

PROTEÍNAS DO STRESS

PAULO M. FILIPE, AFONSO C. FERNANDES

Cadeira de Fisiopatologia Geral. Faculdade de Medicina de Lisboa. Lisboa

RESUMO

As células de todos os seres vivos desenvolveram um número apreciável de estratégias para responderem a alterações adversas do meio. Um destes mecanismos de protecção é a chamada *resposta ao choque térmico ou resposta ao stress*, caracterizada pela expressão rápida de um grupo de proteínas - proteínas do choque térmico (hsp) ou proteínas do *stress* - após aumento súbito da temperatura óptima para o crescimento celular ou sujeição a grande variedade de outros estímulos agressores: a) ambientais: exposição a metais pesados, a alcoóis, a inibidores do metabolismo energético, a análogos de aminoácidos; b) estados de doença: isquemia, lesão oxidativa, infecções, perturbações imunitárias e cancro. Por outro lado, algumas hsp são sintetizadas em condições fisiológicas e pensa-se que têm um papel importante na maturação proteica e no desenvolvimento e diferenciação celulares. O conhecimento deste tipo de resposta ao *stress* é ainda incompleto mas a sua aplicação médica - na isquemia, em certas doenças infecciosas e imunitárias, no cancro - está claramente delineada no horizonte.

SUMMARY

Stress Proteins

Cells from all organisms have developed a remarkable number of strategies to deal with adverse changes in their environment. One of these protective mechanisms is the heat shock response, or *stress* response, characterized by the extremely rapid increased expression of a selected group of proteins - the heat shock proteins (hsp) - after a sudden increase in the normal cellular growth temperature. The same response takes place when cells are subjected to a wide variety of other stressors: a) environmental assaults: exposure to heavy metals, alcohols, inhibitors of energy metabolism, aminoacid analogues; b) states of disease: ischemia, oxidative injury, infectious diseases, immunity disorders and malignancy. On the other hand, some hsp are believed to play an important role in protein maturation steps and in cellular development and differentiation. The understanding of *stress* response is still incomplete but the promise of its medical applications for fighting against ischemia, infection, immunity diseases and cancer is clearly on the horizon.

INTRODUÇÃO

O reconhecimento da existência das inicialmente designadas *proteínas do choque térmico* (hsp) e a progressiva elucidação da regulação da sua produção e das suas funções têm vindo a colmatar algumas lacunas no conhecimento do normal funcionamento das células bem como da resposta celular a diversos estímulos agressores.

Por outro lado, surgiram dados que permitem admitir a relevância da resposta ao *stress* e das proteínas que lhe estão associadas para o reconhecimento da agressão celular, para a compreensão de elos das cadeias patogénicas de diversas doenças e para eventual intervenção terapêutica.

Apresenta-se, de seguida, uma breve revisão sobre este tema que não se pretendeu exaustiva nem de detalhada análise crítica mas que teve como principal objectivo chamar a atenção para esta área actual da investigação biomédica.

PROTEÍNAS DO STRESS - CARACTERIZAÇÃO, SÍNTESE E FUNÇÕES

Em 1962, Ritossa observou que os cromossomas das células das glândulas salivares da *Drosophila*, quando expostos a temperaturas ligeiramente acima da temperatura óptima para o crescimento e desenvolvimento normal da mosca, apresentavam um novo padrão. Isto é, algumas regiões ao longo dos cromossomas alargavam (*puffing*). Esta modificação era observada logo no primeiro ou segundo minuto após o aumento da temperatura e progredia até aos 30 ou 40 minutos¹.

Em 1974, Tissières, baseando-se nas observações de Ritossa, demonstrou que as alterações cromossómicas induzidas pelo calor eram acompanhadas por aumento da expressão de um grupo de proteínas que designou por *proteínas do choque térmico* (hsp); as alterações cromos-

sómicas representavam regiões no DNA onde moléculas específicas de RNA_m eram sintetizadas; estas moléculas de RNA_m codificavam informação genética para a síntese de hsp². Até finais da década de 70, verificou-se que esta resposta era conservada filogeneticamente. Estudos posteriores mostraram que o mesmo tipo de resposta ocorre quando as células são sujeitas a uma grande variedade de agressões ambientais, nomeadamente quando expostas a metais pesados, a alcoóis, a inibidores do metabolismo energético, a análogos de aminoácidos, a fármacos usados em quimioterapia, a infecções virais, a radicais livres de oxigénio; mas também se verifica em diversas situações de doença: na febre, na resposta inflamatória, na isquemia, na hipertrofia de determinados órgãos, na lesão oxidativa, na carcinogénese³⁻⁶. Todos estes diferentes estímulos desencadeiam o mesmo mecanismo de defesa celular, que passou a designar-se *resposta celular ao stress* e as proteínas expressas como consequência desta resposta chamam-se *proteínas do stress* (fig. 1).

