

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи



Албакова Зарема

**Протективные и иммуномодулирующие эффекты белков теплового шока в
лимфомах**

3.2.7 – Аллергология и иммунология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2022

Работа выполнена в лаборатории клеточных взаимодействий Института Биоорганической химии им. академиков М.М.Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук

Научный руководитель **Сапожников Александр Михайлович**
доктор биологических наук, профессор

Официальные оппоненты **Гужова Ирина Владимировна**
доктор биологических наук
Руководитель отдела молекулярных и клеточных взаимодействий Института Цитологии Российской академии наук

Абакушина Елена Вячеславовна
доктор медицинских наук
Руководитель отдела по разработке и исследованиям в области иммунологии, заместитель генерального директора ООО "Текон Медицинские приборы"

Муранова Лидия Константиновна
кандидат биологических наук
Научный сотрудник кафедры биохимии биологического факультета, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»

Защита диссертации состоится «23» декабря 2022 г. в 15 часов 00 минут на заседании диссертационного совета МГУ.015.1 (МГУ.03.12) Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова по адресу: Москва, Ленинские горы, д.1, стр 12, Биологический факультет, ауд. 389.

E-mail: dkiselevs@mail.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп. д 27) и на сайте ИАС «ИСТИНА» <https://istina.msu.ru/dissertations/510176527/>

Автореферат разослан «__» _____ 2022 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук



Д.Б. Киселевский

Общая характеристика работы

Актуальность и степень разработанности темы исследования

Молекулярные шапероны семейства белков теплового шока (HSP) являются одними из самых мультифункциональных белков, эффекты которых сопровождают раковые клетки на всех основных этапах их развития. Исследования, направленные на изучение эффектов HSP в подавлении клеточной смерти, стали основой для открытия и разработки нового типа лекарственных средств - ингибиторов HSP. Иммунологические эффекты HSP послужили основой для разработки различных иммунотерапевтических подходов.

Иммуномодулирующие эффекты белков теплового шока не до конца изучены в патогенезе и терапии раковых заболеваний, в частности в лимфоме. Лимфома - это гетерогенный вид рака, который подразделяется на два основных типа, такие как лимфома Ходжкина и неходжкинские лимфомы. Клетки лимфомы создают сложное и уникальное иммуномодулирующее микроокружение, где воспалительные и стромальные клетки секретируют различные факторы для пролиферации и выживания опухолевых клеток. Хотя иммунологические подходы в лечении лимфомы показали многообещающие результаты, значительная часть онкологических больных не отвечает на лечение. Целью прецизионной иммунотерапии является определение правильного лечения для подходящего пациента и предсказание наилучшего ответа пациента на точно настроенную персонализированную терапию, управляемую биомаркерами. Настоящая работа посвящена изучению роли HSP в качестве биомаркеров рака, а также исследованию иммуномодулирующего потенциала HSP в патогенезе и иммунотерапии лимфомы. Дальнейшее изучение иммунологических и протективных функций HSP в раковых заболеваниях может помочь в разработке более эффективной прецизионной иммунотерапии лимфомы.

Цели и задачи исследования

Целью настоящей работы являлось изучение молекулярных шаперонов семейства HSP и ко-шаперонов в патогенезе и иммунотерапии лимфомы.

Основные задачи проекта:

1. Определить ключевые и диагностически значимые HSP биомаркеры рака.
2. Исследовать содержание внутриклеточных и внеклеточных гомологов HSP в лимфоцитах периферической крови и костного мозга первичных пациентов с лимфомой Ходжкина и В-клеточными неходжкинскими лимфомами.
3. Исследовать эффект активации на внутриклеточный и внеклеточный пул HSP в Т клетках периферической крови первичных пациентов с В-клеточными лимфомами.
4. Изучить иммуномодулирующий потенциал белков HSP в иммунных клетках пациентов с В-клеточными лимфомами.
5. Исследовать эффект анти-PD-1 иммунотерапии на содержание внутриклеточных и внеклеточных HSP в иммунных клетках пациентов с рефрактерной/рецидивирующей классической лимфомой Ходжкина.

Объект и предмет исследования

Объектом и предметом исследования являются белки теплового шока, их протективные и иммуномодулирующие эффекты в патогенезе и иммунотерапии лимфомы, а также их потенциальное использование в качестве биомаркеров рака.

