

Chaperony endoplazmatického retikula na povrchu nádorové buňky a v extracelulárním prostředí

Endoplasmic Reticulum Chaperones at the Tumor Cell Surface and in the Extracellular Space

Brychtová V., Vojtěšek B.

Regionální centrum aplikované molekulární onkologie, Masarykův onkologický ústav, Brno

Souhrn

Východiska: Chaperony endoplazmatického retikula jsou stresem indukované proteiny, které mohou být translokovány mimo endoplazmatické retikulum do cytozolu, buněčné membrány, případně extracelulárního prostředí. K transportu chaperonů z endoplazmatického retikula dochází především za podmínek stresu endoplazmatického retikula, přičemž konstitutivní extracelulární exprese chaperonů byla zaznamenána u nádorových onemocnění. Chaperony endoplazmatického retikula lokalizované na povrchu buněk nebo v extracelulárním prostředí zastávají odlišné funkce ve srovnání s jejich endoplazmaticko-retikulární rezidentní variantou, neboť se chovají jako multifunkční receptory a ovlivňují tak buněčnou signalizaci a proliferaci. **Cíl:** Předkládaná přehledová práce se zaměřuje především na expresi chaperonů endoplazmatického retikula na povrchu nádorových buněk a v extracelulárním prostředí. Popisuje možné mechanismy translokace chaperonů endoplazmatického retikula na povrch nádorových buněk zahrnující KDEL transportní mechanismus a retrotranslokační dráhu a dále vliv posttranslačních modifikací chaperonů na jejich lokalizaci v buňce. K nejvíce popsáným chaperonům endoplazmatického retikula detekovaným na membráně nádorových buněk patří GRP78, GRP94, kalretikulín a kalnexin, které se různým způsobem podílejí na signalizaci nádorových buněk. Pozornost je dále věnována imunogenním vlastnostem membránově lokalizovaných chaperonů, neboť tyto chaperony se mohou účastnit imunitních reakcí buněk. Prostřednictvím interakcí s toll-like receptory nebo při prezentaci antigenů se tak mohou podílet na vrozené i adaptivní imunitní odpovědi organismu a také nádorově-specifické imunitě. Exprese chaperonů na povrchu nádorových buněk je potenciálně využitelná ve specificky cílené protinádorové léčbě, stejně tak jako při přípravě léčebných vakcín, proto je závěrečná část práce věnována tomuto tématu.

Klíčová slova

endoplazmatické retikulum – glukózou regulované proteiny – molekulární chaperony – KDEL sekvence – imunobiologie

Práce byla podpořena projektem MŠMT – NPU I – LO1413.

This work was supported by the project MEYS – NPS I – LO1413.

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy.

The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE recommendation for biomedical papers.



Mgr. Veronika Brychtová, Ph.D.
Regionální centrum aplikované
molekulární onkologie
Masarykův onkologický ústav
Žlutý kopec 7
656 53 Brno
e-mail: vebrychtova@mou.cz

Obdrženo/Submitted: 17. 5. 2016
Přijato/Accepted: 20. 7. 2016

<http://dx.doi.org/10.14735/amko20164S25>

Summary

Background: Endoplasmic reticulum chaperones are stress induced proteins capable of translocation into cytosol, cell membrane or extracellular space. The chaperones are transported from the endoplasmic reticulum particularly under endoplasmic reticulum stress conditions, while their constitutive extracellular expression was found in many cancers. Cell surface or extracellular endoplasmic reticulum chaperones take up distinct functions compared to their endoplasmic reticulum resident variants because they act like multifunctional receptors and thus affect cell signaling and proliferation. **Aim:** The presented review focuses primarily on endoplasmic reticulum chaperones expression on the cell surface of cancer cells and into extracellular space. The work describes possible mechanisms of chaperones translocation to the cancer cell surface, including KDEL transport mechanism and retrotranslocation and the influence of chaperone posttranslational modifications on their localization within the cell. Well described cancer cell surface endoplasmic reticulum chaperones include GRP78, GRP94, calreticulin and calnexin that are involved in cancer cell signaling in different ways. The attention is also paid to immunogenic properties of membrane-localized chaperones for their ability to participate in immune reactions. They can take part in innate and adaptive immune response through their interaction with toll-like receptors or during the antigen presentation as well as in tumor-specific immunity. The expression of endoplasmic reticulum chaperones on the cancer cells surface is potentially exploitable in specific antitumor therapy as well as vaccine therapy, thus the final part of this review is dedicated to this topic.

Key words

endoplasmic reticulum – glucose-regulated proteins – molecular chaperones – KDEL sequence – immunobiology

Úvod

Endoplazmatické retikulum (ER) a nava-
zující Golgiho komplex je nepostrada-
telný buněčný aparát, ve kterém probíhá
velké množství procesů vč. biosyntézy
proteinů, jejich sbalení do stabilního
prostorového uspořádání a následné
posttranslační modifikace. Globulární
proteiny se v buňkách mohou za ur-
čitých podmínek vyskytovat v nesba-
lené nebo jen částečně sbalené formě,
a to bezprostředně po vlastní bio-
syntéze nebo při průchodu buněčnými
membránami. K denaturaci proteinu
nebo nedokonalému skládání naopak
dochází za stresových podmínek, jako
je vyšší teplota, změna pH nebo hy-
poxie. Základní ochranu buňky před
vznikem denaturovaných a agregujících

