziomie dwukrotnie niższym niż w przypadku szczepienia z użyciem Hsp60 pochodzenia bakteryjnego (chHsp60) [112]. Wyniki te wskazują na dużą immunogenność Hsp60 pochodzącego od *Procarvota*. Dotychczas potwierdzono wytwarzanie przeciwciał klasy IgG, w tym podklasy IgG₁ oraz IgG_{2a}, w odpowiedzi na Hsp60 pochodzące od: *Helicobacter pylori* [2,109,111], *Salmonella* Typhi [3,74], *Legionella pneumophila* [9,105], *Yersinia enterocolitica* [70], *Piscirickettsia salmonis* [108], *Histophilus somni* [badania własne, niepublikowane] oraz *Francisella tularensis* [51], *Escherichia coli*, *Pasteurella multocida*, *Salmonella* Enteritidis [badania własne, niepublikowane]. Wysoki poziom przeciwciał anty-Hsp60 pochodzenia bakteryjnego identyfikuje się u osób chorych na schorzenia wywołane przez *Helicobacter pylori* [2], *Mycoplasma pneumoniae* [5], *Porphyromonas gingivalis* [66], *Mycobacterium tuberculosis* oraz *Mycobacterium leprae* [113]. Udowodniono również, że przeciwciała skierowane przeciwko bakteryjnym Hsp60 wykazują dużą reaktywność krzyżową, co potwierdzono w reakcjach Hsp60 uzyskanego od *Streptococcus suis* z poliklonalną surowicą anty-Hsp60 *Pseudomonas aeruginosa*, *Legionella micdadei* oraz z przeciwciałami monoklonalnymi anty-Hsp65 *Mycobacterium leprae* i *Neisseria gonorrhoeae* [6], jak również w przypadku białka Hsp60 *Giardia lamblia* w reakcji z poliklonalną surowicą anty-Hsp65 *Mycobacterium bovis* [91]. Zaobserwowano, że surowica poliklonalna anty-Hsp60 *S.suis* wykazywała reaktywność krzyżową z lizatami bakterii: *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus equisimilis*, *S. agalactiae*, *S. bovis*, *S. pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Shigella sonnei*, *Campylobacter jejuni*, *Yersinia enterocolitica*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella* Typhimurium, *Bordetella bronchiseptica* natomiast przeciwciała monoklonalne swoiste dla Hsp60 *Pseudomonas aeruginosa* reagowały z *P. stutzeri*, *P. alcaligenes*, *P. mendocina*, *P. pseudoalcaligenes* [6,65].

INTERAKCJE HSP60 Z LIMFOCYTAMI T

Podobnie jak limfocyty B komórki T są zdolne do rozpoznania własnego i obcego Hsp60, jednak wpływ tego białka na limfocyty T jest różnorodny i często nieprzewidywalny. W przypadku ludzkiego Hsp60 (hHsp60) rozpoznanie to występuje zarówno u osób zdrowych, jak i chorych na schorzenia o podłożu autoimmunologicznym. Limfocyty T Hsp60-reaktywne izoluje się już z krwi pępowinowej zdrowych noworodków, tak więc zdolność rozpoznania przez limfocyty T własnego Hsp60 wydaje się zjawiskiem wrodzonym i naturalnym [87]. Reaktywność limfocytów T wobec Hsp60 skutkować może zróżnicowanym profilem wytwarzanych przez nie cytokin. Limfocyty T, które wskutek oddziaływania z Hsp60 wytwarzać będą cytokiny prozapalne przyczynią się do rozwoju choroby autoimmunologicznej, odegrają jednak istotną rolę w czasie zwalczania infekcji bakteryjnej.

Natomiast wytwarzanie przez limfocyty T cytokin supresorowych będzie korzystne dla osób z chorobą autoimmunologiczną, lecz niekorzystne w przypadku infekcji bakteryjnej. Analizując następstwa oddziaływania białek Hsp60 z limfocytami T, należy uwzględnić udział limfocytów T: naiwnych, efektorowych, supresorowych (Treg) oraz antyergotypowych. Dodatkowo należy rozróżnić dwie możliwości wpływu Hsp60 na limfocyty T jako liganda dla receptora TLR lub jako antygeny.

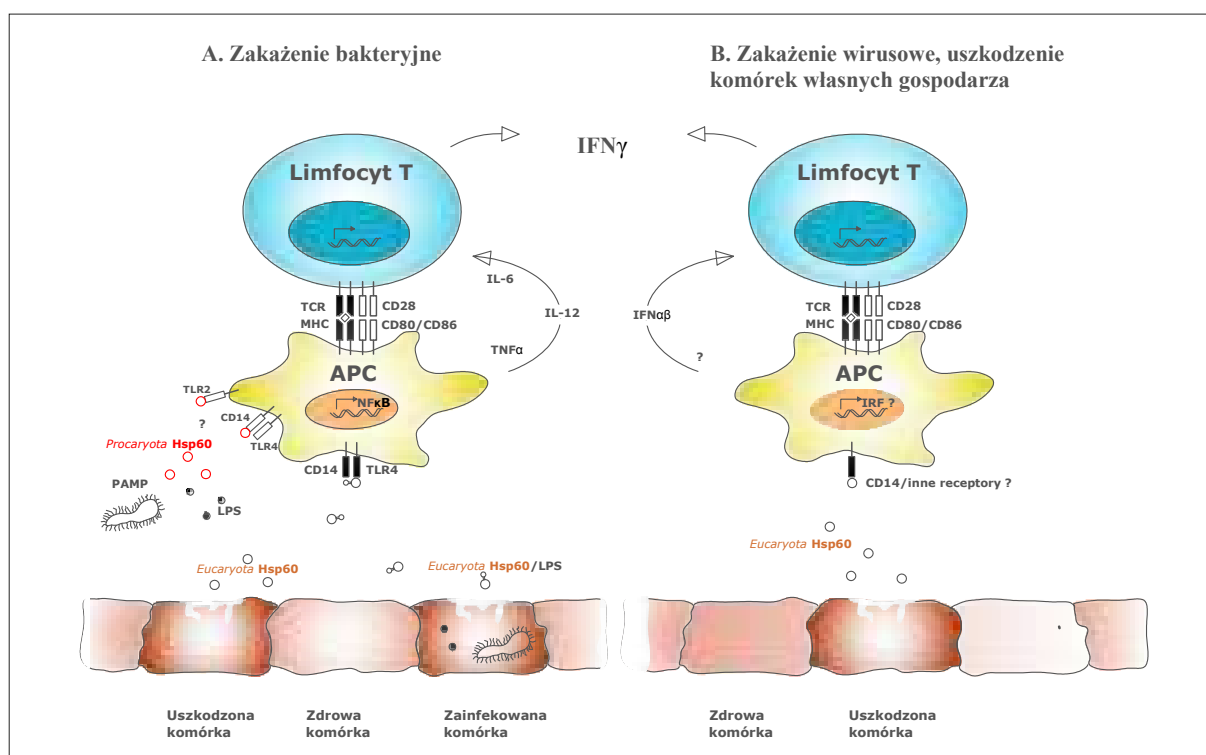
Jak udokumentowano hHsp60 reguluje aktywność efektorowych oraz naiwnych limfocytów T z udziałem receptora TLR2 nie zaś TLR4. Wyizolowane z ludzkiej krwi obwodowej zdrowych osobników limfocyty T o fenotypie CD45RO⁺ (efektorowe limfocyty T) oraz CD45RA⁺ (naiwne limfocyty T) wykazują zdolność do rozpoznania hHsp60 oraz peptydu p277 kodującego 24aa fragment tego białka przez receptor TLR2. Zaobserwowano, że preinkubacja obu frakcji limfocytów T z hHsp60 i peptydem p277 powoduje hamowanie chemotaksji indukowanej przez SDF-1α i ECL. hHsp60 wzmacnia proces adhezji obu frakcji limfocytów T do fibronektyny, zaś Ec-Hsp60 (nie Mt-Hsp65) adhezę jedynie limfocytów T naiwnych [116,117]. Ramage i wsp. wykazali, że frakcja komórek jednojądrzastych izolowanych z krwi zdrowych osobników wykazuje podwyższoną proliferację wskutek stymulacji przez hHsp60, przy czym jedynie wybrana frakcja komórek CD45RA⁺ (naiwne limfocyty T) proliferuje intensywnie pod wpływem tego antygeny, a użycie antygenów pochodzenia bakteryjnego o wysokiej homologii do hHsp60, takich jak Ml-Hsp65, Ec-Hsp60 oraz Cht-Hsp60 (*Chlamydia trachomatis* Hsp60) przyczynia się do stymulacji obu frakcji limfocytów T [87]. Badania Osterloha i wsp. dotyczące stymulacji limfocytów T pod wpływem Hsp60 wolnego od endotoksyn wykazały, że obecność wolnego od LPS mHsp60 prowadzi do wzrostu antygenozależnego wytwarzania IFN-γ przez zaktwowane limfocyty T niezależnie od TLR4/MyD88 (ryc. 4) [72,73]. Neutralizacja IL-6 oraz TNF-α nie wpływa na wytwarzanie IFN-γ przez limfocyty T. Jego wytwarzanie jest również niezależne od IL-12 (głównego induktora IFN-γ) oraz IL-23, podczas gdy uwolnienie IFN-γ wskutek stymulacji komórek LPS lub kompleksem LPS/hHsp60 silnie zależy od IL-12. Wykazano, że to IFN-α (uwalniany przez komórki APC) pod wpływem wolnego od endotoksyn Hsp60 stanowi główny mediator wzmacniający aktywację limfocytów T. Osterloh i wsp. wysunęli przypuszczenie, że Hsp60 prowadzi do aktywacji układu immunologicznego na dwóch różnych, lecz częściowo powiązanych ze sobą ścieżkach (ryc. 4) [72,73]. W pierwszym przypadku, kiedy jest obecny LPS, czyli w czasie infekcji bakteryjnej, Hsp60 pochodzące od *Eucaryota* (gospodarza) funkcjonuje jako proteina wiążąca LPS, co ułatwia jego oddziaływanie z kompleksem CD14/TLR4 na powierzchni APC i wzmacnia sygnał przekazywany przez receptor TLR4. Komórki ulegają również stymulacji pod wpływem Hsp60 pochodzącego od *Procarvota* (bakterii), w ten sposób oba białka przyczyniają się do rozpoznania patogenu (ryc. 4A). W drugim przypadku Hsp60 pochodzące od *Eucaryota* działa jako sygnał zagrożenia dla

organizmu, pośrednicząc we wzmożeniu antygenozależnej aktywacji limfocytów T. Zjawisko to obserwuje się, kiedy w środowisku brak jest nie tylko LPS, ale również innych struktur bakteryjnych. W tym przypadku Hsp60 może oddziaływać z receptorami APC przez nieopisane dotychczas receptory, inne niż TLR4 i TLR2. Taka sytuacja może się zdarzyć podczas zakażeń wirusowych, uszkodzenia komórek, śmierci nekrotycznej komórek (ryc. 4B).