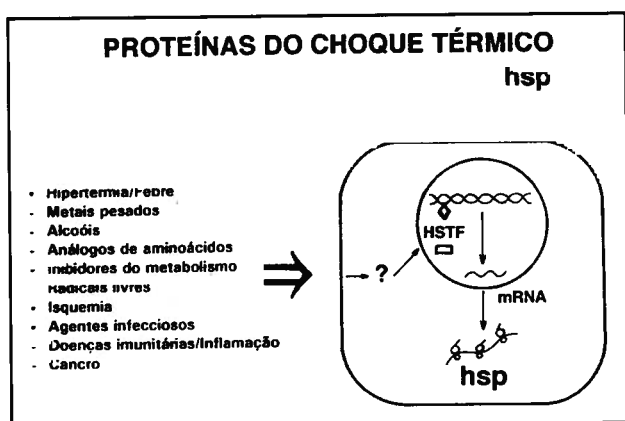


Fig.1 – Alguns estímulos indutores da síntese de proteínas do stress ou do choque térmico (hsp). HSTF –heat shock transcription factor (ver texto).

Com o conhecimento mais profundo da estrutura e das funções destas proteínas, verificou-se que eram mais do que meras proteínas defensivas. Com efeito, participam em processos metabólicos essenciais, nomeadamente na síntese e na aglomeração proteicas e intervêm na regulação do crescimento e da diferenciação celulares⁷⁻¹⁴.

Na sequência dos estudos, foram clonados os genes que codificam as proteínas do stress. E mais, verificou-se que bactérias com mutações nestes genes apresentavam alterações na síntese do DNA e do RNA e perdiam a capacidade de se dividirem normalmente e de degradarem proteínas adequadamente. Estes mutantes não resistiam, também, a temperaturas elevadas¹⁵⁻¹⁹. Os genes que codificam as proteínas do stress são estruturalmente semelhantes em todos os seres vivos, assim como as proteínas que codificam. A conservação e a ubiquidade destas proteínas durante a evolução atestam o seu papel essencial em todos os seres vivos. Os primeiros estudos com células animais em cultura revelaram que quando eram expostas a temperatura elevada, não letal, durante um breve período de tempo, suficiente para aumentar a síntese de proteínas do stress, tornavam-se mais resistentes

a uma segunda elevação da temperatura, que seria letal se não tivessem sido previamente sensibilizadas²⁰. Por outro lado, estas células termo-tolerantes eram também mais resistentes a outros estímulos agressores²¹.

Podemos dividir as proteínas do stress em dois grandes grupos: as que têm papel fisiológico e as que são induzidas apenas em condições de stress. Por outro lado, as proteínas do stress são, também, classificadas de acordo com as suas funções e com o seu peso molecular, em famílias: ubiquitina, 60 kDa, 70 kDa e 90 kDa²².

Após estas considerações debruçemo-nos sobre o modo de actuação das proteínas do stress. Em 1980, Hightower observou que muitos dos estímulos agressores que desencadeavam a resposta ao stress eram capazes de desnaturar proteínas com perda da sua função. Este facto permitiu postular que a acumulação de proteínas desnaturadas desencadeava a resposta celular ao stress. As proteínas do stress poderiam facilitar a identificação e a posterior remoção das proteínas desnaturadas das células agredidas²³. Mais tarde, esta hipótese foi confirmada usando células em cultura que eram injectadas com proteínas desnaturadas e células em que era feita a transfecção de genes que codificavam proteínas anormais. Estes estímulos desencadeavam uma resposta idêntica ao stress²⁴.