proteinů zajišťují molekulární chape-
rony. Chaperony lze zařadit do několika
vzájemně nepříbuzných rodin proteinů,
které se kromě prevence vzniku amorfních
proteinových agregátů podílejí
i na regulaci vápníkového metabolismu
buňky. Mezi nejvíce abundantní lumi-
nální chaperony ER patří glukózou re-
gulované proteiny (GRP), které zahr-
nují protein GRP78 kódovaný genem
HSPA5, dále protein GRP94 kódovaný
genem *HSP90B1*, protein GRP170 kó-
dovaný genem *HYOU1* a protein GRP75
kódovaný genem *HSPA9* z rodiny pro-
teinů teplotního šoku (heat shock pro-
teins – HSP) a multifunkční protein kal-
retikulín. Molekulární chaperony se
dělí do několika rodin na základě mo-
lekulové hmotnosti (pro přehled-

nost tab. 1). Kromě chaperonů obsa-
huje lumen ER množství enzymů, které
se také účastní formování prostoro-
vého uspořádání proteinů. Patří mezi
ně enzymy z rodiny protein disulfid izo-
meráz (PDI) s nejvíce zastoupenými
ERP57 a PDI a skupina protein prolyl
izomeráz [1,2].

Vysoká intracelulární hladina chape-
ronů je typická pro většinu nádorů a je
dána zvýšenou proteosyntézou a nároky
na kapacitu ER u proliferaujících nádoro-
vých buněk. Udržováním homeostázy
ER přispívají chaperony ER k přežívání
nádorových buněk a jejich proliferaci.
Proteomickou analýzou bylo zjištěno, že
buněčná membrána nádorových buněk
obsahuje poměrně velké množství HSP
a GRP [3], které jsou preferenčně ex-
primovány na povrchu nádorových
buněk ve srovnání s buňkami zdravé
tkáně (např. GRP78) [4–6]. Ukazuje se, že
funkce luminálních chaperonů přesahují
hranice ER a kromě skládání proteinů za-
hrnují i další procesy, jako je regulace
proliferace, apoptóza a imunitní reakce
buněk [7–10].

Lokalizace chaperonů ER

Molekulární chaperony byly dlouhou
dobu považovány za typické intracelu-
lární proteiny s charakteristickou subce-
lulární lokalizací. Později se ukázalo, že se
vyskytují i v buněčné membráně a v ex-
tracelulárním prostoru. V současnosti je
známo, že za normálních podmínek se
chaperony vyskytují téměř ve všech bu-
něčných kompartmentech, kde se po-

Tab. 1. Rozdělení molekulárních chaperonů do rodin.

	gen	protein	synonyma	lokalizace
Rodina HSP70	<i>HSPA9</i>	HSP70-9	GRP75/mtHSP70	mitochondrie (ER)
	<i>HSPA5</i>	HSP70-5	BiP/GRP78	ER
	<i>HYOU1</i>	HYOU1	GRP170, ORP-150	ER
	<i>HSPA1A</i>	HSP70	HSX70, HSP72, HSP70i, HSP70-1	jádro/cytozol
Rodina HSP90	<i>HSP90AA1</i>	HSP90- α_1	HSP90A, HSP89, HSP86	cytozol
	<i>HSP90AA2</i>	HSP90- α_2	HSP90alpha	cytozol
	<i>HSP90AB1</i>	HSP90- β	HSP84, HSP90B	cytozol
	<i>HSP90B1</i>	endo- plazmin	Gp96, GRP94	ER

ER – endoplazmatické retikulum

dílejší na skládání nově vznikajících proteinů, jejich transportu přes membrány a také brání agregaci proteinů [11].

Chaperony ER jsou solubilní proteiny, které se v lumen ER a v organelách podél celé sekreční dráhy (cis-Golgiho aparát) účastní posttranslačních úprav proteinů. Z cis-Golgiho komplexu jsou „recyklovány“ a navraceny zpět do ER tzv. COPI (Coat protein 1) transportním systémem prostřednictvím transportních váčků. Tento mechanismus rozpoznává ER rezidentní proteiny na základě charakteristické sekvence na C-konci obsahující aminokyseliny Lys-Asp-Glu-Leu (zkracováno KDEL) [12]. Chaperony mohou nést různé alternativy KDEL sekvence, které však mají obdobnou funkci [13]. Proteiny vybavené KDEL sekvencí nebo její alternativou se pak účastní vezikulárního transportu proteinů mezi ER, ER-Golgiho komplexem a trans-Golgiho komplexem, aniž by docházelo k jejich uvolňování ven z buňky a ztrátám. Chaperony nesoucí KDEL sekvenci jsou vychytávány pomocí KDEL receptorů přítomných v organelách sekreční dráhy a následně vráceny zpět do ER [14]. Doposud byly popsány tři typy KDEL receptorů (KDEL1, KDEL2, KDEL3), přičemž každý z nich interaguje s jedinečnými retenčními motivy chaperonů ER [13].

Přestože jsou chaperony ER aktivně zadržovány v ER, vyskytují se i v ostatních organelách, jako je buněčné jádro, mitochondrie a buněčná membrána. Mimo ER se množství chaperonů z rodiny HSP běžně nachází v cytozolu [15]. Některé z nich mohou asociovat s fosfolipidy na lumenální straně buněčné membrány a asistovat při exportu proteinů z buňky [16]. V mitochondriích jsou zase nejvíce zastoupeny chaperony z rodin HSP60 a HSP70, které se zde účastní biogeneze mitochondriálních proteinů [17]. Chaperony se dále účastní transportu proteinů z cytozolu do mitochondrií a ER [18]. Jaderné chaperony se naopak podílejí na interakcích DNA s kompletně sbalenými proteiny, a to při vzniku multiproteinových komplexů v průběhu remodelace chromatinu [18]. V extracelulárním prostředí byly chaperony detekovány v extracelulární matrix a tělních tekutinách, jako je krevní sérum a moč (tab. 2) [19].

