



Papel das Proteínas de Choque Térmico na apoptose mediada por Espécies Reativas de Oxigénio em culturas celulares

Jorge Miguel Almeida Terrinca

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Ciências Biomédicas

Orientador: Prof.^a Dr.^a Patrícia Alexandra Saraiva Madureira

Co-orientador: Prof.^a Dr.^a Ana Beatriz Rodríguez Moratinos

2015



Papel das Proteínas de Choque Térmico na apoptose mediada por Espécies Reativas de Oxigénio em culturas celulares

Jorge Miguel Almeida Terrinca

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Ciências Biomédicas

Orientador: Prof.^a Dr.^a Patrícia Alexandra Saraiva Madureira

Co-orientador: Prof.^a Dr.^a Ana Beatriz Rodríguez Moratinos

2015

Papel das Proteínas de Choque Térmico na apoptose mediada por Espécies Reativas de Oxigénio em culturas celulares

Declaração de autoria de trabalho

Declaro ser o autor deste trabalho, que é original e inédito. Autores e trabalhos consultados estão devidamente citados no texto e constam da listagem de referências incluída.

Jorge Miguel Almeida Terrinca

Copyright

A Universidade do Algarve tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar este trabalho através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, de o divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Jorge Miguel Almeida Terrinca

Agradecimentos

Agradeço a todos que tornaram isto possível. A Doutora Ana Beatriz Rodriguez Moratinos por me receber no seu grupo de trabalho, ao Doutor José António Pariente Llanos por todo o apoio e preocupação, ao Javier Espino Palma por me ensinar tudo o que necessitava, à Ana Maria Marchena Lopes pela prestabilidade, à Lourdes Franco Hernandez pela simpatia e disponibilidade e aos restantes membros do grupo de investigação de “Neuroimunofisiologia e Crononutrição” do departamento de Fisiologia da Faculdade de Ciências da Universidade de Extremadura em Badajoz, Espanha. Obrigado a todos pela ajuda e carinho.

Agradeço também à Doutora Patrícia Alexandra Saraiva Madureira por ter aceitado de imediato o convite para ser minha orientadora e por todo o apoio, disponibilidade e paciência que demonstrou durante todo o processo. O meu muito obrigado.

Agradeço especialmente à minha família pela dedicação e apoio em todos os momentos difíceis.

Resumo

As consequências negativas do stress fazem-se sentir em todos os componentes celulares desde o ADN às membranas lipídicas, passando pelas proteínas, podendo mesmo ter como última consequência a morte celular programada (apoptose). Por forma a minimizar os danos causados por stress as células possuem uma complexa maquinaria de resposta a qualquer alteração ambiental que coloque em causa a sua homeostasia. Entre os sistemas mais eficazes encontram-se as proteínas conhecidas de choque térmico (*Heat Shock Proteins*, HSP) que atuam tanto ao nível mitocondrial controlando a libertação de proteínas pró-apoptóticas, como ao nível pós-mitocondrial impedindo a ativação de caspases.

Apesar do papel citoprotetor estar bem estudado em diversos tipos celulares, pouco se sabe acerca do efeito das HSP quando sobre-expressas em linhas linfoides humanas como a U937. Assim sendo, seria interessante caracterizar o papel destas proteínas (HSPs) num modelo de apoptose induzida, quer por espécies reativas de oxigénio (*Reactive Oxygen Species*, ROS) através de peróxido de hidrogénio (H_2O_2), quer por sobrecarga de cálcio intracelular induzida por taspigargina (TG) na linha celular cancerígena U937. De seguida verificou-se o efeito da sobre-expressão de HSPs num modelo de viabilidade/morte celular induzida por H_2O_2 ou TG. O último passo foi averiguar se a morte celular estava relacionada com a via das caspases, para tal procedeu-se à medição da atividade da caspase-3 sob as mesmas condições.

Os resultados mostraram uma diminuição da expressão de HSP70 e HSP90 após 24 h de tratamento com H_2O_2 (60 μ M) e TG (2,5 μ M) comparativamente com células U937 não tratadas. O H_2O_2 (60 μ M) e a TG (2,5 μ M) também se mostraram eficazes em diminuir a viabilidade celular para 70 % e 40 %, respetivamente. Viabilidade esta que é completamente restaurada na presença de 1 ng/mL de HSP47, HSP60, HSP70 e HSP90 em células tratadas com H_2O_2 (60 μ M), mas não em células tratadas com TG (2,5 μ M). Resultados similares são observáveis nos testes para avaliação da atividade de caspase-3, ou seja, a TG (2,5 μ M) é mais eficaz na sua ativação do que o H_2O_2 (60 μ M), e apenas o efeito do H_2O_2 pode ser revertido por HSPs.

Termos chave: Proteínas de choque térmico (*Heat Shock Proteins*, HSP); Apoptose; Espécies reativas de oxigénio (*Reactive Oxygen Species*, ROS).

Abstract

The negative consequences of stress are felt in all cellular components from DNA to lipid membranes, and proteins, potentially triggering programmed cell death (apoptosis). To minimize the damage induced by stress, cells have developed a complex response machinery that is able to read environmental changes that threaten cellular homeostasis. Among the most effective systems are proteins known as Heat Shock Proteins (HSP) that act both at the mitochondrial level by controlling the release of pro-apoptotic proteins, and at the post-mitochondrial level by preventing the activation of caspases.

Despite the cytoprotective role of HSP being well studied in different cell types, little is known about the effect of HSPs when overexpressed in human lymphoid lines such as the U937. It would be interesting to characterize the role(s) of these proteins (HSPs) in an apoptosis model induced by Reactive Oxygen Species (ROS) such as hydrogen peroxide (H_2O_2) or by intracellular calcium overload induced by thapsigargin (TG) using the U937 cancer cell line. To do this I first studied the effect of HSP over-expression in a cell viability/death model induced by H_2O_2 or TG. The last step was to investigate whether cell death was related to activation of caspases, so I proceeded to the measurement of caspase-3 activity under the same conditions.

The results showed a decrease of HSP70 and HSP90 expression after 24 h of exposure to H_2O_2 (60 μ M) and TG (2,5 μ M), compared to untreated U937 cells. H_2O_2 (60 μ M) and TG (2,5 μ M) also proved to be effective in reducing cell viability to 70 % and 40 %, respectively. Cell viability was completely restored by 1ng/mL of HSP47, HSP60, HSP70 and HSP90 in cells treated with H_2O_2 (60 μ M), but not in cells treated with TG (2,5 μ M). Similar results were observed in the tests for assessment of caspase-3 activity, in other words, TG (2,5 μ M) was more effective in caspase-3 activation than H_2O_2 (60 μ M), and only H_2O_2 effects could be reversed by HSPs.

Keywords: Heat Shock Proteins (HSP); Apoptosis; Reactive Oxygen Species (ROS).

Índice

Agradecimentos	iv
Resumo	v
Abstract	vi
Índice de Figuras	ix
Índice de Tabelas	x
Lista de Abreviaturas	xi
1. Introdução.....	1
1.1. Proteínas de choque térmico (<i>Heat Shock Proteins</i>, HSP).....	1
1.1.1. Fatores indutores das proteínas de choque térmico (<i>Heat Shock Proteins</i> , HSP)	1
1.1.2. Regulação das proteínas de choque térmico (<i>Heat Shock Proteins</i> , HSP).....	1
1.1.3. Função das proteínas de choque térmico (<i>Heat Shock Proteins</i> , HSP)	2
1.1.4. Pequenas proteínas de choque térmico (<i>small Heat Shock Proteins</i> , sHSP)	3
1.1.4.1. Proteína de choque térmico 22 (<i>Heat Shock Protein 22</i> , Hsp22)	4
1.1.4.2. Proteína de choque térmico 27 (<i>Heat Shock Protein 27</i> , Hsp27)	4
1.1.4.3. Proteína de choque térmico 32 (<i>Heat Shock Protein 32</i> , Hsp32)	5
1.1.5. Proteína de choque térmico 47 (<i>Heat Shock Protein 47</i> , Hsp47)	5
1.1.6. Família da proteína de choque térmico 60 (<i>Family of Heat Shock Protein 60</i> , HSP60)	6
1.1.7. Família da proteína de choque térmico 70 (<i>Family of Heat Shock Protein 70</i> , HSP70)	6
1.1.7.1. Proteínas auxiliares dos membros da família da proteína de choque térmico 70 (<i>Family of Heat Shock Protein 70</i> , HSP70)	8
1.1.7.1.1. Funções dos membros da família da proteína de choque térmico 70 (<i>Family of Heat Shock Proteins 70</i> , HSP70)	10
1.1.2. Família da proteína de choque térmico 90 (<i>Family of Heat Shock Protein 90</i> , HSP90)	10
1.1.2.1. Co-chaperones e proteínas clientes da família da proteína de choque térmico 90 (<i>Family of Heat Shock Protein 90</i> , HSP90)	11
1.1.2.2. Funções dos membros da família da proteína de choque térmico 90 (<i>Heat Shock Protein 90</i> , HSP90).....	11
1.2. Apoptose	11
1.2.1. Causas da apoptose.....	11
1.2.2. Características da apoptose	11
1.2.3. Caspases	12
1.2.4. Fases apoptóticas	12
1.2.5. Vias apoptóticas	12
1.2.5.1. Via Extrínseca	13
1.2.5.2. Via intrínseca	14
1.2.5.3. Via do retículo endoplasmático	16
1.2.5.4. Apoptose mediada por lípidos	16
1.2.5.5. Via independente de caspases	17
1.2.5.6. Catepsinas	17
1.3. Espécies reativas de oxigénio (<i>Reactive Oxygen Species</i>, ROS).....	17
2. Objetivos	21

3. Materiais e Métodos	21
3.1. Materiais	21
3.1.1. Equipamentos	21
3.1.2. Reagentes	22
3.1.3. Soluções tampão	23
3.1.4. Linhas celulares	24
3.1.5. Anticorpos	24
3.2. Métodos	24
3.2.1. Cultura celular	24
3.2.2. <i>Western blotting</i>	25
3.2.3. Viabilidade celular	25
3.2.4. Medição da atividade caspase-3	26
3.2.5. Análise estatística	26
4. Resultados	26
4.1. Análise da expressão das proteínas de choque térmico (<i>Heat Shock Proteins</i> , HSP) em células U937 tratadas com tapsigargina (TG) ou peróxido de hidrogénio (H ₂ O ₂)	26
4.2. Viabilidade celular	28
4.3. Medição da atividade de caspase-3 em células U937 tratadas com proteínas de choque térmico (<i>Heat Shock Proteins</i> , HSP) e tapsigargina (TG) ou peróxido de hidrogénio (H ₂ O ₂)	29
5. Discussão	31
5.1. Análise da expressão de proteínas de choque térmico (<i>Heat Shock Proteins</i> , HSP) em células U937 tratadas com tapsigargina (TG) ou peróxido de hidrogénio (H ₂ O ₂)	31
5.2. Viabilidade celular	32
5.3. Medição da atividade de caspase-3 em células U937 tratadas com proteínas de choque térmico (<i>Heat Shock Proteins</i> , HSP) e tapsigargina (TG) ou peróxido de hidrogénio (H ₂ O ₂)	34
6. Conclusões	35
7. Perspectivas	35
8. Bibliografia	36

Índice de Figuras

Figura 1.1. Mecanismo de formação de HSPs aquando da indução de stress.....	2
Figura 1.2. Estrutura da Hsp70 e Hsc70 humana.....	7
Figura 1.3. Estrutura da proteína Dnak com enfase (a verde) para o local de ligação ao substrato.....	8
Figura 1.4. Estrutura proposta para a Hsp110.....	9
Figura 1.5. Funcionamento dos recetores TRAIL-R2/R1.....	13
Figura 1.6. Citocromo c na ativação de caspase-3.....	15
Figura 4.1. Figura 4.1. Análise da expressão de HSP70 e HSP90 em células U937 tratadas com TG ou H ₂ O ₂	27
Figura 4.2. Ensaio de viabilidade celular.....	29
Figura 4.3. Atividade de caspase-3 em células U937 tratadas com 1ng/mL de HSP e 2,5µM de TG.....	30
Figura 4.4. Atividade de caspase-3 em células U937 tratadas com 1ng/mL de HSP e 60µM de H ₂ O ₂	31

Índice de Tabelas

Tabela 1.1. Principais características de alguns antioxidantes.....	19
---	----

Lista de Abreviaturas

A:

ABD	<i>ATP Binding Domain</i> (domínio de ligação ao ATP)
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
Aha1	<i>Activator of heat shock 90kDa protein ATPase homolog 1</i> (homólogo do ativador da HSP90 ATPase)
AIF	<i>Apoptosis-Inducing Factor</i> (fator de indução apoptótica)
AP1	<i>Activator Protein 1</i> (Proteína ativadora 1)
Apaf-1	<i>Apoptotic protease activating factor 1</i> (fator de ativação de apoptose 1)
Akt	<i>Protein Kinase B</i> (proteína cinase B)
APO-1	Recetor Fas
ATF6	<i>Activating Transcription Factor 6</i> (fator transcrição da ativação 6)
ASK1	<i>Apoptosis Signal-regulating Kinase 1</i> (cinase reguladora do sinal apoptótico 1)

B:

Bad	<i>Bcl-2-associated death promoter</i> (promotor de morte associado ao Bcl-2)
BAG	<i>Athanogene Associated with Bcl-2</i> (atanogene associado à Bcl-2)
Bak	<i>Bcl-2-antagonist/killer</i> (Bcl-2-antagonista/assassino)
Bax	<i>Bcl-2-associated X protein</i> (proteína X associada ao Bcl-2)
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i> (linfoma de células B 2)
Bcl-XL	<i>B-cell lymphoma-extra large</i> (linfoma de células B extra grande)
Bid	<i>BH3 interacting-domain death agonist</i> (agonista de morte do domínio de interação BH3)
BiP	<i>Binding immunoglobulin Protein</i> (proteína de ligação à imunoglobulina)

C:

CARD	<i>Caspase Activation and Recruitment Domains</i> (domínios de ativação e recrutamento de caspases)
CAT	Catalase
Cdc37	<i>Cell division cycle 37</i> (ciclo de divisão celular 37)
CFTR	<i>Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator</i> (regulador de condutância transmembranar de fibrose cística)
CHIP	<i>C-terminus of HSC70-Interacting Protein</i> (proteína de interação com o C-terminal da HSC70)
CHOP	<i>C/EBP-homologous Protein</i> (proteína homóloga C/EBP)

D:

DAXX	<i>Death-domain associated protein</i> (proteína associada aos domínios de morte)
DD	<i>Death Domain</i> (domínio de morte)
DED	<i>Death Efecter Domain</i> (domínio de morte efetor)
DIABLO	<i>Direct IAP binding protein with low pI</i> (proteína de ligação direta ao IAP com baixo pI)
DMSO	Dimetilsulfóxido

E:

ER	<i>Endoplasmic Reticulum</i> (retículo endoplasmático)
eIF4G	<i>eukaryotic Initiation Factor 4G</i> (fator de iniciação eucariótica 4G)

F:

FADD	<i>Fas-Associated protein with Death Domain</i> (domínio de morte associado ao Fas)
FBS	Fetal Bovine Serum (Soro fetal bovino)

G:

GATA-1	Erythroid transcription factor (fator de transcrição eritroide)
GPX	Glutathione Peroxidase
GRP	<i>Glucose-Regulated Protein</i> (proteína regulada por glucose)
GSH	Glutathione
GSSG	Glutathione disulfido

H:

H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogénio
Hsc	<i>Heat Shock Cognate</i> (proteína constitutiva de choque térmico)
HER2	<i>Human Epidermal growth factor Receptor 2</i> (receptor do fator de crescimento epidermal humano 2)
HIP	<i>Huntingtin Interacting Protein</i> (proteína de interação com a huntingtina)
HOP	<i>Hsp70/Hsp90 Organizing Protein</i> (proteína organizadora da Hsp70/Hsp90)
HSE	<i>Heat Shock Element</i> (elemento promotor de choque térmico)
HSF	<i>Heat Shock Factor</i> (fator de transcrição de choque térmico)
Hsp	<i>Heat Shock Protein</i> (proteína de choque térmico)
HSP	<i>Family of Heat Shock Protein</i> (família da proteína de choque térmico)
HspBP1	Heat Shock Protein 70 Binding Protein 1 (proteína 1 de ligação à proteína de choque térmico 70)

I:

IAP	<i>Inhibitor Apoptosis Protein</i> (proteína inibidora de apoptose)
IκBα	Inibidor α do fator nuclear κ de células B
IKK	<i>IκB kinase</i> (I kappa B cinase)
Ire1	<i>Inositol-requiring enzyme 1</i> (enzima 1 requerida pelo inositol)

J:

JNK	<i>c-Jun N-terminal Kinase</i> (cinase c-Jun N-terminal)
-----	--

M:

MAP	<i>Mitogen Activated Protein</i> (proteína ativada por mitogénio)
MAPKAP	<i>MAP Kinase-Activated Protein</i> (proteína cinase ativada por MAP)
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i> (complexo principal de histocompatibilidade)
MyoD	<i>Myogenic differentiation 1</i> (proteína de diferenciação miogénica 1)

N:

NF-κB	<i>Nuclear Factor kappa B</i> (fator nuclear kappa B)
-------	---

O:

$^1\text{O}_2$	Oxigénio singlete
$\text{O}_2^{\cdot-}$	Radical superóxido
OH^{\cdot}	Radical hidroxilo
OH^-	Hidroxilo
Osp94	<i>Osmotic Stress Protein 94</i> (proteína de stress osmótico 94)

P:

PBD	<i>Peptide Binding Domain</i> (domínio de ligação ao péptido)
PERK	<i>Protein kinase RNA-like Endoplasmic Reticulum Kinase</i> (cinase do retículo endoplasmático tipo proteína cinase ARN)
PIM	<i>Protease Inhibitor Mix</i> (Cocktail inibidor de proteases)
PKC	<i>Protein Kinase C</i> (proteína cinase C)
PI3K	<i>Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate-3-kinase</i> (fosfatidilinositol-4,5-bifosfato-3-cinase)
PP5	<i>Protein Phosphatase 5</i> (proteína fosfatase 5)
PTP	<i>Permeability Transition Pore</i> (poro de permeabilidade transitória)
<u>R:</u>	
RIP	<i>Receptor-Interacting Protein</i> (proteína de interação com o recetor)
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i> (espécies reativas de oxigénio)

RuBisCoBP *Rubisco binding protein* (proteína de ligação a Rubisco)

S:

SD *Standard deviation* (Desvio padrão)

Smac *Second mitochondria-derived activator of caspases* (segundo ativador de caspases derivado da mitocôndria)

SOD Superóxido dismutase

T:

TBS *Tris-buffered saline* (Solução salina tamponada com Tris)

TBST *Tris-buffered saline and Tween 20* (Solução salina tamponada com Tris e Tween 20)

TG Tapsigargina

TGF β *Transforming Growth Factor β* (fator de crescimento transformante β)

TM Tunicamicina

TNF- α *Tumour Necrosis Factor α* (fator de necrose tumoral α)

TPR *Tetratricopeptide Repeat* (repetição tetratricopéptida)

TRiC *t-complex polipeptide-1 ring complex* (complexo anelar do complexo-t polipéptido-1)

TRADD *TNF Receptor-Associated Death Domain* (domínio de morte associado ao receptor TNF)

TRAIL-R TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor (receptor do ligando indutor de apoptose relacionado com TNF)

TRAP1 *TNF Receptor-Associated Protein 1* (proteína 1 associada ao receptor TNF)

TRX Tiorredoxina

U:

UPR *Unfolded Protein Response* (resposta a proteínas não-dobradas)

X:

XBP1 *X-box Binding Protein 1* (proteína 1 de ligação à X-box)

1. Introdução

1.1. Proteínas de choque térmico (*Heat Shock Proteins*, HSP)

A primeira descrição das proteínas de choque térmico (*Heat Shock Proteins*, HSP) remonta a Tissières e colaboradores em células de *Drosófila* e data de 1974 [1]. Anos mais tarde, descobriu-se que a sequência de ADN responsável por regular a expressão dos genes de choque térmico em células eucarióticas é invariante desde a levedura até ao Homem [2, 3].

Podemos dividir as HSPs em seis famílias de acordo com o seu peso molecular: sHSP, HSP40, HSP60, HSP70, HSP90 e HSP100 [4]. As famílias de maior peso molecular (HSP60, HSP70 e HSP90) dependem de ATP para o seu correto funcionamento bem como de co-chaperones para a sua modelagem conformacional. Por outro lado, as sHSPs são independentes de ATP [5]. As HSPs podem ser expressas constitutivamente (Hsp60, Hsp73 e Hsp90) e/ou ser induzidas (Hsp27 e Hsp72) por diferentes tipos de stress [6, 7, 8, 9].

1.1.1. Fatores indutores das proteínas de choque térmico (*Heat Shock Proteins*, HSP)

São vários os estímulos que podem conduzir à expressão de HSPs. Entre os quais podemos referir: hipertermia [10, 11, 12], desidratação [13], hipóxia [14], metais pesados [15], radicais livres [16] e indução viral [17, 18, 19, 20], entre outros [6, 21, 22].

1.1.2. Regulação das proteínas de choque térmico (*Heat Shock Proteins*, HSP)

A transcrição dos genes que codificam para as HSPs é regulada por fatores de transcrição de choque térmico (*Heat Shock Factor*, HSF) (**Figura 1.1.**) [22, 23] que se ligam a elementos de choque térmico (*Heat Shock Element*, HSE) existentes nos promotores dos genes que codificam para as proteínas de choque térmico. Os HSE são motivos pentanucleotidos 5'-

nGAAn-3' geralmente localizados a 80-150 pares de base acima do local de iniciação da transcrição do ARN [24, 25, 26].

A família de proteínas cinases ativadas por mitogénio (*Mitogen Activated Protein Kinases*, MAPKs) tem sido descrita como inibidora da resposta ao choque através de alterações no estado de fosforilação do HSF1 [27, 28].

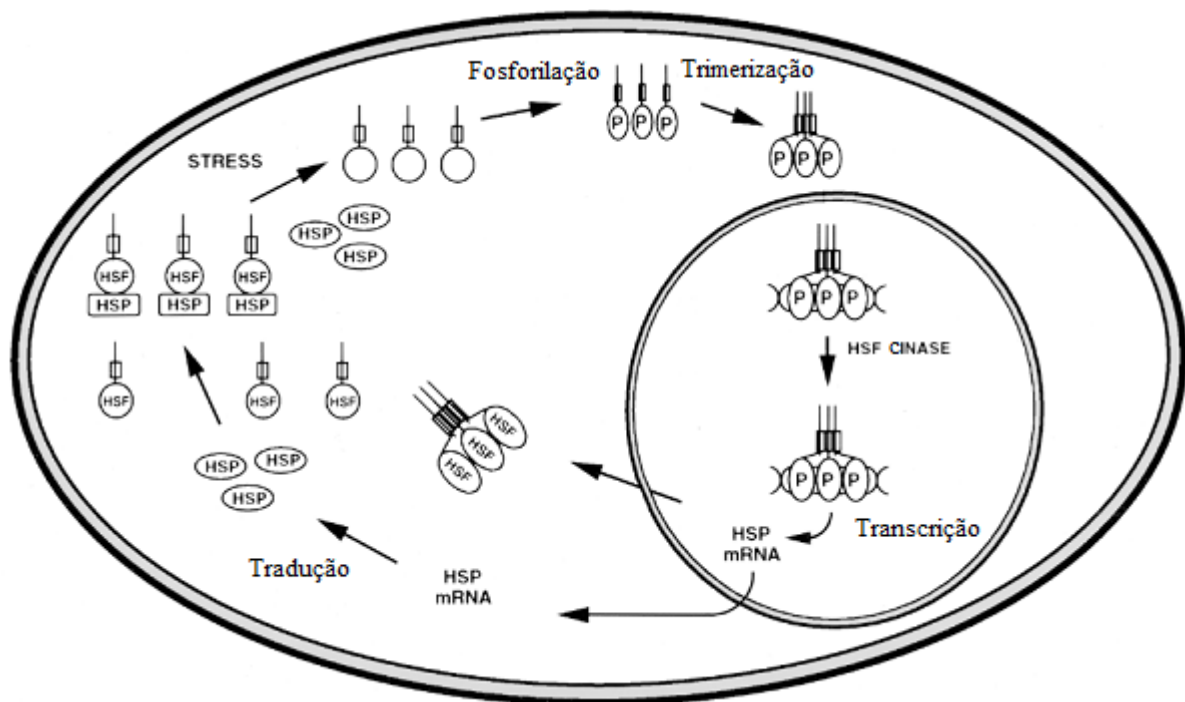


Figura 1.1. Mecanismo de síntese de HSPs aquando da indução de stress. Adaptado de [418]. Sob condições de não-stress, as HSPs ligam-se aos HSFs presentes no citosol, tornando-os monómeros inativos [419, 420]. Quando é induzido um stress na célula, os HSFs separam-se das HSPs e são fosforilados pela proteína cinase C (*Protein Kinase C*, PKC) ou por outra serina/treonina cinase originando um homotrímero [421, 422] que entra no núcleo, liga-se ao HSE localizado na região promotora dos genes *HSPs* e é novamente fosforilado, desta vez por HSF cinases [423], dando início à transcrição de genes *HSP* [424].

1.1.3. Função das proteínas de choque térmico (*Heat Shock Proteins*, HSP)

De um modo geral podemos apontar algumas funções características de todas as HSPs que serão descritas e exemplificadas mais à frente nas secções destinadas a cada HSP.

- 1) Dobramento/desdobramento (*folding*) de proteínas [29, 30, 31];
- 2) Ligar transientemente a um péptido/proteína para impedir que este se enrole antes da sua síntese estar completa [32];
- 3) Manter um péptido/proteína na conformação apropriada para que este possa atravessar membranas de organelos [8, 33, 34];

- 4) Prevenir a agregação proteica e restaurar a atividade de enzimas desnaturadas como a citrato sintase, β -galactosidase ou luciferase [29, 31];
- 5) Estabilização do citoesqueleto através da interação direta com proteínas estruturais [35, 36, 37, 38];
- 6) Manter os complexos apo-recetores esteroides ativos para os ligandos [39];
- 7) Desmontagem ativa de vesículas revestidas de clatrina [40];
- 8) Proteção/recuperação de cardiomiócitos [41, 42, 43, 44, 45, 46] e neurónios [47, 48, 49, 50, 51] após o choque;
- 9) Combate a doenças degenerativas [52, 53];
- 10) Proteção contra doenças infecciosas como conjuntivite granulomatosa [54], doença de legionários [55] e malária [56];
- 11) Facilitar o transplante de tecidos [57, 46];
- 12) Regular a mitogénese [58];
- 13) Regular o ciclo celular [59, 60];
- 14) Regular a proliferação celular [61];
- 15) Regular a diferenciação celular [62, 63];
- 16) Regular a apoptose [64, 65, 66];
- 17) Promover a ubiquitinação e lise proteossómica de metabolitos tóxicos [67, 68, 69];
- 18) Apresentação de antígenos a moléculas da classe I e II do Complexo principal de histocompatibilidade (*Major Histocompatibility Complex*, MHC) [70, 71, 72, 73].