A indução da transcrição dos genes das proteínas do stress é mediada por um promotor altamente conservado ao longo da evolução das espécies, que é uma sequência cis-reguladora conhecida por *elemento do choque térmico*. Esta sequência foi encontrada em associação com todos os genes que codificam as proteínas do stress. O *elemento do choque térmico* é a região onde se vão ligar proteínas com função de factores de transcrição (HSTF)^{3,4,25}.

O *elemento do choque térmico* é muito sensível à DNA_{ase}I, mas durante a activação dos genes das proteínas do stress torna-se resistente a esta nucleasa. Este fenómeno deve-se à ligação de proteínas ao *elemento do choque térmico*, que o protegem da digestão enzimática²⁶.

A activação dos genes das proteínas do stress veio confirmar o papel supressor das histonas na regulação genética. Com efeito, no decurso da activação da transcrição dos genes das proteínas do stress há depleção de várias histonas. Com a perda das histonas, que são decisivas para a formação dos nucleossomas, a cadeia de DNA torna-se acessível aos factores de transcrição e à RNA polimerase, sendo estas etapas decisivas para a transcrição²⁷.

Por outro lado, as hsp têm uma semi-vida curta. Elas não são degradadas pelos sistemas enzimáticos habituais, mas sofrem um processo de auto-degradação espontânea²⁸⁻³².

A maior parte das proteínas do stress induzidas por um golpe de calor sub-letal pertencem à família de 70 kDa³⁻⁵. Após choque térmico, observa-se grande aumento na concentração de proteínas de 70 kDa no nucléolo³³. É neste organelo celular que são produzidos os ribossomas responsáveis pela síntese proteica. Por outro lado, sabe-se que após stress térmico é inibida a síntese de ribossomas. Uma das funções das proteínas de 70 kDa no nucléolo poderia ser a de reconhecer as proteínas desnaturadas dos ribossomas e promover o restabelecimento da sua conformação normal.

Uma das proteínas de 70 kDa é idêntica à BiP (*immunoglobulin binding protein*)³⁴⁻³⁷. Esta proteína está

envolvida na preparação de imunoglobulinas e de outras proteínas para serem segregadas pelas células. A BiP liga-se às novas proteínas sintetizadas durante o seu processamento até se tornarem proteínas na forma conformacional madura. Se o enrolamento ou a associação das proteínas são alterados, a BiP liga-se a estas e poderão ser eventualmente degradadas^{36,37}. Em condições de *stress*, em que há excesso de proteínas desnaturadas ou com conformação alterada, as células sintetizam mais BiP. A BiP parece actuar como controlador de qualidade da síntese proteica, permitindo a secreção de proteínas com estrutura normal e induzindo a degradação das proteínas que têm alterações conformacionais. De igual modo, a ubiquitina, um polipéptido de 8,6 kDa, participa na degradação não lisossômica dependente do ATP^{28,38}.

Todas as proteínas de 70 kDa têm afinidade para o ATP e estão presentes em condições fisiológicas nas células³⁹. Contudo, a sua concentração aumenta em situações de *stress*. No citoplasma, as proteínas de 70 kDa ligam-se transitoriamente com proteínas que estão a ser sintetizadas nos ribossomas. Este processo é dependente do ATP^{12,40}. Contudo, em condições de *stress*, as proteínas apresentam alterações maturativas e a ligação de proteínas de 70 kDa a estas é estável^{36,37}.

Georgopoulos verificou que mutações nos genes de duas proteínas do *stress* - a gro EL e gro ES - nas bactérias impedem o crescimento de pequenos fagos, processo dependente dos mecanismos celulares. Na ausência de gro EL ou de gro ES funcionais, várias proteínas virais sofrem alterações de maturação^{41,42}. Nas células animais, há proteínas de 10 kDa e 60 kDa semelhantes a gro EL e gro ES¹². Estas proteínas são essenciais para o enrolamento e para a maturação proteicas. As moléculas de 60 kDa intervêm no processamento das cadeias polipeptídicas para a estrutura terciária. Este processo é dependente de energia e da participação de proteínas de 10 kDa¹². Através de múltiplas etapas de ligação e separação destas proteínas, a cadeia polipeptídica vai adquirindo a estrutura terciária. Por conseguinte, quer as proteínas de 60 kDa quer as de 10 kDa funcionam conjuntamente na maturação proteica¹². À medida que uma cadeia polipeptídica emerge do ribossoma liga-se a uma proteína de 70 kDa no citoplasma ou dentro dum organito celular. Esta ligação impede o enrolamento precoce da cadeia polipeptídica. Quando a síntese está completada, o novo polipéptido ligado à proteína de 70 kDa é transferido para uma molécula de 60 kDa e é então iniciado o enrolamento e a maturação proteicas. Estes processos ocorrem com uma velocidade e precisão consideráveis^{12,40}.