Tab. 2. Lokalizace chaperonů ER mimo ER/Golgiho komplex.

Protein	Lokalizace mimo ER/Golgiho komplex
HSP47/serpin H1	buněčný povrch, extracelulární prostor, krevní sérum
GRP78/BiP	buněčný povrch, jádro, cytozol, mitochondrie
GRP94/gp96	buněčný povrch, jádro
GRP170	buněčný povrch
PDI	buněčný povrch
ERP57	buněčný povrch, jádro, cytozol, extracelulární prostor, moč
kalretikulín	buněčný povrch, cytozol, extracelulární prostor

ER – endoplazmatické retikulum

Mechanismus translokace chaperonů ER na buněčný povrch a do extracelulárního prostoru

Mechanismus transportu chaperonů ER nesoucích KDEL sekvenci na povrch živočišných buněk je vysvětlován několika teoriemi. Za normálních podmínek se chaperony ER dostávají do extracelulárního prostředí pomocí KDEL receptorů cestou tzv. anterográdního transportu. Za podmínek buněčného stresu tento systém naopak napomáhá zadržování chaperonů v ER-Golgiho komplexu obráceným, tzv. retrográdním způsobem, kdy jsou nároky buňky na aktivitu chaperonů ER zvýšené [20]. Dále se chaperony ER mohou směrem ven z buňky dostávat jako součást sekrečních váčků, přičemž retence pomocí KDEL receptorů je překonána z důvodu: 1. nasycení kapacity KDEL receptorů např. v důsledku stresu ER v průběhu tumorigeneze, 2. mutace v oblasti KDEL sekvence nebo KDEL receptorů [14,19], nebo 3. maskování KDEL retenčního motivu asociovaným proteinem [21]. Další způsoby, jakými mohou chaperony ER „uniknout“ z prostředí ER, zahrnují uvolňování pomocí extracelulárních váčků (případně exozomů) [22], případně za podmínek buněčného stresu to může být transport prostřednictvím tzv. retrotranslokační dráhy. Tato dráha je součástí ER-asociované degradace proteinů (ERAD), která zbavuje buňku nestabilních proteinů cestou ubiquitinace a degradace proteazomem [23]. Chaperony relokované tímto způsobem (např. kalretikulín) se dostávají z ER do cytozolu, avšak není

zcela jasné, zdali je tato dráha současně i zdrojem membránových nebo extracelulárních variant chaperonů ER [19].

Lokalizaci chaperonů ER může kromě výše zmiňovaných transportních drah ovlivňovat také jejich posttranslační modifikace, jak je to známo u kalretikulínu. Extracelulárně se vyskytující forma kalretikulínu je glykosylovaná, naopak neglykosylovaná forma je výhradně intracelulární, neboť není schopná projít anterográdní sekreční dráhou ven z buňky [20]. Glykosylace nebo jiná modifikace tak může maskovat signální tetrapeptid KDEL a zabránit tak jeho vazbě s receptorem. U proteinu GRP78 bylo v blízkosti KDEL sekvence identifikováno potenciální glykosylační místo (Thr648) [24,25]. Současně byly popsány další odlišně lokalizované posttranslačně modifikované varianty kalretikulínu v buňce zahrnující arginylovanou formu na buněčné membráně a v cytozolu [26] a citrullinovanou formu související s imunitní aktivitou u revmatoidní artritidy [27,28].

Imunogenní vlastnosti chaperonů ER

Chaperony ER se mohou díky lokalizaci do buněčné membrány nebo extracelulárního prostředí přímo podílet na modulaci imunitní odpovědi buněk [29]. Imunogenní vlastnosti extracelulárních chaperonů ER jsou spjaté s proteiny, které se na povrchu buňky chovají jako „signál označující nebezpečí“ a jsou schopné interagovat s receptory buněk imunitního systému. Je známo, že extracelu-

lární chaperony, jako jsou HSP27, HSP60, HSP70, GRP94, HSP90 nebo GRP170, se mohou vázat s TLR (toll like receptor) receptory, které jsou obvykle exprimovány dendritickými buňkami a makrofágy, a tudíž se účastní vrozené imunitní odpovědi organismu [29]. Jako chaperony ER schopné aktivovat imunitní systém na povrchu buňky nebo v extracelulárním prostředí byly popsány kalretikulín, GRP78 a GRP94 [30–34]. Kromě toho je známo, že GRP96 je schopný aktivovat nádorově-specifickou imunitu [35].

GRP94 a GRP170 se podílejí na prezentaci antigenu a jejich sekretované formy jsou schopné vyvolat vrozenou a adaptivní imunitní odpověď [2]. Na základě výše uvedených vlastností se vybrané chaperony ER ukazují jako potenciálně vhodné cíle pro vývoj protinádorových léčebných vakcín.

Chaperony ER na povrchu nádorových buněk

ER je jednou z klíčových organel pro udržení stavu buněčné homeostázy. Pokud jsou funkce ER narušeny v důsledku nedostatku živin, hypoxie, změn v metabolismu vápníku, změn v oxido-redukční rovnováze nebo změn v hodnotě pH, dochází ke stresu ER a následnému hromadění nesbalených nebo špatně sbalených proteinů.