W przypadku limfocytów Treg Zanin-Zhorov i wsp. wykazali, że stymulacja receptora TLR2, ekspozycja na ich powierzchni, przez hHsp60 oraz peptyd p277 przyczynia się do wzmożenia przeciwzapalnego oddziaływania [115]. Obecność limfocytów Treg ($CD4^+CD25^+$) w populacji komórek $CD4^+$ izolowanej z krwi obwodowej zdrowych osobników powoduje zmniejszenie sekrecji cytokin: $IFN-\gamma$, $TNF-\alpha$ przez te komórki pod wpływem hHsp60/p277. Natomiast preinkubacja oczyszczonej frakcji komórek $CD4^+CD25^+$ z hHsp60, a następnie ich hodowla w kokulturze z niestymulowanymi hHsp60, lecz z aktywowanymi z udziałem przeciwciał anti-CD3 komórkami $CD4^+CD25^-$ prowadzi do supresji proliferacji tej populacji ($CD4^+CD25^-$). Wiąże się to z wpływem hHsp60 zarówno na komórki T regulatorowe, jak i T efektorowe. hHsp60 może również w sposób pośredni, poprzez limfocyty Treg hamujące wyrzut cytokin $IFN-\gamma$ i $TNF-\alpha$, oddziaływać na limfocyty T cytotoksyczne ($CD8^+$). hHsp60 przyczynia się jednocześnie do zwiększonej sekrecji IL-10 oraz TGF- β przez lim-

focyty T regulatorowe. Należy zaznaczyć, że aktywacja limfocytów T przez TLR2 wymaga 1000x mniejszego stężenia tego białka niż w przypadku aktywacji przez TLR4 monocytów i limfocytów B, stąd przyjmuje się, że małe stężenie Hsp60 w surowicy krwi przyczynia się do aktywacji limfocytów Treg [115], natomiast duża koncentracja tego białka wywołuje prozapalną odpowiedź monocytów [83].

Należy również podkreślić rolę antyergotypowych regulatorowych limfocytów T w rozpoznaniu Hsp60 prezentowanego przez zaktywowane efektorowe limfocyty T. Antyergotypowe limfocyty T to typ Treg, które rozpoznają z udziałem receptora TCR epitopy białkowe, prezentowane w restrykcji MHC I/II przez pobudzone efektorowe limfocyty T. Jedynie te komórki są zdolne do prezentacji ergotypów (markerów aktywacji) komórkom antyergotypowym. Wykazano, że w przypadku szczurów immunizowanych hHsp60, zarówno w postaci szczepionki DNA, jak i z użyciem wybranych fragmentów białka, a następnie poddanych indukcji AA (adjuwant arthritis – reumatoidalne zapalenie stawów indukowane adiuwantem) nie obserwuje się rozwoju choroby, a izolowane z węzłów chłonnych limfocyty (w tym limfocyty antyergotypowe) wykazują w obecności pobudzonych limfocytów T (linia komórkowa A2b) podwyższoną proliferację oraz sekrecję TGF- β . Jednocześnie udowodniono, że antyergotypowe limfocyty T wpływają na obniżenie stopnia proliferacji oraz sekrecji $IFN-\gamma$ przez efektorowe limfocyty T (np. izolowane od szczurów z AA) zarówno



Ryc. 4. Biologiczne mechanizmy modulacji odpowiedzi immunologicznej pod wpływem Hsp60 pochodzącego od *Procaryota* oraz *Eucaryota* (wg [73] zmodyfikowano)

w warunkach *in vitro*, jak i *in vivo*, mogą się przyczyniać do hamowania rozwoju chorób autoimmunologicznych [83,84].

EKSPOZYCJA HSP60 NA POWIERZCHNI KOMÓREK

Wiele doniesień naukowych, potwierdza ekspozycję białek HSP60 na powierzchni komórek *Eucaryota* i *Procaryota*. Mechanizmy zaangażowane w translokację białek szoku cieplnego na powierzchnię komórki nie są znane, szczególnie, że są to typowe białka cytoplazmatyczne i brak w ich strukturze swoistych sekwencji liderowych odpowiedzialnych za translokację na powierzchnię komórki [37,68]. Zakłada się, że proces ten u *Eucaryota* jest niezależny od sekrecyjnej ścieżki ER-Golgi, gdyż zastosowanie inhibitorów tej drogi nie hamuje uwalniania HSP z przestrzeni wewnątrzkomórkowej. Wiadomo również, że białka szoku cieplnego w przypadku *Eucaryota* są ekspozowane jedynie na powierzchni komórek zakażonych wirusami lub bakteriami oraz w komórkach nowotworowych, lecz nie identyfikuje się ich w komórkach zdrowych. Obserwacje te nasunęły wniosek, że to silnie zaburzony w tych komórkach metabolizm zakłóca proces sekrecji. W przypadku komórek nowotworowych wewnątrzkomórkowe środowisko charakteryzuje się silną kwasowością, hipoksją oraz obniżoną ilością składników odżywczych. Kwaśne środowisko może odpowiadać za konformacyjne zmiany HSP, a to może promować jego powierzchniowe umiejscowienie [68]. U *Procaryota* obserwuje się stałą ekspozycję HSP60 na powierzchni komórki, ekspozycja intensywnie wzrasta pod wpływem bodźców stresowych, takich jak szok termiczny lub osmotyczny. Podobne zjawisko występuje w chwili wniknięcia drobnoustroju do organizmu gospodarza. Patogen narażony jest wówczas na zróżnicowane zmiany środowiskowe, które mogą być dla komórki bardzo stresogenne. Należy tutaj wymienić zmianę temperatury, pH oraz pO_2 . Jednocześnie patogen jest narażony na naturalne procesy obronne organizmu, np. fagocytozę. Sfagocytowana komórka bakteryjna jest poddawana działaniu reaktywnych form tlenu, mediatorów NO oraz enzymów lizosomalnych. W celu obrony przed tymi czynnikami patogen uruchamia różnorodne procesy ochronne, w tym zwiększa ilość syntetyzowanych HSP [120]. Przypuszcza się, że w przypadku *Procaryota* to obecność domeny hydrofobowej na domenie C-terminalnej białka może ułatwiać jego interakcje z hydrofobowymi regionami innych cząsteczek, takich jak fosfolipidy oraz lipopolisacharydy i sprzyjać translokacji na powierzchnię komórki oraz sekrecji do przestrzeni zewnątrzkomórkowej [53].

Ekspozycja cząsteczek HSP na powierzchni komórek odgrywa istotną rolę w interakcji między bakterią a komórką docelową, rozpoznawaniu komórki bakteryjnej przez układ immunologiczny, rozwoju chorób autoimmunizacyjnych i neurodegeneracyjnych, rozwoju procesów zapalnych, infekcjach wirusowych, odrzuceniu przeszczepów oraz rozpoznawaniu komórek nowotworowych przez komórki układu immunologicznego

[68]. U *Procaryota* obserwuje się dwa zjawiska związane z ekspozycją białek szoku cieplnego na powierzchni komórek: w pierwszym HSP60 komórek docelowych jest receptorem dla bakteryjnych ligandów, w drugim sam jest ligandem bakteryjnym. Przykładem pierwszego z obserwowanych zjawisk są wyniki badań przeprowadzonych przez Burkholder i Bhunia, w których analizowano interakcje między *Listeria monocytogens* a komórkami gospodarza [13]. Zespół Bhunia zidentyfikował u *Listeria* białko adhezyjne (*Listeria* adhesion protein, LAP) i uznał je za przypuszczalny czynnik adhezyjny, promujący wiązanie do kultur komórkowych wyprowadzonych z tkanek jelit, jak również czynnik umożliwiający translokację bakterii do wątroby i śledziony u zakażonych doustnie myszy [58]. Wskazał również receptor LAP, którym okazało się białko Hsp60 ekspozowane na powierzchni komórek nabłonkowych. Inkubacja linii komórkowej Caco-2 (ludzka linia komórkowa nabłonka okrężnicy) z przeciwciałami anti-Hsp60 wywoływała zależną od LAP redukcję adhezji komórek bakteryjnych [102], a interakcja LAP z Hsp60 gospodarza umożliwiała przyleganie, a następnie translokację bakterii przez jednowarstwowy nabłonek jelita. Potwierdzono również, że infekcja komórek nabłonka jelit z wykorzystaniem małej dawki bakterii (1×10^6 cfu/ml) powodowała wzrost ekspozycji Hsp60 na ich powierzchni, co prowadziło do jeszcze wydajniejszego wiązania patogenu przez komórki docelowe [13]. Rolę HSP, jako czynnika stanowiącego receptor ligandów pochodzenia bakteryjnego wykazano również w oddziaływaniach białka wiążącego fibronektynę (fibronectin binding protein, FnBP) *Staphylococcus aureus* z Hsp60 komórek nabłonkowych (linia komórkowa MCT-1) [24], białka X wirusa zapalenia wątroby typu B (HBx) tworzącego z h/E.c-Hsp60 i h/E.c Hsp70 kompleksy mogące mieć wyraźny udział w molekularnych mechanizmach infekcji wirusowej [119]. Białko Hsp70 (Hsc70) również ekspozowane przez komórki olbrzymie trofoblastu są wykorzystywane przez *Brucella abortus* w procesie inwazji trofoblastu ciężarnych myszy [104].