Em situações de *stress* formam-se ligações estáveis entre proteínas desnaturadas e proteínas do *stress* de 60 e 70 kDa, baixando as concentrações destas proteínas na forma livre. Esta redução é detectada pela célula, que responde com o aumento da síntese de mais proteínas do *stress*. Este aumento é necessário para a substituição das proteínas alteradas e, também, para o processamento e maturação de novas proteínas constitutivas e funcionais de que a célula necessita para substituir as proteínas lesadas^{5,6}.

Uma outra família de proteínas do *stress* é a de 90 kDa. Estas proteínas participam na oncogénese viral. No

sarcoma de Rous é produzida uma proteína, a pp60 src, por um gene de origem viral. Esta enzima actua noutras proteínas que regulam o crescimento celular. Logo após a sua síntese no citoplasma, a pp60 src liga-se rapidamente a duas proteínas: à p50 e a uma proteína de 90 kDa. Quando a pp60 src está ligada no citoplasma a estas duas proteínas, permanece inactiva. À medida que o complexo formado pelas três proteínas se dirige para a membrana celular, as proteínas associadas à pp60 src separam-se desta. Já na membrana celular, a pp60 src torna-se activa⁴³⁻⁴⁵. Outras enzimas que intervêm na oncogénese viral interactuam com proteínas de 90 kDa e com a p50 de modo semelhante^{46,47}.

Outra função das proteínas de 90 kDa nas células dos mamíferos é a de regularem a resposta às hormonas esteróides. Estas proteínas do *stress* ajudam a manter os receptores das hormonas esteróides na forma inactiva quando a eles estão ligadas. Na presença de hormonas esteróides, estas proteínas separam-se dos receptores dos esteróides e o complexo hormona-receptor adquire a forma activa que, interagindo com o DNA, inicia a expressão de genes para determinadas proteínas.

PROTEÍNAS DO STRESS EM MEDICINA

Lesão de Isquemia-Reperfusão – Há evidência da participação de proteínas do *stress* em determinadas situações patológicas. Na isquemia, o aporte sanguíneo ao órgão em causa é temporariamente comprometido. Na ausência de oxigénio, o órgão é incapaz de manter os níveis adequados de ATP necessários para os processos metabólicos. Durante a reperfusão, o órgão é rapidamente reoxigenado. Nesta etapa, há formação de formas reactivas de oxigénio, que podem agravar a lesão. Em modelos animais de isquemia-reperfusão do miocárdio foi observada a síntese de proteínas do *stress*⁴⁸. Este facto poderá constituir um marcador da intensidade de lesão do órgão-alvo com utilidade clínica. Também em culturas de células se verificou que as células que sintetizam mais proteínas do *stress* parecem estar mais aptas a resistir a situações de isquemia⁴⁹. Estudos com animais revelaram que, após um breve período de isquemia do miocárdio, há indução da síntese de proteínas do *stress* de 70 kDa⁴⁸. Por outro lado, verificou-se que este pré-condicionamento do miocárdio o protegia temporariamente de posteriores episódios de isquemia⁵⁰. Dados recentes sugerem que este fenómeno também ocorre no homem. Resta saber se as proteínas do *stress* estão ou não implicadas no pré-condicionamento.

A catalase é também uma proteína do *stress*. Com efeito, Currie *et al.* demonstraram um aumento de actividade da catalase no coração do rato após curtos períodos de isquemia-reperfusão⁵¹.

Doenças Infeciosas – Certas bactérias e parasitas, responsáveis por doenças como a tuberculose, a lepra, a filariase, a shistosomiase, a malária, sintetizam proteínas do *stress* quando infectam o hospedeiro^{6,52-56}. A infecção de células de um organismo por agentes intracelulares pode desencadear a indução da síntese de proteínas do *stress* na célula infectada. Algumas destas proteínas são

encaminhadas para a membrana celular, onde são apresentadas às células T^{52,53}. Por outro lado, os próprios agentes intracelulares podem sintetizar e libertar proteínas do *stress*, idênticas às do hospedeiro, que funcionariam como determinantes antigénicos⁵⁴. As proteínas do *stress* destes agentes, obtidas por recombinação genética, poderão ser utilizadas em vacinas para a prevenção de determinadas infecções⁵⁴.