Научная новизна работы

В ходе работы, был разработан метод по выявлению ключевых и диагностически значимых HSP биомаркеров рака. Разработанный метод был опубликован в специальной секции «Внедрение технологий искусственного интеллекта и машинного обучения в медицину» журнала *Frontiers in Medicine* (2021).

Впервые было показано, что В лимфоциты имеют повышенное содержание HSP90 β и STIP1 у пациентов с лимфомой, в то время как блокировка PD-1 приводила к изменению внутриклеточного и внеклеточного пула HSP90 в лимфоцитах пациентов с резистентной формой лимфомы Ходжкина.

Впервые было установлено, что у пациентов с В - клеточной лимфомой нарушено содержание внутриклеточных и внеклеточных HSP, иммунных контрольных точек (PD-1, CTLA-4) и STAT3 в активированных Т клетках. Кроме того, было показано, что блокировка HSP90 специфично ингибирует дегрануляцию NK клеток и продукцию IFN γ , тогда как комбинированная блокировка HSP90 и иммунных контрольных точек влияет на дегрануляцию активированных CD4⁺ и CD8⁺ Т клеток у пациентов с В - клеточными лимфомами.

Теоретическая и практическая значимость работы

Разработанный метод позволяет определить рак по содержанию HSP и ко-шаперонов в моче пациентов, что открывает новые возможности для потенциального использования HSP для диагностики рака.

В ходе работы, было установлено, что уровень конститутивной изоформы HSP90 (HSP90 β) различается между Т, В, NK и NKT клетками, предполагая, что различные типы иммунных клеток по-разному экспрессируют конститутивные гомологи HSP. Также было показано, что пациенты с В - клеточными лимфомами отличаются от здоровых доноров по содержанию внутриклеточных и внеклеточных гомологов HSP в активированных Т клетках.

Методология и методы исследования

Для исследования взаимодействия доменов HSP70 в закрытой и открытой формах с различными иммунными рецепторами, был проведен молекулярный докинг. Для обнаружения критических белков HSP в раковых заболеваниях, были проанализированы данные 231 раковых больных и доноров с помощью алгоритмов машинного обучения. Для изучения свойств белка HSP70, была сконструирована плазида, кодирующая *HSP70*, и подобраны оптимальные условия для выделения рекомбинантного белка HSP70. Для изучения роли HSP в иммунных клетках, в исследование были включены только первичные пациенты с определенными типами лимфом. Для изучения роли HSP в иммунотерапии лимфомы, в исследование были включены пациенты с рецидивной или рефрактерной (p/r) формой лимфомы. В ходе работы использовались различные методы, такие как проточная цитофлуориметрия, ПЦР, SDS-PAGE, Вестерн-блоттинг, выделение, культивирование, активация

различных видов иммунных клеток периферической крови и костного мозга, а также *in vitro* анализы (анализ дегрануляции и секреции цитокинов).

Степень достоверности результатов

Достоверность результатов, описанных в настоящей работе, заключается в проведенной теоретической работе, в выдвижении и проверке научных гипотез с использованием современных методов научных исследований, включая методы биоинформатики, биостатистики, а также критического анализа/сравнения полученных результатов с данными из мировой научной литературы. Все описанные в настоящей работе основные результаты прошли процесс 'peer-review' и опубликованы в международных рецензируемых журналах Q1 & Q2.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Присутствие гомологов HSP90 в моче пациентов коррелирует с наличием у них ракового заболевания.
2. Первичные пациенты с В-клеточными лимфомами имеют аберрантное содержание HSP90 и ко-шаперона STIP1 в В клетках периферической крови и костного мозга. Повышенный уровень HSP90 в В клетках периферической крови и костного мозга не связан с их злокачественным фенотипом.
3. Содержание HSP, иммунных контрольных точек (PD-1 и CTLA-4) и STAT3 нарушено в активированных Т клетках первичных пациентов с В-клеточными лимфомами.
4. Модулирование содержания HSP90 может влиять на функции активированных Т и NK клеток первичных пациентов с В-клеточными лимфомами.
5. Иммунотерапия анти-PD-1 может изменять внутриклеточный и внеклеточный пул HSP90 в лимфоцитах пациентов с рецидивной или рефрактерной классической лимфомой Ходжкина.