Przykładem drugiego zjawiska są wyniki badań przeprowadzonych przez Hennequin i wsp. dotyczące interakcji *Clostridium difficile* z komórkami gospodarza [53]. Zaobserwowano, że jej adhezja do docelowych komórek wzrasta podczas szoku cieplnego, osmotycznego czy kwasowego oraz przy niedoborze żelaza, maleje w obecności surowicy zawierającej przeciwciała anti-GroEL *Mycobacterium leprae*. Ekspozycja białek Hsp60 na powierzchni *C. difficile* wzrasta podczas jej termicznego szokowania w 42°C oraz 48°C, a w temperaturze wyższej zwiększa się również wyrzut białka do przestrzeni zewnątrzkomórkowej. Zastosowanie przeciwciał anti-Hsp60 *C. difficile* oraz oczyszczonego rekombinowanego białka Hsp60 *C. difficile* przyczynia się do zahamowania procesu adhezji patogenu do komórek gospodarza. Wyniki te potwierdziły przypuszczenia dotyczące adhezyjnej roli Hsp60. Analogicznych obserwacji dostarczyły badania dotyczące: *Legionella pneumophila* [37,38], *Helicobacter pylori* [39], *Escherichia coli* [40], *Salmonella typhimurium* [41], *Yersinia enterocolitica* [42], *Shigella flexneri* [43], *Neisseria meningitidis* [44], *Neisseria gonorrhoeae* [45], *Chlamydia trachomatis* [46], *Chlamydia pneumoniae* [47], *Mycobacterium tuberculosis* [48], *Mycobacterium avium* [49], *Mycobacterium fortuitum* [50], *Mycobacterium goodii* [51], *Mycobacterium neoaurum* [52].

cobacter pylori [110], *Haemophilus ducreyi* [30], *Salmonella Typhimurium* [25], *Actinobacillus actinomycetemcomitans* [41], *Borrelia burgdorferi* [60], w których potwierdzono udział białka Hsp60 w procesach adhezji oraz infekcji komórek docelowych.

U *Eucaryota* zastosowanie przeciwciał monoklonalnych umożliwiło identyfikację białek HSP na powierzchni licznych komórek nowotworowych. W liniach komórkowych MKN28, MKN45, KATOIII, Caco-2, H9 wykazano powierzchniową obecność Hsp60 [77,102,110], a linii GCL-1 ekspozycję Hsp72 i Hsp90 [27]. Obecność Hsp60 stwierdzono również na nieobjętych procesem transformacji nowotworowej komórkach, takich jak makrofagi i komórki endotelialne [52,103]. Należy jednak podkreślić, że w przypadku makrofagów izolowanych ze szpiku kostnego, powierzchniową ekspozycję Hsp60 identyfikowano dopiero po 3-dniowej inkubacji w warunkach *in vitro*, ze znacznym wzrostem translokacji po 9 dniach hodowli stymulowanej IFN- γ [103]. W komórkach nabłonkowych czynniki stresogenne, takie jak klasyczne czynniki ryzyka w arteriosklerozie oraz fale magnetyczne przyczyniały się do pozakomórkowego umiejscawiania Hsp60 [52]. Znane są przypadki identyfikacji HSP60 na powierzchni komórek objętych procesami chorobotwórczymi, przykładem może być pozytywny wynik barwienia z użyciem przeciwciał anti-Hsp60 wycinka nabłonka jelita pobranego od pacjenta z chorobą wrzodową jelit [110]. W wielu zaburzeniach na tle autoimmunologicznym, zarówno w modelu ludzkim, jak i mysim, obserwowano występowanie białek HSP na powierzchni komórek objętych zmianami chorobowymi, co przypuszczalnie może indukować zmiany immunopatologiczne. Podejrzewa się, że wszelkie stany zapalne ośrodkowego układu nerwowego jak autoimmunologiczne, przewlekłe zapalenie rdzenia kręgowego i mózgu prowadzą do zmian w ekspresji białek szoku cieplnego [36].

OBCENOŚĆ HSP60 W STRUKTURZE BIOFILMU

Jednym z czynników wirulencji niektórych bakterii jest ich zdolność do tworzenia biofilmu, który umożliwia przetrwanie komórkom bakteryjnym warunki letalne [95,118]. Biofilm wykazuje dużą oporność na fagocytozę i na 10-1000 razy wyższe stężenia antybiotyków w porównaniu do hodowli, gdzie nie został wytworzony [17]. Dlatego infekcje spowodowane przez bakterie zdolne do tworzenia biofilmu mają najczęściej charakter przewlekłych lub nawracających, które trudno zwalczać standardowymi antybiotykami [59]. W dotychczas przeprowadzonych badaniach wykazano, że w macierzy biofilmu tworzonego zarówno przez *H. somni* [118], jak i *H. influenzae* [33] są obecne białka szoku cieplnego o masie 60 kDa wytwarzane przez nie. Zarankiewicz i wsp. udowodnili, że przeciwciała anti-rHsp60 *H. somni* (zarówno mysie, jak i kozie) aktywnie hamują tworzenie biofilmu przez *H. somni* w warunkach *in vitro* [118]. Ponieważ *H. somni* tworzy biofilm w warunkach *in vivo* [96], immunizacja rHsp60 może przynieść znaczące korzyści w postaci inhibicji tworzenia biofilmu przez ten pato-

gen u zwierząt hodowlanych, a tym samym ekspozycja patogenu na antybiotyki i skuteczność układu immunologicznego gospodarza w jego zwalczaniu może bardzo wzrosnąć.

ZASTOSOWANIE BIAŁEK SZOKU CIEPLNEGO (W TYM HSP60) JAKO SKŁADNIKA SZCZEPIONEK

Szczepionką nazywa się produkt pochodzenia biologicznego zawierający substancje zdolne do indukcji procesów immunologicznych warunkujących powstanie trwałej i swoistej odporności bez wywołania działań toksycznych [39]. Idealna szczepionka przeciwko chorobom infekcyjnym oraz nowotworowym powinna jednocześnie indukować humoralne i komórkowe mechanizmy odporności, charakteryzować się dobrą stabilnością, bezpieczeństwem, niskim kosztem produkcji, a wzbudzona przez nią odporność powinna być długotrwała. Ponieważ HSP są dominującymi antygenami bakteryjnymi identyfikowanymi podczas zakażeń, mogą stanowić składnik szczepionek podjednostkowych lub ze względu na ich właściwości być nośnikami innych antygenów. Obecnie istnieje wiele szczepień z wykorzystaniem tych białek, wśród których wymienić należy:

- Białka szoku cieplnego oczyszczane chromatograficznie izolowane z linii komórek nowotworowych

Przykładem jest tu białko Hsp70 izolowane z mysiej linii komórkowej wątrobiaka (HCAf), oczyszczane chromatografią powinowactwa ConA-sefaroza, ADP-agarozą oraz chromatografią jonowymienną. Dwukrotna immunizacja podskórna samicy myszy szczepu BALB/c oczyszczonym w ten sposób mHsp70 (600 μ g/kg) spowodowała wzrost przeżywalności myszy do 83,3% w porównaniu do grupy kontrolnej (przeżywalność 0%) po podskórnym podaniu 5×10^4 komórek nowotworowych HCAf. Podobny wynik uzyskano po wykonaniu transferu adoktywnego splenocytów myszy immunizowanych mHsp70, co wskazuje na przeciwnowotworowe właściwości izolowanego białka [14]. W przypadku białka szoku cieplnego HSP60-96 (heat-shock protein peptide complex-96) izolowanego ze zmian skórnych pacjentów z czerniakiem złośliwym (wg skali Karnofsky'go > 70%, stopnia III i IV) zastosowano oczyszczanie, wykorzystując precypitację z użyciem siarczanu amonu, chromatografię powinowactwa ConA-sefaroza oraz chromatografię jonowymiennej. Wykazano, że u pacjentów poddanych operacji usunięcia znamion oraz leczeniu z zastosowaniem chemioterapii standardowej/cytokin, czterokrotna śródskórna immunizacja oczyszczonym, autologicznym białkiem HSP60-96 w dawce 2,5 μ g/25 μ g/100 μ g może stanowić terapię uzupełniającą. Zastosowana szczepionka okazała się bezpieczna, nie zaobserwowano objawów toksycznych oraz reakcji autoimmunologicznych. Dziewięciu pacjentów (spośród 36 objętych doświadczeniem) z IV stopniem zaawansowania klinicznego czerniaka poddanych terapii adiuwantowej oraz immunizacji HSP60-96 przeżyło ponad 10 lat [26].

• Szczepionki DNA jako antygen związany kowalencyjnie lub niekowalencyjnie z HSP

Przykładem jest tu szczepionka DNA złożona z genów, zintegrowanych z ekspresyjnym plazmidem pCI, kodujących endogenne białko mGp96 oraz immunodominujący peptyd *Listeria monocytogenes* (p60₂₁₇₋₂₂₅ lub LLO₉₁₋₉₉) prezentowany w restrykcji MHC I podczas zakażeń tym patogenem. W tym przypadku endogenne mGp96 jest swoistym nośnikiem białkowym ułatwiającym prezentację peptydów w restrykcji MHC I. Trzykrotna domięśniowa immunizacja myszy szczepu BALB/c 50 µg DNA wykazała działanie protekcyjne podczas ich zakażenia letalną dawką *L. monocytogenes*. Zaobserwowano, że stymulacja splenocytów (myszy immunizowanych szczepionką DNA) peptydem homologicznym (p60 lub LLO) przyczyniła się do wyrzutu IFN-γ oraz antygenoswoistej odpowiedzi limfocytów T cytotoksycznych [90]. Wykazano również, że proponowana strategia może być wykorzystana w leczeniu chorych z nowotworem. Przykładem są badania Huanga i wsp., które objęły skonstruowanie rekombinowanych plazmidów ekspresyjnych zintegrowanych z genem kodującym hHsp60 oraz białko E6 i/lub E7 (najbardziej onkogenne proteiny wirusa HPV-wirus brodawczaka ludzkiego typ16) [57]. Dwukrotna immunizacja myszy szczepu C57BL/6J dawką 2 µg DNA (w tym z wykorzystaniem konstruktów Hsp60/E6; Hsp60/E7; Hsp60/E6/E7) w pełni chroniła myszy przed rozwojem nowotworu po podskórnym podaniu 5x10⁴ komórek TC-1 (ekspresjonujących białka E6 oraz E7). Ten rodzaj szczepionki wzmacniał odpowiedź typu komórkowego, za co, jak podejrzewają autorzy, bezpośrednio odpowiada obecność Hsp60.