V mikroprostředí nádoru jsou buňky vystaveny stresu ER v důsledku změn buněčného metabolismu na mnoha úrovních. Na tyto podmínky pak reagují mimo jiné i extracelulární expresí chaperonů ER.

GRP78/BiP

Jedním z nejlépe popsaných chaperonů ER je GRP78 (BiP). GRP78 patří do rodiny HSP70 a je považován za hlavní chaperon ER, který zprostředkovává skládání proteinů vč. jejich kontroly, účastní se vápníkového metabolismu udržováním jeho homeostázy a podílí se na signalizaci během stresu ER. V prostředí nádoru nebo za podmínek stresu ER je exprese GRP78 výrazně indukovaná. GRP78 byl kromě ER detekován také na membráně nádorových buněk, přičemž buňky zdravé tkáně povrchový GRP78 normálně neexprimují. Mechanismus, kterým se GRP78 dostává na povrch, nebyl

doposud přesně popsán. K relokalizaci dochází pravděpodobně v důsledku přesycení kapacity retenčního systému ER, nebo je GRP78 transportován společně s klientními proteiny (může se jednat o adaptivní mechanismus nádorových buněk). Povrchový GRP78 má také zcela jiné funkce než jeho ER varianta, protože se chová jako multifunkční receptor, jehož aktivovaná forma podporuje nádorové bujení. GRP78 je schopný vázat α 2-makroglobulin a podporovat tak proliferaci, přežívání a metastazování nádorových buněk [36–38]. Interakce s α 2-makroglobulinem dále vede k aktivaci signálních kaskád ERK1/2, p38 MAPK, Akt, PI3K a NF- κ B [37,39–42]. Kromě výše uvedeného může GRP78 membránový receptor jako povrchový protein podporovat tvorbu autoprotiláttek, které mají vlastnosti agonistické s α 2-makroglobulinem a po interakci s receptorem vedou k indukci proliferace nádorových buněk [43,44].

GRP94/Gp96

GRP94 je nejvíce abundantním proteinem ER a podobně jako u GRP78 jeho zvýšená exprese souvisí s nádorovou transformací [45]. Jako chaperon ER nese C-koncový ER retenční peptid KDEL, který však nefunguje absolutně. Z toho důvodu byl GRP94 detekován i na membráně nádorových buněk a v extracelulární tekutině (pankreatické šťávě) [46–48]. Jeho funkce na membráně však není zcela jasná, ale je známo, že GRP94 je schopný aktivovat dendritické buňky a nádorově specifické T buňky [49].

Kalretikulín a kalnexin

Kalretikulín je vysoce konzervovaný chaperon ER, který ačkoliv je majoritně lokalizován do ER, vykazuje množství dalších intra- i extracelulárních lokalizací. V ER je jeho hlavní úlohou asistovat společně se svým homologem kalnexinem při skládání a kontrole nově syntetizovaných glykoproteinů. Povrchově lokalizovaný kalretikulín má různé funkce, které zahrnují podporu rozpadu fokálních adhezí a migrace [50,51], dále zprostředkování fagocytózy umírajících nádorových buněk [52–54]. Kalnexin patří stejně jako kalretikulín mezi proteiny ER detekované na buněčné membráně. Funkcí povr-

chově lokalizovaného kalnexinu je zřejmě modulace adhezivních vlastností a integrinem řízené buněčné signalizace [55].

Extracelulární HSP70 a HSP90

Přestože HSP70 a HSP90 nejsou chaperony ER, uvádíme je zde z toho důvodu, že jejich extra- i intracelulární funkce jsou poměrně dobře popsány a současně se jedná o homology ER rezidentních chaperonů (GRP78, GRP94), které jsou nádorovými buňkami uvolňovány.

HSP70

Členové rodiny HSP70 asistují při skládání nascentních proteinů a jsou důležitou součástí procesů zajišťujících buněčnou homeostázu. V nádorových buňkách je exprese HSP70 často zvýšena a koreluje s horší prognózou onemocnění [56]. Extracelulární HSP70 se vyskytuje jako solubilní protein, dále potom v komplexu s antigenními peptidy nebo jako součást exozomů. Tyto odlišné varianty interagují s povrchovými receptory nádorových buněk, buněk imunitního systému, endotelovými a epitelovými buňkami. Extracelulární HSP70 v komplexu s nádorovými peptidy interaguje s receptory na povrchu antigen-prezentujících buněk (CD91, SREC-1) [57,58] a je schopný aktivovat NK buňky [37]. Samotný extracelulární HSP70 spouští nespecifické imunitní reakce (signalizace prostřednictvím aktivace TLR2/4 receptoru) [58], ovlivňuje invazivitu nádorových buněk regulací aktivity matrix-metaloproteázy [59] a aktivací zánětlivého mikroprostředí (produkce reaktivních kyslíkových radikálů) [60].

HSP90

HSP90 je vysoce exprimovaný chaperon, který ovlivňuje funkci a stabilitu velkého množství klientních proteinů. V jaderných buňkách obratlovců se vyskytuje ve dvou cytozolárních variantách – HSP90 α a HSP90 β . HSP90 se ve zdravých buňkách za fyziologických podmínek vyskytuje nejčastěji v cytoplazmě, malá frakce je přítomna také v jádře.