1.1.4. Pequenas proteínas de choque térmico (*small Heat Shock Proteins*, sHSP)

As sHSP constituem um grupo de proteínas cujo tamanho varia entre os 15 a 30 kDa e que partilham sequências homólogas e propriedades bioquímicas como a própria fosforilação e oligomerização [74].

Estruturalmente, todas as sHSP partilham um domínio C-terminal de 80-100 resíduos de aminoácidos, referido como domínio alfa-cristalino que é responsável pela função chaperone [75]. O domínio N-terminal é menos conservado, mas existe uma pequena região rica em resíduos de prolina/fenilalanina que contém um ou dois motivos WD/EPF ou WDPF que estão relacionados com processos de oligomerização [76].

Funcionalmente as sHSP estão associadas à síntese e degradação proteica, que geralmente ocorre em períodos de elevada reorganização celular como é o caso da

embriogénese [77]. A acumulação de grandes quantidades de proteínas desdobradas leva a que as sHSP formem agregados como sinal para a apoptose [78].

1.1.4.1. Proteína de choque térmico 22 (*Heat Shock Protein 22, Hsp22*)

A Hsp22 ou $\alpha\beta$ -cristalina é a proteína estrutural mais abundante na lente ocular. Tecidualmente é também significativamente expressa no coração, constituindo 1 a 3 % de todas as proteínas solúveis [79, 80]. Em cardiomiócitos não estimulados a $\alpha\beta$ -cristalina é altamente solúvel e permanece na fração citosólica sob a forma de complexos hetero-oligoméricos de 500 a 800 kDa tanto *in vivo* como *in vitro* [81]. Quando as células são submetidas a stresses como calor ou isquémia a Hsp22 migra rapidamente para a fração insolúvel (núcleo ou bandas Z do citoesqueleto) formando um padrão semelhante à desmina e actina [82].

1.1.4.2. Proteína de choque térmico 27 (*Heat Shock Protein 27, Hsp27*)

O aumento dos níveis de Hsp27 em resposta ao stress é precedido de uma fosforilação num resíduo de serina (Ser-15, Ser-78 ou Ser-82) [83], resultando na divisão de um grande oligómero em sub-unidades tetraméricas [84]. Esta fosforilação é catalizada pelas proteínas cinases ativadas por MAPK (*MAP Kinase-Activated Protein*, MAPKAP) 2 e 3 [85] que por sua vez são fosforiladas por p38 [86]. Outras evidências defendem que a Hsp27 também pode ser fosforilada pela isoforma delta da PKC [87]. Uma vez fosforilada a Hsp27 associa-se a proteínas como a proteína associada aos domínios de morte (*Death-domain associated protein*, DAXX) [88], proteína cinase B (*Protein Kinase B*, PKB) [89], I kappa B cinase (*I κ B kinase*, IKK) [90] ou actina [91]. A fosforilação também parece ser importante para a sua translocação para o núcleo [92] onde é capaz de alterar pós-traducionalmente alguns fatores de transcrição como o HSF1 (regulação da resposta ao stress) [93], provocar a ubiquitinação e degradação proteossômica do fator de diferenciação eritroblástica (*Erythroid transcription factor*, GATA-1) quando acetilado [94] ou inibir a síntese proteica através da ligação ao fator de iniciação eucariótica humano 4G (*eukaryotic Initiation Factor 4G*, eIF4G), um fator essencial na iniciação da tradução de ARNm (isto pode ser visto como um mecanismo protetor para impedir uma possível acumulação de proteínas *unfolded* que poderiam levar à morte celular) [95, 96].

Podemos assim concluir que entre as principais funções da Hsp27 está estabilizar o citoesqueleto [97], reparar ou remover proteínas danificadas [98], prevenir a apoptose através da capacidade de sequestrar citocromo c e pró-caspase-3, inibir a agregação proteica [5] e a polimerização da actina [99, 100, 101, 102].

1.1.4.3. Proteína de choque térmico 32 (*Heat Shock Protein 32, Hsp32*)

As Hsp32 ou Heme Oxigenases (*Heme Oxygenase, HO*) são as enzimas limitantes na degradação do heme, biliverdina, ferro molecular e dióxido de carbono [103]. Três genes relacionados, mas únicos, codificam as três isoformas da Hsp32: HO-1, HO-2 e HO-3 [104, 105, 106].

A HO-1 é a isoforma mais abundante, encontra-se a níveis elevados em cardiomiócitos [107] e é induzida por diversos tipos de stress: hipóxia, isquémia, peróxido de hidrogénio, hemina e metais pesados (selénio, cobalto, cádmio e estanho) [108].

Ao contrário da HO-1, a HO-2 não é induzida por choque térmico [109, 110]. Uma cópia do gene produz cinco transcritos diferentes [111] que resultam numa proteína 43 % semelhante à HO-1 [112].

A HO-3 é o resultado de um transcrito de 2.4 kb que codifica para uma proteína de 33 kDa estruturalmente muito semelhante à HO-2 (90 % de homologia) e um pouco menos homóloga relativamente à HO-1 (50% de homologia). A HO-3 é expressa no baço, fígado, timo, próstata, coração, rim, cérebro e testículos [113].

1.1.5. Proteína de choque térmico 47 (*Heat Shock Protein 47, Hsp47*)

As Hsp47 pertencem à superfamília de serpinas e são significativamente induzidas por calor ou estados fisiopatológicos associados ao aumento da síntese de colagénio como a fibrose hepática [114]. Os membros desta família possuem uma estrutura secundária altamente conservada que é formada por um “núcleo” constituído por três folhas β em redor de nove hélices α [115].

Apenas é expressa em células produtoras de colagénio [114] e liga-se exclusivamente a este ou à sua proto-forma [116, 117] nas repetições Gli-X-Y [118] estabilizando a tripla hélix e prevenindo dissociações [119, 120]. Após a ligação pró-colagénio-Hsp47, os complexos são transportados do retículo endoplasmático (*Endoplasmic Reticulum, ER*) para o complexo de

Golgi [121, 122] onde a Hsp47 se dissocia e volta para o ER onde exerce novamente esta função [123].

1.1.6. Família da proteína de choque térmico 60 (*Family of Heat Shock Protein 60, HSP60*)

As chaperoninas dividem-se em dois grupos sequencialmente diferentes mas estruturalmente semelhantes [124]. O grupo I encontra-se em procariotas e organelos endossimbóticos como mitocôndrias [125, 126] e cloroplastos [127]. O grupo II existe no citosol de procariotas *archaea* e de eucariotas [128]. O grupo I inclui GroEL no citosol bacteriano, Hsp60 em mitocôndrias [129] e proteína de ligação a Rubisco (*Rubisco binding protein*, RuBisCoBP) em cloroplastos [130]. O grupo II é constituído pela *Thermosome* em *archaea* e pelo complexo anelar do complexo-t polipéptido-1 (*t-complex polipeptide-1 ring complex*, TRiC) em eucariotas [131].

Os membros do Grupo I cooperam com um co-factor pertencente à família HSP10 que regula a ligação ao substrato e a atividade ATPase [69]. Na presença de ADP duas moléculas de HSP10 ligam-se a uma de HSP60 formando um complexo hétero-oligomérico com 14 subunidades idênticas dispostas em dois anéis heptaméricos contendo uma cavidade à qual as proteínas recém-sintetizadas/translocadas se ligam para serem corretamente conformacionadas [69, 132]. As HSP60 que se encontram no citosol (*Thermosome* e TRiC) são expressas constitutivamente [133] e não necessitam de co-factor HSP10 [134].

1.1.7. Família da proteína de choque térmico 70 (*Family of Heat Shock Protein 70, HSP70*)

As HSP70 compreendem proteínas com pesos moleculares entre 66 e 78kDa codificadas por uma família de 11 genes humanos [135]. Muitas delas estão localizadas no citosol, como é o caso da Hsp70 indutível (Hsp72) ou da Hsc70 constitutiva (Hsp73) (**Figura 1.2.**) [136]. Outras encontram-se na mitocôndria (mtHsp70) [137, 138] ou no ER como a proteína relacionada com a glucose 78 (*Glucose Related Protein 78, GRP78*) [139] ou proteína de ligação à imunoglobulina (*Binding immunoglobulin Protein, Bip*) (ambas de forma constitutiva) [140].

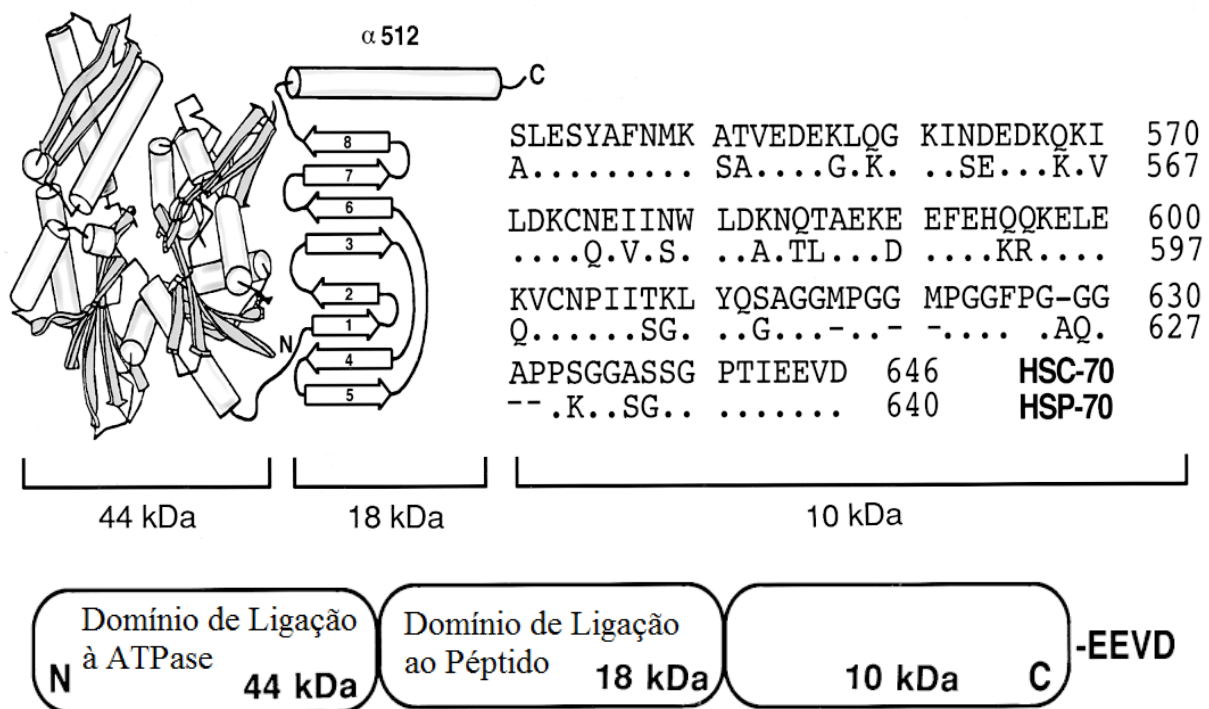


Figura 1.2. Estrutura das proteínas Hsp70 e Hsc70 humanas. Adaptado de [418]. Ambas contêm um fragmento de 44kDa (resíduos 1-386) bastante conservado que contém o domínio ATPase (*ATP Binding Domain*, ABD) [425] e um domínio de ligação ao péptido (*Peptide Binding Domain*, PBD) de 18kDa (resíduos 384-543) que consiste em duas folhas β antiparalelas e uma hélice α [426, 427, 428]. A estrutura C-terminal de 10kDa (resíduos 542-640/646) é a fração menos análoga entre as diferentes HSP70 [429, 430].

A ligação da molécula de ATP é explicada em poucos passos: começa pela rápida formação de complexos frágeis, seguido de um lento rearranjo estrutural que aumenta o K_d da molécula de ATP [141] e reforça a ligação Hsp70-ATP com a posterior conversão do complexo Hsp70-ATP-substrato para a conformação ADP, estabilizando a interação Hsp70-substrato (**Figura 1.3.**) [142]. O passo final do ciclo ATPase é a libertação de ADP e P_i que permite uma nova ligação de ATP [143, 144]. O ciclo ATPase da Hsp70 consiste na alteração entre o estado de baixa afinidade e trocas rápidas (estado ATP) e o estado ADP de alta afinidade e trocas lentas de substrato. Tendo em consideração que em condições fisiológicas normais a concentração citoplasmática de ATP é elevada, a hidrólise do ATP é o passo limitante do ciclo [142], o que faz com que seja constantemente sujeito a regulação e alteração [143]. A sua taxa máxima de síntese ocorre 3-5h após o choque e regressa ao normal após 8h [145]. Durante o choque térmico (e um período imediatamente após) a sua concentração intensifica-se no núcleo procedente do citoplasma [69].

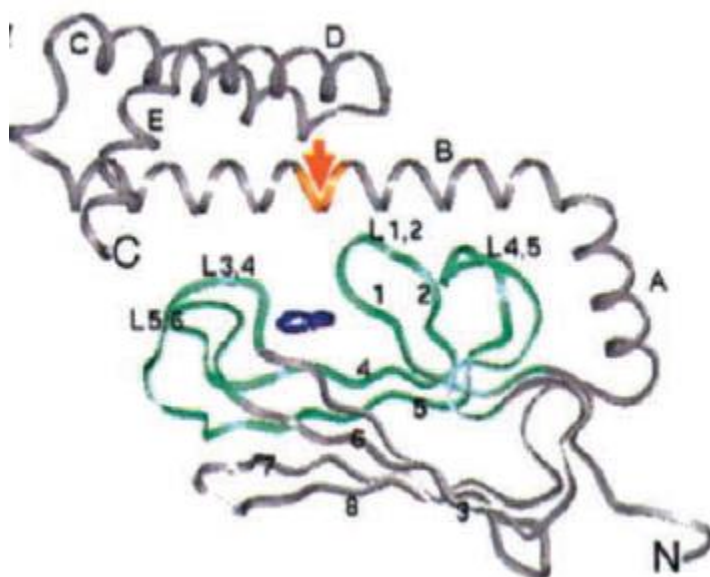


Figura 1.3. Estrutura da proteína Dnak com ênfase (a verde) para o local de ligação ao substrato. Adaptado de [431]. A verde encontram-se uma folha- β com a $\beta 1$ e $\beta 2$ inclinadas 20° relativamente às vizinhas $\beta 4$ e $\beta 5$. A conexão entre estas é estabelecida por quatro *loops*, dois externos (L3,4 e L5,6) e dois internos (L1,2 e L4,5). Este segmento é seguido por hélices- α de A a E. As hélices A e B estão empacotadas na *sandwich*- β por interações iônicas e hidrofóbicas, contribuindo para a estabilização desta e para a ligação do substrato (azul) [432]. A cavidade de ligação ao substrato consiste num canal de aproximadamente $5 \times 7 \text{ \AA}$ formado pelas folhas $\beta 1$ e $\beta 2$ e pelos loops L3,4 e L1,2 e estabilizada pelos loops L4,5, L5,6 e pela hélice B que funciona como uma tampa, impedindo a saída prematura do substrato [431, 432].

1.1.7.1. Proteínas auxiliares dos membros da família da proteína de choque térmico 70 (*Family of Heat Shock Protein 70, HSP70*)

Várias proteínas como a Hsp40 [146, 147, 148], Hsp110 (Figura 1.4.) [149, 150, 151], proteína de interação com a região C-terminal da Hsc70 (*C-terminus of Hsc70-Interacting Protein, CHIP*) [152], proteína organizadora da Hsp70/Hsp90 (*Hsp70/Hsp90 Organizing Protein, HOP*) [153], proteína de interação com a huntingtina (*Huntingtin Interacting Protein, HIP*) [154], atanogene associado à Bcl-2 (*Athano gene Associated with Bcl-2, BAG*) [155, 156] e proteína 1 de ligação à proteína de choque térmico 70 (*Heat Shock Protein 70 Binding Protein 1, HspBP1*) [157] foram identificadas como co-chaperones das HSP70, podendo ligar-se tanto ao ABD como ao PBD de forma a modular a sua atividade [158, 159, 160, 161].

Estudos de imunocitoquímica revelaram que a Hsp110 encontra-se preferencialmente localizada dentro ou perto do núcleo [162]. No citosol, forma complexos de elevado peso molecular com as proteínas Hsc70 [163], Hsp70 [164], Hsp90 [165] e Hsp40 por forma a prevenir a agregação proteica de forma dependente de ATP [166]. Para além da Hsp110 fazem ainda parte desta família as proteínas Hsp105 [167], Apg-1 [168] e a proteína de stress osmótico 94 (*Osmotic stress protein 94, Osp94*) [169]. Nos mamíferos existem duas isoformas da

Hsp105: Hsp105 α e Hsp105 β [167]. A isoforma Hsp105 α é constitutivamente expressa e tem como principal função controlar a biogénese e o dobramento da proteína reguladora de condutância transmembranar de fibrose cística (*Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*, CFTR) no ER [170].

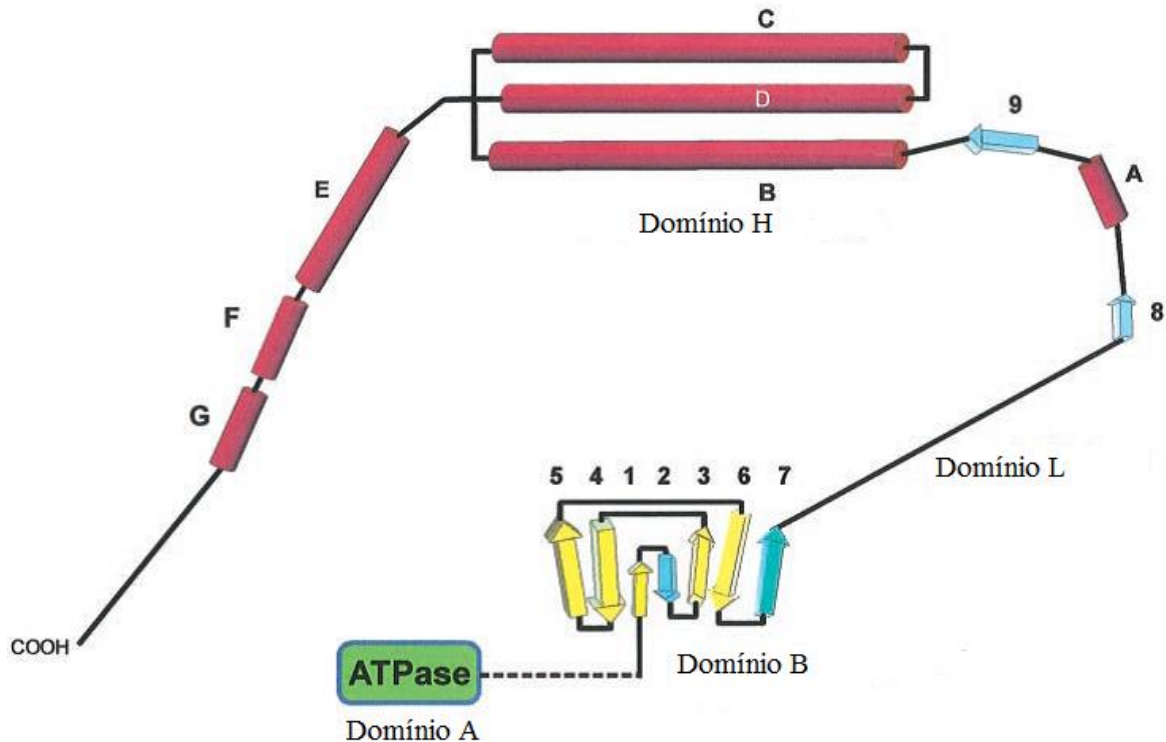


Figura 1.4. Estrutura proposta para a Hsp110. Adaptado de [433]. Os resíduos 1 a 394 (domínio A) são responsáveis pela ligação ao ATP (ABD). A partir do aminoácido 394 ao 509 situam-se sete folhas β (domínio B) responsáveis pela ligação ao péptido (PBD). Os seguintes 98 resíduos da proteína (510-608) são carregados negativamente e formam um *loop* designado de “domínio L”. Os restantes resíduos (608-858) formam uma série de hélices α conhecidas como “domínio H” [432].

A proteína Hsp40 é utilizada pelas HSP70 como co-chaperone devido ao seu domínio J (80 aminoácidos altamente conservados localizados perto do terminal amina e dispostos em quatro hélices com um *loop* entre a 2^a e a 3^a hélice) [171, 172, 173]. A Hsp40 estimula a hidrólise de ATP, resultando numa alteração conformacional que fecha o recetáculo da HSP70, facilitando a captura de substratos proteicos não-nativos [174]. A parceria com as HSP70 não fica por aqui: também é capaz de encontrar substratos proteicos e marcá-los para serem mais facilmente reconhecidos pela HSP70 [29].

A proteína de 60kDa HOP forma dímeros e interage com a região C-terminal da Hsp70 (e Hsp90) através dos seus três domínios tetratricopéptidos (*tetratricopeptide repeat*, TPR) [175] de forma a regular a resposta ao choque e integrar o complexo recetor de progesterona

[176]. A CHIP é uma proteína de 35kDa que forma dímeros e compete com a HOP pela região C-terminal das Hsp70 e Hsp90 [177] de forma a inibir a atividade chaperone destas proteínas [178]. A HIP é uma proteína de 43kDa que interage com o domínio ATPase da Hsc70 [154]. As funções da HIP incluem estimular a ativação do recetor de glucocorticoides (mas não de mineralocorticoides, estrogénio ou progesterona) [179], estabilizar o estado ADP e estimular a atividade chaperone da HSP70 [155].

1.1.1.1. Funções dos membros da família da proteína de choque térmico 70 (*Family of Heat Shock Proteins 70, HSP70*)

As HSP70 encontram-se presentes em quase todos os compartimentos celulares exercendo funções como: (1) auxiliar o dobramento de algumas proteínas recém-sintetizadas [29, 30, 130, 180]; (2) ajudar no deslocamento de proteínas através das membranas organelares [33, 181]; (3) controlar a atividade biológica de proteínas reguladoras como fatores de transcrição [182, 183]; (4) preservar a função de proteínas mutadas [184, 185] tais como p53 [186], CFTR Δ F508 [186, 188, 189, 190] ou superóxido dismutase (SOD) [191]; (5) desmontagem de estruturas proteicas oligoméricas [192]; (6) facilitar a degradação proteolítica de proteínas instáveis [67, 193, 194].

1.1.2. Família da proteína de choque térmico 90 (*Family of Heat Shock Protein 90, HSP90*)

São quatro as proteínas pertencentes a esta família: as isoformas citoplasmáticas Hsp90 α (induzível) e Hsp90 β (constitutiva), a mitocondrial Hsp75 ou proteína 1 associada ao recetor TNF (*TNF Receptor-Associated Protein 1*, TRAP1) e a proteína regulada por glucose 94 (Glucose-Regulated Protein 94, GRP94) do ER [195, 196, 197]. Alguns estudos relatam a existência de uma quinta forma associada à transformação celular denominada Hsp90N [198]. As isoformas citoplasmáticas apresentam uma homologia de 86% entre si [195, 197].

As Hsp90 α e Hsp90 β encontram-se principalmente sob a forma de homodímeros ($\alpha\alpha$ ou $\beta\beta$), apesar de a isoforma α dimerizar mais rapidamente que a β . Também podem ocorrer sob a forma de monómeros, heterodímeros ou oligómeros [197]. Quando estimuladas por stress translocam-se para o núcleo [199] onde interagem com histonas [200] e induzem a condensação da cromatina [201].

1.1.2.1. Co-chaperones e proteínas clientes da família da proteína de choque térmico 90 (*Family of Heat Shock Protein 90, HSP90*)

As co-chaperones ciclo de divisão celular 37 (*Cell cycle division, Cdc37*), p23, ativador da HSP90 ATPase (*Activator of heat shock 90kDa protein ATPase homolog 1, Aha1*), proteína fosfatase 5 (*Protein Phosphatase 5, PP5*), HOP e CHIP permitem que as HSP90 se associem com um número significativo de proteínas sinalizadoras (proteínas clientes) incluindo recetores esteróides [39], proteína de diferenciação miogénica 1 (*Myogenic Differentiation 1, MyoD*) [202], cinases de tirosina como v-Src [203] e c-Kit [204], cinases de serina/treonina como Raf-1 [205] e Akt [206] e proteína de interação com o recetor (*Receptor-Interacting Protein, RIP*) [207] que sem as HSP90 seriam degradadas.

1.1.2.2. Funções dos membros da família da proteína de choque térmico 90 (*Heat Shock Protein 90, HSP90*)

De entre as suas funções podemos citar: transdução de sinal [208], *folding* [29, 209], estabilização do citoesqueleto [210, 211], manutenção dos complexos apo-recetores esteróides [39, 212], regulação do ciclo celular [59], diferenciação [62, 63] e apoptose [64].

1.2. Apoptose

Podemos definir apoptose como uma forma de morte celular controlada e dependente de energia. Foi descrita como um processo altruista através do qual as células se suicidam de forma a protegerem as vizinhas de um processo inflamatório catastrófico [212].

1.2.1. Causas da apoptose

A apoptose pode ser desencadeada por estímulos como: hipertermia, agentes oxidantes, hipóxia, citocinas, glucocorticoides, drogas citotóxicas, agentes quimioterapêuticos, entre outros [213, 214, 215].

1.2.2. Características da apoptose

A apoptose pode ser reconhecida por características fisiológicas e bioquímicas muito marcadas e coordenadas [216]. De um modo geral trata-se de um fenómeno bastante rápido com início em alguns acontecimentos bioquímicos mais discretos como acidificação celular,

aumento do Ca^{2+} intracelular e degradação de proteínas específicas [214, 217], passando depois para os morfológicos: retração celular, perda de aderência à matriz [218], contração do citoplasma [219], vesiculação de membranas [220], condensação da cromatina, fragmentação do ADN nuclear e formação de corpos apoptóticos que são rapidamente fagocitados por macrófagos e removidos sem causar infecção [221, 222]. Por norma os organelos celulares mantêm a sua estrutura, com exceção da mitocôndria que pode apresentar rutura da membrana externa [223].

1.2.3. Caspases

Os estímulos que levam à apoptose acabam por convergir na ativação de uma família de proteases que contêm uma cisteína no domínio catalítico e a capacidade de reconhecer e clivar proteínas intracelulares que possuem resíduos de aspartato, denominadas caspases [224, 225]. Até ao momento foram descritas 14 caspases diferentes em mamíferos, 11 das quais estão presentes em humanos [226]. Estas são constitutivamente expressas nas células como zimogénios (pró-caspases) e são ativadas em resposta ao estímulo apoptótico [227]. A ativação de caspases acontece de forma hierárquica via alterações na estrutura tridimensional ou por clivagem proteolítica. Primeiro são ativadas as caspases com um pró-domínio longo, as chamadas caspases iniciadoras (8, 9 e 10), que por sua vez ativam as caspases de pró-domínio curto, as caspases efetoras (3, 6 e 7) que propagam o sinal de morte clivando proteínas chave [228, 229]. As restantes estão envolvidas no processo de maturação de citocinas e a sua contribuição para a apoptose todavia não está bem esclarecida [230].