• Białka HSP lub ich fragmenty jako swoiste adiuwanty/nośniki innych białek lub peptydów

Przykładem jest wykorzystanie białek fuzyjnych zbudowanych z N-terminalnego końca proteiny Gp96 (N1-355aa/N34-355aa) oraz białka VSV8 (proteina wirusa pęcherzowego zapalenia jamy ustnej VSV). W przeprowadzonym doświadczeniu Biswas i wsp. wykorzystali właściwości N-terminalnej domeny białka Gp96 zdolnej do wiązania nukleotydów lub peptydów oraz właściwości samego białka, które jest ligandem receptorów CD91 oraz SP-A eksponowanych na powierzchni komórek APC i bierze udział w prezentacji antygenów w restrykcji MHC I [8]. Zaobserwowano, że splenocyty izolowane od myszy 2-krotnie immunizowanych kompleksem N1-335-VSV8 (20 µg N1-335 oraz 20 ng VSV8) wykazywały aktywność cytolityczną, wyższą niż splenocyty myszy immunizowanych samym białkiem VSV8 zemulgowanym z kompletnym adiuwantem Freund. Białka fuzyjne swoiście wiązały się do powierzchni komórek APC i wpływały na dojrzewanie komórek dendrytycznych. Rico i wsp., stosując białko Hsp70 pochodzące od *Leishmania infantum* (Li-Hsp70) powiązane z białkiem wiążącym maltozę (MBP) pochodzącym od *Escherichia coli* wykazali, że dwukrotna dootrzewnowa immunizacja myszy BALB/c 5,6 µg LiHsp70-MBP prowadziła do silnej,

swoistej odpowiedzi humoralnej skierowanej przeciwko MBP (anty-MBP IgG₁<IgG_{2a}) [94]. Natomiast populacja komórek LNCs izolowanych od tych zwierząt charakteryzowała się wzmożoną proliferacją oraz wyrzutem IL-2 i IFN-γ pod wpływem MBP. Nie zaobserwowano takich działań podczas immunizacji myszy białkiem MBP oraz mieszaniną MBP z Li-Hsp70.

• Szczepionki typu „prime-boost”

Strategia szczepienia polegająca na wstępnej immunizacji z wykorzystaniem DNA, a następnie podaniu dawki przypominającej w postaci białka. Przykładem jest zastosowanie szczepionki złożonej z DNA/białka E7 ludzkiego wirusa HPV16 oraz *Xenopus* Gp96. Bolhassani i wsp. opisali doświadczenie, w którym poddali procesowi immunizacji myszy szczepu C57BL/6 z użyciem DNA (pcDNA-E7 i/lub pcDNA-Gp96) oraz rekombinowanych białek rE7 i/lub rNT-Gp96 (fragment N-terminalny) i/lub rCT-Gp96 (fragment C-terminalny) zemulgowanych z Montanidem 720 [11]. Wykazali silną odpowiedź humoralną we wszystkich możliwych kombinacjach podania szczepionki, skierowaną przeciwko fragmentom rE7 i rGp96, wskazując na szczególne zaangażowanie limfocytów Th2 w odpowiedź immunologiczną. Badania nad proliferacją oraz wyrzutem cytokin (IFN-γ) przez splenocyty izolowane od immunizowanych zwierząt i stymulowanych rE7, NT-Gp96, CT-Gp96 dowiodły, że zastosowanie pierwszego szczepienia w postaci DNA pobudza również limfocyty Th1, czyli odpowiedź typu komórkowego. Uzyskane wyniki są przesłanką do wykorzystania takiego sposobu immunizacji do leczenia chorych z nowotworem szyjki macicy, gdyż angażuje zarówno odpowiedź humoralną, jak i komórkową organizmu. Innym przykładem jest immunizacja myszy szczepu BALB/c (szczep wrażliwy) i C57BL/6 (szczep oporny) w systemie „prime-boost” przeciwko *Leishmania major* białkiem Hsp70 pochodzącym od tego patogenu. Rafati i wsp. wykazali, że podskórne podanie zwierzętom 100 µg pcDNA-Hsp70, a następnie (trzy tygodnie później) 30 µg rHsp70 zemulgowanego z 70% Montanidem 720 i zakażenie ich dawką 3,5x10⁵ komórek pasożyta nie chroniło zwierząt przed rozwojem zmian patologicznych w miejscu zakażenia [86]. Uzyskane od zakażonych zwierząt splenocyty nie wykazywały zwiększonej proliferacji oraz wyrzutu cytokin (IFN-γ i IL-5) pod wpływem stymulacji rHsp70 lub jego C – albo N-końcowymi fragmentami. W uzyskanych po 9 tygodniach od zakażenia surowicach myszy szczepu BALB/c identyfikowano duże stężenie przeciwciał podklas IgG₁ i IgG_{2a} anty-Hsp70, co świadczy o zaangażowaniu w odpowiedź immunologiczną limfocytów Th1 i Th2. Należy jednak zaznaczyć, że strategia ta okazała się nieskuteczna w zapobieganiu infekcjom wywoływanym przez *Leishmania* sp.

• Szczepionki DNA lub szczepionki białkowe HSP pochodzące od patogenów

Istnieje wiele doniesień naukowych dotyczących zastosowania białek szoku cieplnego izolowanych z patogen-

nych szczepów bakterii, drożdży oraz pasożytów jako szczepionek wykazujących wysoki poziom immunogenności oraz protektywności w przypadku zakażenia zwierząt letalnymi dawkami wybranych mikroorganizmów lub chorób autoimmunologicznych indukowanych z udziałem patogenów. Niewątpliwie istnieją co najmniej dwie możliwości zastosowania tego rodzaju szczepionek i są nimi immunizacja z użyciem DNA lub rekombinowanego białka. Pierwsza z możliwości jest stosowana znacznie rzadziej, mimo że istnieją doniesienia o jej dużej skuteczności. Quintana i wsp. wykazali, że trzykrotna domięśniowa immunizacja szczurów Lewis (150 µg/os.) plazmidem kodującym całą sekwencję mikobakteryjnego Hsp60 (pMI-Hsp60), ludzkiego Hsp60 (phHsp60) lub jedynie wybranym fragmentem hHsp60 (1-140aa-pI, 130-260aa-pII) chroniła zwierzęta przed rozwojem zapalenia stawów indukowanego adiuwantem (AA) [81,82]. W porównaniu z grupą kontrolną szczury immunizowane wykazywały jedynie nieznaczne zmiany w obrębie kości, chrząstek oraz mazi stawowej. Zaobserwowano, że immunizacja z udziałem phHsp60 przyczyniła się do znacznego wzrostu stężenia Hsp60 w surowicy, a izolowana z węzłów chłonnych podkolanowych oraz pachwinowych populacja komórek (LNC) wykazywała wzmogoną proliferację pod wpływem stymulacji ludzkim oraz mikobakteryjnym Hsp60. Wykazano również, że komórki LNC pozyskane od szczurów immunizowanych zarówno phHsp60, jak i pMI-Hsp65 z indukowanym AA cechuje bardzo duże wytwarzanie IFN-γ, IL-10 oraz TGF-β1 pod wpływem stymulacji hHsp60. Za wytwarzanie tego profilu cytokinowego odpowiadają najprawdo-

podobnie limfocyty T regulatorowe – Treg1 kontrolujące odpowiedź immunologiczną limfocytów Th1 i 2. Bonato i wsp. udowodnili, że 4-krotna domięśniowa immunizacja myszy szczepu BALB/c plazmidem kodującym MI-Hsp65 (pMI-Hsp65) przyczyniła się do zwiększenia populacji limfocytów T Hsp65 reaktywnych o fenotypie CD4⁺/CD8⁻CD44^{hi} i CD8⁺/CD4⁻CD44^{hi} wytwarzających IFN-γ [12]. Transfer adoptywny limfocytów CD8⁺/CD4⁻CD44^{hi} chronił zwierzęta przed rozwojem gruźlicy wywołanej dożylnym zakażeniem *Mycobacterium tuberculosis*.

Ponieważ Hsp60 jest jednym z dominujących antygenów mikroorganizmów identyfikowanych podczas zakażenia, istnieją przesłanki, aby mógł znaleźć zastosowanie jako składnik szczepionek podjednostkowych w immunoprofilaktyce wielu zakażeń. W literaturze naukowej odnaleźć można liczne potwierdzenia ochronnej roli białek szoku cieplnego Hsp60 (tabela nr 1). Dotychczas stwierdzono protektywność białek Hsp60 pochodzących od drobnoustrojów z rodzaju *Salmonella enterica* serowar Typhi [3,74], *Helicobacter pylori* [109,111], *Histoplasma capsulatum* [20,40], *Legionella pneumophila* [9,105], *Yersinia enterocolitica* [70,71], *Chlamydia trachomatis* [89], *Paracoccidioides brasiliensis* [18], *Piscirickettsia salmonis* [108] oraz *Francisella tularensis* [51]. Jednak w przedstawionych przykładach istnieją wyraźne różnice dotyczące postaci (pełne białko lub fragment), sposobu podania oraz zastosowanej do immunizacji dawki antygeny. Doświadczenia przeprowadzane były na różnorodnych modelach zwierzęcych, co istotnie utrudnia ocenę realnej skuteczności zastosowanych szczepionek.

Tabela 1. Zastosowanie białek szoku cieplnego o masie 60kDa (Hsp60) pochodzących od patogennych szczepów bakterii, drożdży oraz pasożytów jako składników szczepionek podjednostkowych.