Личный вклад автора

В основу данного проекта легла идея автора, получившая в 2020 году поддержку гранта РФФИ «Аспиранты» №20-315-90081. Экспериментальные данные, послужившие основой для публикации, получены автором самостоятельно за время аспирантуры. Исключение составляет ПЦР-анализ В-клеточной клональности, проведенный Никулиной Е.Е. (НМИЦ гематологии). Исключение также составляют результаты, полученные из публичных баз данных, которые указываются в соответствующем разделе настоящей работы. Планирование, интерпретация данных и подготовка статей к публикации проводились автором. Дополнительный вклад автора в работу заключался в рецензировании статей по HSP и раку для журналов Life Sciences, Translational Oncology, Heliyon и Oncology letters.

Клонирование *HSPA1A* и выделение рекомбинантного белка HSP70 проводилось в Лаборатории Молекулярной Диагностики ИБХ РАН под руководством к.б.н. Рязанцева Д.Ю. Техническая работа по молекулярному докингу проводилась к.б.н. Армеевым Г.А. (кафедра биоинженерии МГУ, Москва). Техническая работа по машинному обучению была проведена Норинхо Д.Д. (департамент статистики, Португалия). Сопровождение проекта со стороны клиники проводилось врачом-гематологом к.м.н. Мангасаровой Я.К. (НМИЦ гематологии, Москва).

Апробация результатов и публикации

Диссертация была апробирована на межлабораторном семинаре Отдела иммунологии ИБХ РАН 1 сентября 2022 года. Результаты работы отражены в 8 публикациях в журналах, индексируемых в международных системах цитирования (Web of Science, Scopus). Результаты работы были также представлены на международной конференции 2nd International Conference on Immunology and Vaccines, online, 6-7 августа 2021 года.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа состоит из Введения, Обзора литературы, Материалов и методов, Resultados, Обсуждения, Выводов и списка цитируемой литературы, который включает 292 источника. Работа изложена на 87 страницах, содержит 18 рисунков, 2 таблицы и 3 приложения.

Основное содержание работы

Работа по исследованию роли молекулярных шаперонов HSP состояла из двух частей:

1. Определение ключевых гомологов HSP в раковых заболеваниях.
2. Анализ иммуномодулирующего потенциала HSP в лимфомах:
 - 2.1. Анализ содержания внутриклеточных и внеклеточных HSP90 гомологов и STIP1 ко-шаперона в иммунных клетках периферической крови и костного мозга первичных пациентов с лимфомой Ходжкина и В-клеточными неходжкинскими лимфомами.
 - 2.2. Анализ содержания внутриклеточных и поверхностных HSP90 α , HSP90 β , HSP70, HSC70, HSP40/DNAJB1, HSP60, GRP78, PD-1 и CTLA-4 в активированных Т клетках. Исследование влияния комбинированной блокировки HSP90 и иммунных контрольных точек (PD-1 и CTLA-4) на дегрануляцию активированных CD4⁺ и CD8⁺ Т клеток у пациентов с В-клеточными лимфомами. Исследование влияния блокировки HSP90 на внутриклеточные PD-1 и CTLA-4 в активированных Т клетках.
 - 2.3. Исследование влияния блокировки HSP90 на функциональную активность активированных NK клеток периферической крови и костного мозга первичных пациентов с В-клеточными лимфомами.
 - 2.4. Исследование влияния анти-PD-1 иммунотерапии на внутриклеточный и внеклеточный пул HSP90 в иммунных клетках пациентов с рецидивной или рефрактерной лимфомой Ходжкина.

Определение ключевых HSP и ко-шаперонов в онкологических заболеваниях

Для определения ключевых гомологов HSP в раковых заболеваниях, были проанализированы масс-спектрометрические данные пациентов с различными типами рака, полученные из открытого доступа (ProteomeXchange PXD008846) (Zhang, *et al.*, EBioMedicine, 2018). Содержание гомологов HSP и ко-шаперонов в моче было проанализировано для здоровых доноров (CTL), пациентов с доброкачественными заболеваниями, таких как пневмония (PM) и хроническая обструктивная болезнь легких (COPD), а также для шести групп рака: рак легкого (LC), рак мочевого пузыря (BC), рак шейки матки (CCA), колоректальный рак (CRC), рак пищевода (EC) и рак желудка (GC). Процедура была разделена на две стадии: тест Крускала-Уоллиса и апостериорный тест Данна (Dolgun & Demirhan, 2017). Также, использовалась

коррекция теста множественных сравнений - коррекция Холма-Бонферрони (Blakesley, *et al.* 2009).