1.2.4. Fases apoptóticas

Podemos sequenciar o processo apoptótico em três fases: (1) a fase de iniciação ou sinalização pode dar-se através da ativação de recetores de morte (via extrínseca), da via mitocondrial (intrínseca) ou da via do ER; (2) fase de transdução do sinal ou preparatória na qual se dá a ativação de caspases iniciadoras (8, 9 e 10); (3) a fase de execução ou de morte envolve a ativação das caspases efetoras (3, 6 e 7) [226].

1.2.5. Vias apoptóticas

Podemos definir duas vias apoptóticas centrais mediadas por caspases: a via extrínseca ou acoplada a recetores e a via intrínseca ou mitocondrial (embora as duas possam estar ligadas) [231].

1.2.5.1. Via Extrínseca

A via extrínseca começa com a união de um ligando a um recetor de morte acoplado à membrana como por exemplo Fas (APO-1/CD95) ou recetor do ligando indutor de apoptose relacionado com TNF (*TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor*, TRAIL-R1 ou TRAIL-R2) (Figura 1.6.) [232, 233, 234].

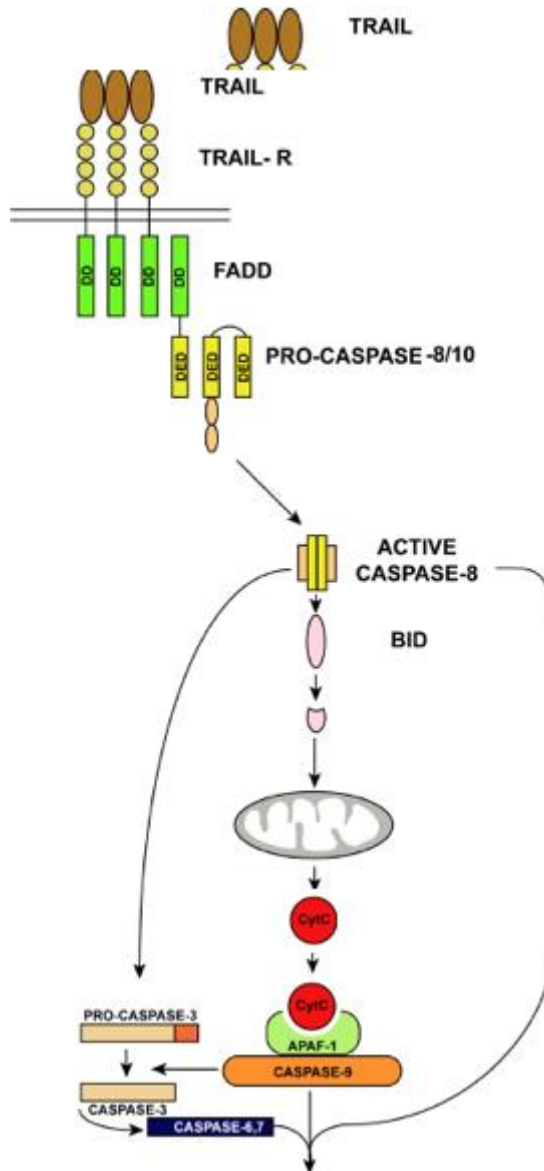


Figura 1.5. Funcionamento dos receptores TRAIL-R2/R1. Adaptado de [434]. Os receptores TRAIL-R1 e R2 contêm um domínio extracelular rico em resíduos de cisteína [435] e um domínio citoplasmático com 65 aminoácidos denominado domínio de morte (*Death Domain*, DD) [436] que interage com o DD de proteínas adaptadoras citosólicas como o domínio de morte associado ao receptor TNF (*TNF Receptor-Associated Death Domain*, TRADD) ou o domínio de morte associado ao Fas (*Fas-Associated protein with Death Domain*, FADD). Estas proteínas, por sua vez, contêm domínios efetores de morte (*Death Effector Domain*, DED) que possibilitam a ligação a DEDs de pró-caspases-8, provocando a sua auto-ativação proteolítica [437, 438, 439]. A caspase-8 que daí resulta cliva e ativa a proteína agonista de morte de domínio de interação BH3 (*BH3 interacting-domain death agonist*, Bid), gerando um fragmento pró-apoptótico que se transloca para a mitocôndria, permeabilizando a

membrana externa e libertando citocromo c para o citoplasma [440, 441] onde interage com fator de ativação de apoptose 1 (*Apoptotic protease activating factor 1*, Apaf-1) [442] na presença de dATP/ATP potenciando a sua oligomerização [443, 444]. O apoptossoma resultante recruta e ativa a pró-caspase-9 que por sua vez recruta, cliva e ativa as caspases efetoras 3 e 7 [445]. Os acontecimentos que têm lugar após a permeabilização da mitocôndria são comuns à via intrínseca descrita no sub-capítulo seguinte (**1.2.5.2. Via intrínseca**).

Para além da molécula adaptadora FADD, a proteína associada aos domínios de morte (*Death-domain associated protein*, DAXX) pode traduzir os sinais de morte do ligando Fas para a cinase reguladora do sinal apoptótico 1 (*Apoptosis Signal-regulating Kinase 1*, ASK1) e desta para cinase c-Jun N-terminal (*c-Jun N-terminal Kinase*, JNK) [235].

1.2.5.2. Via intrínseca

A integração de inúmeros estímulos de morte pela mitocôndria leva à formação de um “megaporo” denominado poro de permeabilidade transitória (*Permeability Transition Pore*, PTP) que é formado pelo translocador de adenina na membrana interna e pelo canal de aniões dependente da voltagem na membrana externa [236, 237]. Através dele ocorre a fuga de moléculas pró-apoptóticas para o citoplasma [238, 239, 240] como citocromo c [241], segundo ativador de caspases derivado da mitocôndria (*Second mitochondria-derived activator of caspases*, Smac) /proteína de ligação direta ao IAP com baixo pI (*Direct IAP binding protein with low pI*, DIABLO) (**Figura 1.7.**) [242], fator de indução apoptótica (*Apoptosis-Inducing Factor*, AIF) [243, 244, 245] e endonuclease G (EndoG) [246].

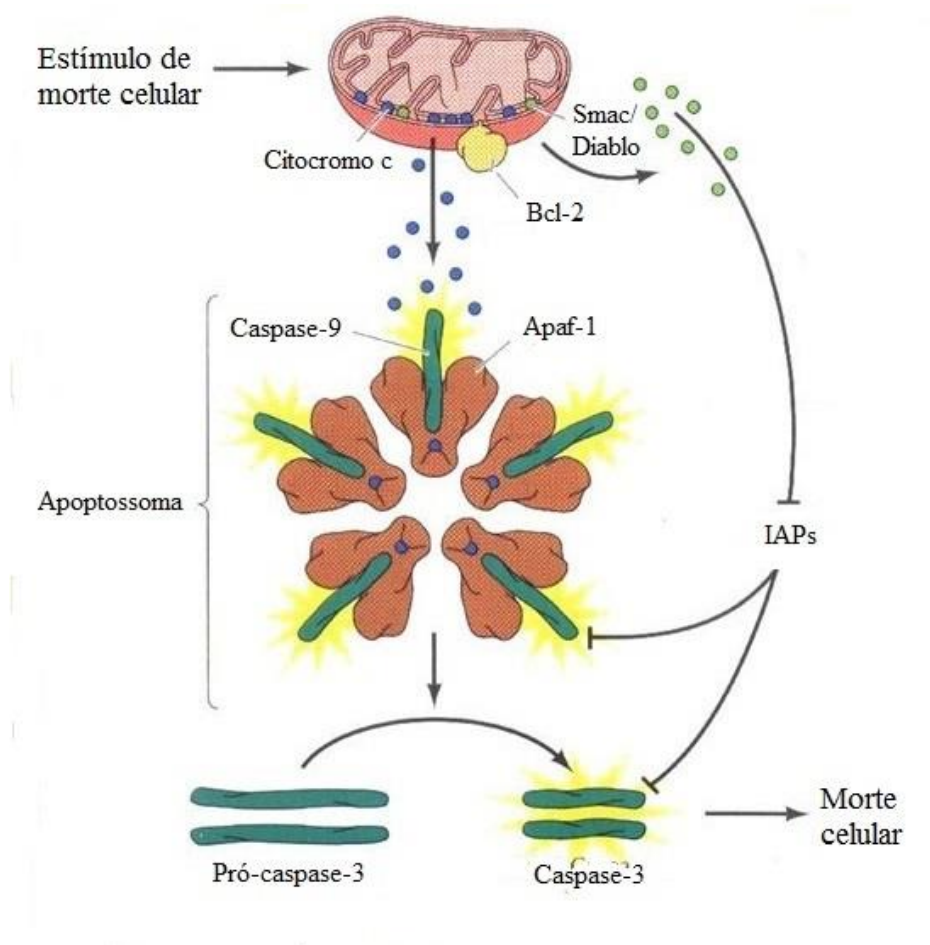


Figura 1.6. Citocromo c na ativação de caspase-3. Adaptado de [446]. Lesões mitocondriais levam à liberação de citocromo c para o citoplasma onde se liga ao Apaf-1 promovendo a sua oligomerização e expondo o seu domínio de ativação e recrutamento de caspases (*Caspase Activation and Recruitment Domains, CARD*) [447] que na presença de dATP [448] permite que se ligue à pró-caspase-9 [449] dando origem a uma estrutura designada apoptossoma [450]. Uma vez ativa, a caspase-9 provoca a maturação proteolítica (auto-ativação) da pró-caspase-3 [451]. Por outro lado, o Smac/DIABLO também libertado pela mitocôndria no mesmo processo promove a apoptose removendo as proteínas inibidoras de apoptose (*Inhibitor Apoptosis Protein, IAPs*) da sua ligação inibitória às caspases [242, 452, 453].

O AIF é uma flavoproteína efetora de morte que se desloca da mitocôndria para o citosol e deste para o núcleo onde induz a condensação da cromatina e fragmentação do ADN em fragmentos de 50kb, independentemente da ativação de caspases [247, 248, 249, 250]. A translocação do AIF é inibida por Bcl-2 [251], Hsp70 e Hsc70 [252].

Alguns membros da família Bcl-2 são anti-apoptóticos como é o caso de Bcl-2 [253] e da proteína linfoma de células B extra grande (*B-cell lymphoma-extra large, Bcl-XL*) [254]. Estas atuam sobre as caspases de duas formas: regulando a liberação de moléculas ativadoras de caspases como citocromo c [255] e AIF (apenas Bcl-2) [256] e aprisionando as caspases na membrana mitocondrial prevenindo a sua ativação [257, 258, 259].

Por outro lado, alguns membros desta família são pró-apoptóticos, como é o caso do antagonista/assassino Bcl-2 (*Bcl2-antagonist/killer, Bak*) e da proteína X associada ao Bcl-2

(*Bcl2-associated X protein*, Bax) [260, 261]. Quando existe ADN danificado, dá-se a translocação da histona H1.2 do núcleo para o citoplasma [262] onde ativa proteínas como a Bak levando à sua migração para a mitocôndria, oligomerização libertação de (mais) citocromo c e outras moléculas pró-apoptóticas [263, 264, 265]. Durante a apoptose, Bax e Bid (reguladas pela libertação de citocromo c) mobilizam-se do citosol para as membranas sub-celulares (sobretudo mitocondrial) [266] levando a uma perda de potencial de membrana e uma posterior abertura do PTP que conduz à libertação de mais citocromo c e de outros fatores mitocondriais indutores de apoptose que ativam caspases que levam à fragmentação de ADN e consequente morte celular [267, 268]. A proteína Bax também atua sobre a membrana do ER, facilitando a saída de Ca^{2+} para o citosol e posterior entrada no núcleo [269, 270, 271].

1.2.5.3. Via do retículo endoplasmático

O ER responde a dois tipos de stress: proteínas não dobradas e distúrbios na concentração de Ca^{2+} intracelular [272, 273]. Qualquer um destes stresses faz com que o complexo GRP78/Bip se disrompa e ative uma de três proteínas transmembranares descritas seguidamente. A ativação da cinase do retículo endoplasmático tipo proteína cinase ARN (*Protein kinase RNA-like Endoplasmic Reticulum Kinase*, PERK) leva à paragem temporária da tradução proteica e, sob certas condições, à ativação da proteína pró-apoptótica proteína homóloga C/EBP (*C/EBP-homologous Protein*, CHOP). Quando clivado o fator de transcrição de ativação 6 (*Activating Transcription Factor 6*, ATF6) induz a transcrição de genes que codificam para chaperones e fatores de transcrição como o GRP78 e a proteína 1 de ligação à X-box (*X-box Binding Protein 1*, XBP1) [274]. A enzima 1 requerida pelo inositol (*Inositol-requiring enzyme 1*, Ire1), quando ativa causa a indução do fator de transcrição XBP1 que induz a sua própria expressão e de outras proteínas envolvidas na via apoptótica específica do ER - resposta a proteínas não-dobradas (*Unfolded Protein Response*, UPR) - que culmina com a ativação da caspase-12 [275, 276].

1.2.5.4. Apoptose mediada por lípidos

O fator de necrose tumoral α (*Tumour Necrosis Factor α* , TNF- α) e o Fas ativam a via de sinalização da esfingomielina [277, 278]. Esta, quando fosforilada pela esfingomielinase de membrana dá origem a um lípido mediador da apoptose, a ceramida [279, 280]. Esta vai despoletar a apoptose através da ativação de caspases [281, 282], da supressão de Hsp70 [283], da estimulação de sHSP [284] e da libertação de proteases lisossómicas (catepsinas) [285]. A

apoptose induzida por ceramida pode ser inibida por Bcl-2 [286], Hsp70 [287] e pelo metabolito derivado de ceramida, a esfingosina-1-fosfato [288].

Outro evento tardio é a exposição de fosfatidilserina na superfície exterior da membrana citoplasmática [289] sendo depois reconhecida pelo sistema imune [290].

1.2.5.5. Via independente de caspases

Algumas vias apoptóticas são independentes de caspases (*anoikis*) apesar de mais tarde poderem convergir nestas. A EndoG e as AIFs são moléculas intermembranares libertadas após o estímulo apoptótico e que se deslocam para o núcleo dando início à apoptose sem caspases [246, 249]. A Hsp70 é capaz de prevenir este tipo de apoptose ligando-se diretamente ao AIF e inibindo a condensação de cromatina [252] ou associando-se à EndoG e prevenindo a fragmentação do ADN [291].

1.2.5.6. Catepsinas

Os lisossomas são importantes integradores de sinais de morte [292]. As proteases lisossomais, das quais as mais estudadas são as catepsinas, movimentam-se para o citosol em resposta a uma grande variedade de estímulos como TNF- α [293], Fas [294], p53 [295] e agentes lisossomotrópicos [296].

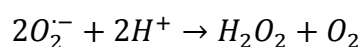
As catepsinas constituem uma classe de enzimas proteolíticas que contêm vários tipos de proteases. Os três tipos principais são as proteases de cisteína (catepsinas B, C, H, L e S), proteases de aspartil (catepsinas D e E) e proteases de serina (catepsinas A e G) [297]. As catepsinas A, B, L e D são as que se encontram mais envolvidas no processo apoptótico [293]. São sintetizadas como pré-pró-enzimas inativas e glicosiladas pós-traducionalmente. As catepsinas podem ser libertadas do lisossoma para o citosol, onde permeabilizam a membrana mitocondrial externa [298] promovendo a libertação de moléculas pró-apoptóticas ou resultando na apoptose por si só [299]. Outra forma de atuação citoplasmática consiste na clivagem de substratos como a Bid [300] que alteram a membrana mitocondrial e promovem a libertação de citocromo c [301] que por sua vez cliva caspases dando início à apoptose [302].

1.3. Espécies reativas de oxigénio (*Reactive Oxygen Species, ROS*)

As ROS são moléculas com potencial para danificar proteínas, lípidos e ácidos nucleicos, direta ou indiretamente. Podem ter origem ambiental ou endógena. Ao nível ambiental, os radicais livres podem formar-se devido à ação de radiações ionizantes, luz

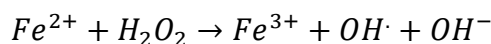
ultravioleta, poluentes, fumo de tabaco, xenobióticos ou medicamentos. De origem endógena, as espécies reativas de oxigénio devem-se a reações enzimáticas, tais como as reações de auto-oxidação, β -oxidação de ácidos gordos [303, 304], rutura mitocondrial [305], peroxissomas (D-amino-ácido oxidase, L- α -hidroxiácido oxidase, acil-CoA oxidase e urato oxidase) [306, 307] e ER [308].

O radical superóxido ($O_2^{\cdot -}$) é produzido maioritariamente através da redução de electrões desemparelhados provenientes do O_2 nos complexos I e III da mitocôndria [307] e é convertido em peróxido de hidrogénio (H_2O_2) por uma enzima chamada SOD (**Equação 1.1.**) [308, 309, 310].



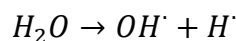
Equação 1.1. Transmutação do radical superóxido. A SOD cataliza a transmutação de $O_2^{\cdot -}$ para H_2O_2 e O_2 .

O H_2O_2 tem a capacidade de se difundir através das membranas podendo sair da mitocôndria para o citoplasma e deste para o núcleo [311]. No citosol reage facilmente com metais de transição como o Fe^{2+} ou Cu^+ podendo originar radicais hidróxilo (OH^{\cdot}) via reação de Fenton (**Equação 1.2.**) [312, 313]. A transferrina e a ferritina sequestram iões de ferro, enquanto a ferroxidase sequestra iões de cobre, evitando reações de Fenton e a formação de radicais OH^{\cdot} (**Equação 1.2.**) [312].



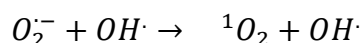
Equação 1.2. Reação de Fenton. Processo de formação de OH^{\cdot} a partir de água e de um metal de transição (neste caso o Fe^{2+}).

Para além da reação de Fenton, o OH^{\cdot} também pode ser produzido através de homólise de água por exposição a radiação ionizante (**Equação 1.3.**) [309].



Equação 1.3. Homólise da água. Processo de formação de OH^{\cdot} através da homólise da água quando submetida a radiação ionizante.

O OH^{\cdot} ataca tanto bases nitrogenadas como a desoxirribose, o que causa frequentemente a rutura da cadeia de ADN [314]. Para além disso pode reagir com $O_2^{\cdot -}$ produzindo oxigénio singlete (1O_2) (**Equação 1.4.**) [315].



Equação 1.4. Formação de oxigénio singlete a partir de superóxido.

As ROS desempenham constantemente importantes funções no organismo como produção de energia, fagocitose, sinalização intra e intercelular, síntese de substâncias [316, 317] e proteção contra patogénios [318] mas também estão relacionadas com uma série de patologias como artrite, choque hemorrágico, doenças coronárias, cataratas, disfunções cognitivas e cancro [309, 319].

A fim de evitar os efeitos perniciosos causados pelas ROS, o organismo desenvolveu uma maquinaria de defesa composta por um vasto leque de moléculas denominadas de antioxidantes [320]. Segundo Halliwell, “antioxidante é qualquer substância que quando presente em baixa concentração, comparada à do substrato oxidável, regenera-o ou previne significativamente a oxidação do mesmo” [321]. Estes podem ter uma ação enzimática (macromoléculas) ou não-enzimática (micromoléculas); ter origem na dieta ou serem produzidas pelo próprio organismo e inibir (prevenir) ou reduzir os malefícios das ROS (**Tabela 1.1.**) [322, 323].

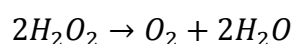
Tabela 1.1. Principais características de alguns antioxidantes.

Antioxidante	Produção		Ação		Atuação	
	Corpo	Dieta	Enzimática	Não	Antes	Depois
Peroxidases de tiorredoxina (TPX)	X		X		X	
Peroxidase de glutathiona (GPX)	X		X		X	
Catalase (CAT)	X		X		X	
Superóxido dismutase (SOD)	X		X		X	
Tiorredoxina (TRX)	X		X			X
Transferrina/Ferritina/Ferroxidase	X			X	X	
Glutathiona (GSH)	X			X		X
Coenzima Q10	X			X		X
Vitamina A/ β -caroteno		X		X		X
Vitamina C/Ácido ascórbico		X		X		X
Vitamina E/ α -tocoferol		X		X		X
Flavonóides		X		X		X

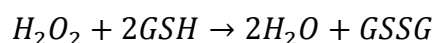
Peroxidases de tiorredoxina (TPX) dimerizam e catalisam a redução de H_2O_2 em H_2O e O_2 [324]. Tal como a Bcl-2, as TPX são capazes de inibir a libertação de citocromo c da

mitocôndria e inibir a peroxidação lipídica. No entanto, as TPX, ao contrário da Bcl-2, previnem a acumulação de H₂O₂ intracelular, sugerindo uma atuação prévia da Bcl-2 [325].

A SOD reduz a molécula altamente reativa O₂^{•-} na menos reativa H₂O₂ (não radicalar) [326] que pode ser reduzida pela catalase (CAT) (**Equação 1.5.**) [327], glutathiona (GSH) (**Equação 1.6.**) [328] e tioredoxina (TRX) [324] em H₂O. A redução de O₂^{•-} a H₂O₂ também pode ocorrer através da colisão entre duas moléculas de O₂^{•-}; o que só acontece sob concentrações muito elevadas [329].



Equação 1.5. Reação catalisada pela CAT. Consiste na dissociação de duas moléculas de H₂O₂ em uma de oxigénio moléculas e duas de água.



Equação 1.6. Reação de oxidação de GSH para glutathiona disulfito (GSSG) catalisada pela glutathiona peroxidase (GPX) na presença de H₂O₂.

Existem duas formas de SOD no organismo, a primeira contém Cu⁺ e Zn²⁺ como centros redox e é expressa no citosol, sendo que a sua atividade não é afetada pela quantidade de ROS. A segunda contém Mn²⁺ como centro redox, encontra-se presente na mitocôndria e a sua atividade é sensível ao stress oxidativo [328, 330].

A coenzima Q10 é uma ubiquinona lipossolúvel que possui uma cadeia longa isoprenóide lateral. É o único lípido produzido endogenamente que apresenta função redox [331]. Devido à longa cadeia lateral a sua função está limitada ao meio lipossolúvel [332] de organelos como o complexo de Golgi, os lisossomas e a membrana mitocondrial interna onde participa na cadeia de transporte de electrões [333] e na regeneração do tocoferol [334]. Também desempenha um papel importante na inativação de ROS (radical superóxido [328], oxigénio singlete [335] e nitrito [333]).

De entre os carotenóides, o β-caroteno é a principal fonte de vitamina A. Ao contrário dos restantes agentes redutores, estes funcionam melhor a baixos níveis de O₂ (o que é comum em tecidos biológicos), o que faz do β-caroteno é um dos mais eficazes eliminadores de ¹O₂ [336, 337, 338, 339].

O ácido ascórbico ou vitamina C é comunmente encontrado no nosso organismo sob a forma de ascorbato. Por ser muito solúvel em água, localiza-se nos compartimentos aquosos dos tecidos orgânicos. Atua como agente redutor de metais de transição como o Fe³⁺ e Cu²⁺ e da maioria das ROS. A sua oxidação produz inicialmente semidesidroascorbato que é então reconvertido em ascorbato [340, 341, 342, 343].

A vitamina E é constituída principalmente por quatro tocoferóis e secundariamente por quatro tocotrienóis, sendo o α -tocoferol o mais ativo [344]. Estudos comprovam que a vitamina E é um eficiente inibidor da peroxidação de lípidos *in vivo* [345]. Estas moléculas agem como doadores de hidrogénio para o radical peróxido, interrompendo a reação radicalar em cadeia [346]. Cada tocoferol pode reagir com até dois radicais peróxido [347].

Os flavonóides possuem uma estrutura ideal para inativação de radicais, sendo antioxidantes mais efetivos do que as vitaminas C e E [348]. Podemos destacar: miricetina, quercetina, luteolina, fustina, eriodictiol, taxifolina, ácido cafeico, ácido gálico e ácido elágico [322, 349, 350].

2. Objetivos

Com este trabalho pretendeu-se averiguar o papel de quatro HSP (47, 60, 70 e 90) em dois modelos de apoptose induzida: 1º) sobrecarga de cálcio induzida por taspigargina (TG); 2º) stress oxidativo. O agente oxidante escolhido foi o H_2O_2 por ser produzido por quase todas as fontes de stress oxidativo intracelular, por se difundir livremente através das membranas e pelo seu papel central na transdução de sinal [351].

Para alcançar o objetivo principal propôs os seguintes objetivos específicos:

- Analisar o efeito de H_2O_2 e TG na expressão de HSPs em células U937;
- Estudar as alterações na viabilidade celular em células U937 tratadas com HSPs e H_2O_2 ou TG;
- Verificar as alterações na atividade caspase em células U937 tratadas com HSPs e H_2O_2 ou TG.

3. Materiais e Métodos

3.1. Materiais

3.1.1. Equipamentos

- Câmara de Fluxo Laminar *Microflow® Biosafety Cabinet Class II* (Astec);
- Banho-maria *SHEL LAB Digital Water Bath* (Seldon MFG);
- Microscópio invertido *Primo Vert* (Carl Zeiss);
- Microscópio *Axiomager Z2* (Carl Zeiss);
- Incubadora *INCOmed* (Mettler);
- Banho seco *Thermo-shaker TS-100* (Biosan);
- Centrífuga refrigerada *Heraeus™ Fresco 17 Centrifuge* (Thermo Scientific);

- Fonte de eletroforese *PowerPac*[™] (Bio-Rad);
- Sistema de eletroforese *Mini-Protean*[®] (Bio-Rad);
- Sistema de transferência *Amersham ECL*[™] (GE Healthcare);
- Leitor de placas *Infinite*[®] *M200* (Tecan);
- Placas *Immobilizer*[™] (Thermo Scientific);
- Microplacas de 96 poços *BD Falcon*[™] (BD Biosciences);
- Microplacas de 96 poços *BRANDplates*[®] (Brand);
- Placas de aquecimento com agitação *MR Hei-Standard* (Heidolph);
- Barras agitadoras magnéticas octogonais com anel removível;
- Agitadores Vórtex;
- Agitadores de microplacas *PMS-1000* (Grant);
- Agitadores de microplacas *Titramax 101* (Heidolph);
- Agitadores orbitais *Rotamax 120* (Heidolph);
- Temporizador/cronômetro digital;
- Balança analítica *CPA* (Sartorius);
- Balança de precisão *CPA* (Sartorius);
- Placas de cultura de 6 poços *Cellstar*[®] (Greiner bio-One);
- Placas de cultura de 12 e 24 poços *TPP*[®] (Biosystems);
- Papel absorvente *Amersham Hybond*[™] (GE Healthcare);
- Membrana de transferência *Amersham Hybond*[™] *ECL*[™] (GE Healthcare);
- Caixas de coloração *Nalgene*[®] (Thermo Scientific);
- Tampões e géis pré-fabricados *ClearPAGE*[™] (C.B.S. Scientific);
- Película *Amersham Hyperfilm*[™] *ECL*[™] (GE Healthcare);
- Cassete para autorradiografia *Amersham Hypercassette*[™] (GE Healthcare);
- Frascos *flask T25 Corning*[®] (Sigma-Aldrich);
- Frascos *flask T75 Corning*[®] (Sigma-Aldrich).