Patogen	Model zwierzęcy zastosowany w doświadczeniu	Postać antygeny	Dawka oraz droga podania antygeny	Dawka oraz droga podania patogenu	Obserwowany poziom śmiertelności/inny efekt	Dodatkowe obserwacje	Referencje
<i>Salmonella enterica</i> serowar Typhi (patogen układu pokarmowego)	4-6-tygodniowe samice myszy szczepu BALB/c	Pełna sekwencja ST-Hsp60	3-krotna immunizacja i.p.: A. 1dawka-40µgST-Hsp60 +FAC 2i3dawka-40µgST-Hsp60+FAI kontrola-FAC/FAI B. 40µgST-Hsp60+woda kontrola-woda	S. Typhi-1x10 ⁸ cfu/os. S. Typhimurium-1x10 ⁵ cfu/os. Zakażenie i.p 30-dniowa obserwacja	A. S. Typhi: Myszy szczepione:20% Kontrola:100% S. Typhimurium: Myszy szczepione:10% Kontrola:100% B. S. Typhi: Myszy szczepione:30% Kontrola:100%	1.Dominacja przeciwciał anty-ST-Hsp60 w podklasie IgG, oraz IgG _{2a} . 2.Wzrost intensywności proliferacji splenocytów stymulowanych ST-Hsp60 w porównaniu z kontrolą 3.Wyrzut IFN-γ i IL-4 przez splenocyty stymulowane ST-Hsp60	[73]
<i>Salmonella enterica</i> serowar Typhi (patogen układu pokarmowego)	7-tygodniowe samice myszy szczepu BALB/c	Pełna sekwencja ST-Hsp60	3-krotna immunizacja i.m.: A. 10µg St-Hsp60+woda kontrola-woda B. 10µg St-Hsp60+glin kontrola- glin+woda C. 1dawka-10µgSt-Hsp60+FAC 2i3dawka-10µgSt-Hsp60+FAI kontrola-FAC/FAI	S. Typhi-1x10 ⁸ cfu/os. Zakażenie i.p 30-dniowa obserwacja	A. S. Typhi: A. Myszy szczepione:30% Kontrola:100% B.Myszy szczepione:50% Kontrola:100% C.Myszy szczepione:20% Kontrola:100%	1. Dominacja przeciwciał anty-ST-Hsp60 w podklasie IgG, oraz IgG _{2a} ; przy czym w przypadku A i C przesunięcie odp. w kierunku Th1 zaś w B w kierunku Th2 (↑ poziom IgG _{2a}) 2. Wzrost intensywności proliferacji splenocytów stymulowanych ST-Hsp60 w porównaniu z kontrolą 3. Wyrzut IFN-γ (w A i C ↑ niż w B), IL-4 (w B ↑ niż w A i C), IL-2 (w A i C ↑ niż w B) przez splenocyty stymulowane ST-Hsp60	[3]
<i>Helicobacter pylori</i> (patogen układu pokarmowego)	a. 6-tygodniowe samice myszy szczepu C57BL/6 b. 6-tygodniowe samice myszy szczepu GF 1Q1	aa. Pełna sekwencja Ec-Hsp60 bb. Pełna sekwencja Hp-Hsp60	5-krotna immunizacja p.o.: 100µg Ec-Hsp60/ Hp-Hsp60+5µg CT kontrola- CT +PBS	H. pylori- 2,5x10 ⁸ cfu/os. 3-krotne zakażenie p.o. 21 lub 70 -dniowa obserwacja	Inhibicja kolonizacji błony śluzowej żołądka przez H.pylori w granicach 90-95% w porównaniu z kontrolą	1. Wysoki poziom przeciwciał (klasy IgG) anty-HpHsp60 w surowicach myszy immunizowanych (Hp-Hsp60 jak również Ec-Hsp60) 2. 10 tygodni po zakażeniu myszy C57BL/6 immunizowanych Hp-Hsp60 zaobserwowano ostry nieżyt żołądka	[111]
<i>Helicobacter pylori</i> (patogen układu pokarmowego)	5-tygodniowe samice myszy szczepu C57BL/6	Fragment Hp-Hsp60 (189-203aa) =pH9	5-krotna immunizacja i.p.: 50µg pH9+FAC kontrola- FAC	H. pylori- 5x10 ⁸ cfu/os. 3-krotne zakażenie p.o. 14-dniowa obserwacja	Wyraźna inhibicja kolonizacji błony śluzowej żołądka przez H.pylori w porównaniu z kontrolą	1. Wysoki poziom przeciwciał (klasy IgG) anty-pH9 w surowicach myszy immunizowanych	[110]

Patogen	Model zwierzęcy zastosowany w doświadczeniu	Postać antygeny	Dawka oraz droga podania antygeny	Dawka oraz droga podania patogenu	Obserwowany poziom śmiertelności/inny efekt	Dodatkowe obserwacje	Referencje
<i>Histoplasma capsulatum</i> (patogen układu oddechowego)	myszyszczepu C57BL/6	Pełna sekwencja Hc-Hsp60	2-krotna immunizacja s.c.: A. 100µg Hc-Hsp60+adjuwant Corixa +100µg mAb anty-CD4 ⁺ B. 100µg Hc-Hsp60+adjuwant Corixa +100µg mAb anty-CD8 ⁺ C. 100µg Hc-Hsp60+adjuwant Corixa +100µg szczurzych IgG kontrola- 100µg szczurzych IgG	<i>H. capsulatum</i> - 1,25x10 ⁷ Zakażenie i.n. 45-dniowa obserwacja	H. capsulatum: A. myszy szczepione: 100% B. myszy szczepione: 10% C. myszy szczepione: 0% kontrola: 100%	1. Eliminacja limfocytów T CD4 ⁺ /CD8 ⁺ 2 tygodnie po immunizacji myszy Hc-Hsp60 nie wpływa na obniżenie skuteczności szczepionki 2. Wyrzut IFN-γ, IL-10 oraz IL-12 przez splenocyty myszy immunizowanych Hc-Hsp60, a następnie stymulowanych tym antygenem	[18]
<i>Histoplasma capsulatum</i> (patogen układu oddechowego)	myszyszczepu BALB/c	Pełna sekwencja Hc-Hsp60	2-krotna immunizacja s.c.: A. 200µg Hc-Hsp60+emulsja (MPL+TDM+CWS) B. 200µg BSA+emulsja kontrola- brak immunizacji	<i>H. capsulatum</i> - 1,2x10 ⁷ Zakażenie i.n. 45-dniowa obserwacja	H. capsulatum: A. myszy szczepione: 0% B. myszy szczepione: 90% kontrola: 100%	1. Wzrost intensywności proliferacji splenocytów stymulowanych Hc-Hsp60 w porównaniu z kontrolą	[37]
<i>Legionella pneumophila</i> (patogen układu oddechowego)	samice /samce świnek morskich szczepu Hartley	Pełna sekwencja Lp-Hsp60	2-krotna immunizacja i.d.: 1 dawka- 50µg Lp-Hsp60+FAC 2 dawka- 50µg Lp-Hsp60+FAI kontrola- ovalbumina +FAC/FAI	<i>L. pneumophila</i> - 2,47x10 ⁶ cfu/os. (dawka ~2,5xLD50) Zakażenie i.t. 10-dniowa obserwacja	<i>L. pneumophila</i> : świnki szczepione: 83% kontrola: 100%	1. Pacjenci chorzy na legionellozę oraz świnki morskie, które przeżyły zakażenie <i>L. pneumophila</i> wykazują silną reakcję skórną (DTH) na Lp-Hsp60 po 24h od podania 2. Wysoki poziom przeciwciał anty-Hsp60 w surowicy świnek szczepionych Lp-Hsp60	[105]
<i>Legionella pneumophila</i> (patogen układu oddechowego)	samce świnek morskich szczepu Hartley	Lp-Hsp60 ekstrahowane z <i>L. pneumophila</i>	3-krotna immunizacja s.c.: 1 dawka- 40µg Lp-Hsp60+CAF 2 i 3 dawka- 40µg Lp-Hsp60+IAF kontrola- 0,9%NaCl+CAF/IAF	<i>L. pneumophila</i> - 1-2x10 ⁶ cfu/ml Zakażenie i.n.- w postaci aerozolu 10-dniowa obserwacja	<i>L. pneumophila</i> : świnki szczepione: 0% kontrola: 94%	1. Świnki morskie poddane immunizacji Lp-Hsp60 wykazują silną reakcję skórną (DTH) na antygen (1µg) po 24h od podania	[9]
<i>Yersinia enterocolitica</i> (patogen układu pokarmowego)	a. 6-8-tygodniowe samice myszy szczepu C57BL/6 b. 6-8-tygodniowe samice myszy szczepu BALB/c	Pełna sekwencja Ye-Hsp60	A. 3-krotna immunizacja i.p.: Aa. 10µg Ye-Hsp60-ISCAM Ab. 10µg OVA-ISCAM kontrola- PBS B. 2-krotna immunizacja i.p./s.c.: Ba. 25µg Ye-Hsp60+0,5 µg IL-12 Bb. 25µg Ye-Hsp60 Bc. 0,5 µg IL-12 kontrola- PBS	<i>Y. enterocolitica</i> : 2,2x10 ⁶ cfu/os. dla układu A 4,1x10 ⁵ cfu/os. Dla układu B Zakażenie i.v. 7-dniowa obserwacja	<i>Y. enterocolitica</i> : A. szczepienie myszy B57BL/6 układem Aa. znacząco (1000-krotnie) obniża ilość bakterii Ye. izolowanych ze śledziony B. szczepienie myszy BALB/c układem Ba. znacząco (100-krotnie) obniża ilość bakterii Ye. izolowanych ze śledziony	1. Wysoki poziom przeciwciał (klasy IgG) anty-Ye-Hsp60 w surowicach myszy immunizowanych układem Aa. jak i Ba. oraz Bb. 2. Wzrost intensywności proliferacji splenocytów pozyskanych od myszy immunizowanych układem Aa, Ba oraz Bb stymulowanych Ye-Hsp60 oraz komórkami bakteryjnymi w porównaniu z kontrolą	[70]
Patogen	Model zwierzęcy zastosowany w doświadczeniu	Postać antygeny	Dawka oraz droga podania antygeny	Dawka oraz droga podania patogenu	Obserwowany poziom śmiertelności/inny efekt	Dodatkowe obserwacje	Referencje
<i>Chlamydia trachomatis</i> (patogen układu rozrodczego)	samice świnek morskich szczepu Hartley	pełna sekwencja ch-Hsp60	3-krotna immunizacja s.c.: 50µg ch-Hsp60+FAI kontrola- nieimmunizowana	20µl sonikatu GPIC-1x10 ⁶ jednostek tworzących inkluzje/os. Zakażenie na drodze wkroplenia do worka spojówkowego oka ~20-dniowa obserwacja	Pojawienie się zmian patologicznych oka dopiero po 48h od infekcji, brak zmian patologicznych określanych jako 4+ w skali Watkina	1. Brak wpływu immunizacji na tworzenie ciałek wtrętowych 2. Brak zmian patologicznych w przypadku reinfekcji oczu świnek immunizowanych z użyciem GPIC (30 dni po pierwszej infekcji) 3. Wysoki poziom przeciwciał (w klasie IgG oraz IgA) anty-chHsp60 w wydzielinie oka świnek reinfekowanych	[88]
<i>Paracoccidioides brasiliensis</i> (patogen układu oddechowego)	myszyszczepu BALB/c	pełna sekwencja Pb-Hsp60	2-krotna immunizacja s.c.: A. 10µg Pb-Hsp60+adjuwant Corixa kontrola- 10µg BSA+adjuwant Corixa B. 10µg Pb-Hsp60+adjuwant Corixa+100µg mAb anty-IFN-γ kontrola- 10µg Pb-Hsp60+adjuwant Corixa+100µg szczurzych IgG	<i>P. brasiliensis</i> : 3x10 ⁷ cfu/os. Zakażenie i.n. 100-dniowa obserwacja	<i>P. brasiliensis</i> : A. myszy szczepione: 0% kontrola: 100% B. myszy szczepione: 100% kontrola: 0%	1. Brak obecności patogenu w płucach, wątrobie oraz śledzionie myszy, które przeżyły infekcję 2. Wzrost intensywności proliferacji splenocytów stymulowanych Pb-Hsp60 w porównaniu z kontrolą 3. Wyrzut IFN-γ oraz IL-12 przez splenocyty myszy immunizowanych w układzie A. i stymulowanych -Pb-Hsp60 4. Eliminacja limfocytów T CD4 ⁺ (preimmunizacja z użyciem mAb anty-CD4 ⁺) <i>in vitro</i> znosi ochronne właściwości szczepionki	[96]
<i>Piscirickettsia salmonis</i> (patogen ryb powodujący posocznice)	<i>Salmo solar</i> łosoś atlantycki	pełna sekwencja Ps-Hsp60	1-krotna immunizacja i.p.: 10µg Ps-Hsp60+emulsja wodno-oleista kontrola 1- emulsja wodno-oleista kontrola 2- brak immunizacji	<i>P. salmonis</i> : 2xLD50 Zakażenie i.p. 50-dniowa obserwacja	<i>P. salmonis</i> : ryby szczepione: 8% kontrola 1: 69% kontrola 2: 77%	1. Wysoki poziom przeciwciał (w klasie IgG) anty-Ps-Hsp60 w surowicy ryb immunizowanych	[107]