Для того, чтобы исследовать возможность использования HSP в качестве биомаркеров рака, была создана модель прогнозирования рака с помощью XGBoost. Так как HSP расположены в разных клеточных компартментах, существуют в разных формах (конститутивной/стресс-индуцированной) и взаимодействуют с ко-шаперонами во время своих функциональных циклов, в модель были введены различные комбинации простых соотношений и стратегии умножения. Примеры соотношений: HSP90AA1/TRAP, HSP90AB1/HSP90AA1, FKBP4/HSP90AA1 и т. д. Эффективность метода оценивалась посредством 10-кратной стратифицированной перекрестной проверки. Для идентификации белков, которые положительно влияли на модель прогнозирования рака, был использован подход Shapely Addictive Explanations (SHAP).

Белки теплового шока и ко-шапероны, включая HSP90AB1, TRAP1, FKBP4, HSPA9, HSPB5, CCT1 и CCT5, были идентифицированы как дифференциально экспрессирующиеся HSP в различных типах рака (Таблица 1).

Таблица 1. Дифференциально экспрессирующиеся HSP в моче раковых больных

H_0	CCT1			CCT5			FKBP4		
	stat	p-value	reject H_0	stat	p-value	reject H_0	stat	p-value	reject H_0
LC - CTL = 0	-3.6	1.69E-03	True	-4.1	2.41E-04	True	-5.0	4.04E-06	True
BC - CTL = 0	-1.9	0.125	False	-2.9	1.02E-02	True	-4.1	1.36E-04	True
CCA - CTL = 0	-3.9	5.92E-04	True	-3.4	2.37E-03	True	-2.7	1.19E-02	True
CRC - CTL = 0	-3.4	2.47E-03	True	-3.8	6.56E-04	True	-4.3	8.05E-05	True
EC - CTL = 0	-2.8	1.53E-02	True	-2.3	4.77E-02	True	-0.84	0.402	False
GC - CTL = 0	-1.4	0.164	False	-1.2	0.216	False	-3.4	1.91E-03	True

H_0	HSP90AB1			HSPA9			HSPB1		
	stat	p-value	reject H_0	stat	p-value	reject H_0	stat	p-value	reject H_0
LC - CTL = 0	-2.2	0.119	False	4.3	1.02E-04	True	-1.7	0.404	False
BC - CTL = 0	0.61	1.00	False	4.3	8.80E-05	True	-0.54	0.592	False
CCA - CTL = 0	-0.68	1.00	False	1.9	7.84E-02	False	2.6	5.79E-02	False
CRC - CTL = 0	-2.7	3.77E-02	True	2.1	7.84E-02	False	-1.5	0.497	False
EC - CTL = 0	0.58	1.00	False	3.1	7.18E-03	True	-1.2	0.497	False
GC - CTL = 0	-2.7	3.77E-02	True	2.2	7.27E-02	False	-1.4	0.497	False

H_0	HSPB5			TRAP1		
	stat	p-value	reject H_0	stat	p-value	reject H_0
LC - CTL = 0	0.25	1.00	False	3.5	2.28E-03	True
BC - CTL = 0	-0.56	1.00	False	3.5	2.76E-03	True
CCA - CTL = 0	2.7	4.07E-02	True	2.8	1.70E-02	True
CRC - CTL = 0	-1.9	0.278	False	1.9	0.119	False
EC - CTL = 0	-1.1	1.00	False	3.3	3.69E-03	True
GC - CTL = 0	0.76	1.00	False	3.4E-02	0.973	False

Модель прогнозирования рака, обученная на гомологах HSP и ко-шаперонах, показала ~ 90% точность и 84,61% сбалансированную точность (точность 87,041%), (Рис. 1А). Низкие уровни HSP90AB1/TRAP1, HSPA6/TRAP1 и HSP90AA1/TRAP1 в моче повышали вероятность наличия рака у пациента (Рис. 1В). Для оценки различий в уровне HSP при разных типах рака, мы построили тепловую карту,

представляющую z-оценку HSP для каждого пациента (Рис. 1Б). HSP90AA1 и HSPD1 показали высокие уровни при ВС; HSPB1 и HSBP5 при ССА; ST13, DNAJA1 и HSPA8 при LC; FKBP4 и HSPA8 при ЕС (Рис. 1Б). В целом, образцы мочи содержат характерные для рака HSP (Рис 1А), однако, это требует дальнейшего изучения и валидации на большой независимой выборке. Эти данные согласуются с предыдущими исследованиями, которые показали, что HSP могут использоваться в качестве биомаркеров рака (Shi, *et al.*, 2014; Fu, *et al.*, 2017; Tas, *et al.* 2017; Sun, *et al.*, 2010; Fredly, *et al.*,2012; Kasanga, *et al.*, 2018; Zhong, *et al.*, 2003; Seiwert, *et al.*, 2005; Suzuki, *et al.*, 2006).