V klidovém stavu buňky HSP90 extracelulárně neuvolňuje, ačkoliv k jeho sekreci dochází v důsledku stresových podmínek, jako je hypoxie, hladovění, virová infekce, γ -záření nebo v přítomnosti reaktivních kyslíkových radikálů [61–65].

Naopak nádorové buňky vykazují konstitutivní extracelulární expresi HSP90, obzvláště v případě nádorů s abnormálně vysokou expresí HIF-1 α [66]. Mezi popsané buněčné regulátory sekrece HSP90 patří nádorový supresor p53, HIF-1 α a ubikvitin ligáza Hectd1 [65].

HSP90 nese sekreční signální peptid a je uvolňován z buněk prostřednictvím exozomální sekreční dráhy [67]. Jeho hlavní funkcí je podpora motility a nádorové progresy, za což je odpovědný 115 aminokyselin dlouhý peptid (aminokyseliny 236-350) na povrchu proteinu. Mezi extracelulární interakční partnery HSP90 patří HER2 receptor, matrix metaloproteázy, LRP-1 [68].

HSP90 byl podobně jako i další HSP proteiny detekován jako molekula cirkulující v krvi. Zvýšené hladiny plazmatického HSP90 α byly popsány u pacientů s karcinomem prsu, plic, pankreatu a jater. Přesto diagnostický význam detekce HSP90 v krvi zatím není zcela jednoznačný [66].

Povrchové a extracelulární chaperony ER a protinádorová léčba

Preferenční exprese GRP78 na povrchu nádorových buněk umožňuje využití specificky cílené protinádorové léčby s minimálním nežádoucím účinkem na zdravé buňky. Potenciálním cílem této léčby jsou současně podpurné buňky nádorové tkáně, na jejichž povrchu byl GRP78 také identifikován [2]. Léčebné strategie zaměřené na GRP78 využívají např. peptidových ligandů konjugovaných s cytotoxickým agens. Aplikace specifické IgG monoklonální protilátky (Mab159) spouští endocytózu a degradaci povrchového GRP78 a současně apoptózu nádorových buněk (xenograftů karcinomu plic, tlustého střeva, metastáz karcinomu prsu a melanomu) prostřednictvím inhibice PI3K signalizace [39]. Tato protilátka je potenciálně využitelná pro *in vivo* zobrazování při výběru vhodného pacienta pro léčbu protinádorovou Mab159 protilátkou nebo pro sledování progresy onemocnění a odpovědi na léčbu.

Další léčebnou strategií je protinádorová vakcinace, která umožňuje personalizovanou léčbu pacientů s nádorovým onemocněním.

Doposud bylo testováno využití autologního sekrečního fúzního proteinu GRP94 s nádorovými antigenními peptidy. Tato vakcína měla na myších modelech antiproliferativní a antimetastatický efekt, avšak v klinických testech byl její imunogenní účinek velmi variabilní [69–71]. Využití GRP170 fúzního proteinu s plnodélkovými antigeny se ukázalo jako efektivní při léčbě nádorů prostaty na myších modelech [72]. Aktivace dendritických buněk a protinádorová imunitní odpověď byla posílena při syntéze fúzního proteinu GRP170 s NF- κ B aktivující doménou bakteriálního proteinu flagelinu u metastazujících nádorů u myši [73].

Závěr

Hlavní složky extracelulárního prostředí zahrnují metaloproteázy a signální molekuly extracelulárního prostředí s jejich receptory. Z pohledu nádorové biologie mohou extracelulární chaperony působit jako na membránu vázané proteiny, které interakcí s povrchovými receptory spouštějí intracelulární signalizaci. Jako extracelulární solubilní proteiny interagují se složkami extracelulární matrix a podporují tak metastazování a invazivitu nádorů. Současně mohou sloužit jako onkogenní proteiny aktivní v mezibuněčné komunikaci. Obecně tedy mohou chaperony ER hrát dvojí biologickou a imunologickou roli, která vychází především z jejich buněčné lokalizace. Intracelulární chaperony ER mají ochrannou funkci podporující přežití nádorových buněk za nepříznivých podmínek, zatímco na membránu vázané a extracelulární chaperony ER usnadňují imunologické rozpoznání nádorových buněk a jejich likvidaci.

Přes značné množství odborných prací stále zůstávají nezodpovězené otázky ohledně mechanismu exportu chaperonů ER do extracelulárního prostředí nádoru a jejich přesné extracelulární funkce. Je však zřejmé, že chaperony ovlivňují jak samotné nádorové buňky, tak i nádorové mikroprostředí. Jako stresem indukované proteiny mohou přispívat k tumorigenezi a lékové rezistenci, ale současně díky možnosti své specifické inhibice jsou zároveň i nadějnými cíli protinádorové terapie.