Patogen	Model zwierzęcy zastosowany w doświadczeniu	Postać antygeny	Dawka oraz droga podania antygeny	Dawka oraz droga podania patogenu	Obserwowany poziom śmiertelności/inny efekt	Dodatkowe obserwacje	Referencje
<i>Francisella tularensis</i> (czynniki infekcyjny tularemii)	6-8-tygodniowe myszy szczepu BALB/c	Ft-Hsp60 pozyskane od bakterii <i>F.tularensis</i> przez elucję z żelu	2-krotna immunizacja i.p. A. 25µg Ft-Hsp60 B. 25µg Ft-Hsp60 + 0,5µg IL-12 C. 0,5µg IL-12 kontrola 1-0,9%NaCl	a. <i>F.tularensis</i> : 1x10 ¹² cfu/os. b. <i>F. tularensis</i> subsp. <i>holarctica</i> : 1x10 ¹¹ cfu/os. c. <i>F. tularensis</i> subsp. <i>tularensis</i> : 1x10 ¹⁰ cfu/os. Zakażenie i.p. 14-dniowa obserwacja	A.a.myszy szczepione: 60% A.b.myszy szczepione: 0% A.c. myszy szczepione: 100% B.a. myszy szczepione: 80% B.b. myszy szczepione: 20% B.c. myszy szczepione: - C.a. myszy szczepione: - C.b. myszy szczepione: - C.c. myszy szczepione: 100% kontrola: 100%	1. Wysoki poziom przeciwciał (w podklasie IgG ₁) anti-Ft-Hsp60 w surowicy myszy immunizowanych 2. Wyrzut TNFα przez splenocyty myszy immunizowanych	[49]

PIŚMIENICTWO

- [1] Asea A., Kraeft S.K., Kurt-Jones E.A., Stevenson M.A., Chen L.B., Finberg R.W., Koo G.C., Calderwood S.K.: Hsp70 stimulates cytokine production through a CD14-dependent pathway, demonstrating its dual role as a chaperone and cytokine. *Nat. Med.*, 2000; 6: 435-442
- [2] Bai Y., Li L.R., Wang J.D., Chen Y., Jin J.F., Zhang Z.S., Zhou D.Y., Zhang Y.L.: Expression of *Helicobacter pylori* Hsp60 protein and its immunogenicity. *World J. Gastroenterol.*, 2003; 9: 2711-2714
- [3] Bansal A., Paliwal P.K., Sagi S.S., Sairam M.: Effect of adjuvants on immune response and protective immunity elicited by recombinant Hsp60 (GroEL) of *Salmonella typhi* against *S. typhi* infection. *Mol. Cell. Biochem.*, 2010; 337: 213-221
- [4] Bartlett A.I., Radford S.E.: An expanding arsenal of experimental methods yields an explosion of insights into protein folding mechanisms. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 2009; 16: 582-588
- [5] Benčina D., Slavec B., Narat M.: Antibody response to GroEL varies in patients with acute *Mycoplasma pneumoniae* infection. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 2005; 43: 399-406
- [6] Benkirane R., Gottschalk M.G., Dubreuil J.D.: Identification of a *Streptococcus suis* 60-kDa heat-shock protein using western blotting. *FEMS Microbiol. Lett.*, 1997; 153: 379-385
- [7] Bharadwaj S., Ali A., Ovsenek N.: Multiple components of the HSP90 chaperone complex function in regulation of heat shock factor 1 *in vivo*. *Mol. Cell. Biol.*, 1999; 19: 8033-8041
- [8] Biswas C., Sriram U., Ciric B., Ostrovsky O., Gallucci S., Argon Y.: The N-terminal fragment of grp94 is sufficient for peptide presentation via professional antigen-presenting cells. *Int. Immunol.*, 2006; 18: 1147-1157
- [9] Blander S.J., Horwitz M.A.: Major cytoplasmic membrane protein of *Legionella pneumophila*, a genus common antigen and member of the hsp60 family of heat shock proteins, induces protective immunity in a guinea pig model of Legionnaires' disease. *J. Clin. Invest.*, 1993; 91: 717-723
- [10] Bolhassani A., Rafati S.: Heat-shock proteins as powerful weapons in vaccine development. *Expert Rev. Vaccines*, 2008; 7: 1185-1199
- [11] Bolhassani A., Zahedifard F., Taghikhani M., Rafati S.: Enhanced immunogenicity of HPV16E7 accompanied by Gp96 as an adjuvant in two vaccination strategies. *Vaccine*, 2008; 26: 3362-3370
- [12] Bonato V.L., Lima V.M., Tascon R.E., Lowrie D.B., Silva C.L.: Identification and characterization of protective T cells in hsp65 DNA-vaccinated and *Mycobacterium tuberculosis*-infected mice. *Infect. Immun.*, 1998; 66: 169-175
- [13] Burkholder K.M., Bhunia A.K.: *Listeria monocytogenes* uses Listeria adhesion protein (LAP) to promote bacterial transepithelial translocation and induces expression of LAP receptor Hsp60. *Infect. Immun.*, 2010; 78: 5026-5073
- [14] Chen D.X., Su Y.R., Shao G.Z., Qian Z.C.: Purification of heat shock protein 70-associated tumor peptides and its antitumor immunity on hepatoma in mice. *World J. Gastroenterol.*, 2004; 10: 361-365
- [15] Chen W., Syldath U., Bellmann K., Burkart V., Kolb H.: Human 60-kDa heat-shock protein: a danger signal to the innate immune system. *J. Immunol.*, 1999; 162: 3212-3219
- [16] Cohen - Sfady M., Nussbaum G., Pevsner-Fischer M., Mor F., Carmi P., Zanin-Zhorov A., Lider O., Cohen I.R.: Heat shock protein 60 activates B cells via TLR4-MyD88 pathway. *J. Immunol.*, 2005; 175: 3594-3602
- [17] Davey M.E., O'toole G.A.: Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 2000; 64: 847-867
- [18] de Bastos Ascenço Soares R., Gomez F.J., de Almeida Soares C.M., Deepe G.S.Jr.: Vaccination with heat shock protein 60 induces a protective immune response against experimental *Paracoccidioides brasiliensis* pulmonary infection. *Infect. Immun.*, 2008; 76: 4214-4221
- [19] de Graaf R., Kloppenburg G., Kitslaar P.J., Bruggeman C.A., Stassen F.: Human heat shock protein 60 stimulates vascular smooth muscle cell proliferation through Toll-like receptors 2 and 4. *Microbes Infect.*, 2006; 8: 1859-1865
- [20] Deepe G.S.Jr., Gibbons R.S.: Cellular and molecular regulation of vaccination with heat shock protein 60 from *Histoplasma capsulatum*. *Infect. Immun.*, 2002; 70: 3759-3767
- [21] Dobson C.M., Karplus M.: The fundamentals of protein folding: Bringing together theory and experiment. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 1999; 9: 92-101
- [22] Douglas N.R., Reissmann S., Zhang J., Chen B., Jakana J., Kumar R., Chiu W., Frydman J.: Dual action of ATP hydrolysis couples lid closure to substrate release into the group II chaperonin chamber. *Cell*, 2011; 144: 240-252
- [23] Dybdahl B., Wahba A., Lien E., Flo T.H., Waage A., Qureshi N., Sellevold O.F., Espevik T., Sundan A.: Inflammatory response after open heart surgery: release of heat-shock protein 70 and signaling through toll-like receptor-4. *Circulation*, 2002; 105: 685-690
- [24] Dziewanowska K., Carson A.R., Patti J.M., Deobald C.F., Bayles K.W., Bohach G.A.: Staphylococcal fibronectin binding protein interacts with heat shock protein 60 and integrins: role in internalization by epithelial cells. *Infect. Immun.*, 2000; 68: 6321-6328
- [25] Engraber M., Loos M.: A 66-kilodalton heat shock protein of *Salmonella typhimurium* is responsible for binding of the bacterium to intestinal mucus. *Infect. Immun.*, 1992; 60: 3072-3078