3.1.2. Reagentes

- Albumina de soro bovino (*Bovine Serum Albumin*, BSA) (Sigma-Aldrich);
- Marcador de peso molecular (Bio-Rad);
- Dimetilsulfóxido (DMSO) *Panreac*[®];
- Substrato quimioluminescente *SuperSignal*[®] (Thermo Scientific);
- Reagente de viabilidade celular *PrestoBlue*[®] (Invitrogen);

- Substrato caspase-3 *DEVD*® (Sigma-Aldrich);
- NP40 *Tergitol*® (Sigma-Aldrich);
- Leite em pó desnatada (Nestle);
- Revelador (Kodak);
- Fixador (Kodak);
- Running Buffer 10x (Bio-Rad);
- Blotting Buffer 10x (Bio-Rad);
- Tampão de caspase (Enzo Life Sciences);
- Cocktail inibidor de proteases (*Protease Inhibitor Mix, PIM*) *UltraCruz*TM (Santa Cruz Biotechnology);
- Peróxido de hidrogénio (10 M) *H1009* (Sigma-Aldrich);
- Tapsigargina (10 mM) *T9033* (Sigma-Aldrich);
- Meio celular RPMI *BioWhittaker*® (Lonza);
- L-glutamina (Sigma-Aldrich);
- Soro fetal bovino (*Fetal Bovine Serum, FBS*) *Gibco*®;
- HSP47, HSP60, HSP70 e HSP90 1 ng/ml e 100 ng/ml (Sigma-Aldrich);

3.1.3. Soluções tampão

- **PBS:** 800 mL de água destilada, 8 g de NaCl, 0.2 g de KCl, 1.44 g de Na₂HPO₄, 0.24 g de KH₂PO₄. Ajustar o pH a 7.4 com HCl e completar com água destilada até prefazer 1 L.
- **RIPA 2x:** 100 mL de água destilada, 0.2426 g de Trizma Base (20 mM), ajustar o pH a 7.2 com HCl, 0.0761 g de EGTA (2 mM), 1.85 g de NaCl (316 mM), 2 g de SDS (2 %), 2 g de desoxicolato de sódio (2 %), 2 mL de Triton X-100 (2 %). No dia da experiência adicionar por cada 1 mL: 20 µL de PIM (50x), 10 µL de PMSF (200 mM), 20 µL de Na₃VO₄ (100 mM).
- **Laemmli 2x:** 40 mL de água destilada, 1.7 g de Tris (140 mM), ajustar o pH a 7.4 com HCl, 4 g de SDS (4 %), 0.0040 g de azul de bromofenol (0.004 %), 20 mL de glicerol (20 %), completar com água destilada até prefazer 100 mL. Adicionar 10 % de DTT (100 mM) no dia da utilização.
- **Ponceau S:** 1 L de água destilada, 50 mL de ácido acético, 1 g de Ponceau S.

- **Solução salina tamponada com Tris (*Tris-buffered saline, TBS*) 10x:** 1 L de água destilada, 24.2 g de Trisma (200 mM), 80 g de NaCl (1.37 M). Acertar o pH a 7.6 com HCl.
- **Solução salina tamponada com Tris e Tween (*Tris-buffered saline and Tween, TBST*):** 900 mL de água destilada, 100 mL de TBS (10x), 1 mL de Tween 20 (0.1 %).
- **Tampão de caspase-3:** 1 mL de tampão de caspase (20 mM HEPES (pH 7.4), 2 mM EDTA, 0.1 % CHAPS), 5 µL de DTT (1 M), 1 µL de NP40 (1 %), 0.4 µL de substrato de caspase-3 (100 mM).

3.1.4. Linhas celulares

A linha celular escolhida para o estudo foi a linhagem tumoral U937 (*ATCC® CRL-1593.2™*). Trata-se de uma linhagem muito utilizada para estudos biomédicos que foi isolada a partir de um linfoma histiocístico de um paciente de 37 anos do sexo masculino.

3.1.5. Anticorpos

- Anticorpo primário de ratinho anti-HSP70 (N27F3-4) [sc-66049] (Santa Cruz Biotechnology);
- Anticorpo primário de ratinho anti-HSP90 (F-8) [sc-131190] (Santa Cruz Biotechnology);
- Anticorpo primário de ratinho anti-β-actina (8H10D10) [SAB1305546] (Sigma-Aldrich);
- Anticorpo secundário anti-ratinho HRP (Sigma-Adrich).

3.2. Métodos

3.2.1. Cultura celular

O crio-tubo contendo as células congeladas foi colocado durante 1 min em álcool etílico a 99 % e 2 min em banho-maria a 37⁰ C. De seguida ressuspendeu-se 0,5 mL de suspensão celular em 5 mL de meio previamente aquecido num tubo cónico de 15 mL, sendo de seguida centrifugado durante 5 min a 2068 g. Após a centrifugação aspirou-se o meio de modo a retirar o DMSO na sua totalidade (pois é tóxico para as células). O *pellet* contendo as células foi ressuspendido em 5 mL ou 15 mL de meio e colocado em frascos *flask* T25 ou T75, respetivamente.

As células foram mantidas numa incubadora a 37° C e 5 % CO₂. O meio celular RPMI 1640 suplementado com 2 mM de L-glutamina, 10 % de FBS e 1 % de penicilina/estreptomicina era mudado aproximadamente de 2 em 2 dias respeitando uma diluição de 1:4.

3.2.2. Western blotting

Um dos objetivos era analisar a expressão de HSP90 e HSP70 em células U937 estimuladas com TG (2,5 µM) ou H₂O₂ (60 µM) durante 24 h. Os lisados celulares foram preparados e mantidos em 250 µl de tampão de inibição de proteases (RIPA2x) e submetidos a um pulso de 40 Hz durante 5 seg. Quantificou-se a proteína total pelo método de Bradford: 250 µL de reagente de Bradford sobre 2,5 µL de amostra proteica, 15 min de agitação e mediu-se no leitor de placas (595 nm de absorvância).

No dia da experiência as amostras foram aquecidas a 75° C durante 10 min e centrifugadas a 10 000 g durante 5 min. Em cada poço do gel colocou-se 25 µl de amostra (salvo raras exceções em que se procedeu a uma dupla carga devido à baixa quantidade de proteína na amostra). A electroforese foi realizada a 150 V e a transferência a 80 mA durante 55 min. As membranas foram incubadas com tampão de bloqueio, constituído por 5 % de leite magro em TBST, durante a noite a 4 °C com agitação. Na manhã seguinte procedeu-se a 3 lavagens com 5 mL de TBST durante 10 min com agitação (por lavagem) antes de se adicionar os anti-corpos primários HSP70 (1:250), HSP90 (1:500) e β-actina (1:1000) durante 3 h sob uma leve agitação à temperatura ambiente. Voltou-se a lavar da mesma forma para retirar o excesso de anticorpo primário e procedeu-se à incubação com o anticorpo secundário anti-ratinho (1:5000) durante 1 h à temperatura ambiente com agitação. Procedeu-se a um último passo de lavagens (3x10 min) antes de adicionar 8 mL de substrato quimioluminescente, o qual se deixou atuar durante 5 min, momento em que se passou à revelação em câmara escura. As membranas foram colocadas na cassete de revelação sob película fotográfica durante 5 a 15 min antes de serem mergulhadas em revelador, água, fixador e água novamente. Deixou-se secar ao ar antes de digitalizar e analisar as imagens obtidas no programa *ImageJ*.

3.2.3. Viabilidade celular

Por forma a avaliar a viabilidade celular em células não tratadas comparativamente com células tratadas com TG ou H₂O₂ utilizou-se o método MTT. As células foram plaqueadas em placas de 24 poços com uma densidade de 2x10⁵ células por poço antes de incubadas com três concentrações de HSP47, 60, 70 e 90, nomeadamente 1, 10 e 100 ng/ml. Três horas depois

adicionou-se H₂O₂ (60 µM) ou TG (2,5 µM) e após 24 h removeu-se o meio e adicionou-se 0,5 mL de reagente MTT (*PrestoBlue*®) em cada poço de acordo com as instruções do fabricante. De seguida incubou-se as células a 37° C e 5 % CO₂ durante 1 h, tal como descrito anteriormente por Bejarano e colaboradores [352]. O sobrenadante foi descartado antes de adicionar DMSO e a densidade óptica foi medida no leitor de placas no modo de absorvância a um comprimento de onda de 530 nm.

3.2.4. Medição da atividade caspase-3

Recolheu-se o conteúdo celular em tubos *ependorf* (1,5 mL), centrifugou-se a 500 g, 5 min e 25° C, aspirou-se o sobrenadante, adicionou-se 200 µl de PBS estéril a 37° C e ressuspendeu-se o conteúdo. De seguida procedeu-se à sonicação de cada amostra durante aproximadamente 5 seg a uma frequência de 50 Hz. Colocou-se 50 µL de suspensão celular (2x10⁴ células) em cada poço (de uma placa negra de 96 poços), adicionou-se 50 µl de tampão caspase-3 reconstituído (20 mM HEPES (pH 7.4), 2 mM EDTA, 0.1 % CHAPS, 5 mM DTT e 8.25 µM substrato de caspase-3 *DEVD*® (Sigma-Aldrich)) e incubou-se durante 1 h a 37° C [352]. Mediu-se a emissão de fluorescência a 37° C durante 14 ciclos com um intervalo de 3 min entre cada leitura a um comprimento de onda de excitação de 360 nm e de emissão de 460 nm. A atividade da caspase-3 foi calculada através da clivagem do substrato fluorogénico AC-DEVD-AMC e da excitação do seu substrato fluorescente AMC.

3.2.5. Análise estatística

A análise estatística foi efetuada recorrendo ao teste *t de Student*. Valores de $P \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Os resultados encontram-se expressos em média +/- desvio padrão (*Standard deviation*, SD).

4. Resultados

4.1. Análise da expressão das proteínas de choque térmico (*Heat Shock Proteins*, HSP) em células U937 tratadas com taspigargina (TG) ou peróxido de hidrogénio (H₂O₂)

O primeiro objetivo foi averiguar o efeito de TG e de H₂O₂ na expressão das duas principais HSPs de características induzíveis (HSP70 e HSP90) em células U937. Para tal as células foram incubadas com um dos dois agentes pró-apoptóticos durante 24 h. No final deste

período de tempo preparou-se o lisado proteico destas células em meio RIPA 2x e analisou-se a expressão de HSP70 e HSP90 por *western blotting* (Figura 4.1.A). A análise dos níveis de β -actina permitiu confirmar que a quantidade de proteína total de cada amostra foi idêntica. Concluímos que tanto a TG como o H_2O_2 induzem a diminuição da expressão de ambas HSPs em células U937 (Figura 4.1.A e B).

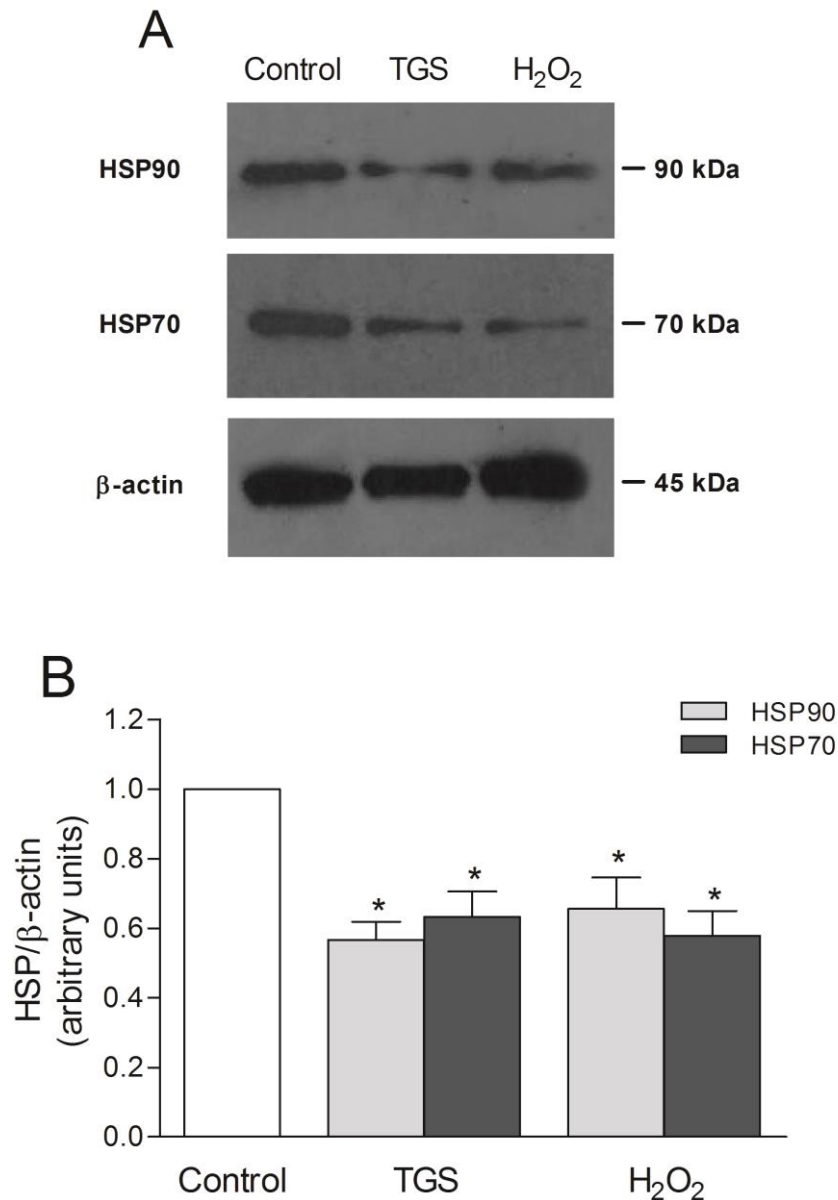


Figura 4.1. Análise da expressão de HSP70 e HSP90 em células U937 tratadas com TG ou H_2O_2 . Células U937 foram não tratadas (control) ou estimuladas com TG (2,5 μ M) ou H_2O_2 (60 μ M) durante 24 h. Os lisados proteicos foram preparados em tampão RIPA 2x. Vinte microgramas de cada lisado foi separado por SDS-PAGE, seguido por *western blotting* realizado com anticorpos específicos anti-HSP90 (F-8), anti-HSP70 (N27F3-4) e anti- β -actina (8H10D10). A) Figura representativa de 6 experiências independentes. B) Análise densiométrica do

conteúdo relativo de HSP90 e HSP70 em relação à β -actina. A análise estatística foi efetuada recorrendo ao teste *t Student* : * $P < 0,05$. N=6.

4.2. Viabilidade celular

As células U937 foram incubadas com diferentes concentrações de HSP (1 ng/mL, 10 ng/mL e 100 ng/mL) 3 h antes de serem tratadas com TG (2,5 μ M) ou H₂O₂ (60 μ M) (**Figura 4.2.**).

Os resultados obtidos foram bastante similares para as quatro HSP testadas (HSP47, HSP60, HSP70 e HSP90). A primeira observação foi o ligeiro aumento de viabilidade em células tratadas com 1 ng/mL de HSP (principalmente HSP70) (**Figura 4.2.B**). A segunda observação consiste na diminuição da viabilidade celular para aproximadamente 40 % quando as células são tratadas com 2,5 μ M de TG, independentemente de incubação prévia com HSP. Concluimos assim que as concentrações/HSPs testadas são incapazes de combater a diminuição da viabilidade celular provocada pela sobrecarga de cálcio intracelular induzida por TG (barras laranja). De notar também o efeito menos nefasto de H₂O₂ (comparando com TG) que diminui os valores de viabilidade para próximo dos 70 % (verde liso). Enquanto a concentração de 100 ng/mL recupera um pouco a viabilidade para valores próximos de 80 % e a de 10 ng/mL para 90 %, é com a concentração de 1 ng/mL que as células são mais resistentes à apoptose (barras verdes); é mesmo possível verificar um aumento da viabilidade para valores superiores a 100 % no caso da HSP47 (**Figura 4.2.D**) e sobretudo HSP60 (**Figura 4.2.C**), sendo que esta última é a HSP que apresenta resultados mais distintos das restantes. As culturas celulares tratadas apenas com 100 ng/mL (concentração máxima testada) de HSP60 têm a sua viabilidade diminuída para aproximadamente 80 % (primeira barra branca preenchida), no entanto, quando se adiciona 60 μ M de H₂O₂ (três horas depois) a esta mesma concentração de HSP60 (100 ng/mL) verifica-se um restaurando a viabilidade celular para mais de 90 % (primeira barra verde preenchida). Quando se diminui a concentração de HSP60 para 10 ng/mL a viabilidade é então totalmente restaurada (segunda barra verde preenchida). O tratamento prévio com 10 ng/mL de HSP60 é suficiente para anular os efeitos nocivos causados por H₂O₂ (60 μ M), enquanto a concentração útil (necessária para restaurar a viabilidade perdida) das restantes HSPs estudadas é de 1 ng/mL. Com esta concentração de HSP60 (última barra verde) os valores de viabilidade celular são superiores ao controlo (aproximadamente 120 %).

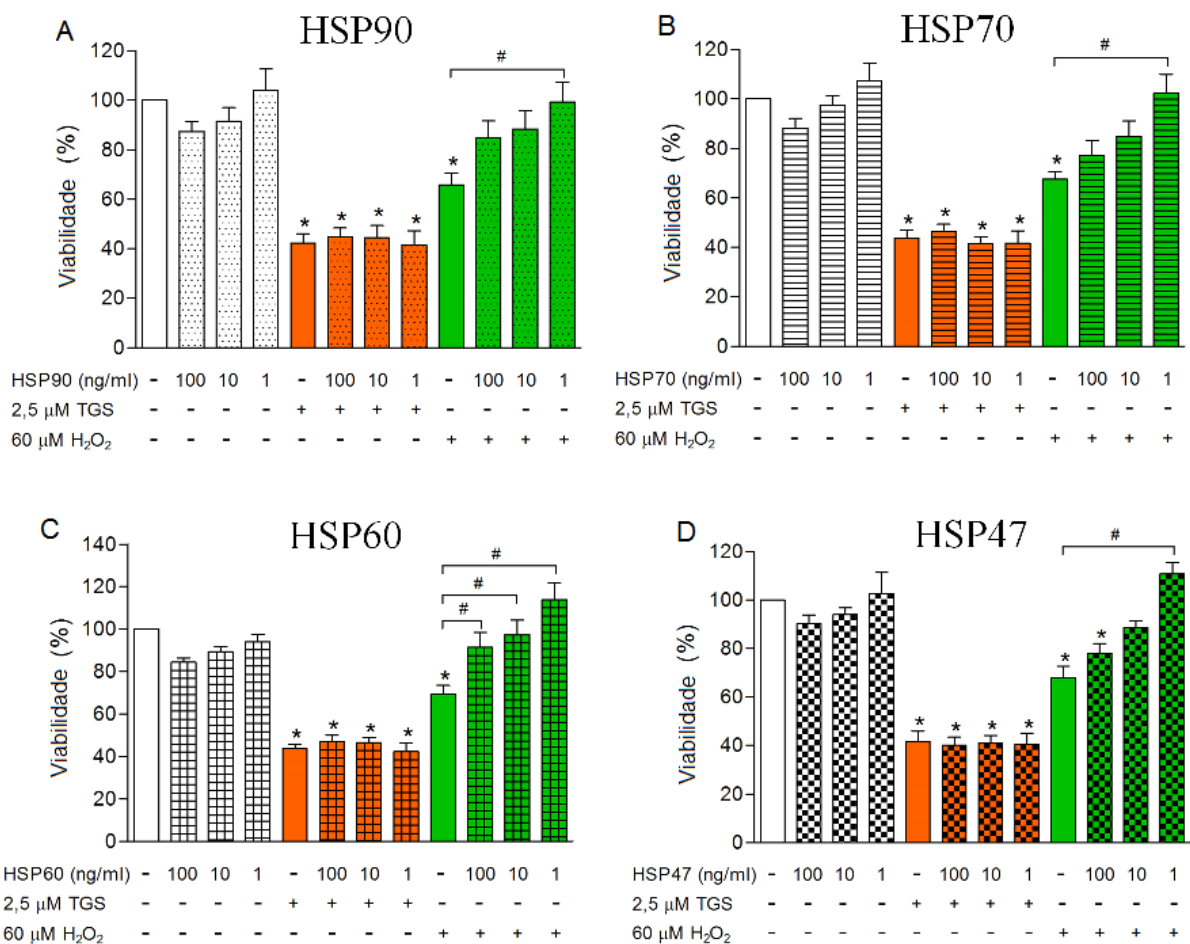


Figura 4.2. Ensaios de viabilidade celular. As células foram tratadas com 2,5 μM de TG ou 60 μM de H₂O₂ durante 24 h na presença ou ausência de diferentes HSP exógenas (pré-incubações de 3h). Foram ensaiadas as concentrações de 1 ng/mL, 10 ng/mL e 100 ng/mL de HSP90 (A), HSP70 (B), HSP60 (C) e HSP47 (D). A linha celular utilizada para o estudo foi a linha mieloide leucêmica de monocitos denominada U937. A viabilidade foi avaliada mediante o método de MTT. As HSP ensaiadas foram capazes de reverter a diminuição da viabilidade celular induzida por H₂O₂, mas não por sobrecarga de cálcio intracelular provocada por TG. Os valores são apresentados como percentagem dos valores controle (amostras não tratadas) e correspondem a seis experiências independentes (N=6). A análise estatística foi efetuada recorrendo ao teste *t Student* : **P* < 0,05; #*P* < 0,05.

4.3. Medição da atividade de caspase-3 em células U937 tratadas com proteínas de choque térmico (*Heat Shock Proteins*, HSP) e taspigargina (TG) ou peróxido de hidrogénio (H₂O₂)

Esta experiência tinha vários objetivos, o primeiro dos quais foi investigar se a perda de viabilidade celular evocada por TG e H₂O₂ (apresentada em **4.2. Viabilidade celular** e na **Figura 4.2 Ensaios de viabilidade celular**) seria devido a um processo apoptótico. Se assim fosse, era expetável que a expressão de caspase-3 aumentasse, uma vez que se trata de uma molécula característica do processo apoptótico que se encontra presente em ambas vias (intrínseca e extrínseca) [353, 354]. O método escolhido passou por incubar as células com 1

ng/mL de cada uma das HSP estudadas durante 3 h, período após o qual estas mesmas células foram tratadas com TG (2,5 μ M) ou H₂O₂ (60 μ M).

Os resultados demonstraram que tanto a TG (**Figura 4.3.**) como o H₂O₂ (**Figura 4.4.**) apresentam a capacidade de aumentar a atividade de caspase-3 em células U937, o que é concordante com os resultados apresentados na **Figura 4.2.** Nas células tratadas com TG a atividade de caspase-3 aumenta 3 vezes em comparação com as células não tratadas (**Figura 4.3.**), enquanto que as tratadas com H₂O₂ apresentam um incremento na ordem de 1,5 (**Figura 4.4.**). Estes resultados são concordantes com os da **Figura 4.2.** referente à viabilidade celular, nos quais é também com TG que se verifica uma maior diminuição da viabilidade celular. Verificou-se também que as células tratadas apenas com a respetiva HSP (veículo) não sofriram qualquer variação ao nível da expressão de caspase-3 (**Figura 4.3.** e **Figura 4.4.**). O mais importante foi verificar que 1 ng/mL de qualquer HSP testada foi suficiente para neutralizar a ativação de caspase-3 evocada por H₂O₂ (60 μ M) (**Figura 4.4.**), mas não por TG (2,5 μ M) (**Figura 4.3.**). Facto este que corrobora com as observações realizadas nos testes de viabilidade (**Figura 4.2.**).

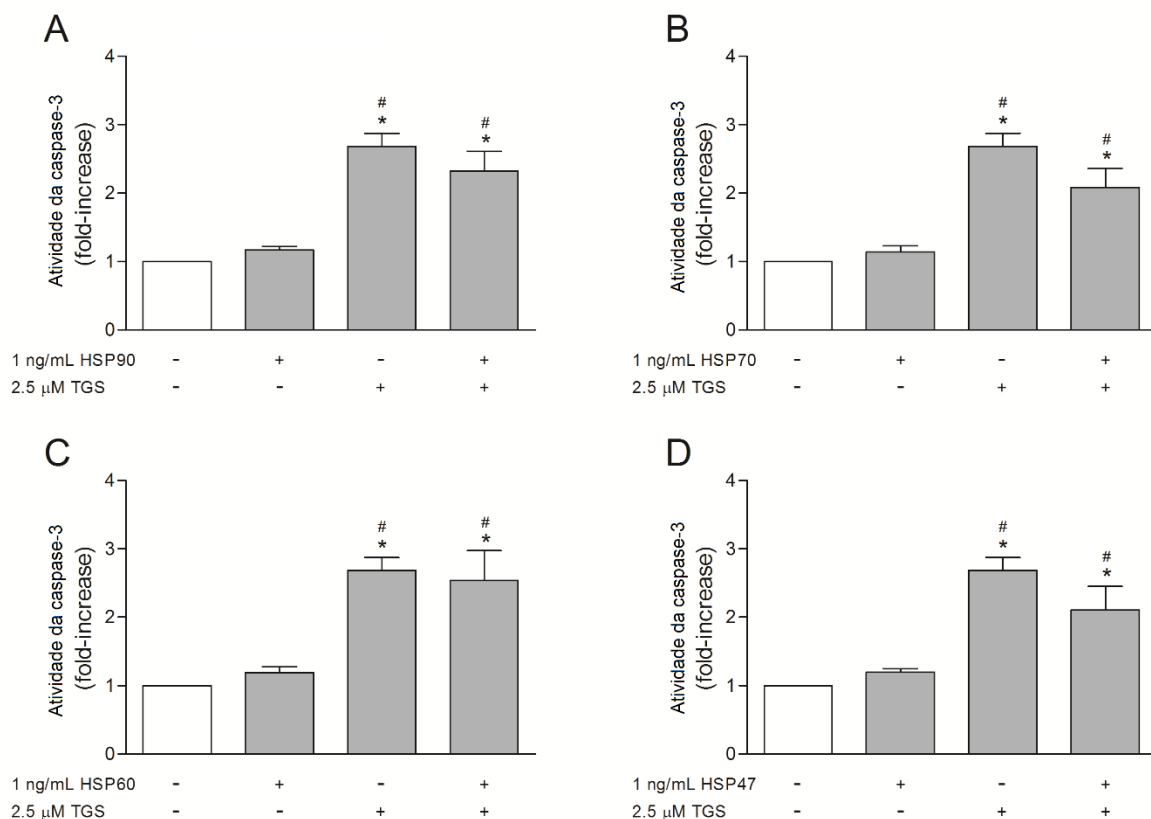


Figura 4.3. Atividade de caspase-3 em células U937 tratadas com 1 ng/mL de HSP e 2,5 μ M de TG. As células foram pré-incubadas com 1ng/mL de HSP90 (A), HSP70 (B), HSP60 (C) e HSP47 (D) durante 3 h e depois estimuladas com TG (2,5 μ M) ou não tratadas (controlo) durante 24 h. Os valores são expressos como *fold-increase*

em relação ao pré-tratamento (experimental/controlo) e correspondem a 6 experiências independentes (N=6). A análise estatística foi efetuada recorrendo ao teste *t Student* : **P* < 0,05 comparada aos valores controlo. #*P* < 0,05 comparado às células tratadas apenas com HSP. ^s*P* < 0,05 comparado às células tratadas apenas com H₂O₂.