Literatura

- Gidalevitz T, Stevens F, Argon Y. Orchestration of secretory protein folding by ER chaperones. *Biochim Biophys Acta* 2013; 1833(11): 2410–2424. doi: 10.1016/j.bbamcr.2013.03.007.
- Lee AS. Glucose-regulated proteins in cancer: molecular mechanisms and therapeutic potential. *Nat Rev Cancer* 2014; 14(4): 263–276. doi: 10.1038/nrc3701.
- Shin BK, Wang H, Yim AM et al. Global profiling of the cell surface proteome of cancer cells uncovers an abundance of proteins with chaperone function. *J Biol Chem* 2003; 278(9): 7607–7616.
- Arap MA, Lahdenranta J, Mintz PJ et al. Cell surface expression of the stress response chaperone GRP78 enables tumor targeting by circulating ligands. *Cancer Cell* 2004; 6(3): 275–284.
- Kim Y, Lillo AM, Steiniger SC et al. Targeting heat shock proteins on cancer cells: selection, characterization, and cell-penetrating properties of a peptidic GRP78 ligand. *Biochemistry* 2006; 45(31): 9434–9444.
- Liu Y, Steiniger SC, Kim Y et al. Mechanistic studies of a peptidic GRP78 ligand for cancer cell-specific drug delivery. *Mol Pharm* 2007; 4(3): 435–447.
- Gonzalez-Gronow M, Selim MA, Papalas J et al. GRP78: a multifunctional receptor on the cell surface. *Antioxid Redox Signal* 2009; 11(9): 2299–2306. doi: 10.1089/ARS.2009.2568.
- Gray PC, Vale W. Cripto/GRP78 modulation of the TGF- β pathway in development and oncogenesis. *FEBS Lett* 2012; 586(14): 1836–1845. doi: 10.1016/j.febslet.2012.01.051.
- Ni M, Zhang Y, Lee AS. Beyond the endoplasmic reticulum: atypical GRP78 in cell viability, signalling and therapeutic targeting. *Biochem J* 2011; 434(2): 181–188. doi: 10.1042/BJ20101569.
- Sato M, Yao VJ, Arap W et al. GRP78 signaling hub a receptor for targeted tumor therapy. *Adv Genet* 2010; 69: 97–114. doi: 10.1016/S0065-2660(10)69006-2.
- Horvath I, Multhoff G, Sonnleitner A et al. Membrane-associated stress proteins: more than simply chaperones. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1778(7–8): 1653–1664. doi: 10.1016/j.bbame.2008.02.012.
- Munro S, Pelham HR. A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins. *Cell* 1987; 48(5): 899–907.
- Raykhel I, Alanan H, Salo K et al. A molecular specificity code for the three mammalian KDEL receptors. *J Cell Biol* 2007; 179(6): 1193–1204.
- Capitani M, Sallèse M. The KDEL receptor: new functions for an old protein. *FEBS Lett* 2009; 583(23): 3863–3871. doi: 10.1016/j.febslet.2009.10.053.
- Basu S, Binder RJ, Ramalingam T et al. CD91 is a common receptor for heat shock proteins gp96, hsp90, hsp70, and calreticulin. *Immunity* 2001; 14(3): 303–313.
- Arispe N, De Maio A. ATP and ADP modulate a cation channel formed by Hsc70 in acidic phospholipid membranes. *J Biol Chem* 2000; 275(40): 30839–30843.
- Voos WK, Rottgers K. Molecular chaperones as essential mediators of mitochondrial biogenesis. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1592(1): 51–62.
- Philpott A, Krude T, Laskey RA. Nuclear chaperones. *Semin Cell Dev Biol* 2000; 11(1): 7–14.
- Wiersma VR, Michalak M, Abdullah TM et al. Mechanisms of translocation of ER chaperones to the cell surface and immunomodulatory roles in cancer and autoimmunity. *Front Oncol* 2015; 5: 7. doi: 10.3389/fonc.2015.00007.
- Cancino J, Jung JE, Luini A. Regulation of Golgi signaling and trafficking by the KDEL receptor. *Histochem Cell Biol* 2013; 140(4): 395–405. doi: 10.1007/s00418-013-1130-9.
- Marzec M, Eletto D, Argon Y. GRP94: an HSP90-like protein specialized for protein folding and quality control in the endoplasmic reticulum. *Biochim Biophys Acta* 2012; 1823(3): 774–787. doi: 10.1016/j.bbamcr.2011.10.013.