- [26] Eton O., Ross M.I., East M.J., Mansfield P.F., Papadopoulos N., Ellerhorst J.A., Bedikian A.Y., Lee J.E.: Autologous tumor-derived heat-shock protein peptide complex-96 (HSPPC-96) in patients with metastatic melanoma. *J. Transl. Med.*, 2010; 8: 9
- [27] Ferrarini M., Heltai S., Zocchi M.R., Rugarli C.: Unusual expression and localization of heat-shock proteins in human tumor cells. *Int. J. Cancer*, 1992; 51: 613-619
- [28] Fink A.L.: Chaperone-mediated protein folding. *Physiol. Rev.*, 1999; 79: 425-449
- [29] Flohé S.B., Brüggemann J., Lendemans S., Nikulina M., Meierhoff G., Flohé S., Kolb H.: Human heat shock protein 60 induces maturation of dendritic cells versus a Th1-promoting phenotype. *J. Immunol.*, 2003; 170: 2340-2348
- [30] Frisk A., Ison C.A., Lagergard T.: GroEL heat shock protein of *Haemophilus ducreyi*: association with cell surface and capacity to bind to eukaryotic cells. *Infect. Immun.*, 1998; 66: 1252-1257
- [31] Frydman J., Nimmesgern E., Erdjument-Bromage H., Wall J.S., Tempst P., Hartl F.U.: Function in protein folding of TRiC, a cytosolic ring complex containing TCP-1 and structurally related subunits. *EMBO J.*, 1992; 11: 4767-4778
- [32] Fujiwara K., Ishihama Y., Nakahigashi K., Soga T., Taguchi H.: A systematic survey of *in vivo* obligate chaperonin-dependent substrates. *EMBO J.*, 2010; 29: 1552-1564
- [33] Gallaher T.K., Wu S., Webster P., Aguilera R.: Identification of biofilm proteins in non-typeable *Haemophilus influenzae*. *BMC Microbiol.*, 2006; 6: 65
- [34] Gao B., Tsan M.F.: Endotoxin contamination in recombinant human heat shock protein 70 (Hsp70) preparation is responsible for the induction of tumor necrosis factor α release by murine macrophages. *J. Biol. Chem.*, 2003; 278: 174-179
- [35] Gao B., Tsan M.F.: Recombinant human heat shock protein 60 does not induce the release of tumor necrosis factor α from murine macrophages. *J. Biol. Chem.*, 2003; 278: 22523-22529
- [36] Gao Y.L., Brosnan C.F., Raine C.S.: Experimental autoimmune encephalomyelitis. Qualitative and semiquantitative differences in heat shock protein 60 expression in the central nervous system. *J. Immunol.*, 1995; 154: 3548-3556
- [37] Garduño R.A., Faulkner G., Trevors M.A., Vats N., Hoffman P.S.: Immunolocalization of Hsp60 in *Legionella pneumophila*. *J. Bacteriol.*, 1998; 180: 505-513
- [38] Garduño R.A., Garduño E., Hoffman P.S.: Surface-associated Hsp60 chaperonin of *Legionella pneumophila* mediates invasion in a HeLa cell model. *Infect. Immun.*, 1998; 66: 4602-4610
- [39] Gołąb J., Jakóbsiak M., Lasek W., Stokłosa T.: Immunologia. Wydawnictwo PWN, Warszawa 2009
- [40] Gomez F.J., Allendoerfer R., Deepe G.S.Jr.: Vaccination with recombinant heat shock protein 60 from *Histoplasma capsulatum* protects mice against pulmonary histoplasmosis. *Infect. Immun.*, 1995; 63: 2587-2595
- [41] Goulhen F., Hafezi A., Uitto V.J., Hinode D., Nakamura R., Grenier D., Mayrand D.: Subcellular localization and cytotoxic activity of the GroEL-Like protein isolated from *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infect. Immun.*, 1998; 66: 5307-5313
- [42] Habich C., Baumgart K., Kolb H., Burkart V.: The receptor for heat shock protein 60 on macrophages is saturable, specific, and distinct from receptors for other heat shock proteins. *J. Immunol.*, 2002; 168: 569-576
- [43] Habich C., Burkart V.: Heat shock protein 60: regulatory role on innate immune cells. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2007; 64: 742-751
- [44] Habich C., Kempe K., Burkart V., van der Zee R., Lillicrap M., Gaston H., Kolb H.: Identification of the heat shock protein 60 epitope involved in receptor binding on macrophages. *FEBS Lett.*, 2004; 568: 65-69
- [45] Habich C., Kempe K., Gomez F.J., Lillicrap M., Gaston H., van der Zee R., Kolb H., Burkart V.: Heat shock protein 60: identification of specific epitopes for binding to primary macrophages. *FEBS Lett.*, 2006; 580: 115-120
- [46] Habich C., Kempe K., van der Zee R., Burkart V., Kolb H.: Different heat shock protein 60 species share pro-inflammatory activity but not binding sites on macrophages. *FEBS Lett.*, 2003; 533: 105-109
- [47] Habich C., Kempe K., van der Zee R., Rümenapf R., Akiyama H., Kolb H., Burkart V.: Heat shock protein 60: specific binding of lipopolysaccharide. *J. Immunol.*, 2005; 174: 1298-1305
- [48] Hartl F.U.: Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature*, 1996; 381: 571-580
- [49] Hartl F.U., Bracher A., Hayer-Hartl M.: Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. *Nature*, 2011; 475: 324-332
- [50] Hartl F.U., Hayer-Hartl M.: Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science*, 2002; 295: 1852-1858
- [51] Hartley M.G., Green M., Choules G., Rogers D., Rees D.G., Newstead S., Sjostedt A., Titball R.W.: Protection afforded by heat shock protein 60 from *Francisella tularensis* is due to copurified lipopolysaccharide. *Infect. Immun.*, 2004; 72: 4109-4113
- [52] Henderson B.R., Pfister G., Boeck G., Kind M., Wick G.: Expression levels of heat shock protein 60 in human endothelial cells *in vitro* are unaffected by exposure to 50 Hz magnetic fields. *Cell Stress Chaperones*, 2003; 8: 172-182
- [53] Hennequin C., Porcheray F., Waligora-Dupriet A.J., Collignon A., Barc M.C., Bourlioux P., Karjalainen T.: GroEL (Hsp60) of *Clostridium difficile* is involved in cell adherence. *Microbiology*, 2001; 147: 87-96
- [54] Hightower L.E., Hendershot L.M.: Molecular chaperones and the heat shock response at Cold Spring Harbor. *Cell Stress Chaperones*, 1997; 2: 1-11
- [55] Hirata D., Hirai I., Iwamoto M., Yoshio T., Takeda A., Masuyama J.I., Mimori A., Kano S., Minota S.: Preferential binding with *Escherichia coli* hsp60 of antibodies prevalent in sera from patients with rheumatoid arthritis. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, 1997; 82: 141-148
- [56] Hu Y., Mivechi N.F.: HSF-1 interacts with Ral-binding protein 1 in a stress - responsive, multiprotein complex with HSP90 *in vivo*. *J. Biol. Chem.*, 2003; 278: 17299-17306
- [57] Huang C.Y., Chen C.A., Lee C.N., Chang M.C., Su Y.N., Lin Y.C., Hsieh C.Y., Cheng W.F.: DNA vaccine encoding heat shock protein 60 co-linked to HPV16 E6 and E7 tumor antigens generates more potent immunotherapeutic effects than respective E6 or E7 tumor antigens. *Gynecol. Oncol.*, 2007; 107: 404-412
- [58] Jaradat Z.W., Wampler J.W., Bhunia A.W.: A *Listeria* adhesion protein-deficient *Listeria monocytogenes* strain shows reduced adhesion primarily to intestinal cell lines. *Med. Microbiol. Immunol.*, 2003; 192: 85-91
- [59] Jefferson K.K.: What drives bacteria to produce a biofilm? *FEMS Microbiol. Lett.*, 2004; 236: 163-173
- [60] Kaneda K., Masuzawa T., Yasugami K., Suzuki T., Suzuki Y., Yanagihara Y.: Glycosphingolipid-binding protein of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. *Infect. Immun.*, 1997; 65: 3180-3185
- [61] Kaźmierczuk A., Kiliańska Z.M.: Plejotropowa aktywność białek szoku cieplnego. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2009; 63: 502-521
- [62] Kol A., Lichtman A.H., Finberg R.W., Libby P., Kurt-Jones E.A.: Cutting edge: heat shock protein (HSP) 60 activates the innate immune response: CD14 is an essential receptor for HSP60 activation of mononuclear cells. *J. Immunol.*, 2000; 164: 13-17
- [63] Lehner T., Lavery E., Smith R., van der Zee R., Mizushima Y., Shinnick T.: Association between the 65-kilodalton heat shock protein, *Streptococcus sanguis*, and the corresponding antibodies in Behcet's syndrome. *Infect. Immun.*, 1991; 59: 1434-1441