Doenças de Imunidade – Em determinadas doenças auto-imunes, em que há formação de anticorpos contra certos constituintes, como no lupus eritematoso sistémico, na artrite reumatóide e na espondilite anquilosante, há formação de anticorpos contra proteínas do *stress* do indivíduo, que funcionam, assim, como antigénios.

A artrite adjuvante do rato, doença que é o paradigma da artrite reumatóide, pode ser induzida com uma única injeção intradérmica de bacilos da tuberculose, inactivados pelo calor, na presença do adjuvante de Freund. Como em todas as doenças auto-imunes, há participação de linfócitos T. O antigénio da micobactéria que é reconhecido pelas células T é uma proteína do *stress* de 65 kDa. O antigénio do hospedeiro, que seria alvo de uma reacção imunitária cruzada, poderá ser uma proteína da sinovial com uma sequência semelhante à da proteína de 65 kDa⁵⁸.

No lupus eritematoso sistémico foram observados auto-anticorpos contra determinadas proteínas do *stress* de 90 kDa, 70 kDa e contra a ubiquitina. Contudo, está ainda por esclarecer se estes achados têm relevância clínica^{58,59}.

Na diabetes tipo I também foi observada a existência de auto-anticorpos contra proteínas do *stress*. Em ratos diabéticos não obesos, foram identificadas uma proteína do *stress* de 65 kDa e uma proteína de 64 kDa que podem funcionar como antigénios, provavelmente correspondentes às existentes na diabetes tipo I humana⁶⁰. Em 1991, Elias *et al.* produziram uma vacina, a partir de um epítipo de uma hsp humana de 65 kDa, que foi usada na prevenção da diabetes auto-imune no rato⁶¹. Estes factos poderão ser úteis no diagnóstico e, talvez, na terapêutica deste grupo de doenças.

Cancro – Algumas linhas celulares tumorais apresentam maior expressão de proteínas do *stress* do que as células normais⁶². Como dissemos acima, certas proteínas de 90 kDa intervêm na carcinogénese induzida por vírus.

Por outro lado, sabe-se que algumas células neoplásicas são mais termo-sensíveis que as células normais^{63,64}. Estes factos poderão ser aplicados à terapêutica, nomeadamente através do uso de temperaturas elevadas para eliminar as células tumorais. Contudo, a resposta celular ao *stress*, pelo uso de terapêuticas anti-neoplásicas, poderá tornar as células neoplásicas mais resistentes a subseqüentes tratamentos, o que é um obstáculo a ter em conta⁶⁵.

DISCUSSÃO

As proteínas do *stress* começaram por ser meras curiosidades bioquímicas. Hoje, constituem uma das áreas mais promissoras de investigação biomédica.

Na lesão de isquemia-reperfusão poderão ser particularmente relevantes, nomeadamente na preservação de

órgãos para transplante e provavelmente na protecção de órgãos que sofreram períodos de isquemia-reperfusão, sobretudo do miocárdio e do sistema nervoso central.

Uma outra área particularmente promissora será a aplicação da resposta do *stress* às doenças infecciosas e imunitárias. Na realidade, a infecção por agentes microbianos e parasitários desencadeia a síntese de proteínas do *stress*, quer por estes agentes quer pelas células do hospedeiro, que seriam alvo de uma resposta imunitária cruzada. A administração de vacinas – preparadas com algumas proteínas do *stress*, semelhantes às sintetizadas pelos agentes infecciosos – com fins terapêuticos está a ser ensaiada.

O cancro é também uma das áreas da investigação neste campo. Atendendo ao facto de alguns tumores serem mais termo-sensíveis que os tecidos normais, a elevação da temperatura tecidual, para irradiar tumores, poderá ser uma atitude terapêutica a conjugar com outras medidas convencionais.

Finalmente, o estudo da resposta ao *stress* é um novo método utilizável em toxicologia para despiste da toxicidade de novos fármacos, cosméticos e aditivos alimentares⁶.