22. De Maio A, Vazquez D. Extracellular heat shock proteins: a new location, a new function. *Shock* 2013; 40(4): 239–246. doi: 10.1097/SHK.0b013e3182a185ab.
23. Stolz A, Wolf DH. Endoplasmic reticulum associated protein degradation: a chaperone assisted journey to hell. *Biochim Biophys Acta* 2010; 1803(6): 694–705. doi: 10.1016/j.bbamcr.2010.02.005.
24. Jakobsen CG, Rasmussen N, Laenkholm AV et al. Phage display derived human monoclonal antibodies isolated by binding to the surface of live primary breast cancer cells recognize GRP78. *Cancer Res* 2007; 67(19): 9507–9517.
25. Zhang Y, Liu R, Ni M et al. Cell surface relocation of the endoplasmic reticulum chaperone and unfolded protein response regulator GRP78/BiP. *J Biol Chem* 2010; 285(20): 15065–15075. doi: 10.1074/jbc.M109.087445.
26. Decca MB, Carpio MA, Bosc C et al. Post-translational arginylation of calreticulin: a new isospecies of calreticulin component of stress granules. *J Biol Chem* 2007; 282(11): 8237–8245.
27. Ling S, Cheng A, Pumpens P et al. Identification of the rheumatoid arthritis shared epitope binding site on calreticulin. *PLoS One* 2010; 5(7): e11703. doi: 10.1371/journal.pone.0011703.
28. Ling S, Pi X, Holoshitz J. The rheumatoid arthritis shared epitope triggers innate immune signaling via cell surface calreticulin. *J Immunol* 2007; 179(9): 6359–6367.
29. Graner MW, Lillehei KO, Katsanis E. Endoplasmic reticulum chaperones and their roles in the immunogenicity of cancer vaccines. *Front Oncol* 2014; 4: 379. doi: 10.3389/fonc.2014.00379.
30. Eggleton P, Reid KB, Kishore U et al. Clinical relevance of calreticulin in systemic lupus erythematosus. *Lupus* 1997; 6(7): 564–571.
31. Kishore U, Sontheimer RD, Sastry KN et al. The systemic lupus erythematosus (SLE) disease autoantigen-calreticulin can inhibit C1q association with immune complexes. *Clin Exp Immunol* 1997; 108(2): 181–190.
32. Panaretakis T, Joza N, Modjtahedi N et al. The co-translocation of ERp57 and calreticulin determines the immunogenicity of cell death. *Cell Death Differ* 2008; 15(9): 1499–1509. doi: 10.1038/cdd.2008.67.
33. Tarr JM, Winyard PG, Ryan B et al. Extracellular calreticulin is present in the joints of patients with rheumatoid arthritis and inhibits FasL (CD95L)-mediated apoptosis of T cells. *Arthritis Rheum* 2010; 62(10): 2919–2929. doi: 10.1002/art.27602.
34. Weber CK, Haslbeck M, Englbrecht M et al. Antibodies to the endoplasmic reticulum-resident chaperones calnexin, BiP and Grp94 in patients with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford)* 2010; 49(12): 2255–2263. doi: 10.1093/rheumatology/keq272.
35. Tamura Y, Hirohashi Y, Kutomi G et al. Tumor-produced secreted form of binding of immunoglobulin protein elicits antigen-specific tumor immunity. *J Immunol* 2011; 186(7): 4325–4330. doi: 10.4049/jimmunol.1004048.
36. Misra UK, Deedwania R, Pizzo SV. Binding of activated alpha2-macroglobulin to its cell surface receptor GRP78 in 1-LN prostate cancer cells regulates PAK-2-dependent activation of LIMK. *J Biol Chem* 2005; 280(28): 26278–26286.
37. Misra UK, Deedwania R, Pizzo SV. Activation and cross-talk between Akt, NF-kappaB, and unfolded protein response signaling in 1-LN prostate cancer cells consequent to ligation of cell surface-associated GRP78. *J Biol Chem* 2006; 281(19): 13694–13707.
38. Misra UK, Gonzalez-Gronow M, Gawdi G et al. A novel receptor function for the heat shock protein Grp78: silencing of Grp78 gene expression attenuates alpha2M*-induced signalling. *Cell Signal* 2004; 16(8): 929–938.
39. Liu R, Li X, Gao W et al. Monoclonal antibody against cell surface GRP78 as a novel agent in suppressing PI3K/AKT signaling, tumor growth, and metastasis. *Clin Cancer Res* 2013; 19(24): 6802–6811. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-13-1106.
40. Misra UK, Gonzalez-Gronow M, Gawdi G et al. The role of Grp 78 in alpha 2-macroglobulin-induced signal transduction. Evidence from RNA interference that the low density lipoprotein receptor-related protein is associated with, but not necessary for, GRP 78-mediated signal transduction. *J Biol Chem* 2002; 277(44): 42082–42087.
41. Misra UK, Pizzo SV. Receptor-recognized alpha(2)-macroglobulin binds to cell surface-associated GRP78 and activates mTORC1 and mTORC2 signaling in prostate cancer cells. *PLoS One* 2012; 7(12): e51735. doi: 10.1371/journal.pone.0051735.
42. Zhang Y, Tseng CC, Tsai YL et al. Cancer cells resistant to therapy promote cell surface relocation of GRP78 which complexes with PI3K and enhances PI(3,4,5)P3 production. *PLoS One* 2013; 8(11): e80071. doi: 10.1371/journal.pone.0080071.
43. Gonzalez-Gronow M, Cuchacovich M, Llanos C et al. Prostate cancer cell proliferation in vitro is modulated by antibodies against glucose-regulated protein 78 isolated from patient serum. *Cancer Res* 2006; 66(23): 11424–11431.
44. Tsunemi S, Nakanishi T, Fujita Y et al. Proteomics-based identification of a tumor-associated antigen and its corresponding autoantibody in gastric cancer. *Oncol Rep* 2010; 23(4): 949–956.
45. Fu Y, Lee AS. Glucose regulated proteins in cancer progression, drug resistance and immunotherapy. *Cancer Biol Ther* 2006; 5(7): 741–744.
46. Altmeyer A, Maki RG, Feldweg AM et al. Tumor-specific cell surface expression of the-KDEL containing, endoplasmic reticular heat shock protein gp96. *Int J Cancer* 1996; 69(4): 340–349.