- [64] Lindquist S., Craig E.A.: The heat-shock proteins. *Ann. Rev. Genet.*, 1988; 22: 631-677
- [65] Lüneberg E., Müller D., Steinmetz I., Frosch M.: Monoclonal antibody against species-specific epitope of *Pseudomonas aeruginosa* Hsp60 protein cross-reacts with *Pseudomonas stutzeri* and other *Pseudomonas* species. *FEMS Microbiol. Lett.*, 1997; 154: 131-137
- [66] Maeda H., Miyamoto M., Kokeguchi S., Kono T., Nishimura F., Takashiba S., Murayama Y.: Epitope mapping of heat shock protein 60 (GroEL) from *Porphyromonas gingivalis*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 2000; 28: 219-224
- [67] Merbl Y., Zucker-Toledano M., Quintana F.J., Cohen I.R.: Newborn humans manifest autoantibodies to defined self molecules detected by antigen microarray informatics. *J. Clin. Invest.*, 2007; 117: 712-718
- [68] Multhoff G., Hightower L.E.: Cell surface expression of the heat shock proteins and the immune response. *Cell Stress Chaperones*, 1996; 1: 167-176
- [69] Muñoz I.G., Yébenes H., Zhou M., Mesa P., Serna M., Park A.Y., Bragado-Nilsson E., Beloso A., de Cárcer G., Malumbres M., Robinson C.V., Valpuesta J.M., Montoya G.: Crystal structure of the open conformation of the mammalian chaperonin CCT in complex with tubulin. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 2011; 18: 14-19
- [70] Noll A., Autenrieth I.B.: Immunity against *Yersinia enterocolitica* by vaccination with *Yersinia* HSP60 immunostimulating complexes or *Yersinia* HSP60 plus interleukin-12. *Infect. Immun.*, 1996; 64: 2955-2961
- [71] Noll A., Roggenkamp A., Heesemann J., Autenrieth I.B.: Protective role for heat shock protein-reactive $\alpha\beta$ T cells in murine yersiniosis. *Infect. Immun.*, 1994; 62: 2784-2791
- [72] Osterloh A., Kalinke U., Weiss S., Fleischer B., Breloer M.: Synergistic and differential modulation of immune responses by Hsp60 and lipopolysaccharide. *J. Biol. Chem.*, 2007; 282: 4669-4680
- [73] Osterloh A., Veit A., Gessner A., Fleischer B., Breloer M.: Hsp60-mediated T cell stimulation is independent of TLR4 and IL-12. *Int. Immunol.*, 2008; 20: 433-443
- [74] Paliwal P.K., Bansal A., Sagi S.S., Mustoori S., Govindaswamy I.: Cloning, expression and characterization of heat shock protein 60 (groEL) of *Salmonella enterica* serovar Typhi and its role in protective immunity against lethal *Salmonella* infection in mice. *Clin. Immunol.*, 2008; 126: 89-96
- [75] Parcellier A., Gurbuxani S., Schmitt E., Solary E., Garrido C.: Heat shock proteins, cellular chaperones that modulate mitochondrial cell death pathways. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2003; 304: 505-512
- [76] Pivovarova A.V., Mikhailova V.V., Chernik I.S., Chebotareva N.A., Levitsky D.I., Gusev N.B.: Effects of small heat shock proteins on the thermal denaturation and aggregation of F-actin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2005; 331: 1548-1553
- [77] Poccia F., Piselli P., Di Cesare S., Bach S., Colizzi V., Mattei M., Bolognesi A., Stirpe F.: Recognition and killing of tumor cells expressing heat shock protein 65kD with immunotoxins containing saporin. *Br. J. Cancer*, 1992; 66: 427-432
- [78] Pockley A.G.: Heat shock proteins in health and disease: therapeutic targets or therapeutic agents? *Expert. Rev. Mol. Med.*, 2001; 3: 1-21
- [79] Pockley A.G.: Heat shock proteins as regulators of the immune response. *Lancet*, 2003; 362: 469-476
- [80] Powers M.V., Workman P.: Inhibitors of the heat shock response: biology and pharmacology. *FEBS Lett.*, 2007; 581: 3758-3769
- [81] Quintana F.J., Carmi P., Mor F., Cohen I.R.: Inhibition of adjuvant arthritis by a DNA vaccine encoding human heat shock protein 60. *J. Immunol.*, 2002; 169: 3422-3428
- [82] Quintana F.J., Carmi P., Mor F., Cohen I.R.: DNA fragments of the human 60-kDa heat shock protein (HSP60) vaccinate against adjuvant arthritis: identification of a regulatory HSP60 peptide. *J. Immunol.*, 2003; 171: 3533-3541
- [83] Quintana F.J., Cohen I.R.: The HSP60 immune system network. *Trends Immunol.*, 2011; 32: 89-95
- [84] Quintana F.J., Mimran A., Carmi P., Mor F., Cohen I.R.: HSP60 as a target of anti-ergotypic regulatory T cells. *PLoS One*, 2008; 3: e4026
- [85] Radford S.E.: Protein folding: progress made and promises ahead. *Trends Biochem. Sci.*, 2000; 25: 611-618
- [86] Rafati S., Gholami E., Hassani N., Ghaemimanesh F., Taslimi Y., Taheri T., Soong L.: *Leishmania major* heat shock protein 70 (HSP70) is not protective in murine models of cutaneous leishmaniasis and stimulates strong humoral responses in cutaneous and visceral leishmaniasis patients. *Vaccine*, 2007; 25: 4159-4169
- [87] Ramage J.M., Young J.L., Goodall J.C., Gaston J.S.: T cell responses to heat shock protein 60: differential responses by CD4⁺ T cell subsets according to their expression of CD45 isotypes. *J. Immunol.*, 1999; 162: 704-710
- [88] Rambukkana A., Das P.K., Witkamp L., Yong S., Meinardi M.M., Bos J.D.: Antibodies to mycobacterial 65-kDa heat shock protein and other immunodominant antigens in patients with psoriasis. *J. Invest. Dermatol.*, 1993; 100: 87-92
- [89] Rank R.G., Dascher C., Bowlin A.K., Bavoil P.M.: Systemic immunization with Hsp60 alters the development of chlamydial ocular disease. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 1995; 36: 1344-1351
- [90] Rapp U.K., Kaufmann S.H.: DNA vaccination with pg96-peptide fusion proteins induces protection against an intracellular bacterial pathogen. *Int. Immunol.*, 2004; 16: 597-605
- [91] Reiner D.S., Shinnick T.M., Ardesir F., Gillin F.D.: Encystation of *Gardia lamblia* leads to expression of antigens recognized by antibodies against conserved heat shock proteins. *Infect. Immun.*, 1992; 60: 5312-5315
- [92] Reissmann S., Parnot C., Booth C.R., Chiu W., Frydman J.: Essential function of the built-in lid in the allosteric regulation of eukaryotic or archaeal chaperonins. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 2007; 14: 432-440
- [93] Retzlaff C., Yamamoto Y., Hoffman P.S., Friedman H., Klein T.W.: Bacterial heat shock proteins directly induce cytokine mRNA and interleukin-1 secretion in macrophage cultures. *Infect. Immun.*, 1994; 62: 5689-5693
- [94] Rico A.I., Del Real G., Soto M., Quijada L., Martinez-A. C., Alonso C., Requena J.M.: Characterization of the immunostimulatory properties of *Leishmania infantum* HSP70 by fusion to the *Escherichia coli* maltose-binding protein in normal and nu/nu BALB/c mice. *Infect. Immun.*, 1998; 66: 347-352
- [95] Sandal I., Hong W., Swords W.E., Inzana T.J.: Characterization and comparison of biofilm development by pathogenic and commensal isolates of *Histophilus somni*. *J. Bacteriol.*, 2007; 189: 8179-8185
- [96] Sandal I., Shao J.Q., Annadata S., Apicella M.A., Boye M., Jensen T.K., Saunders G.K., Inzana T.J.: *Histophilus somni* biofilm formation in cardiopulmonary tissue of the bovine host following respiratory challenge. *Microbes. Infect.*, 2009; 11: 254-263
- [97] Srivastava P.: Roles of heat-shock proteins in innate and adaptive immunity. *Nat. Rev. Immunol.*, 2002; 2: 185-194
- [98] Tabeta K., Yamazaki K., Hotokezaka H., Yoshie H., Hara K.: Elevated humoral immune response to heat shock protein 60 (hsp60) family in periodontitis patients. *Clin. Exp. Immunol.*, 2000; 120: 285-293
- [99] Tsan M.F., Gao B.: Cytokine function of heat shock proteins. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.*, 2004; 286: C739-C744
- [100] Tsan M.F., Gao B.: Heat shock proteins and immune system. *J. Leukoc. Biol.*, 2009; 85: 905-910
- [101] Wallin R.P., Lundqvist A., Moré S.H., von Bonin A., Kiessling

- R., Ljunggren H.G.: Heat-shock proteins as activators of the innate immune system. *Trends Immunol.*, 2002; 23: 130-135
- [102] Wampler J.L., Kim K.P., Jaradat Z., Bhunia A.K.: Heat shock protein 60 acts as a receptor for the *Listeria* adhesion protein in Caco-2 cells. *Infect. Immun.*, 2004; 72: 931-936
- [103] Wand-Württenberger A., Schoel B., Ivanyi J., Kaufmann S.H.: Surface expression by mononuclear phagocytes of an epitope shared with mycobacterial heat shock protein 60. *Eur. J. Immunol.*, 1991; 21: 1089-1092
- [104] Watanabe K., Tachibana M., Tanaka S., Furuoka H., Horiuchi M., Suzuki H., Watarai M.: Heat shock cognate protein 70 contributes to *Brucella* invasion into trophoblast giant cells that cause infectious abortion. *BMC Microbiol.*, 2008; 8: 212
- [105] Weeratna R., Stamler D.A., Edelstein P.H., Ripley M., Marrie T., Hoskin D., Hoffman P.S.: Human and guinea pig immune responses to *Legionella pneumophila* protein antigens OmpS and Hsp60. *Infect. Immun.*, 1994; 62: 3454-3462
- [106] Westerheide S.D., Morimoto R.I.: Heat shock response modulators as therapeutic tools for diseases of protein conformation. *J. Biol. Chem.*, 2005; 280: 33097-33100
- [107] Wick G., Jakic B., Buszko M., Wick M.C., Grundtman C.: The role of heat shock proteins in atherosclerosis. *Nat. Rev. Cardiol.*, 2014; 11: 516-529
- [108] Wilhelm V., Soza C., Martinez R., Roseblatt M., Burzio L.O., Valenzuela P.D.: Production and immune response of recombinant Hsp60 and Hsp70 from the salmon pathogen *Piscirickettsia salmonis*. *Biol. Res.*, 2005; 38: 69-82
- [109] Yamaguchi H., Osaki T., Kai M., Taguchi H., Kamiya S.: Immune response against a cross-reactive epitope on the heat shock protein 60 homologue of *Helicobacter pylori*. *Infect. Immun.*, 2000; 68: 3448-3454
- [110] Yamaguchi H., Osaki T., Taguchi H., Hanawa T., Yamamoto T., Kamiya S.: Flow cytometric analysis of the heat shock protein 60 expressed on the cell surface of *Helicobacter pylori*. *J. Med. Microbiol.*, 1996; 45: 270-277
- [111] Yamaguchi H., Osaki T., Taguchi H., Sato N., Toyoda A., Takahashi M., Kai M., Nakata N., Komatsu A., Atomi Y., Kamiya S.: Effect of bacterial flora on postimmunization gastritis following oral vaccination of mice with *Helicobacter pylori* heat shock protein 60. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 2003; 10: 808-812
- [112] Yi Y., Yang X., Brunham R.C.: Autoimmunity to heat shock protein 60 and antigen-specific production of interleukin-10. *Infect. Immun.*, 1997; 65: 1669-1674
- [113] Young D., Lathigra R., Hendrix R., Sweetser D., Young R.A.: Stress proteins are immune targets in leprosy and tuberculosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1988; 85: 4267-4270
- [114] Zanin-Zhorov A., Bruck R., Tal G., Oren S., Aeed H., HersHKoviz R., Cohen I.R., Lider O.: Heat shock protein 60 inhibits Th1-mediated hepatitis model via innate regulation of Th1/Th2 transcription factors and cytokines. *J. Immunol.*, 2005; 174: 3227-3236
- [115] Zanin-Zhorov A., Cahalon L., Tal G., Margalit R., Lider O., Cohen I.R.: Heat shock protein 60 enhances CD4⁺CD25⁺ regulatory T cell function via innate TLR2 signaling. *J. Clin. Invest.*, 2006; 116: 2022-2032
- [116] Zanin-Zhorov A., Nussbaum G., Franitz S., Cohen I.R., Lider O.: T cells respond to heat shock protein 60 via TLR2: activation of adhesion and inhibition of chemokine receptors. *FASEB J.*, 2003; 17: 1567-1569
- [117] Zanin-Zhorov A., Tal G., Shvitiel S., Cohen M., Lapidot T., Nussbaum G., Margalit R., Cohen I.R., Lider O.: Heat shock protein 60 activates cytokine-associated negative regulator suppressor of cytokine signaling 3 in T cells: effects on signaling, chemotaxis, and inflammation. *J. Immunol.*, 2005; 175: 276-285
- [118] Zarankiewicz T., Madej J., Galli J., Bajzert J., Stefaniak T.: Inhibition of *in vitro* *Histophilus somni* biofilm production by recombinant Hsp60 antibodies. *Pol. J. Vet. Sci.*, 2012; 15: 373-378
- [119] Zhang S.M., Sun D.C., Lou S., Bo X.C., Lu Z., Qian X.H., Wang S.Q.: HBx protein of hepatitis B virus (HBV) can form complex with mitochondrial HSP60 and HSP70. *Arch. Virol.*, 2005; 150: 1579-1590
- [120] Zügel U., Kaufmann S.H.: Role of heat shock proteins in protection from and pathogenesis of infectious diseases. *Clin. Microbiol. Rev.*, 1999; 12: 19-39

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.