BIBLIOGRAFIA

1. RITOSSA FM: A new puffing pattern induced by a temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia* 1962; 18: 571-573.
2. TISSIERES A, MITCHELL HK, TRACY UM: Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: relation to chromosome puffs. *J Mol Biol* 1974; 84: 389-398.
3. NOVER L: Heat shock response of Eukaryotic cells - Berlin: Springer-Verlag, 1984, p. 7-10.
4. LINDQUIST S: The heat-shock response. *Annu Rev Biochem* 1986; 55: 1151-1191.
5. WELCH WJ: Mammalian stress response: cell physiology, structure/function of stress proteins, and implications for medicine and disease. *Physiol Rev* 1992; 72: 1063-1081.
6. WELCH WJ: How cell respond to stress. *Scientific American* 1993; May: 34-41.
7. CHENG MY, HARTL F-U, MARTIN J, POLLOCK, RA, KALOUSEK F, NEUPERT W, HALLBERG EM, HALLBERG RL, HORN-RICH AC: Mitochondrial heat shock protein hsp60 is essential for assembly of proteins imported into yeast mitochondria. *Nature* 1989; 337: 620-625.
8. FLYNN GC, CHAPPELL TG, ROTHMAN JE: Peptid binding and release by proteins implicated as catalysts of protein assembly. *Nature* 1989; 245: 385-390.
9. OSTERMANN J, HORWICH AL, NEUPERT W, HARTL F-U: Protein folding in mitochondria requires complex formation with hsp60 and ATP hydrolysis. *Nature* 1989; 341: 125-130.
10. CHENG MY, HARTL F-U, HORWICH AL: The mitochondrial chaperonin hsp60 is required for its own assembly. *Nature* 1990; 348: 455-458.
11. BECKMANN RP, MIZZEN LA, WELCH WJ: Interaction of Hsp70 with newly synthesized proteins: Implications for protein folding and assembly. *Science* 1990; 248: 850-854.
12. ELLIS RJ: Molecular chaperons. *Annu Rev Biochem* 1991; 60: 321-347.
13. KINGSTON RE, BALDWIN AS JR, SHARP PA: Regulation of heat-shock protein 70 gene expression by C-myc. *Nature* 1984; 312: 280-282.
14. TSUCHIDO T, VAN BOGELEN, RA, NEIDHARDT FC: Heat shock response in *Escherichia coli* influences cell division. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 6959-6963.
15. WAGHORNE C, FUERST CR: Identification of a temperature-sensitive mutation in the htpR (r pot) gene of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* 1985; 164: 960-963.
16. ANG D, CHANDRASEKHAR GN, ZYLICZ M, GEORGOPOULOS C: *Escherichia coli* grp E gene codes for heat shock protein B 25.3, essential for both lambda DNA replication at all temperatures and host growth at high temperature. *J Bacteriol* 1986; 167: 25-29.