47. Bruneau N, Lombardo D, Bendayan M. Participation of GRP94-related protein in secretion of pancreatic bile salt-dependent lipase and in its internalization by the intestinal epithelium. *J Cell Sci* 1998; 111(Pt 17): 2665–2679.
48. Frasson M, Vitadello M, Brunati AM et al. Grp94 is Tyrosine-phosphorylated by Fyn in the lumen of the endoplasmic reticulum and translocates to Golgi in differentiating myoblasts. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1793(2): 239–252. doi: 10.1016/j.bbamcr.2008.10.001.
49. Zheng H, Dai J, Stoilova D et al. Cell surface targeting of heat shock protein gp96 induces dendritic cell maturation and antitumor immunity. *J Immunol* 2001; 167(12): 6731–6735.
50. Orr AW, Elzie CA, Kucik DF et al. Thrombospondin signaling through the calreticulin/LDL receptor-related protein co-complex stimulates random and directed cell migration. *J Cell Sci* 2003; 116(Pt 14): 2917–2927.
51. Orr AW, Pedraza CE, Pallero MA et al. Low density lipoprotein receptor-related protein is a calreticulin coreceptor that signals focal adhesion disassembly. *J Cell Biol* 2003; 161(6): 1179–1189.
52. Eggleton P, Lieu TS, Zappi EG et al. Calreticulin is released from activated neutrophils and binds to C1q and mannan-binding protein. *Clin Immunol Immunopathol* 1994; 72(3): 405–409.
53. Ogden CA, deCathelineau A, Hoffmann PR et al. C1q and mannose binding lectin engagement of cell surface calreticulin and CD91 initiates macropinocytosis and uptake of apoptotic cells. *J Exp Med* 2001; 194(6): 781–795.
54. Vandivier RW, Ogden CA, Fadok VA et al. Role of surfactant proteins A, D, and C1q in the clearance of apoptotic cells in vivo and in vitro: calreticulin and CD91 as a common collectin receptor complex. *J Immunol* 2002; 169(7): 3978–3986.
55. Okazaki Y, Ohno H, Takase K et al. Cell surface expression of calnexin, a molecular chaperone in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 2000; 275(46): 35751–35758.
56. Nimmervoll B, Chtcheglova LA, Juhasz K et al. Cell surface localised Hsp70 is a cancer specific regulator of clathrin-independent endocytosis. *FEBS Lett* 2015; 589(19 Pt B): 2747–2753. doi: 10.1016/j.febslet.2015.07.037.
57. Delneste Y, Magistrelli G, Gauchat J et al. Involvement of LOX-1 in dendritic cell-mediated antigen cross-presentation. *Immunity* 2002; 17(3): 353–362.
58. Theriault JR, Mambula SS, Sawamura T et al. Extracellular HSP70 binding to surface receptors present on antigen presenting cells and endothelial/epithelial cells. *FEBS Lett* 2005; 579(9): 1951–1960.
59. Sims JD, McCready J, Jay DG. Extracellular heat shock protein (Hsp)70 and Hsp90alpha assist in matrix metalloproteinase-2 activation and breast cancer cell migration and invasion. *PLoS One* 2011; 6(4): e18848. doi: 10.1371/journal.pone.0018848.
60. Ellerman JE, Brown CK, de Vera M et al. Masquerader: high mobility group box-1 and cancer. *Clin Cancer Res* 2007; 13(10): 2836–2848.
61. Hung CY, Tsai MC, Wu YP et al. Identification of heat-shock protein 90 beta in Japanese encephalitis virus-induced secretion proteins. *J Gen Virol* 2011; 92(Pt 12): 2803–2809. doi: 10.1099/vir.0.033993-0.
62. Chen JS, Hsu YM, Chen CC et al. Secreted heat shock protein 90alpha induces colorectal cancer cell invasion through CD91/LRP-1 and NF-kappaB-mediated integrin alphaV expression. *J Biol Chem* 2010; 285(33): 25458–25466. doi: 10.1074/jbc.M110.139345.
63. Li W, Li Y, Guan S et al. Extracellular heat shock protein-90alpha: linking hypoxia to skin cell motility and wound healing. *EMBO J* 2007; 26(5): 1221–1233.
64. Liao DF, Jin ZG, Baas AS et al. Purification and identification of secreted oxidative stress-induced factors from vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 2000; 275(1): 189–196.
65. Yu X, Harris SL, Levine AJ. The regulation of exosome secretion: a novel function of the p53 protein. *Cancer Res* 2006; 66(9): 4795–4801.
66. Li W, Tsen F, Sahu D et al. Extracellular Hsp90 (eHsp90) as the actual target in clinical trials: intentionally or unintentionally. *Int Rev Cell Mol Biol* 2013; 303: 203–235. doi: 10.1016/B978-0-12-407697-6.00005-2.
67. McCready J, Sims JD, Chan D et al. Secretion of extracellular hsp90alpha via exosomes increases cancer cell motility: a role for plasminogen activation. *BMC Cancer* 2010; 10: 294. doi: 10.1186/1471-2407-10-294.
68. Eustace BK, Jay DJ. Extracellular roles for the molecular chaperone, hsp90. *Cell Cycle* 2004; 3(9): 1098–1100.
69. Colaco C. Autologous heat-shock protein vaccines. *Hum Vaccin Immunother* 2013; 9(2): 275–276.
70. Randazzo M, Terness P, Opelz G et al. Active-specific immunotherapy of human cancers with the heat shock protein Gp96-revisited. *Int J Cancer* 2012; 130(10): 2219–2231. doi: 10.1002/ijc.27332.
71. Reitsma DJ, Combast AJ. Challenges in the development of an autologous heat shock protein based anti-tumor vaccine. *Hum Vaccin Immunother* 2012; 8(8): 1152–1155. doi: 10.4161/hv.21382.
72. Gao P, Sun X, Chen X et al. Secretion of stress protein grp170 promotes immune-mediated inhibition of murine prostate tumor. *Cancer Immunol Immunother* 2009; 58(8): 1319–1328. doi: 10.1007/s00262-008-0647-6.
73. Yu X, Guo C, Yi H et al. A multifunctional chimeric chaperone serves as a novel immune modulator inducing therapeutic antitumor immunity. *Cancer Res* 2013; 73(7): 2093–2103. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-1740.