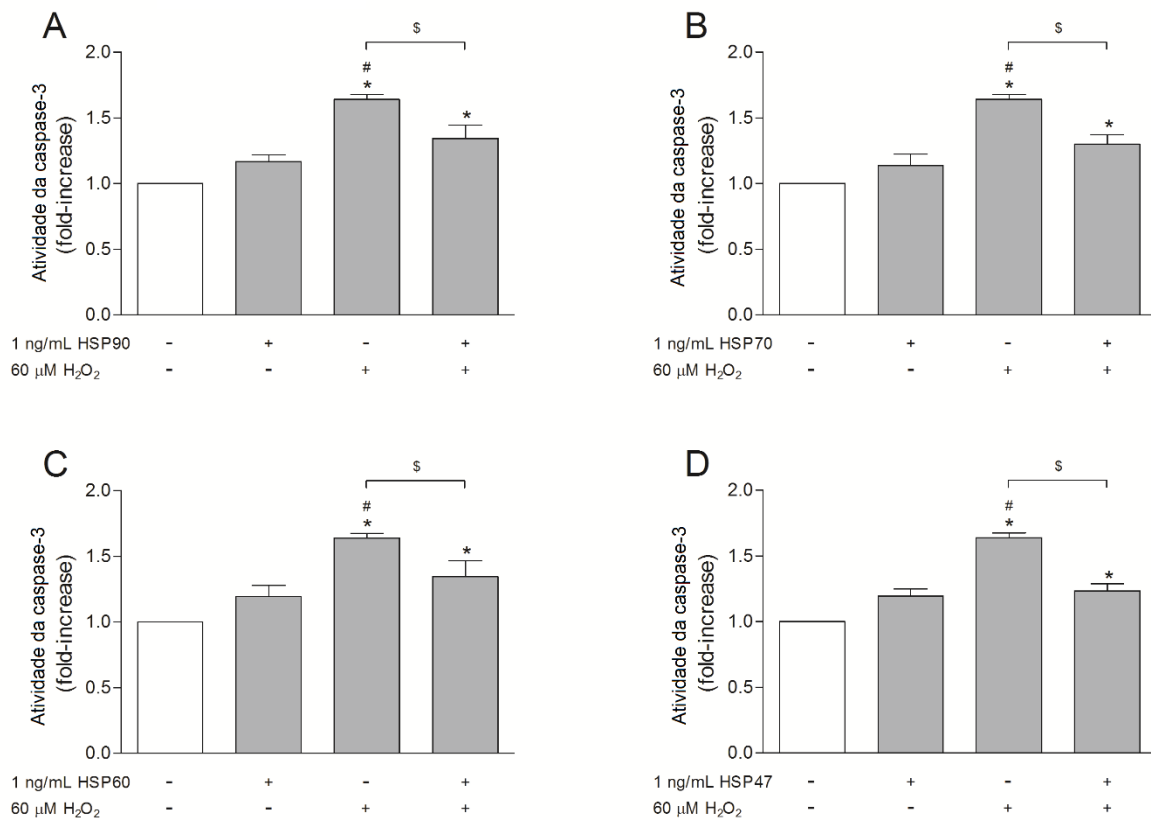


Figura 4.4. Atividade de caspase-3 em células U937 tratadas com 1 ng/mL de HSP e 60 μM de H₂O₂. As células foram pré-incubadas com 1 ng/mL de HSP90 (A), HSP70 (B), HSP60 (C) e HSP47 (D) durante 3 h e depois estimuladas com H₂O₂ (60 μM) ou não tratadas (controlo) durante 24 h. Os valores são expressos como *fold-increase* em relação ao pré-tratamento (experimental/controlo) e correspondem a 6 experiências independentes (N=6). A análise estatística foi efetuada recorrendo ao teste *t Student* : **P* < 0,05 comparado aos valores controlo. #*P* < 0,05 comparado às células tratadas apenas com HSP. ^s*P* < 0,05 comparado às células tratadas com H₂O₂ na presença da HSP correspondente.

5. Discussão

5.1. Análise da expressão de proteínas de choque térmico (*Heat Shock Proteins*, HSP) em células U937 tratadas com taspigargina (TG) ou peróxido de hidrogénio (H₂O₂)

Na literatura os resultados relativos à regulação dos níveis de HSPs em resposta a TG e H₂O₂ são contraditórios. Enquanto alguns estudos mostram um aumento na expressão de HSPs em resposta a TG e H₂O₂ [355, 356, 357], outros mostram uma diminuição da expressão de HSPs em resposta a estes insultos, tal como observei neste trabalho (**Figura 4.1.A e 4.1.B**). Por exemplo, a exposição de neurónios e células da glia a longos períodos de isquémia (10-20 min) é suficiente para reduzir a expressão de HSP70 [358], a exposição a ácido cainico (análogo

cíclico do glutamato) resulta num aumento da expressão de HSP70 após 6 h e 12 h, mas numa diminuição após 24 h [359], a expressão de HSP70 diminui após o tratamento de hepatócitos com TG (1 μ M) [360], células humanas de carcinoma epidermóide A-431 mostraram que alterações na homeostase do cálcio intracelular resultam na diminuição da síntese de HSP70 [361], células H460 foram tratadas com TG (0,1 μ M) e após 15 min com um poderoso indutor da HSP70, a geldanamicina (0,5 μ M). Quatro horas após os tratamentos a expressão de HSP70 foi avaliada por *western blotting* e verificou-se uma diminuição na expressão da HSP70 nas células tratadas com TG em comparação com aquelas que apenas foram tratadas com geldanamicina [362]. Os resultados contraditórios podem dever-se à utilização de diferentes tipos celulares, diferentes doses e diferentes tempos de exposição e recuperação [363, 364].

5.2. Viabilidade celular

A diminuição da viabilidade celular mediada por H₂O₂ deve-se, não só à diminuição da expressão de HSPs (**Figura 4.1.**) mas também ao aumento da ativação de proteínas pró-apoptóticas como JNK, ERK, e da expressão de p53, p73, Bax, c-myc [365]. Outro parâmetro que varia é a localização do citocromo c que se desloca da mitocôndria para o citosol após o estímulo. Células HeLa tratadas com H₂O₂ (125 μ M) apresentam um aumento da apoptose 29 % 3 h após o tratamento [356]. Num estudo com células de Schwann, a estimulação com H₂O₂ (800 μ M) induz uma diminuição da viabilidade celular ao longo do tempo, sendo que se torna significativa após 16 h de exposição. Passadas 24 h podemos encontrar valores de viabilidade celular na ordem de 60 %, muito semelhantes aos da **Figura 4.2.** No entanto, quando as células de Schwann são pré-tratadas com Hsp72 3 h antes da exposição a H₂O₂ (800 μ M) a viabilidade celular após 16 h aumenta de forma dependente da dose de HSP, sendo que aumentos significativos são observados a concentrações de Hsp72 de 100 ng/mL (75 %) e 1000 ng/mL (85 %), mas não de 10 ng/mL [366].

As proteínas de choque térmico podem bloquear o processo de apoptose a vários níveis: (1) modulando as vias de sinalização que precedem a mitocôndria; (2) ao nível mitocondrial, controlando a libertação de citocromo c e (3) ao nível pós-mitocondrial interagindo com o citocromo c ou com proteínas como Apaf-1 e/ou Smac/DIABLO [64, 367].

A Hsp27 (não incluída no estudo) atua na via extrínseca induzida quer por Fas/APO-1 [368] quer por TNF- α [369] bloqueando Bid e evitando a sua ativação por caspase-8 [370] e na via mitocondrial inibindo a libertação de citocromo c [371, 372] e Smac/DIABLO [373]. Em experiências paralelas verifica-se que a Hsp27 co-precipita com citocromo c e pró-caspase-3,

sugerindo o sequestro como forma de embargo apoptótico [374, 375, 376]. Além disso a Hsp27 fosforila o inibidor α do fator nuclear κ de células B (I κ B α) de modo a ser degradado e libertando o fator de transcrição de pró-sobrevivência fator nuclear κ B (*Nuclear Factor kappa B*, NF- κ B) que migra para ao núcleo induzindo a transcrição de genes anti-apoptóticos como *Bcl-2* e *Bcl-XL* [377].

Elevadas concentrações (100 ng/mL) de HSP60 parecem diminuir a viabilidade celular, no entanto, é a HSP mais eficaz em restabelecer a viabilidade celular na presença de 60 μ M de H₂O₂ quando é adicionada sob a menor concentração testada (1 ng/mL). O primeiro facto pode ser explicado pela baixa concentração basal da mesma o que faz com que uma dose elevada seja pernicioso para as células (sobretudo porque a HSP60 se encontra predominantemente na mitocôndria) [378]. O facto de ser a mais eficaz em reduzir a diminuição da viabilidade celular após o tratamento com 60 μ M de H₂O₂ poderá dever-se à sua capacidade de entrar no espaço intermembranar da mitocôndria e atuar sobre as moléculas aí presentes, impedindo a sua libertação para o citoplasma numa fase muito precoce da apoptose [379], no entanto mais estudos serão necessários para confirmar esta hipótese.

A HSP70 já havia sido relacionada com a proteção de células sob o efeito de hipertermia, endotoxinas, radiação UV [380], óxido nítrico [381] e privação de energia/depleção de ATP [382]. Vários estudos sugerem que a HSP70 inibe a apoptose atuando tanto na via independente de caspases como na via dependente, antes e após a sua ativação, tanto na via intrínseca como extrínseca [383, 384]. A Hsp70 inibe a apoptose ligando-se e bloqueando proteínas pró-apoptóticas como p53 [385, 386, 387], ASK1 [388] e JNK1 [389, 390, 391], impedindo que este ative Bid [380, 392] e caspases-3 [393, 394]. Ao nível mitocondrial a HSP70 inibe a permeabilização da membrana e a libertação de moléculas pró-apoptóticas [380, 395]. A um nível pós-mitocondrial, a HSP70 liga-se ao domínio CARD da Apaf-1, prevenindo o recrutamento de pró-caspase-9 para o apoptossoma (não por competição direta mas porque inibe a alteração conformacional que possibilita a ligação da pró-caspase-9) [396, 397, 398]. A HSP70 também atua num cenário de apoptose não mediada por caspases [399]. Liga-se ao AIF (entre os aminoácidos 150 e 228) impedindo a sua deslocação para o núcleo e a condensação de cromatina [252, 400] e associa-se a EndoG de forma a prevenir a fragmentação do ADN [291]. Além disso, a HSP70 inibe a permeabilização das membranas lisossomais impedindo desta forma a libertação de catepsinas para o citoplasma [401, 402]. Por fim, a HSP70 é capaz de resgatar células de uma fase tão avançada da apoptose como nenhuma outra droga ou proteína. Por exemplo, na apoptose induzida por TNF a HSP70 não previne a ativação de caspase-3 mas previne as alterações morfológicas seguintes [160]. No que toca a estudos com

a linhagem celular U937, a HSP70 também aumenta a viabilidade celular num modelo de apoptose induzido por TNF e cicloheximida, ao contrário da HSP90 que aumenta a apoptose [403]. No entanto, nestas mesmas células, a HSP90 inibe a apoptose induzida por estaurosporina e previne a ativação de caspases em extratos citosólicos tratados com citocromo c através da inibição de Apaf-1 (tal como a HSP70) [404]. A Hsp90 regula e estabiliza vários fatores de transcrição [405] e cinases [406] implicadas na apoptose como os fatores de transcrição p53 [407], fator indutor de hipóxia α (*Hypoxia-inducible factor α* , HIF1 α) [408] e o recetor do fator de crescimento epidermal humano 2 (*Human Epidermal growth factor Receptor 2*, Her2) [409] e as cinases JNK [410], Raf-1 [411] e Akt [206, 412]. Esta última, quando fosforilada pode fosforilar Bad [413] e caspase-9 inibindo a apoptose [404, 414] e fosforilar a cinase I κ B resultando na promoção de NF- κ B e na sobrevivência celular [207, 415]. A Hsp90 também se liga diretamente a Apaf-1 inibindo a formação do apoptossoma [404]. Alguns estudos reportam a formação do complexo Bcl-2-HSP90 β de modo a prevenir a libertação de citocromo c [416].

5.3. Medição da atividade de caspase-3 em células U937 tratadas com proteínas de choque térmico (*Heat Shock Proteins*, HSP) e taspigargina (TG) ou peróxido de hidrogénio (H₂O₂)

No estudo já descrito acima com células de Schwann também a atividade caspase foi avaliada verificando-se um aumento da atividade de caspase-3 em células tratadas com H₂O₂ (800 μ M) e uma diminuição desta atividade após pré-tratamento com Hsp72 [366]. Estes resultados são suportados por Li e colaboradores [417] que mostraram que a HSP70 inibe a apoptose depois da ativação de citocromo c e antes da ativação de caspase-3 [399]. Isto porque a HSP70 liga-se à pró-caspase-3 através da sua sequência EEVD presente no terminal carboxilo (**Figura 1.2.**) de forma a inibir o seu processamento [380]. Além disso a HSP70 inibe a formação do apoptossoma e a subsequente ativação de caspase-3. Interagindo com Apaf-1 e citocromo c, inibindo a alteração conformacional que expõe o CARD, um evento necessário para o recrutamento e ativação de caspase-9 [396, 397, 398].

Em células U937 a HSP90 tem a capacidade de inibir a apoptose induzida por estaurosporina e prevenir a ativação de caspases em extratos citosólicos tratados com citocromo c [404]. A HSP90 também interage com Akt fosforilada que por sua vez pode fosforilar Bad e caspase-9, deixando-as inativas [414].

6. Conclusões

Primeiro é de notar que tanto H₂O₂ (60 µM) como TG (2,5 µM) têm a capacidade de diminuir a expressão intracelular de HSP70 e HSP90 em células U937 (**Figura 4.1.**). Este decréscimo pode ser uma das causas para a apoptose induzida por estes agentes verificada na **Figura 4.2.** Quando se adicionam HSPs externas verificamos que a viabilidade celular é restaurada no caso da apoptose induzida por H₂O₂, mas não pelo aumento de cálcio intracelular provocado por TG (**Figura 4.2.**). De notar ainda que este efeito é partilhado por todas as HSP testadas (HSP47, HSP60, HSP70 e HSP90) mas apenas de forma significativa na concentração de 1 ng/mL (a menor testada). Esta foi a concentração utilizada para testar o efeito destas quatro HSPs extracelulares na ativação de caspase-3. Os resultados mostram que todas as HSP diminuem a ativação de caspase-3 induzida por H₂O₂ (60 µM) (**Figura 4.3.**), mas não por TG (2,5 µM) (**Figura 4.4.**). De notar ainda as semelhanças entre os resultados obtidos para as quatro HSPs, apesar das diferenças estruturais e funcionais entre elas. Estes resultados são mais uma prova que suporta a teoria de que é possível utilizar HSP exógenas como agente citoprotetor em situações envolvendo stress oxidativo [380].

7. Perspectivas

As HSPs são responsáveis por uma grande quantidade de funções celulares. Apesar de estarem quase todas descritas estrutural e funcionalmente, ainda há muito para compreender acerca destes “guardiões” celulares, assim, num futuro próximo seria interessante realizar alguns testes adicionais que permitissem tirar outras conclusões ou fortalecer os resultados, por exemplo:

- Diferentes linhas celulares;
- Diferentes doses de TG e H₂O₂;
- Diferentes concentrações de HSP, uma vez que a mais eficaz no restauro da viabilidade celular foi a menor (de 1 ng/mL), seria interessante testar concentrações mais baixas de HSP;
- Diferentes tempos após tratamento, principalmente no que diz respeito à análise de expressão das HSPs por *western blotting*;
- Utilizar outros marcadores de viabilidade e de apoptose;
- Analisar a atividade de caspase-9, que nos permitiria conhecer qual a via de ativação da caspase-3: se através do apoptossoma (via intrínseca) ou de caspase-8 (via extrínseca);
- Analisar a expressão e clivagem de caspase-3 e caspase-9 por *western blotting*;

- Analisar a expressão de HSP47, HSP60 por *western blotting*;
- Testar outras HSP;
- Quantificar as ROS intracelulares;
- *Western blotting* aos marcadores de stress do ER (ATF6, PERK, CHOP, etc.);
- Utilizar uma outra forma de provocar stress no ER, por exemplo através de tunicamicina (TM).

8. Bibliografia

1. Tissières, A., Mitchell, H. K., & Tracy, U. M. (1974). Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: relation to chromosome puffs. *Journal of molecular biology*, 84(3), 389-398.
2. Alexandrov, V. Y. (1994). Functional aspects of cell response to heat shock. *International review of cytology*, 148, 171-228.
3. Gupta, R. S., & Golding, G. B. (1993). Evolution of HSP70 gene and its implications regarding relationships between archaebacteria, eubacteria, and eukaryotes. *Journal of Molecular Evolution*, 37(6), 573-582.
4. Morimoto, R. I., Tissieres, A., & Georgopoulos, C. (1994). 1 progress and perspectives on the biology of heat shock proteins and molecular chaperones. *Cold Spring Harbor Monograph Archive*, 26, 1-30.
5. Parcellier, A., Gurbuxani, S., Schmitt, E., *et al.* (2003). Heat shock proteins, cellular chaperones that modulate mitochondrial cell death pathways. *Biochemical and biophysical research communications*, 304(3), 505-512.
6. Parsell, D. A., & Lindquist, S. (1994). 18 Heat Shock Proteins and Stress Tolerance. *Cold Spring Harbor Monograph Archive*, 26, 457-494.
7. Gerge, J., Shoenfeld, Y., & Georgopoulos, C. (1999). Heat shock proteins and stress tolerance in the biology of heat shock proteins and molecular chaperones. *Arteri Thromb Vasc Biol*, 19(3), 505-510.
8. Lindquist, S., & Craig, E. A. (1988). The heat-shock proteins. *Annual review of genetics*, 22(1), 631-677.
9. Feder, M. E., & Hofmann, G. E. (1999). Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. *Annual review of physiology*, 61(1), 243-282.
10. Wang, S., & Edens, F. W. (1998). Heat conditioning induces heat shock proteins in broiler chickens and turkey poults. *Poultry science*, 77(11), 1636-1645
11. Ritossa, F. (1962). A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia*, 18(12), 571-573.
12. Ostberg, J. R., Kaplan, K. C., & Repasky, E. A. (2002). Induction of stress proteins in a panel of mouse tissues by fever-range whole body hyperthermia. *International journal of hyperthermia*, 18(6), 552-562.
13. Ravindran, R. K., Tablin, F., Crowe, *et al.* (2005). Resistance to dehydration damage in HeLa cells correlates with the presence of endogenous heat shock proteins. *Cell Preservation Technology*, 3(3), 155-164.
14. Patel, B., Khaliq, A., Jarvis-Evans, *et al.* (1995). Hypoxia induces HSP 70 gene expression in human hepatoma (HEP G2) cells. *Biochemistry and molecular biology international*, 36(4), 907-912.

15. Levinson, W., Oppermann, H., & Jackson, J. (1980). Transition series metals and sulfhydryl reagents induce the synthesis of four proteins in eukaryotic cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Nucleic Acids and Protein Synthesis*, 606(1), 170-180.
16. Kukreja, R. C., Kontos, M. C., Loesser, K. E., *et al.* (1994). Oxidant stress increases heat shock protein 70 mRNA in isolated perfused rat heart. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 267(6), H2213-H2219.
17. Phillips, B., Abravaya, K., & Morimoto, R. I. (1991). Analysis of the specificity and mechanism of transcriptional activation of the human hsp70 gene during infection by DNA viruses. *Journal of virology*, 65(11), 5680-5692.
18. Wu, B. J., Hurst, H. C., Jones, *et al.* (1986). The E1A 13S product of adenovirus 5 activates transcription of the cellular human HSP70 gene. *Molecular and cellular biology*, 6(8), 2994-2999.
19. Niewiarowska, J., D'Halluin, J. C., & Belin, M. T. (1992). Adenovirus capsid proteins interact with HSP70 proteins after penetration in human or rodent cells. *Experimental cell research*, 201(2), 408-416.
20. Glotzer, J. B., Saltik, M., Chiocca, S., *et al.* (2000). Activation of heat-shock response by an adenovirus is essential for virus replication. *Nature*, 407(6801), 207-211.
21. Lindquist, S. (1986). The heat-shock response. *Annual review of biochemistry*, 55(1), 1151-1191.
22. Morimoto, R. I. (1993). Cells in stress: transcriptional activation of heat shock genes. *Science-New York Then Washington*, 259, 1409-1409.
23. Wu, C. (1995). Heat shock transcription factors: structure and regulation. *Annual review of cell and developmental biology*, 11(1), 441-469.
24. Fernandes, M., O'Brien, T., & Lis, J. T. (1994). 15 Structure and Regulation of Heat Shock Gene Promoters. *Cold Spring Harbor Monograph Archive*, 26, 375-393.
25. Zimarino, V., Tsai, C., & Wu, C. (1990). Complex modes of heat shock factor activation. *Molecular and cellular biology*, 10(2), 752-759.
26. Lis, J. T., Xiao, H., & Perisic, O. (1990). 17 Modular Units of Heat Shock Regulatory Regions: Structure and Function. *Cold Spring Harbor Monograph Archive*, 19, 411-428.
27. Mivechi, N. F., Murai, T., & Hahn, G. M. (1994). Inhibitors of tyrosine and Ser/Thr phosphatases modulate the heat shock response. *Journal of cellular biochemistry*, 54(2), 186-197.
28. Mivechi, N. F., & Giaccia, A. J. (1995). Mitogen-activated protein kinase acts as a negative regulator of the heat shock response in NIH3T3 cells. *Cancer research*, 55(23), 5512-5519.
29. Hartl, F. U. (1996). Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature*, 381, 571-580.
30. Bukau, B., Hesterkamp, T., & Lührink, J. (1996). Growing up in a dangerous environment: a network of multiple targeting and folding pathways for nascent polypeptides in the cytosol. *Trends in cell biology*, 6(12), 480-486.
31. Gething, M. J., & Sambrook, J. (1992). Protein folding in the cell. *Nature*, 355(6355), 33-45.
32. Hartl, F. U., Martin, J., & Neupert, W. (1992). Protein folding in the cell. *Annual review of biophysics and biomolecular structure*, 293-322.
33. Ryan, M. T., & Pfanner, N. (2002). Hsp70 proteins in protein translocation. *Advances in protein chemistry*, 59, 223-243.
34. Bukau, B., Deuerling, E., Pfund, C., *et al.* (2000). Getting newly synthesized proteins into shape. *Cell*, 101(2), 119-122.

35. Gao, Y., Thomas, J.O., Chow, R.L., *et al.* (1992). A cytoplasmatic chaperonin that catalyzes beta-actin folding. *Cell*, 69, 1043-1050.
36. Koyasu, S., Nishida, E., Kadowaki, *et al.* (1986). Two mammalian heat shock proteins, Hsp90 and Hsp100 are actin-binding proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 83(21), 8054-8058.
37. Margulis, B. A., & Welsh, M. (1991). Isolation of hsp70-binding proteins from bovine muscle. *Biochemical and biophysical research communications*, 178(1), 1-7.
38. Csermely, P. (2001). A nonconventional role of molecular chaperones: involvement in the cytoarchitecture. *Physiology*, 16(3), 123-126.
39. Nathan, D. F., & Lindquist, S. (1995). Mutational analysis of Hsp90 function: interactions with a steroid receptor and a protein kinase. *Molecular and Cellular Biology*, 15(7), 3917-3925.
40. Chappell, T. G., Welch, W. J., Schlossman, *et al.* (1986). Uncoating ATPase is a member of the 70 kilodalton family of stress proteins. *Cell*, 45(1), 3-13.
41. Vogt, S., Troitzsch, D., Abdul-Khaliq, *et al.* (2000). Improved myocardial preservation with short hyperthermia prior to cold cardioplegic ischemia in immature rabbit hearts. *European journal of cardio-thoracic surgery*, 18(2), 233-240.
42. Currie, R. W., Karmazyn, M., Kloc, *et al.* (1988). Heat-shock response is associated with enhanced postischemic ventricular recovery. *Circulation Research*, 63(3), 543-549.
43. Lau, S., Patnaik, N., Sayen, *et al.* (1997). Simultaneous overexpression of two stress proteins in rat cardiomyocytes and myogenic cells confers protection against ischemia-induced injury. *Circulation*, 96(7), 2287-2294.
44. Lin, K. M., Lin, B., Lian, *et al.* (2001). Combined and individual mitochondrial HSP60 and HSP10 expression in cardiac myocytes protects mitochondrial function and prevents apoptotic cell deaths induced by simulated ischemia-reoxygenation. *Circulation*, 103(13), 1787-1792.
45. Donnelly, T. J., Sievers, R. E., Vissern, *et al.* (1992). Heat shock protein induction in rat hearts. A role for improved myocardial salvage after ischemia and reperfusion? *Circulation*, 85(2), 769-778.
46. Gowda, A., Yang, C. J., Asimakis, *et al.* (1998). Cardioprotection by local heating: improved myocardial salvage after ischemia and reperfusion. *The Annals of thoracic surgery*, 65(5), 1241-1247.
47. Nowak Jr, T. S., & Abe, H. (1994). 21 Postischemic Stress Response in Brain. *Cold Spring Harbor Monograph Archive*, 26, 553-575.
48. Hoehn, B., Ringer, T. M., Xu, *et al.* (2001). Overexpression of HSP72 after induction of experimental stroke protects neurons from ischemic damage. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 21(11), 1303-1309.
49. Giffard, R. G., & Yenari, M. A. (2004). Many mechanisms for hsp70 protection from cerebral ischemia. *Journal of neurosurgical anesthesiology*, 16(1), 53-61.
50. Giffard, R. G., Xu, L., Zhao, H., *et al.* (2004). Chaperones, protein aggregation, and brain protection from hypoxic/ischemic injury. *Journal of Experimental Biology*, 207(18), 3213-3220.
51. van der Weerd, L., Lythgoe, M. F., *et al.* (2005). Neuroprotective effects of HSP70 overexpression after cerebral ischaemia—an MRI study. *Experimental neurology*, 195(1), 257-266.
52. Sakahira, H., Breuer, P., Hayer-Hartl, *et al.* (2002). Molecular chaperones as modulators of polyglutamine protein aggregation and toxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(4), 16412-16418.
53. Klucken, J., Shin, Y., Masliyah, *et al.* (2004). Hsp70 reduces α -synuclein aggregation and toxicity. *Journal of Biological Chemistry*, 279(24), 25497-25502.