17. MACKIE G, WILSON DB: Regulation of the gal Operon of *Escherichia coli* by the capR Gen. *J Biol Chem* 1972; 247: 2973-2978.
18. HUA SS, MARKOVITZ A: Multiple regulator gene control of the galactose Operon in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* 1972; 110: 1089-1099.
19. GOTTESMAN S, GOTTESMAN M, SHAW JE, PEARSON ML: Protein degradation in *Escherichia coli* the lon mutation and bacteriophage lambda N and CII protein stability. *Cell* 1981; 24: 225-233.
20. HALLBERG RL, KRAUS KW, HALLBERG EM: Induction of acquired thermotolerance in *Tetrahymena thermophila*: effects of protein synthesis inhibitors. *Mol Cell Biol* 1985; 5: 2061-2069.
21. CIAVARRA RP, SIMEONE A: T lymphocyte stress response. II Protection of translation and DNA replication against some forms of stress by prior hyperthermic stress. *Cell Immunol* 1990; 131: 11-26.
22. KAUFMANN SHE: Heat shock proteins and the immune response. *Immunol Today* 1990; 9: 134-137.
23. HIGHTOWER LE: Cultured animal cells exposed to amino acid analogues or puromycin rapidly synthesize several polypeptides. *J Cell Physiol* 1980; 102: 407-424.
24. ANANTHAN J, GOLDBERG AL, VOELLMY R: Abnormal proteins serve as eukaryotic stress signals and trigger the activation of heat shock genes. *Science* 1986; 232: 522-524.
25. SORGER PK, LEWIS MJ, PELHAM HR: Heat shock factor is regulated differently in yeast and HeLa cells. *Nature* 1987; 329: 81-84.
26. PELHAM H: Activation of heat-shock genes in eucaryotes. *Trends Genet* 1985; 1: 31-35.
27. KARPOV VL, PREOBRAZHENSKAYA O, MIRZABEKOV AD: Chromatin structure of hsp 70 genes, activated by heat shock: selective removal of histones from the coding region and their absence from the 5' region. *Cell* 1984; 36: 423-431.
28. FINLEY D, CIECHANOVER A, VARSHAVSKY A: Thermolability of ubiquitin-activating enzyme from the mammalian cell cycle mutant ts 85. *Cell* 1984; 37: 43-55.
29. PHILIPS TA, VAN BOGELEN RA, NEIDHARDT FC: Lon gene product of *Escherichia coli* is a heat-shock protein. *J Bacteriol* 1984; 159: 283-287.
30. CHARETTE MF, HENDERSON GW, MARKOVITZ A: ATP hydrolysis-dependent protease activity of the lon (CapR) protein of *Escherichia coli* K-12. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; 78: 4728-4732.
31. CHUNG CH, GOLDBERG AL: The product of the lon (CapR) gene in *Escherichia coli* is the ATP-dependent protease, protease La. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; 78: 4931-4935.
32. LARIMORE FS, WAXMAN L, GOLDBERG AL: Studies of the ATP-dependent proteolytic enzyme, protease La, from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 1982; 257: 4187-4195.
33. WELCH WJ, FERAMISCO JR: Nuclear and Nucleolar localization of the 72,000-dalton heat-shock protein in heat-shocked mammalian cells. *J Biol Chem* 1984; 259: 4501-4513.
34. HAAS IG, WABL M: Immunoglobulin heavy chain binding protein. *Nature* 1983; 306: 387-389.
35. MUNSO S, PELHAM HRB: A hsp70-like protein in the ER: identity with the 78 kd glucose-regulated protein. *Cell* 1986; 46: 292-300.
36. KASSEMBROCK CK, GARCIA PD, WALTER P, KELLY RB: Heavy-chain binding protein recognizes aberrant polypeptides translocated in vitro. *Nature* 1988; 333: 90-93.
37. KOZUTSUMI Y, SEGAL M, NORMINGTON K, GETHING MJ, SAMBROOK J: The presence of misfolded proteins in the endoplasmic reticulum signals the induction of glucose regulated proteins. *Nature* 1988; 332: 462-464.
38. BOND U, SCHLESINGER MJ: Ubiquitin is a heat shock protein in chicken embryo fibroblasts. *Mol Cell Biol* 1986; 5: 949-956.
39. WELCH J, FERAMISCO JR: Rapid purification of mammalian 70,000-Dalton stress proteins. Affinity of the Protein for nucleotides. *Mol Cell Biol* 1985; 5: 1229-1237.
40. ROTHMAN JE: Polypeptide chain binding proteins: catalysts of protein folding and related processes in cells. *Cell* 1989; 59: 591-602.
41. GEORGOPOULOS, CP: A new bacterial gene (gro PC) which affects lambda replication. *Mol Gen Genet* 1977; 151: 35-39.
42. GEORGOPOULOS C, ANG D, LIBEREK K, ZYLICZ M: Properties of the *Escherichia coli* heat shock proteins and their role in bacteriophage lambda growth. In: *Stress proteins in Biology and Medicine*, edited by R. Morimoto, A. Tissières, and C. Georgopoulos, Cold Spring Harbor, N. Y.: Cold Spring Harbor 1990; pp. 191-222.