54. Zhong, G., & Brunham, R. C. (1992). Antigenic analysis of the chlamydial 75-kilodalton protein. *Infection and immunity*, 60(3), 1221-1224.
55. Blander, S. J., & Horwitz, M. A. (1993). Major cytoplasmic membrane protein of *Legionella pneumophila*, a genus common antigen and member of the hsp 60 family of heat shock proteins, induces protective immunity in a guinea pig model of Legionnaires' disease. *Journal of Clinical Investigation*, 91(2), 717.
56. Dubois, P., Dedet, J. P., Fandeur, *et al.* (1984). Protective immunization of the squirrel monkey against asexual blood stages of *Plasmodium falciparum* by use of parasite protein fractions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 81(1), 229-232.
57. Perdrizet, G. A., Kaneko, H., Buckley, *et al.* (1993). Heat shock and recovery protects renal allografts from warm ischemic injury and enhances HSP72 production. *Transplantation proceedings* (Vol. 25, No. 1 Pt. 2, p. 1670).
58. Helmbrecht, K., Zeise, E., & Rensing, L. (2000). Chaperones in cell cycle regulation and mitogenic signal transduction: a review. *Cell proliferation*, 33(6), 341-365.
59. Aligue, R., Akhavan-Niak, H., & Russell, P. (1994). A role for Hsp90 in cell cycle control: Wee1 tyrosine kinase activity requires interaction with Hsp90. *The EMBO journal*, 13(24), 6099.
60. Milarski, K. L., & Morimoto, R. I. (1986). Expression of human HSP70 during the synthetic phase of the cell cycle. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 83(24), 9517-9521.
61. Pechan, P. M. (1991). Heat shock proteins and cell proliferation. *FEBS letters*, 280(1), 1-4.
62. Galea-Lauri, J., Latchman, D. S., & Katz, D. R. (1996). The role of the 90-kDa heat shock protein in cell cycle control and differentiation of the monoblastoid cell line U937. *Experimental cell research*, 226(2), 243-254.
63. Morano, K. A., & Thiele, D. J. (1998). Heat shock factor function and regulation in response to cellular stress, growth, and differentiation signals. *Gene expression*, 7(4-6), 271-282.
64. Samali, A., & Orrenius, S. (1998). Heat shock proteins: regulators of stress response and apoptosis. *Cell stress & chaperones*, 3(4), 228.
65. Samali, A., & Cotter, T. G. (1996). Heat shock proteins increase resistance to apoptosis. *Experimental cell research*, 223(1), 163-170.
66. Sreedhar, A. S., Pardhasaradhi, B. V. V., Begum, Z., *et al.* (1999). Lack of heat shock response triggers programmed cell death in a rat histiocytic cell line. *FEBS letters*, 456(2), 339-342.
67. Straus, D. B., Walter, W. A., & Gross, C. A. (1988). *Escherichia coli* heat shock gene mutants are defective in proteolysis. *Genes & development*, 2(12b), 1851-1858.
68. Ellis, J. (1987). Proteins as molecular chaperones. *Nature*, 328(6129), 378.
69. Bukau, B., & Horwich, A. L. (1998). The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell*, 92(3), 351-366.
70. Li, Z., Menoret, A., & Srivastava, P. (2002). Roles of heat-shock proteins in antigen presentation and cross-presentation. *Current opinion in immunology*, 14(1), 45-51.
71. Calderwood, S. K. (2005). Molecular chaperones and the immune response. *Trends in Biotechnology*, 23(2), 57-59.
72. Millar, D. G., Garza, K. M., Odermatt B., *et al.* (2003). Hsp70 promotes antigen-presenting cell function and converts T-cell tolerance to autoimmunity in vivo. *Nature medicine*, 9(12), 1469-1476.
73. Kaufmann, S. H. (1990). Heat shock proteins and the immune response. *Immunology today*, 11, 129-136.

74. Garrido, C., Paul, C., Seigneuric, R., *et al.* (2012). The small heat shock proteins family: the long forgotten chaperones. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 44(10), 1588-1592.
75. Hayes, D., Napoli, V., Mazurkie, A., *et al.* (2009). Phosphorylation dependence of hsp27 multimeric size and molecular chaperone function. *Journal of Biological Chemistry*, 284(28), 18801-18807.
76. Thériault, J. R., Lambert, H., Chávez-Zobel, A. T., *et al.* (2004). Essential role of the NH₂-terminal WD/EPF motif in the phosphorylation-activated protective function of mammalian Hsp27. *Journal of Biological Chemistry*, 279(22), 23463-23471.
77. Haynes, J. I., Duncan, M. K., & Piatigorsky, J. (1996). Spatial and temporal activity of the α B-crystallin/small heat shock protein gene promoter in transgenic mice. *Developmental dynamics*, 207(1), 75-88.
78. Soldatenkov, V. A., & Dritschilo, A. (1997). Apoptosis of Ewing's sarcoma cells is accompanied by accumulation of ubiquitinated proteins. *Cancer research*, 57(18), 3881-3885.
79. Leach, I. H., Tsang, M. L., Church, R. J., *et al.* (1994). Alpha-B crystallin in the normal human myocardium and cardiac conducting system. *The Journal of pathology*, 173(3), 255-260.
80. Lutsch, G., Vetter, R., Offhaus, U., *et al.* (1997). Abundance and location of the small heat shock proteins HSP25 and α B-crystallin in rat and human heart. *Circulation*, 96(10), 3466-3476.
81. Longoni, S., James, P., & Chiesi, M. (1990). Cardiac alpha-crystallin. I. Isolation and identification. *Molecular and cellular biochemistry*, 99(1), 113-120.
82. Bennardini, F., Wrzosek, A., & Chiesi, M. (1992). Alpha B-crystallin in cardiac tissue. Association with actin and desmin filaments. *Circulation Research*, 71(2), 288-294.
83. Gaestel, M., Schröder, W., Benndorf, R., *et al.* (1991). Identification of the phosphorylation sites of the murine small heat shock protein hsp25. *Journal of Biological Chemistry*, 266(22), 14721-14724.
84. Zantema, A., Verlaan-De Vries, M., Maasdam, D., *et al.* (1992). Heat shock protein 27 and alpha B-crystallin can form a complex, which dissociates by heat shock. *Journal of Biological Chemistry*, 267(18), 12936-12941.
85. Stokoe, D., Engel, K., Campbell, D. G., *et al.* (1992). Identification of MAPKAP kinase 2 as a major enzyme responsible for the phosphorylation of the small mammalian heat shock proteins. *FEBS letters*, 313(3), 307-313.
86. Freshney, N. W., Rawlinson, L., Guesdon, *et al.* (1994). Interleukin-1 activates a novel protein kinase cascade that results in the phosphorylation of Hsp27. *Cell*, 78(6), 1039-1049.
87. Maizels, E., Peters, C., Kline, M., *et al.* (1998). Heat-shock protein-25/27 phosphorylation by the δ isoform of protein kinase C. *Biochem. J*, 332, 703-712.
88. Charette, S. J., Lavoie, J. N., Lambert, H., *et al.* (2000). Inhibition of Daxx-mediated apoptosis by heat shock protein 27. *Molecular and cellular biology*, 20(20), 7602-7612.
89. Rane, M. J., Pan, Y., Singh, S., *et al.* (2003). Heat shock protein 27 controls apoptosis by regulating Akt activation. *Journal of Biological Chemistry*, 278(30), 27828-27835.
90. Park, K. J., Gaynor, R. B., & Kwak, Y. T. (2003). Heat shock protein 27 association with the I κ B kinase complex regulates tumor necrosis factor α -induced NF- κ B activation. *Journal of Biological Chemistry*, 278(37), 35272-35278.
91. Graceffa, P. (2011). Hsp27-actin interaction. *Biochemistry research international*, 2011
92. Kostenko, S., & Moens, U. (2009). Heat shock protein 27 phosphorylation: kinases, phosphatases, functions and pathology. *Cellular and molecular life sciences*, 66(20), 3289-3307.

93. Simioni, M. B., De Thonel, A., Hammann, A., *et al.* (2009). Heat shock protein 27 is involved in SUMO-2/3 modification of heat shock factor 1 and thereby modulates the transcription factor activity. *Oncogene*, 28(37), 3332-3344.
94. de Thonel, A., Vandekerckhove, J., Lanneau, D., *et al.* (2010). HSP27 controls GATA-1 protein level during erythroid cell differentiation. *Blood*, 116(1), 85-96.
95. Cuesta, R., Laroia, G., & Schneider, R. J. (2000). Chaperone hsp27 inhibits translation during heat shock by binding eIF4G and facilitating dissociation of cap-initiation complexes. *Genes & development*, 14(12), 1460-1470.
96. Didomenico, B. J., Bugaisky, G. E., & Lindquist, S. (1982). The heat shock response is self-regulated at both the transcriptional and posttranscriptional levels. *Cell*, 31(3), 593-603.
97. Perng, M. D., Cairns, L., van den IJssel, P., *et al.* (1999). Intermediate filament interactions can be altered by HSP27 and alphaB-crystallin. *Journal of cell science*, 112(13), 2099-2112.
98. Ehrnsperger, M., Gräber, S., Gaestel, M., *et al.* (1997). Binding of non-native protein to Hsp25 during heat shock creates a reservoir of folding intermediates for reactivation. *The EMBO Journal*, 16(2), 221-229.
99. Miron, T., Vancompernelle, K., Vandekerckhove, J., *et al.* (1991). A 25-kD inhibitor of actin polymerization is a low molecular mass heat shock protein. *The Journal of cell biology*, 114(2), 255-261.
100. Benndorf, R., Hayess, K., Ryazantsev, S., *et al.* (1994). Phosphorylation and supramolecular organization of murine small heat shock protein HSP25 abolish its actin polymerization-inhibiting activity. *Journal of Biological Chemistry*, 269(32), 20780-20784.
101. Lavoie, J. N., Lambert, H., Hickey, E., *et al.* (1995). Modulation of cellular thermoresistance and actin filament stability accompanies phosphorylation-induced changes in the oligomeric structure of heat shock protein 27. *Molecular and Cellular Biology*, 15(1), 505-516.
102. Beissinger, M., & Buchner, J. (1998). How chaperones fold proteins. *Biological chemistry*, 379(3), 245-259.
103. Maines, M. D., & Kappas, A. (1974). Cobalt induction of hepatic heme oxygenase; with evidence that cytochrome P-450 is not essential for this enzyme activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 71(11), 4293-4297.
104. Shibahara, S., Müller, R., Taguchi, H., *et al.* (1985). Cloning and expression of cDNA for rat heme oxygenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 82(23), 7865-7869.
105. Cruse, I., & Maines, M. D. (1988). Evidence suggesting that the two forms of heme oxygenase are products of different genes. *Journal of Biological Chemistry*, 263(7), 3348-3353.
106. Keyse, S. M., & Tyrrell, R. M. (1989). Heme oxygenase is the major 32-kDa stress protein induced in human skin fibroblasts by UVA radiation, hydrogen peroxide, and sodium arsenite. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86(1), 99-103.
107. Abraham, N. G., Pinto, A., Levere, R. D., *et al.* (1987). Identification of heme oxygenase and cytochrome P-450 in the rabbit heart. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 19(1), 73-81.
108. Ewing, J. F., & Maines, M. D. (1991). Rapid induction of heme oxygenase 1 mRNA and protein by hyperthermia in rat brain: heme oxygenase 2 is not a heat shock protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(12), 5364-5368.

109. Maines, M. D., Trakshel, G. M., & Kutty, R. K. (1986). Characterization of two constitutive forms of rat liver microsomal heme oxygenase. Only one molecular species of the enzyme is inducible. *Journal of Biological Chemistry*, 261(1), 411-419.
110. Trakshel, G. M., & Maines, M. D. (1989). Multiplicity of heme oxygenase isozymes. HO-1 and HO-2 are different molecular species in rat and rabbit. *Journal of Biological Chemistry*, 264(2), 1323-1328.
111. McCoubrey, W. K., Eke, B., & Maines, M. D. (1995). Multiple transcripts encoding heme oxygenase-2 in rat testis: developmental and cell-specific regulation of transcripts and protein. *Biology of Reproduction*, 53(6), 1330-1338.
112. Müller, R. M., Taguchi, H., & Shibahara, S. (1987). Nucleotide sequence and organization of the rat heme oxygenase gene. *Journal of Biological Chemistry*, 262(14), 6795-6802.
113. McCoubrey, W. K., Huang, T. J., & Maines, M. D. (1997). Isolation and characterization of a cDNA from the rat brain that encodes hemoprotein heme oxygenase-3. *European Journal of Biochemistry*, 247(2), 725-732.
114. Nagata, K. (1996). Hsp47: a collagen-specific molecular chaperone. *Trends in biochemical sciences*, 21(1), 23-26.
115. Elliott, P. R., Lomas, D. A., Carrell, R. W., *et al.* (1996). Inhibitory conformation of the reactive loop of α 1-antitrypsin. *Nature Structural & Molecular Biology*, 3(8), 676-681.
116. Natsume, T., Koide, T., Yokota, S. I., *et al.* (1994). Interactions between collagen-binding stress protein HSP47 and collagen. Analysis of kinetic parameters by surface plasmon resonance biosensor. *Journal of Biological Chemistry*, 269(49), 31224-31228.
117. Nakai, A., Satoh, M., Hirayoshi, K., *et al.* (1992). Involvement of the stress protein HSP47 in procollagen processing in the endoplasmic reticulum. *The Journal of cell biology*, 117(4), 903-914.
118. Koide, T., Asada, S., & Nagata, K. (1999). Substrate Recognition of Collagen-specific Molecular Chaperone HSP47. *Journal of Biological Chemistry*, 274(49), 34523-34526.
119. Sauk, J. J., Smith, T., Norris, K., *et al.* (1994). Hsp47 and the translation-translocation machinery cooperate in the production of alpha 1 (I) chains of type I procollagen. *Journal of Biological Chemistry*, 269(6), 3941-3946.
120. Tasab, M., Batten, M. R., & Bulleid, N. J. (2000). Hsp47: a molecular chaperone that interacts with and stabilizes correctly-folded procollagen. *The EMBO journal*, 19(10), 2204-2211.
121. Smith, T., Ferreira, L. R., Hebert, C., *et al.* (1995). Hsp47 and Cyclophilin B Traverse the Endoplasmic Reticulum with Procollagen into Pre-Golgi Intermediate Vesicles. *Journal of Biological Chemistry*, 270(31), 18323-18328.
122. Bonfanti, L., Mironov, A. A., Martínez-Menárguez, J. A., *et al.* (1998). Procollagen traverses the Golgi stack without leaving the lumen of cisternae: evidence for cisternal maturation. *Cell*, 95(7), 993-1003.
123. Satoh, M., Hirayoshi, K., Yokota, S. I., *et al.* (1996). Intracellular interaction of collagen-specific stress protein HSP47 with newly synthesized procollagen. *The Journal of cell biology*, 133(2), 469-483.
124. Horwich, A. L., Fenton, W. A., Chapman, E., *et al.* (2007). Two families of chaperonin: physiology and mechanism. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 23, 115-145.
125. McMullin, T. W., & Hallberg, R. L. (1988). A highly evolutionarily conserved mitochondrial protein is structurally related to the protein encoded by the *Escherichia coli* groEL gene. *Molecular and cellular biology*, 8(1), 371-380.
126. Ostermann, J., Horwich, A., Neupert, W., *et al.* (1989). Protein folding in mitochondria requires complex formation with hsp60 and ATP hydrolysis. *Nature*, 125-130.

127. Hemmingsen, S. M., Woolford, C., van der Vies, S. M., *et al.* (1988). Homologous plant and bacterial proteins chaperone oligomeric protein assembly. *Nature* 333, 330-334.
128. Lund, P. A. (2001). Molecular chaperones in the cell. *Oxford University Press*, 37.
129. Singh, B., Patel, H. V., Ridley, R. G., *et al.* (1990). Mitochondrial import of the human chaperonin (HSP60) protein. *Biochemical and biophysical research communications*, 169(2), 391-396.
130. Hartl, F. U., & Hayer-Hartl, M. (2002). Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science*, 295(5561), 1852-1858.
131. Soltys, B. J., & Gupta, R. S. (1996). Immunoelectron microscopic localization of the 60-kDa heat shock chaperonin protein (Hsp60) in mammalian cells. *Experimental cell research*, 222(1), 16-27.
132. Hutchinson, E. G., Tichelaar, W., Hofhaus, G., *et al.* (1989). Identification and electron microscopic analysis of a chaperonin oligomer from *Neurospora crassa* mitochondria. *The EMBO journal*, 8(5), 1485.
133. Vargas-Parada, L., Solis, C. F., & Laclette, J. P. (2001). Heat shock and stress response of *Taenia solium* and *T. crassiceps* (Cestoda). *Parasitology*, 122(05), 583-588.
134. Gupta, R. S. (1995). Evolution of the chaperonin families (HSP60, HSP 10 and TCP-1) of proteins and the origin of eukaryotic cells. *Molecular microbiology*, 15(1), 1-11.
135. Tavaría, M., Gabriele, T., Kola, I., *et al.* (1996). A hitchhiker's guide to the human Hsp70 family. *Cell stress & chaperones*, 1(1), 23.
136. Welch, W. J., & Feramisco, J. R. (1985). Rapid purification of mammalian 70,000-dalton stress proteins: affinity of the proteins for nucleotides. *Molecular and Cellular Biology*, 5(6), 1229-1237.
137. Mizzen, L. A., Chang, C., Garrels, J. I., *et al.* (1989). Identification, characterization, and purification of two mammalian stress proteins present in mitochondria, grp 75, a member of the hsp 70 family and hsp 58, a homolog of the bacterial groEL protein. *Journal of biological chemistry*, 264(34), 20664-20675.
138. Craig, E. A., Kramer, J., Shilling, J., *et al.* (1989). SSC1, an essential member of the yeast HSP70 multigene family, encodes a mitochondrial protein. *Molecular and cellular biology*, 9(7), 3000-3008.
139. Munro, S., & Pelham, H. R. (1986). An Hsp70-like protein in the ER: identity with the 78 kd glucose-regulated protein and immunoglobulin heavy chain binding protein. *Cell*, 46(2), 291-300.
140. Morris, J. A., Dorner, A. J., Edwards, C. A., *et al.* (1997). Immunoglobulin binding protein (BiP) function is required to protect cells from endoplasmic reticulum stress but is not required for the secretion of selective proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 272(7), 4327-4334.
141. Gao, B., Greene, L., & Eisenberg, E. (1994). Characterization of Nucleotide-Free Uncoating ATPase and Its Binding to ATP, ADP, and ATP Analogs. *Biochemistry*, 33(8), 2048-2054.
142. McCarty, J. S., Buchberger, A., Reinstein, J., *et al.* (1995). The role of ATP in the functional cycle of the DnaK chaperone system. *Journal of molecular biology*, 249(1), 126-137.
143. Theyssen, H., Schuster, H. P., Packschies, L., *et al.* (1996). The second step of ATP binding to DnaK induces peptide release. *Journal of molecular biology*, 263(5), 657-670.
144. Karzai, A. W., & McMacken, R. (1996). A bipartite signaling mechanism involved in DnaJ-mediated activation of the *Escherichia coli* DnaK protein. *Journal of Biological Chemistry*, 271(19), 11236-11246.

145. Kiang, J. G., Carr, F. E., Burns, M. R., *et al.* (1994). HSP-72 synthesis is promoted by increase in $[Ca^{2+}]_i$ or activation of G proteins but not pH_i or cAMP. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 267(1), C104-C114.
146. Hennessy, F., Nicoll, W. S., Zimmermann, R., *et al.* (2005). Not all J domains are created equal: implications for the specificity of Hsp40–Hsp70 interactions. *Protein Science*, 14(7), 1697-1709.
147. Qiu, X. B., Shao, Y. M., Miao, S., *et al.* (2006). The diversity of the DnaJ/Hsp40 family, the crucial partners for Hsp70 chaperones. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 63(22), 2560-2570.
148. Couturier, M., Buccellato, M., Costanzo, S., *et al.* (2010). High affinity binding between Hsp70 and the C-terminal domain of the measles virus nucleoprotein requires an Hsp40 co-chaperone. *Journal of Molecular Recognition*, 23(3), 301-315.
149. Raviol, H., Sadlish, H., Rodriguez, F., *et al.* (2006). Chaperone network in the yeast cytosol: Hsp110 is revealed as an Hsp70 nucleotide exchange factor. *The EMBO journal*, 25(11), 2510-2518.
150. Polier, S., Dragovic, Z., Hartl, F. U., *et al.* (2008). Structural basis for the cooperation of Hsp70 and Hsp110 chaperones in protein folding. *Cell*, 133(6), 1068-1079.
151. Schuermann, J. P., Jiang, J., Cuellar, J., *et al.* (2008). Structure of the Hsp110: Hsc70 nucleotide exchange machine. *Molecular cell*, 31(2), 232-243.
152. Petrucelli, L., Dickson, D., Kehoe, K., *et al.* (2004). CHIP and Hsp70 regulate tau ubiquitination, degradation and aggregation. *Human molecular genetics*, 13(7), 703-714.
153. Carrigan, P. E., Nelson, G. M., Roberts, P. J., *et al.* (2004). Multiple domains of the co-chaperone Hop are important for Hsp70 binding. *Journal of Biological Chemistry*, 279(16), 16185-16193.
154. Höfeld, J., Minami, Y., & Hartl, F. U. (1995). Hip, a novel cochaperone involved in the eukaryotic Hsc70/Hsp40 reaction cycle. *Cell*, 83(4), 589-598.
155. Höfeld, J., & Jentsch, S. (1997). GrpE-like regulation of the Hsc70 chaperone by the anti-apoptotic protein BAG-1. *The EMBO journal*, 16(20), 6209-6216.
156. Takayama, S., & Reed, J. C. (2001). Molecular chaperone targeting and regulation by BAG family proteins. *Nature Cell Biology*, 3(10), E237-E241.
157. Kabani, M., McLellan, C., Raynes, D. A., *et al.* (2002). HspBP1, a homologue of the yeast Fes1 and Sls1 proteins, is an Hsc70 nucleotide exchange factor. *FEBS letters*, 531(2), 339-342.
158. Flynn, G. C., Pohl, J., Flocco, M. T., *et al.* (1991). Peptide-binding specificity of the molecular chaperone BiP. *Nature*, 353(6346), 726-730.
159. Mayer, M. P., & Bukau, B. (2005). Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. *Cellular and molecular life sciences*, 62(6), 670-684.
160. Jäättelä, M., Wissing, D., Kokholm, K., *et al.* (1998). Hsp70 exerts its anti-apoptotic function downstream of caspase-3-like proteases. *The EMBO Journal*, 17(21), 6124-6134.
161. Muchowski, P. J., & Wacker, J. L. (2005). Modulation of neurodegeneration by molecular chaperones. *Nature Reviews Neuroscience*, 6(1), 11-22.
162. Subject, J. R., Shyy, T., Shen, J., *et al.* (1983). Association between the mammalian 110,000-dalton heat-shock protein and nucleoli. *The Journal of cell biology*, 97(5), 1389-1395.
163. Hatayama, T., Yasuda, K., & Yasuda, K. (1998). Association of HSP105 with HSC70 in high molecular mass complexes in mouse FM3A cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 248(2), 395-401.
164. Mattoo, R. U., Sharma, S. K., Priya, S., *et al.* (2013). Hsp110 is a bona fide chaperone using ATP to unfold stable misfolded polypeptides and reciprocally collaborate with

- Hsp70 to solubilize protein aggregates. *Journal of Biological Chemistry*, 288(29), 21399-21411.
165. Liu, X. D., Morano, K. A., & Thiele, D. J. (1999). The yeast Hsp110 family member, Sse1, is an Hsp90 cochaperone. *Journal of Biological Chemistry*, 274(38), 26654-26660.
 166. Oh, H. J., Chen, X., & Subject, J. R. (1997). Hsp110 protects heat-denatured proteins and confers cellular thermoresistance. *Journal of Biological Chemistry*, 272(50), 31636-31640.
 167. Yasuda, K., Nakai, A., Hatayama, T., *et al.* (1995). Cloning and expression of murine high molecular mass heat shock proteins, HSP105. *Journal of Biological Chemistry*, 270(50), 29718-29723.
 168. Kaneko, Y., Nishiyama, H., Nonoguchi, K., *et al.* (1997). A novel hsp110-related gene, apg-1, that is abundantly expressed in the testis responds to a low temperature heat shock rather than the traditional elevated temperatures. *Journal of Biological Chemistry*, 272(5), 2640-2645.
 169. Kojima, R., Randall, J., Brenner, B. M., *et al.* (1996). Osmotic stress protein 94 (OSP94) A new member of the Hsp110/SSE gene subfamily. *Journal of Biological Chemistry*, 271(21), 12327-12332.
 170. Saxena, A., Banasavadi-Siddegowda, Y. K., Fan, Y., *et al.* (2012). Human heat shock protein 105/110 kDa (Hsp105/110) regulates biogenesis and quality control of misfolded cystic fibrosis transmembrane conductance regulator at multiple levels. *Journal of Biological Chemistry*, 287(23), 19158-19170.
 171. Wall, D., Zylicz, M., & Georgopoulos, C. (1994). The NH₂-terminal 108 amino acids of the Escherichia coli DnaJ protein stimulate the ATPase activity of DnaK and are sufficient for lambda replication. *Journal of Biological Chemistry*, 269(7), 5446-5451.
 172. Cheetham, M. E., Jackson, A. P., & Anderton, B. H. (1994). Regulation of 70-kDa heat-shock-protein ATPase activity and substrate binding by human DnaJ-like proteins, HSJ1a and HSJ1b. *European Journal of Biochemistry*, 226(1), 99-107.
 173. Cheetham, M. E., & Caplan, A. J. (1998). Structure, function and evolution of DnaJ: conservation and adaptation of chaperone function. *Cell stress & chaperones*, 3(1), 28.
 174. Minami, Y., Höhfeld, J., Ohtsuka, K., *et al.* (1996). Regulation of the heat-shock protein 70 reaction cycle by the mammalian DnaJ homolog, Hsp40. *Journal of Biological Chemistry*, 271(32), 19617-19624.
 175. Scheufler, C., Brinker, A., Bourenkov, G., *et al.* (2000). Structure of TPR domain-peptide complexes: critical elements in the assembly of the Hsp70-Hsp90 multichaperone machine. *Cell*, 101(2), 199-210.
 176. Smith, D. F., Sullivan, W. P., Marion, T. N., *et al.* (1993). Identification of a 60-kilodalton stress-related protein, p60, which interacts with hsp90 and hsp70. *Molecular and Cellular Biology*, 13(2), 869-876.
 177. Nikolay, R., Wiederkehr, T., Rist, W., *et al.* (2004). Dimerization of the human E3 ligase CHIP via a coiled-coil domain is essential for its activity. *Journal of Biological Chemistry*, 279(4), 2673-2678.
 178. Ballinger, C. A., Connell, P., Wu, Y., *et al.* (1999). Identification of CHIP, a novel tetratricopeptide repeat-containing protein that interacts with heat shock proteins and negatively regulates chaperone functions. *Molecular and cellular biology*, 19(6), 4535-4545.
 179. Picard, D., Khursheed, B., Garabedian, M. J., *et al.* (1990). Reduced levels of hsp90 compromise steroid receptor action in vivo. *Nature* 348, 166-168.

180. Beckmann, R. P., Mizzen, L. E., & Welch, W. J. (1990). Interaction of Hsp 70 with newly synthesized proteins: implications for protein folding and assembly. *Science*, 248(4957), 850-854.
181. Shi, Y. & Thomas, J. O. (1992). The transport of proteins into the nucleus requires the 70-kilodalton heat shock protein or its cytosolic cognate. *Molecular and cellular biology*, 12(5), 2186-2192.
182. Craig, E. A., & Gross, C. A. (1991). Is hsp70 the cellular thermometer? *Trends in biochemical sciences*, 16, 135-140.
183. Wickner, S., Hoskins, J., & McKenney, K. (1991). Monomerization of RepA dimers by heat shock proteins activates binding to DNA replication origin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(18), 7903-7907.
184. Rutherford, S. L., & Lindquist, S. (1998). Hsp90 as a capacitor for morphological evolution. *Nature*, 396(6709), 336-342.
185. Queitsch, C., Sangster, T. A., & Lindquist, S. (2002). Hsp90 as a capacitor of phenotypic variation. *Nature*, 417(6889), 618-624.
186. King, F. W., Wawrzynow, A., Höhfeld, J., *et al.* (2001). Co-chaperones Bag-1, Hop and Hsp40 regulate Hsc70 and Hsp90 interactions with wild-type or mutant p53. *The EMBO journal*, 20(22), 6297-6305.
187. Cheng, S. H., Gregory, R. J., Marshall, J., *et al.* (1990). Defective intracellular transport and processing of CFTR is the molecular basis of most cystic fibrosis. *Cell*, 63(4), 827-834.
188. Meacham, G. C., Lu, Z., King, S., *et al.* (1999). The Hdj-2/Hsc70 chaperone pair facilitates early steps in CFTR biogenesis. *The EMBO Journal*, 18(6), 1492-1505.
189. Farinha, C., Nogueira, P., Mendes, F., *et al.* (2002). The human DnaJ homologue (Hdj)-1/heat-shock protein (Hsp) 40 co-chaperone is required for the *in vivo* stabilization of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator by Hsp70. *Biochem. J*, 366, 797-806.
190. Wang, X., Venable, J., LaPointe, P., *et al.* (2006). Hsp90 cochaperone Aha1 downregulation rescues misfolding of CFTR in cystic fibrosis. *Cell*, 127(4), 803-815.
191. Shinder, G. A., Lacourse, M. C., Minotti, S., *et al.* (2001). Mutant Cu/Zn-superoxide dismutase proteins have altered solubility and interact with heat shock/stress proteins in models of amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Biological Chemistry*, 276(16), 12791-12796.
192. Chappell, T. G., Welch, W. J., Schlossman, D. M., *et al.* (1986). Uncoating ATPase is a member of the 70 kilodalton family of stress proteins. *Cell*, 45(1), 3-13.
193. Jäättelä, M. (1999). Heat shock proteins as cellular lifeguards. *Annals of medicine*, 31(4), 261-271.
194. Meacham, G. C., Patterson, C., Zhang, W., *et al.* (2001). The Hsc70 co-chaperone CHIP targets immature CFTR for proteasomal degradation. *Nature cell biology*, 3(1), 100-105.
195. Sreedhar, A. S., Kalmár, É., Csermely, P., *et al.* (2004). Hsp90 isoforms: functions, expression and clinical importance. *FEBS letters*, 562(1), 11-15.
196. Kampinga, H. H., Hageman, J., Vos, M. J., *et al.* (2009). Guidelines for the nomenclature of the human heat shock proteins. *Cell Stress and Chaperones*, 14(1), 105-111.
197. Csermely, P., Schneider, T., So, C., *et al.* (1998). The 90-kDa molecular chaperone family: structure, function, and clinical applications. A comprehensive review. *Pharmacology & therapeutics*, 79(2), 129-168.

198. Grammatikakis, N., Vultur, A., Ramana, C. V., *et al.* (2002). The role of Hsp90N, a new member of the Hsp90 family, in signal transduction and neoplastic transformation. *Journal of Biological Chemistry*, 277(10), 8312-8320.
199. Csermely, P., Schnaider, T., & Szántó, I. (1995). Signalling and transport through the nuclear membrane. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Biomembranes*, 1241(3), 425-451.
200. Schnaider, T., Oikarinen, J., Ishiwatari-Hayasaka, H., *et al.* (1999). Interactions of Hsp90 with histones and related peptides. *Life sciences*, 65(22), 2417-2426.
201. Csermely, P., Kajtár, J., Hollosi, M., *et al.* (1994). The 90-kDa heat shock protein (HSP90) induces the condensation of the chromatin structure. *Biochemical and biophysical research communications*, 202(3), 1657-1663.
202. Shakovich, R., Shue, G., & Kohtz, D. S. (1992). Conformational activation of a basic helix-loop-helix protein (MyoD1) by the C-terminal region of murine HSP90 (HSP84). *Molecular and cellular biology*, 12(11), 5059-5068.
203. Hartson, S. D., & Matts, R. L. (1994). Association of Hsp90 with cellular Src-family kinases in a cell-free system correlates with altered kinase structure and function. *Biochemistry*, 33(30), 8912-8920.
204. Yu, W., Wang, J., Jin, J., *et al.* (2011). Heat shock protein 90 inhibition results in altered downstream signaling of mutant KIT and exerts synergistic effects on Kasumi-1 cells when combining with histone deacetylase inhibitor. *Leukemia research*, 35(9), 1212-1218.
205. Wartmann, M., & Davis, R. J. (1994). The native structure of the activated Raf protein kinase is a membrane-bound multi-subunit complex. *Journal of Biological Chemistry*, 269(9), 6695-6701.
206. Sato, S., Fujita, N., & Tsuruo, T. (2000). Modulation of Akt kinase activity by binding to Hsp90. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(20), 10832-10837.
207. Lewis, J., Devin, A., Miller, A., *et al.* (2000). Disruption of hsp90 function results in degradation of the death domain kinase, receptor-interacting protein (RIP), and blockage of tumor necrosis factor-induced nuclear factor- κ B activation. *Journal of Biological Chemistry*, 275(14), 10519-10526.
208. Richter, K., & Buchner, J. (2001). Hsp90: chaperoning signal transduction. *Journal of cellular physiology*, 188(3), 281-290.
209. Picard, D. (2002). Heat-shock protein 90, a chaperone for folding and regulation. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 59(10), 1640-1648.
210. Koyasu, S., Nishida, E., Kadowaki, T., *et al.* (1986). Two mammalian heat shock proteins, HSP90 and HSP100, are actin-binding proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 83(21), 8054-8058.
211. Cambiazo, V., González, M., Isamit, C., *et al.* (1999). The β -isoform of heat shock protein hsp-90 is structurally related with human microtubule-interacting protein Mip-90. *FEBS letters*, 457(3), 343-347.
212. Cohen, J. J., Duke, R. C., Fadok, V. A., *et al.* (1992). Apoptosis and programmed cell death in immunity. *Annual review of immunology*, 10(1), 267-293.
213. Slater, A. F., Stefan, C., Nobel, I., *et al.* (1995). Signalling mechanisms and oxidative stress in apoptosis. *Toxicology letters*, 82, 149-153.
214. Hengartner, M. O. (2000). The biochemistry of apoptosis. *Nature*, 407(6805), 770-776
215. Solary, E., Droin, N., Bettaieb, A., *et al.* (2000). Positive and negative regulation of apoptotic pathways by cytotoxic agents in hematological malignancies. *Leukemia*, 14(10), 1833-1849.
216. Saraste, A., & Pulkki, K. (2000). Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovascular research*, 45(3), 528-537.

217. Lawen, A. (2003). Apoptosis—an introduction. *Bioessays*, 25(9), 888-896.
218. Kerr, J. F., Wyllie, A. H., & Currie, A. R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British journal of cancer*, 26(4), 239.
219. Yu, S. P., & Choi, D. W. (2000). Ions, cell volume, and apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(17), 9360-9362.
220. Coleman, M. L., Sahai, E. A., Yeo, M., *et al.* (2001). Membrane blebbing during apoptosis results from caspase-mediated activation of ROCK I. *Nature cell biology*, 3(4), 339-345.
221. Willie, A. H. (1980). Cell death: the significance of apoptosis. *Int. Rev. Cytol.*, 68, 251-306.
222. Samali, A., Gorman, A. M., & Cotter, T. G. (1996). Apoptosis-the story so far... *Experientia*, 52(10-11), 933-941.
223. Ziegler, U., & Groscurth, P. (2004). Morphological features of cell death. *Physiology*, 19(3), 124-128.
224. Alnemri, E. S., Livingston, D. J., Nicholson, D. W., *et al.* (1996). Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell*, 87(2), 171.
225. Wolf, B. B., & Green, D. R. (1999). Suicidal tendencies: apoptotic cell death by caspase family proteinases. *Journal of Biological Chemistry*, 274(29), 20049-20052.
226. Thornberry, N. A., & Lazebnik, Y. (1998). Caspases: enemies within. *Science*, 281(5381), 1312-1316.
227. Fuentes-Prior, P., & Salvesen, G. (2004). The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition. *Biochem. J*, 384, 201-232.
228. Fischer, U., Jänicke, R. U., & Schulze-Osthoff, K. (2003). Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. *Cell Death & Differentiation*, 10(1), 76-100.
229. Riedl, S. J., & Shi, Y. (2004). Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nature reviews Molecular cell biology*, 5(11), 897-907.
230. Denault, J. B., & Salvesen, G. S. (2002). Caspases: keys in the ignition of cell death. *Chemical reviews*, 102(12), 4489-4500.
231. Ferri, K. F., & Kroemer, G. (2001). Organelle-specific initiation of cell death pathways. *Nature Cell Biology*, 3(11), E255-E263.
232. Nagata, S. (1997). Apoptosis by death factor. *Cell*, 88(3), 355-365.
233. Ashkenazi, A., & Dixit, V. M. (1998). Death receptors: signaling and modulation. *Science*, 281(5381), 1305-1308.
234. Dickens, L. S., Powley, I. R., Hughes, M. A., *et al.* (2012). The ‘complexities’ of life and death: death receptor signalling platforms. *Experimental cell research*, 318(11), 1269-1277.
235. Chang, H. Y., Nishitoh, H., Yang, X., *et al.* (1998). Activation of apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) by the adapter protein Daxx. *Science*, 281(5384), 1860-1863.
236. Bossy-Wetzel, E., & Green, D. R. (1999). Apoptosis: checkpoint at the mitochondrial frontier. *Mutation Research/DNA Repair*, 434(3), 243-251.
237. Desagher, S., & Martinou, J. C. (2000). Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends in cell biology*, 10(9), 369-377.
238. Kroemer, G., & Reed, J. C. (2000). Mitochondrial control of cell death. *Nature medicine*, 6(5), 513-519.
239. Polster, B. M., & Fiskum, G. (2004). Mitochondrial mechanisms of neural cell apoptosis. *Journal of neurochemistry*, 90(6), 1281-1289.

240. Mishra, N. C., & Kumar, S. (2005). Apoptosis: a mitochondrial perspective on cell death. *Indian J Exp Biol*, 43(1), 25-34.
241. Liu, X., Kim, C. N., Yang, J., *et al.* (1996). Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell*, 86(1), 147-157.
242. Verhagen, A. M., Ekert, P. G., Pakusch, M., *et al.* (2000). Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell*, 102(1), 43-53.
243. Lorenzo, H. K., Susin, S. A., Penninger, J., *et al.* (1999). Apoptosis inducing factor (AIF): a phylogenetically old, caspase-independent effector of cell death. *Cell death and differentiation*, 6(6), 516-524.
244. Susin, S. A., Lorenzo, H. K., Zamzami, N., *et al.* (1999). Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature*, 397(6718), 441-446.
245. Joza, N., Susin, S. A., Daugas, E., *et al.* (2001). Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature*, 410(6828), 549-554.
246. Schäfer, P., Scholz, S. R., Gimadutdinov, O., *et al.* (2004). Structural and functional characterization of mitochondrial EndoG, a sugar non-specific nuclease which plays an important role during apoptosis. *Journal of molecular biology*, 338(2), 217-228.
247. Daugas, E., Susin, S.A., Zamzami, N., *et al.* (2000). Mitochondrio-nuclear translocation of AIF in apoptosis and necrosis. *The FASEB Journal*, 14(5), 729-739.
248. Candé, C., Cohen, I., Daugas, E., *et al.* (2002). Apoptosis-inducing factor (AIF): a novel caspase-independent death effector released from mitochondria. *Biochimie*, 84(2), 215-222.
249. Cande, C., Vahsen, N., Garrido, C., *et al.* (2004). Apoptosis-inducing factor (AIF): caspase-independent after all. *Cell Death & Differentiation*, 11(6), 591-595.
250. Bröker, L. E., Kruyt, F. A., & Giaccone, G. (2005). Cell death independent of caspases: a review. *Clinical Cancer Research*, 11(9), 3155-3162.
251. Candé, C., Cecconi, F., Dessen, P., *et al.* (2002). Apoptosis-inducing factor (AIF): key to the conserved caspase-independent pathways of cell death? *Journal of Cell Science*, 115(24), 4727-4734.
252. Ravagnan, L., Gurbuxani, S., Susin, S. A., *et al.* (2001). Heat-shock protein 70 antagonizes apoptosis-inducing factor. *Nature cell biology*, 3(9), 839-843.
253. Yang, J., Liu, X., Bhalla, K., *et al.* (1997). Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science*, 275(5303), 1129-1132.
254. Zong, W. X., Lindsten, T., Ross, A. J., *et al.* (2001). BH3-only proteins that bind pro-survival Bcl-2 family members fail to induce apoptosis in the absence of Bax and Bak. *Genes & development*, 15(12), 1481-1486.
255. Kluck, R. M., Bossy-Wetzel, E., Green, D. R., *et al.* (1997). The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science*, 275(5303), 1132-1136.
256. Willis, S., Day, C. L., Hinds, M. G., *et al.* (2003). The Bcl-2-regulated apoptotic pathway. *Journal of cell science*, 116(20), 4053-4056.
257. Gross, A., McDonnell, J. M., & Korsmeyer, S. J. (1999). BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes & development*, 13(15), 1899-1911.
258. Cory, S., & Adams, J. M. (2002). The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nature Reviews Cancer*, 2(9), 647-656.
259. Borner, C. (2003). The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions. *Molecular immunology*, 39(11), 615-647.
260. Wei, M. C., Zong, W. X., Cheng, E. H. Y., *et al.* (2001). Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science*, 292(5517), 727-730.

261. Emily, H. Y. C., Wei, M. C., Weiler, S., *et al.* (2001). BCL-2, BCL-XL sequester BH3 domain-only molecules preventing BAX-and BAK-mediated mitochondrial apoptosis. *Molecular cell*, 8(3), 705-711.
262. Konishi, A., Shimizu, S., Hirota, J., *et al.* (2003). Involvement of histone H1.2 in apoptosis induced by DNA double-strand breaks. *Cell*, 114(6), 673-688.
263. Gross, A., Jockel, J., Wei, M. C., *et al.* (1998). Enforced dimerization of BAX results in its translocation, mitochondrial dysfunction and apoptosis. *The EMBO journal*, 17(14), 3878-3885.
264. Wei, M. C., Lindsten, T., Mootha, V. K., *et al.* (2000). tBID, a membrane-targeted death ligand, oligomerizes BAK to release cytochrome c. *Genes & development*, 14(16), 2060-2071.
265. Rich, T., Allen, R. L., & Wyllie, A. H. (2000). Defying death after DNA damage. *Nature*, 407(6805), 777-783.
266. Wolter, K. G., Hsu, Y. T., Smith, C. L., *et al.* (1997). Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis. *The Journal of cell biology*, 139(5), 1281-1292.
267. Antonsson, B., Conti, F., Ciavatta, A., *et al.* (1997). Inhibition of Bax channel-forming activity by Bcl-2. *Science*, 277(5324), 370-372.
268. De Giorgi, F., Lartigue, L., Bauer, M. K., *et al.* (2002). The permeability transition pore signals apoptosis by directing Bax translocation and multimerization. *The FASEB journal*, 16(6), 607-609.
269. Schlesinger, P. H., Gross, A., Yin, X. M., *et al.* (1997). Comparison of the ion channel characteristics of proapoptotic BAX and antiapoptotic BCL-2. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(21), 11357-11362.
270. Duchen, M. R. (2000). Mitochondria and calcium: from cell signalling to cell death. *The Journal of physiology*, 529(1), 57-68.
271. Hajnóczky, G., Davies, E., & Madesh, M. (2003). Calcium signaling and apoptosis. *Biochemical and biophysical research communications*, 304(3), 445-454
272. Ma, Y., & Hendershot, L. M. (2002). The mammalian endoplasmic reticulum as a sensor for cellular stress. *Cell stress & chaperones*, 7(2), 222.
273. Chen, L., & Gao, X. (2002). Neuronal apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress. *Neurochemical research*, 27(9), 891-898.
274. Lee, A. H., Iwakoshi, N. N., & Glimcher, L. H. (2003). XBP-1 regulates a subset of endoplasmic reticulum resident chaperone genes in the unfolded protein response. *Molecular and cellular biology*, 23(21), 7448-7459.
275. Nakagawa, T., Zhu, H., Morishima, N., *et al.* (2000). Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid- β . *Nature*, 403(6765), 98-103.
276. Yoneda, T., Imaizumi, K., Oono, K., *et al.* (2001). Activation of caspase-12, an endoplasmic reticulum (ER) resident caspase, through tumor necrosis factor receptor-associated factor 2-dependent mechanism in response to the ER stress. *Journal of Biological Chemistry*, 276(17), 13935-13940.
277. Jarvis, W. D., Kolesnick, R. N., Fornari, F. A., *et al.* (1994). Induction of apoptotic DNA damage and cell death by activation of the sphingomyelin pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(1), 73-77.
278. Rufini, A., & Testi, R. (2002). Lipid signaling in CD95-mediated apoptosis. *Phospholipid Metabolism in Apoptosis* (285-308). Springer US.
279. Obeid, L. M., Linardic, C. M., Karolak, L. A., *et al.* (1993). Programmed cell death induced by ceramide. *Science*, 259(5102), 1769-1771.
280. Jarvis, W. D., Grant, S., & Kolesnick, R. N. (1996). Ceramide and the induction of apoptosis. *Clinical cancer research*, 2(1), 1-6.

281. Movsesyan, V. A., Yakovlev, A. G., Dabaghyan, E. A., *et al.* (2002). Ceramide induces neuronal apoptosis through the caspase-9/caspase-3 pathway. *Biochemical and biophysical research communications*, 299(2), 201-207.
282. Hannun, Y. A. (1996). Functions of ceramide in coordinating cellular responses to stress. *Science*, 274(5294), 1855-1859.
283. Kondo, T., Matsuda, T., Tashima, M., *et al.* (2000). Suppression of heat shock protein-70 by ceramide in heat shock-induced HL-60 cell apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 275(12), 8872-8879.
284. Chang, Y., Abe, A., & Shayman, J. A. (1995). Ceramide formation during heat shock: a potential mediator of alpha B-crystallin transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(26), 12275-12279.
285. Kagedal, K., Zhao, M., Svensson, I., *et al.* (2001). Sphingosine-induced apoptosis is dependent on lysosomal proteases. *Biochem. J.*, 359, 335-343.
286. Ruvolo, P. P., Clark, W., Mumby, M., *et al.* (2002). A functional role for the B56 α -subunit of protein phosphatase 2A in ceramide-mediated regulation of Bcl2 phosphorylation status and function. *Journal of Biological Chemistry*, 277(25), 22847-22852.
287. Ahn, J. H., Ko, Y. G., Park, W. Y., *et al.* (1999). Suppression of ceramide-mediated apoptosis by HSP70. *Molecules and cells*, 9(2), 200-206.
288. Cuvillier, O., Pirianov, G., Kleuser, B., *et al.* (1996). Suppression of ceramide-mediated programmed cell death by sphingosine-1-phosphate. *Nature*, 381, 800-803.
289. Martin, S., Reutelingsperger, C. P., McGahon, A. J. *et al.* (1995). Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *The Journal of experimental medicine*, 182(5), 1545-1556.
290. Schild, H., & Rammensee, H. G. (2000). gp96—the immune system’s Swiss army knife. *Nat Immunol*, 1(2), 100-101.
291. Kalinowska, M., Garncarz, W., Pietrowska, M., *et al.* (2005). Regulation of the human apoptotic DNase/RNase endonuclease G: involvement of Hsp70 and ATP. *Apoptosis*, 10(4), 821-830.
292. Jäättelä, M., & Tschopp, J. (2003). Caspase-independent cell death in T lymphocytes. *Nature immunology*, 4(5), 416-423.
293. Foghsgaard, L., Wissing, D., Mauch, D., *et al.* (2001). Cathepsin B acts as a dominant execution protease in tumor cell apoptosis induced by tumor necrosis factor. *The Journal of cell biology*, 153(5), 999-1010.
294. Brunk, U. T., & Svensson, I. (1999). Oxidative stress, growth factor starvation and Fas activation may all cause apoptosis through lysosomal leak. *Redox Report*, 4(1-2), 3-11.
295. Yuan, X. M., Li, W., Dalen, H., *et al.* (2002). Lysosomal destabilization in p53-induced apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(9), 6286-6291.
296. Brunk, U. T., Dalen, H., Roberg, K., *et al.* (1997). Photo-oxidative disruption of lysosomal membranes causes apoptosis of cultured human fibroblasts. *Free Radical Biology and Medicine*, 23(4), 616-626.
297. Turk, B., Stoka, V., Rozman-Pungercar, J., *et al.* (2002). Apoptotic pathways: involvement of lysosomal proteases. *Biological chemistry*, 383(7-8), 1035-1044.
298. Boya, P., Gonzalez-Polo, R. A., Poncet, D., *et al.* (2003). Mitochondrial membrane permeabilization is a critical step of lysosome-initiated apoptosis induced by hydroxychloroquine. *Oncogene*, 22(25), 3927-3936.
299. Guicciardi, M. E., Deussing, J., Miyoshi, H., *et al.* (2000). Cathepsin B contributes to TNF- α -mediated hepatocyte apoptosis by promoting mitochondrial release of cytochrome c. *Journal of Clinical Investigation*, 106(9), 1127.

300. Mandic, A., Viktorsson, K., Strandberg, L., *et al.* (2002). Calpain-mediated Bid cleavage and calpain-independent Bak modulation: two separate pathways in cisplatin-induced apoptosis. *Molecular and cellular biology*, 22(9), 3003-3013.
301. Sutton, V. R., Davis, J. E., Cancilla, M., *et al.* (2000). Initiation of apoptosis by granzyme B requires direct cleavage of bid, but not direct granzyme B-mediated caspase activation. *The Journal of experimental medicine*, 192(10), 1403-1414.
302. Van De Craen, M., Van Den Brande, I., Declercq, W., *et al.* (1997). Cleavage of caspase family members by granzyme B: a comparative study in vitro. *European journal of immunology*, 27(5), 1296-1299.
303. Cross, A. R., & Jones, O. T. G. (1991). Enzymic mechanisms of superoxide production. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1057(3), 281-298.
304. Freeman, B. A., & Crapo, J. D. (1982). Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 47(5), 412.
305. Green, D. R., & Reed, J. C. (1998). Mitochondria and apoptosis. *Science*, 281(5381), 1309.
306. Boveris, A., Oshino, N., & Chance, B. (1972). The cellular production of hydrogen peroxide. *Biochem. j*, 128, 617-630.
307. Chance, B., Sies, H., & Boveris, A. (1979). Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev*. 59, 527-605.
308. Hwang, C., Sinskey, A. J., & Lodish, H. F. (1992). Oxidized redox state of glutathione in the endoplasmic reticulum. *Science*, 257(5076), 1496-1502.
309. Halliwell, B., Gutteridge, J., & Cross, C. E. (1992). Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now? *The Journal of laboratory and clinical medicine*, 119(6), 598-620.
310. Kehrer, J. P. (2000). The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology*, 149(1), 43-50.
311. Halliwell, B., Clement, M. V., & Long, L. H. (2000). Hydrogen peroxide in the human body. *FEBS letters*, 486(1), 10-13.
312. Trenam, C. W., Blake, D. R., & Morris, C. J. (1992). Skin inflammation: reactive oxygen species and the role of iron. *Journal of investigative dermatology*, 99(6), 675-682.
313. Toledano, B. J., Bastien, Y., Noya, F., *et al.* (1997). Platelet-activating factor abrogates apoptosis induced by cross-linking of the surface IgM receptor in a human B lymphoblastoid cell line. *The Journal of Immunology*, 158(8), 3705-3715.
314. Cadet, J., Delatour, T., Douki, T., *et al.* (1999). Hydroxyl radicals and DNA base damage. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 424(1), 9-21.
315. Huie, R. E., & Padmaja, S. (1993). The reaction of NO with superoxide. *Free radical research*, 18(4), 195-199.
316. Husain, S. R., Cillard, J., & Cillard, P. (1987). Hydroxyl radical scavenging activity of flavonoids. *Phytochemistry*, 26(9), 2489-2491.
317. Suzuki, Y. J., Forman, H. J., & Sevanian, A. (1997). Oxidants as stimulators of signal transduction. *Free Radical Biology and Medicine*, 22(1), 269-285.
318. Babior, B. M. (2000). Phagocytes and oxidative stress. *The American journal of medicine*, 109(1), 33-44.
319. Ame, S. N., Shigrenaga, M. K., & Hagen, T. M. (1993). Oxidants, antioxidants and degenerative diseases of ageing. *Proceedings of the national Academy of Sciences of the United States of America*, 90, 7915-7922.
320. Sies, H. (1995). Strategies of antioxidant defense. *Pharmacological Research*, 31, 161.