43. BRUGGE JS: Interaction of the Rous sarcoma virus protein, pp60src, with the cellular proteins pp50 and pp90. *Curr Top Microbiol Immunol* 1986; 123: 1-23.
44. BRUGGE JS, ERIKSON E, ERIKSON RL: The specific interaction of the Rous sarcoma virus transforming protein, pp60src, with cellular proteins. *Cell* 1981; 25: 363-372.
45. OPPERMANN H, LEVINSON W, BISHOP JM: A cellular protein that associates with a transforming protein of Rous sarcoma virus is also a heat shock protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; 78: 1067-1071.
46. DERMARCO AM, BECK CA, ONATE SA, EDWARDS DP: Dimerization of mammalian progesterone receptors occurs in the absence of DNA and is related to the release of the 90kDa heat shock protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 72-76.
47. PRATT WB, SANCHEZ ER, BRESNICK EH, MESHINCHI S, SCHERRER LC, DALMAN FC, WELCH MJ: Interaction of the glucocorticoid receptor with the Mr 90000 heat shock protein: an evolving model of ligand-mediated receptor transformation and translocation. *Cancer Res* 1989; 49 (Suppl): 2222-2229.
48. KNOWLTON AA, BRECHER P, APSTEIN CS: Rapid expression of heat shock protein in the rabbit after brief cardiac ischemia. *J Clin Invest* 1991; 87: 139-147.
49. BENJAMIN IJ, HORIE S, GREENBERG ML, ALPERN RJ, WILLIAMS R.S.: Induction of stress proteins in cultured myogenic cells. *J Clin Invest* 1992; 89: 1685-1689.
50. YELLON DM, PASINI E, CARGNONI A, MARBER MS, LATCHMAN DS, FERRARI R: The protective role of heat stress in the ischaemic and reperfused rabbit myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 1992; 24: 895-907.
51. CURRIE RW, KARMAZYN M, KLOC M, MAILER K: Heat-shock response is associated with enhanced postischemic ventricular recovery. *Circ Res* 1988; 63: 543-549.
52. HAREGEWOIN A, SOMAN F, HOM RC, FINBERG RW: Human gd+ T cells respond to mycobacterial heat-shock protein. *Nature* 1989; 340: 309-312.
53. MUNK ME, SCHOEL B, MODROW S, KARR RW, YOUNG RA, KAUFMANN SHE: T lymphocytes from healthy individuals with specificity to self-peptides shared by the mycobacterial and human 65-kilodalton heat shock protein. *J Immunol* 1989; 143: 2844-2849.
54. SWEETSER D, YOUNG RA: Stress proteins are immune targets in leprosy and tuberculosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85: 4267-4270.
55. SELKIRK ME, DENHAM DA, PARTONO F, MAIZELS RM: Heat shock cognate 70 is a prominent immunogen in brugian filariasis. *J Immunol* 1989; 143: 299-308.
56. BUCHMEIER NA, HEFFRON F: Induction of *Salmonella* stress proteins upon infection of macrophages. *Science* 1990; 248: 730-732.
57. WAGAR EA, SCHACHTER J, BAVIOL P, STEPHENS RS: Differential human serologic response to two 60,000 molecular weight *Chlamydia trachomatis* antigens. *J Infectious Diseases* 1990; 162: 922-927.
58. YOUNG RA: Stress proteins and immunology. *Annu Rev Immunol* 1990; 8: 401-420.
59. MINOTA S, KOYASU S, YAHARA I, WINFIELD J: Autoantibodies to the heat shock protein hsp90 in systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest* 1988; 81: 106-109.
60. EDITORIALS: The 64 k question in diabetes. *Lancet* 1990; 336: 597-598.
61. ELIAS D, MARKOVITS D, RESHEF T, VAN DER ZEE R, COHEN IR: Induction and therapy of autoimmune diabetes in the non-obese diabetic (NOD/Lt) mouse by a 65 kDa heat shock protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 1576-1580.
62. FERRARINI M, HALTAI S, ZOCHI MR, RUGARLI C: Unusual expression and localization of heat-shock proteins in human tumor cells. *Int J Cancer* 1992; 51: 613-619.
63. FERRINI U, FALCIONI R, DELFINO A, CAVALIERE R, ZUPI G, NATALI PG: Heat-shock proteins produced by two human melanoma cell lines: absence of correlation with thermosensitivity. *Int J Cancer* 1984; 34: 651-655.
64. OMAR RA, LANKS KW: Heat shock protein synthesis and cell survival in clones of normal simian virus 40-transformed mouse embryo cells. *Cancer Res* 1984; 44: 3976-3982.
65. CIOCCA DR, FUQUA SA, LOCK-LIM S, TOFT DO, WELCH WJ, Mc GUIRE WL: Response of human breast cancer cells to heat shock and chemotherapeutic drugs. *Cancer Res* 1992; 52: 3648-3654.