321. Halliwell, B. (2000). The antioxidant paradox. *The Lancet*, 355(9210), 1179-1180
322. Halliwell, B., Aeschbach, R., Löliger, J., *et al.* (1995). The characterization of antioxidants. *Food and Chemical Toxicology*, 33(7), 601-617.
323. Finkel, T., & Holbrook, N. J. (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, 408(6809), 239-247.
324. Kang, S. W., Chae, H. Z., Seo, M. S., *et al.* (1998). Mammalian peroxiredoxin isoforms can reduce hydrogen peroxide generated in response to growth factors and tumor necrosis factor- α . *Journal of Biological Chemistry*, 273(11), 6297-6302.
325. Zhang, P., Liu, B., Seo, M. S., *et al.* (1997). Thioredoxin peroxidase is a novel inhibitor of apoptosis with a mechanism distinct from that of Bcl-2. *Journal of Biological Chemistry*, 272(49), 30615-30618.
326. Fridovich, I. (1995). Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annual review of biochemistry*, 64(1), 97-112.
327. Matés, J. M. (1999). Antioxidant Enzymes and their Implications in Pathophysiologic Processes. *Frontiers in Bioscience*, 4, 339-345.
328. Babior, B. M. (1997). Superoxide: a two-edged sword. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 30, 141-155.
329. Tyler, D. D. (1975). Polarographic assay and intracellular distribution of superoxide dismutase in rat liver. *Biochem. J.*, 147, 493-504.
330. Majima, H. J., Oberley, T. D., Furukawa, K., *et al.* (1998). Prevention of mitochondrial injury by manganese superoxide dismutase reveals a primary mechanism for alkaline-induced cell death. *Journal of Biological Chemistry*, 273(14), 8217-8224.
331. Nohl, H., Gille, L., & Kozlov, A. V. (1998). Antioxidant-derived prooxidant formation from ubiquinol. *Free Radical Biology and Medicine*, 25(6), 666-675.
332. Dallner, G., & Sindelar, P. J. (2000). Regulation of ubiquinone metabolism. *Free Radical Biology and Medicine*, 29(3), 285-294.
333. Nohl, H., Kozlov, A. V., Staniek, K., *et al.* (2001). The multiple functions of coenzyme Q. *Bioorganic chemistry*, 29(1), 1-13.
334. Kagan, V. E., Arroyo, A., Tyurin, V. A., *et al.* (1998). Plasma membrane NADH-coenzyme Q₀ reductase generates semiquinone radicals and recycles vitamin E homologue in a superoxide-dependent reaction. *FEBS letters*, 428(1), 43-46.
335. Larson, R. A. (1997). Naturally occurring antioxidants. *CRC Press*.
336. Di Mascio, P., Kaiser, S., & Sies, H. (1989). Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher. *Archives of biochemistry and biophysics*, 274(2), 532-538.
337. Conn, P. F., Schalch, W., & Truscott, T. G. (1991). The singlet oxygen and carotenoid interaction. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 11(1), 41-47.
338. Burri, B. J. (1997). Beta-carotene and human health: a review of current research. *Nutrition Research*, 17(3), 547-580.
339. Palace, V. P., Khaper, N., Qin, Q., *et al.* (1999). Antioxidant potentials of vitamin A and carotenoids and their relevance to heart disease. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(5), 746-761.
340. Podmore, I. D., Griffiths, H. R., Herbert, K. E., *et al.* (1998). Vitamin C exhibits pro-oxidant properties. *Nature*, 392(6676), 559-559.
341. Halliwell, B. (1999). Vitamin C: poison, prophylactic or panacea? *Trends in biochemical sciences*, 24(7), 255-259.
342. May, J. M. (1999). Is ascorbic acid an antioxidant for the plasma membrane? *The FASEB journal*, 13(9), 995-1006.
343. Arrigoni, O., & De Tullio, M. C. (2002). Ascorbic acid: much more than just an antioxidant. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1569(1), 1-9.

344. Theriault, A., Chao, J. T., Wang, Q. I., *et al.* (1999). Tocotrienol: a review of its therapeutic potential. *Clinical biochemistry*, 32(5), 309-319.
345. Packer, J. E., Slater, T., & Willson, R. L. (1979). Direct observation of a free radical interaction between vitamin E and vitamin C. *Nature*, 278, 737-738.
346. Burton, G. W., & Ingold, K. U. (1981). Autoxidation of biological molecules. 1. Antioxidant activity of vitamin E and related chain-breaking phenolic antioxidants in vitro. *Journal of the American Chemical Society*, 103(21), 6472-6477.
347. Buettner, G. R. (1993). The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, α -tocopherol, and ascorbate. *Archives of biochemistry and biophysics*, 300(2), 535-543.
348. Noroozi, M., Angerson, W. J., & Lean, M. E. (1998). Effects of flavonoids and vitamin C on oxidative DNA damage to human lymphocytes. *The American journal of clinical nutrition*, 67(6), 1210-1218.
349. Cao, G., Sofic, E., & Prior, R. L. (1997). Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. *Free Radical Biology and Medicine*, 22(5), 749-760.
350. Yang, B., Kotani, A., Arai, K., *et al.* (2001). Relationship of electrochemical oxidation of catechins on their antioxidant activity in microsomal lipid peroxidation. *Chemical and pharmaceutical bulletin*, 49(6), 747-751.
351. Barbouti, A., Doulias, P. T., Nouis, L., *et al.* (2002). DNA damage and apoptosis in hydrogen peroxide-exposed Jurkat cells: bolus addition versus continuous generation of H₂O₂. *Free Radical Biology and Medicine*, 33(5), 691-702.
352. Bejarano, I., Espino, J., Marchena, A. M., *et al.* (2011). Melatonin enhances hydrogen peroxide-induced apoptosis in human promyelocytic leukaemia HL-60 cells. *Molecular and cellular biochemistry*, 353(1-2), 167-176.
353. Cho, S. G., & Choi, E. J. (2002). Apoptotic signaling pathways: caspases and stress-activated protein kinases. *Journal of biochemistry and molecular biology*, 35(1), 24-27.
354. Shi, Y. (2004). Caspase activation, inhibition, and reactivation: a mechanistic view. *Protein Science*, 13(8), 1979-1987.
355. Jornot, L., Mirault, M. E., & Junod, A. F. (1991). Differential expression of hsp70 stress proteins in human endothelial cells exposed to heat shock and hydrogen peroxide. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 5(3), 265-275.
356. Singh, M., Sharma, H., & Singh, N. (2007). Hydrogen peroxide induces apoptosis in HeLa cells through mitochondrial pathway. *Mitochondrion*, 7(6), 367-373.
357. Hsu, S. F., Hsu, C. C., Cheng, B. C., *et al.* (2014). Cathepsin B is involved in the heat shock induced cardiomyocytes apoptosis as well as the anti-apoptosis effect of HSP-70. *Apoptosis*, 19(11), 1571-1580.
358. Massa, S. M., Swanson, R. A., & Sharp, F. R. (1995). The stress gene response in brain. *Cerebrovascular and brain metabolism reviews*, 8(2), 95-158.
359. Armstrong, J. N., Plumier, J. C., Robertson, H. A., *et al.* (1996). The inducible 70,000 molecular weight heat shock protein is expressed in the degenerating dentate hilus and piriform cortex after systemic administration of kainic acid in the rat. *Neuroscience*, 74(3), 685-693.
360. Silomon, M., Bauer, I., Bauer, M., *et al.* (2007). Induction of heme oxygenase-1 and heat shock protein 70 in rat hepatocytes: the role of calcium signaling. *Cellular and Molecular Biology Letters*, 12(1), 25-38.
361. Kiang, J. G., Ding, X. Z., & McClain, D. E. (1996). Thermotolerance attenuates heat-induced increases in [Ca²⁺]_i and HSP-72 synthesis but not heat-induced intracellular acidification in human A-431 cells. *Journal of investigative medicine: the official publication of the American Federation for Clinical Research*, 44(2), 53-63.

362. Shu, C. W., Cheng, N. L., Chang, W. M., *et al.* (2005). Transactivation of hsp70-1/2 in geldanamycin-treated human non-small cell lung cancer H460 cells: Involvement of intracellular calcium and protein kinase C. *Journal of cellular biochemistry*, 94(6), 1199-1209.
363. De Benedetti, A., & Baglioni, C. (1986). Translational regulation of the synthesis of a major heat shock protein in HeLa cells. *Journal of Biological Chemistry*, 261(33), 15800-15804.
364. Theodorakis, N. G., Banerji, S. S., & Morimoto, R. I. (1988). HSP70 mRNA translation in chicken reticulocytes is regulated at the level of elongation. *Journal of Biological Chemistry*, 263(28), 14579-14585.
365. Thompson, E. B. (1998). The many roles of c-Myc in apoptosis. *Annual review of physiology*, 60(1), 575-600.
366. Luo, X., Tao, L., Lin, P., *et al.* (2012). Extracellular heat shock protein 72 protects schwann cells from hydrogen peroxide-induced apoptosis. *Journal of neuroscience research*, 90(6), 1261-1269.
367. Lanneau, D., Brunet, M., Frisan, E., *et al.* (2008). Heat shock proteins: essential proteins for apoptosis regulation. *Journal of cellular and molecular medicine*, 12(3), 743-761.
368. Mehlen, P., Schulze-Osthoff, K., & Arrigo, A. P. (1996). Small stress proteins as novel regulators of apoptosis heat shock protein 27 blocks Fas/APO-1-and staurosporine-induced cell death. *Journal of Biological Chemistry*, 271(28), 16510-16514.
369. Rogalla, T., Ehrnsperger, M., Preville, X., *et al.* (1999). Regulation of Hsp27 oligomerization, chaperone function, and protective activity against oxidative stress/tumor necrosis factor α by phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry*, 274(27), 18947-18956.
370. Park, Y. M., Han, M. Y., Blackburn, R. V., *et al.* (1998). Overexpression of HSP25 reduces the level of TNF α -induced oxidative DNA damage biomarker, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, in L929 cells. *Journal of cellular physiology*, 174(1), 27-34.
371. Paul, C., Manero, F., Gonin, S., *et al.* (2002). Hsp27 as a negative regulator of cytochrome C release. *Molecular and Cellular Biology*, 22(3), 816-834.
372. Bruey, J. M., Ducasse, C., Bonniaud, P., *et al.* (2000). Hsp27 negatively regulates cell death by interacting with cytochrome c. *Nature cell biology*, 2(9), 645-652.
373. Chauhan, D., Li, G., Hideshima, T., *et al.* (2003). Hsp27 inhibits release of mitochondrial protein Smac in multiple myeloma cells and confers dexamethasone resistance. *Blood*, 102(9), 3379-3386.
374. Garrido, C., Bruey, J. M., Fromentin, A., *et al.* (1999). HSP27 inhibits cytochrome c-dependent activation of procaspase-9. *The FASEB Journal*, 13(14), 2061-2070.
375. Concannon, C. G., Orrenius, S., & Samali, A. (2001). Hsp27 inhibits cytochrome c-mediated caspase activation by sequestering both pro-caspase-3 and cytochrome c. *Gene expression*, 9(4-5), 195-201.
376. Voss, O. H., Batra, S., Kolattukudy, S. J., *et al.* (2007). Binding of caspase-3 prodomain to heat shock protein 27 regulates monocyte apoptosis by inhibiting caspase-3 proteolytic activation. *Journal of Biological Chemistry*, 282(34), 25088-25099.
377. Parcellier, A., Schmitt, E., Gurbuxani, S., *et al.* (2003). HSP27 is a ubiquitin-binding protein involved in I- κ B α proteasomal degradation. *Molecular and cellular biology*, 23(16), 5790-5802.
378. Samali, A., Cai, J., Zhivotovsky, B., *et al.* (1999). Presence of a pre-apoptotic complex of pro-caspase-3, Hsp60 and Hsp10 in the mitochondrial fraction of Jurkat cells. *The EMBO journal*, 18(8), 2040-2048.

379. Itoh, H., Komatsuda, A., Ohtani, H., *et al.* (2002). Mammalian HSP60 is quickly sorted into the mitochondria under conditions of dehydration. *European Journal of Biochemistry*, 269(23), 5931-5938.
380. Mosser, D. D., Caron, A. W., Bourget, L., *et al.* (1997). Role of the human heat shock protein hsp70 in protection against stress-induced apoptosis. *Molecular and cellular biology*, 17(9), 5317-5327.
381. Klein, S., & Brune, B. (2002). Heat-shock protein 70 attenuates nitric oxide-induced apoptosis in RAW macrophages by preventing cytochrome c release. *Biochem. J*, 362, 635-641.
382. Wong, H. R., Menendez, I. Y., Ryan, M. A., *et al.* (1998). Increased expression of heat shock protein-70 protects A549 cells against hyperoxia. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 275(4), L836-L841.
383. Wei, Y. Q., Zhao, X., Kariya, Y., *et al.* (1995). Inhibition of proliferation and induction of apoptosis by abrogation of heat-shock protein (HSP) 70 expression in tumor cells. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 40(2), 73-78.
384. Takayama, S., Reed, J. C., & Homma, S. (2003). Heat-shock proteins as regulators of apoptosis. *Oncogene*, 22(56), 9041-9047.
385. Pinhasi-Kimhi, O., Michalovitz, D., Ben-Zeev, A., *et al.* (1986). Specific interaction between the p53 cellular tumour antigen and major heat shock proteins. *Nature*, 320, 182-185.
386. Akakura, S., Yoshida, M., Yoneda, Y., *et al.* (2001). A role for Hsc70 in regulating nucleocytoplasmic transport of a temperature-sensitive p53 (p53Val-135). *Journal of Biological Chemistry*, 276(18), 14649-14657.
387. Zylicz, M., King, F. W., & Wawrzynow, A. (2001). Hsp70 interactions with the p53 tumour suppressor protein. *The EMBO journal*, 20(17), 4634-4638.
388. Park, H. S., Cho, S. G., Kim, C. K., *et al.* (2002). Heat shock protein hsp72 is a negative regulator of apoptosis signal-regulating kinase 1. *Molecular and cellular biology*, 22(22), 7721-7730.
389. Meriin, A. B., Yaglom, J. A., Gabai, V. L., *et al.* (1999). Protein-damaging stresses activate c-Jun N-terminal kinase via inhibition of its dephosphorylation: a novel pathway controlled by HSP72. *Molecular and cellular biology*, 19(4), 2547-2555.
390. Gabai, V. L., Yaglom, J. A., Volloch, V., *et al.* (2000). Hsp72-mediated suppression of c-Jun N-terminal kinase is implicated in development of tolerance to caspase-independent cell death. *Molecular and Cellular Biology*, 20(18), 6826-6836.
391. Park, H. S., Lee, J. S., Huh, S. H., *et al.* (2001). Hsp72 functions as a natural inhibitory protein of c-Jun N-terminal kinase. *The EMBO journal*, 20(3), 446-456.
392. Gabai, V. L., Mabuchi, K., Mosser, D. D., *et al.* (2002). Hsp72 and stress kinase c-jun N-terminal kinase regulate the bid-dependent pathway in tumor necrosis factor-induced apoptosis. *Molecular and cellular biology*, 22(10), 3415-3424.
393. Lee, J. S., Li, C. Y., Ko, Y. G., *et al.* (2000). Hsp70 inhibits apoptosis downstream of cytochrome c release and upstream of caspase-3 activation. *Biochemical Society Transactions*, 28(5), A378-A378.
394. Lee, J. S., Lee, J. J., & Seo, J. S. (2005). HSP70 deficiency results in activation of c-Jun N-terminal Kinase, extracellular signal-regulated kinase, and caspase-3 in hyperosmolarity-induced apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 280(8), 6634-6641.
395. Buzzard, K. A., Giaccia, A. J., Killender, M., *et al.* (1998). Heat shock protein 72 modulates pathways of stress-induced apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 273(27), 17147-17153.

396. Beere, H. M., Wolf, B. B., Cain, K., *et al.* (2000). Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome. *Nature cell biology*, 2(8), 469-475.
397. Saleh, A., Srinivasula, S. M., Balkir, L., *et al.* (2000). Negative regulation of the Apaf-1 apoptosome by Hsp70. *Nature cell biology*, 2(8), 476-483.
398. Komarova, E. Y., Afanasyeva, E. A., Bulatova, M. M., *et al.* (2004). Downstream caspases are novel targets for the antiapoptotic activity of the molecular chaperone hsp70. *Cell stress & chaperones*, 9(3), 265.
399. Creagh, E. M., Carmody, R. J., & Cotter, T. G. (2000). Heat shock protein 70 inhibits caspase-dependent and-independent apoptosis in Jurkat T cells. *Experimental cell research*, 257(1), 58-66.
400. Gurbuxani, S., Schmitt, E., Cande, C., *et al.* (2003). Heat shock protein 70 binding inhibits the nuclear import of apoptosis-inducing factor. *Oncogene*, 22(43), 6669-6678.
401. Gyrð-Hansen, M., Nylandsted, J., & Jäättelä, M. (2004). Heat shock protein 70 promotes cancer cell viability by safeguarding lysosomal integrity. *Cell Cycle*, 3(12), 1484-1485.
402. Bivik, C., Rosdahl, I., & Öllinger, K. (2006). Hsp70 protects against UVB induced apoptosis by preventing release of cathepsins and cytochrome c in human melanocytes. *Carcinogenesis*, 28(3), 537-544.
403. Galea-Lauri, J., Richardson, A. J., Latchman, D. S., *et al.* (1996). Increased heat shock protein 90 (hsp90) expression leads to increased apoptosis in the monoblastoid cell line U937 following induction with TNF-alpha and cycloheximide: a possible role in immunopathology. *The Journal of Immunology*, 157(9), 4109-4118.
404. Pandey, P., Saleh, A., Nakazawa, A., *et al.* (2000). Negative regulation of cytochrome c-mediated oligomerization of Apaf-1 and activation of procaspase-9 by heat shock protein 90. *The EMBO journal*, 19(16), 4310-4322.
405. Zhang, H., & Burrows, F. (2004). Targeting multiple signal transduction pathways through inhibition of Hsp90. *Journal of molecular medicine*, 82(8), 488-499.
406. Pratt, W. B., & Toft, D. O. (2003). Regulation of signaling protein function and trafficking by the hsp90/hsp70-based chaperone machinery. *Experimental Biology and Medicine*, 228(2), 111-133.
407. Lin, K., Rockliffe, N., Johnson, G. G., *et al.* (2008). Hsp90 inhibition has opposing effects on wild-type and mutant p53 and induces p21 expression and cytotoxicity irrespective of p53/ATM status in chronic lymphocytic leukaemia cells. *Oncogene*, 27(17), 2445-2455.
408. Hur, E., Kim, H. H., Choi, S. M., *et al.* (2002). Reduction of hypoxia-induced transcription through the repression of hypoxia-inducible factor-1 α /aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator DNA binding by the 90-kDa heat-shock protein inhibitor radicicol. *Molecular Pharmacology*, 62(5), 975-982.
409. Münster, P. N., Marchion, D. C., Basso, A. D., *et al.* (2002). Degradation of HER2 by ansamycins induces growth arrest and apoptosis in cells with HER2 overexpression via a HER3, phosphatidylinositol 3'-kinase-AKT-dependent pathway. *Cancer research*, 62(11), 3132-3137.
410. Haendeler, J., Hoffmann, J., Rahman, S., *et al.* (2003). Regulation of telomerase activity and anti-apoptotic function by protein-protein interaction and phosphorylation. *FEBS letters*, 536(1), 180-186.
411. Cissel, D. S., & Beaven, M. A. (2000). Disruption of Raf-1/heat shock protein 90 complex and Raf signaling by dexamethasone in mast cells. *Journal of Biological Chemistry*, 275(10), 7066-7070.

412. Basso, A. D., Solit, D. B., Chiosis, G., *et al.* (2002). Akt forms an intracellular complex with heat shock protein 90 (Hsp90) and Cdc37 and is destabilized by inhibitors of Hsp90 function. *Journal of Biological Chemistry*, 277(42), 39858-39866.
413. Datta, S. R., Dudek, H., Tao, X., *et al.* (1997). Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell*, 91(2), 231-241.
414. Cardone, M. H., Roy, N., Stennicke, H. R., *et al.* (1998). Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science*, 282(5392), 1318-1321.
415. Ozes, O. N., Mayo, L. D., Gustin, J. A., *et al.* (1999). NF- κ B activation by tumour necrosis factor requires the Akt serine-threonine kinase. *Nature*, 401(6748), 82-85
416. Cohen-Saidon, C., Carmi, I., Keren, A., *et al.* (2006). Antiapoptotic function of Bcl-2 in mast cells is dependent on its association with heat shock protein 90 β . *Blood*, 107(4), 1413-1420.
417. Li, C. Y., Lee, J. S., Ko, Y. G., *et al.* (2000). Heat shock protein 70 inhibits apoptosis downstream of cytochrome c release and upstream of caspase-3 activation. *Journal of Biological Chemistry*, 275(33), 25665-25671.
418. Kiang, J. G., & Tsokos, G. C. (1998). Heat shock protein 70 kDa: molecular biology, biochemistry, and physiology. *Pharmacology & therapeutics*, 80(2), 183-201.
419. Zou, J., Guo, Y., Guettouche, T., *et al.* (1998). Repression of heat shock transcription factor HSF1 activation by HSP90 (HSP90 complex) that forms a stress-sensitive complex with HSF1. *Cell*, 94(4), 471-480.
420. Ali, A., Bharadwaj, S., O'Carroll, R., *et al.* (1998). HSP90 interacts with and regulates the activity of heat shock factor 1 in *Xenopus* oocytes. *Molecular and Cellular Biology*, 18(9), 4949-4960.
421. Kroeger, P. E., Sarge, K. D., & Morimoto, R. I. (1993). Mouse heat shock transcription factors 1 and 2 prefer a trimeric binding site but interact differently with the HSP70 heat shock element. *Molecular and cellular biology*, 13(6), 3370-3383.
422. Zuo, J., Baler, R., Dahl, G., *et al.* (1994). Activation of the DNA-binding ability of human heat shock transcription factor 1 may involve the transition from an intramolecular to an intermolecular triple-stranded coiled-coil structure. *Molecular and cellular biology*, 14(11), 7557-7568.
423. Price, B. D., & Calderwood, S. K. (1991). Ca²⁺ is essential for multistep activation of the heat shock factor in permeabilized cells. *Molecular and cellular biology*, 11(6), 3365-3368.
424. Ding, X. Z., Tsokos, G. C., & Kiang, J. G. (1998). Overexpression of HSP-70 inhibits the phosphorylation of HSF1 by activating protein phosphatase and inhibiting protein kinase C activity. *The FASEB journal*, 12(6), 451-459.
425. Flaherty, K. M., DeLuca-Flaherty, C., & McKay, D. B. (1990). Three-dimensional structure of the ATPase fragment of a 70 K heat-shock cognate protein. *Nature*, 346(6285), 623-628.
426. Wang, T. F., Chang, J. H., & Wang, C. (1993). Identification of the peptide binding domain of hsc70. 18-Kilodalton fragment located immediately after ATPase domain is sufficient for high affinity binding. *Journal of Biological Chemistry*, 268(35), 26049-26051.
427. Gragerov, A., Zeng, L., Zhao, X., *et al.* (1994). Specificity of DnaK-peptide binding. *Journal of molecular biology*, 235(3), 848-854.
428. Morshauer, R. C., Wang, H., Flynn, G. C., *et al.* (1995). The peptide-binding domain of the chaperone protein Hsc70 has an unusual secondary structure topology. *Biochemistry*, 34(19), 6261-6266.

429. Hightower, L. E., Sadis, S. E., & Takenaka, I. M. (1994). 8 Interactions of Vertebrate hsc70 and hsp70 with Unfolded Proteins and Peptides. *Cold Spring Harbor Monograph Archive*, 26, 179-207.
430. Leung, S. M., & Hightower, L. E. (1997). Mammalian Hsc70 and Hsp70 proteins. *Guidebook to Molecular Chaperones and Protein Folding Catalysts*, 52-58.
431. Rüdiger, S., Buchberger, A., & Bukau, B. (1997). Interaction of Hsp70 chaperones with substrates. *Nature Structural & Molecular Biology*, 4(5), 342-349.
432. Zhu, X., Zhao, X., Burkholder, W. F., *et al.* (1996). Structural analysis of substrate binding by the molecular chaperone DnaK. *Science*, 272(5268), 1606-1614.
433. Oh, H. J., Easton, D., Murawski, M., *et al.* (1999). The Chaperoning Activity of hsp110. *Journal of Biological Chemistry*, 274(22), 15712-15718.
434. Pasquini, L., Petrucci, E., Riccioni, R., *et al.* (2006). Sensitivity and resistance of human cancer cells to TRAIL: mechanisms and therapeutical perspectives. *Cancer Ther*, 4, 47-72.
435. Ashkenazi, A. (2002). Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily. *Nature Reviews Cancer*, 2(6), 420-430.
436. Naismith, J. H., & Sprang, S. R. (1998). Modularity in the TNF-receptor family. *Trends in biochemical sciences*, 23(2), 74-79.
437. Stewart, B. W. (1994). Mechanisms of apoptosis: integration of genetic, biochemical, and cellular indicators. *Journal of the National Cancer Institute*, 86(17), 1286-1296.
438. Daniel, P. T., Wieder, T., Sturm, I., *et al.* (2001). The kiss of death: promises and failures of death receptors and ligands in cancer therapy. *Leukemia*, 15(7), 1022-1032.
439. Thorburn, A. (2004). Death receptor-induced cell killing. *Cellular signalling*, 16(2), 139-144.
440. Luo, X., Budihardjo, I., Zou, H., *et al.* (1998). Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell*, 94(4), 481-490.
441. Li, H., Zhu, H., Xu, C. J., *et al.* (1998). Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell*, 94(4), 491-501.
442. Zou, H., Henzel, W. J., Liu, X., *et al.* (1997). Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell*, 90(3), 405-413.
443. Srinivasula, S. M., Ahmad, M., Fernandes-Alnemri, T., *et al.* (1998). Autoactivation of procaspase-9 by Apaf-1-mediated oligomerization. *Molecular cell*, 1(7), 949-957.
444. Zou, H., Li, Y., Liu, X., *et al.* (1999). An APAF-1· cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *Journal of Biological Chemistry*, 274(17), 11549-11556.
445. Nicholson, D. W., & Thornberry, N. A. (1997). Caspases: killer proteases. *Trends in biochemical sciences*, 22(8), 299-306.
446. Cooper Geoffrey, M. (2000). The cell a molecular approach.
447. Acehan, D., Jiang, X., Morgan, D. G., *et al.* (2002). Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation. *Molecular cell*, 9(2), 423-432.
448. Hu, Y., Benedict, M. A., Ding, L., *et al.* (1999). Role of cytochrome c and dATP/ATP hydrolysis in Apaf-1-mediated caspase-9 activation and apoptosis. *The EMBO journal*, 18(13), 3586-3595.
449. Zhou, P., Chou, J., Olea, R. S., *et al.* (1999). Solution structure of Apaf-1 CARD and its interaction with caspase-9 CARD: a structural basis for specific adaptor/caspase interaction. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(20), 11265-11270.

450. Hill, M. M., Adrain, C., & Martin, S. J. (2003). Portrait of a killer: the mitochondrial apoptosome emerges from the shadows. *Molecular interventions*, 3(1), 19.
451. Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., *et al.* (1997). Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell*, 91(4), 479-489.
452. Chai, J., Du, C., Wu, J. W., *et al.* (2000). Structural and biochemical basis of apoptotic activation by Smac/DIABLO. *Nature*, 406(6798), 855-862.
453. Du, C., Fang, M., Li, Y., *et al.* (2000). Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell*, 102(1), 33-42.