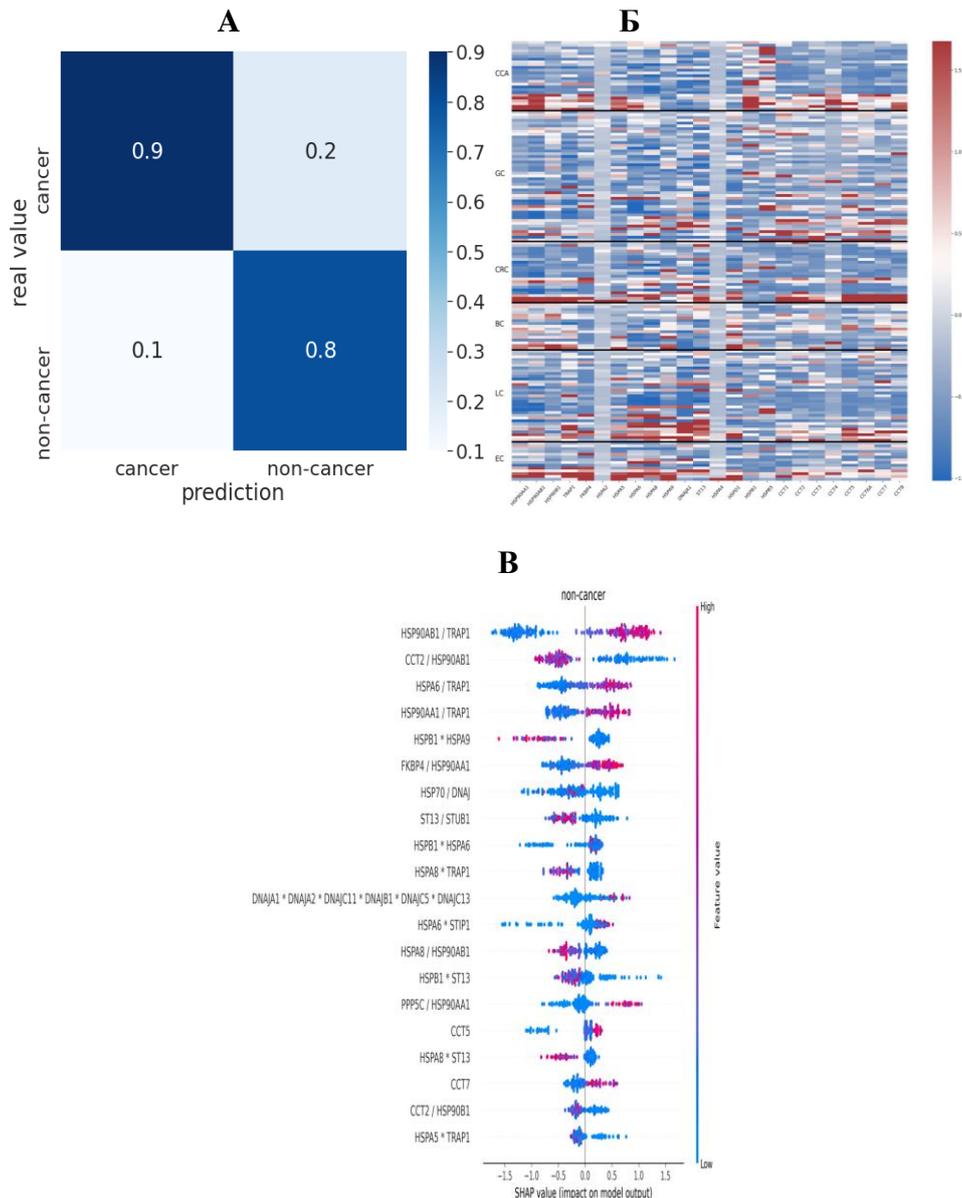
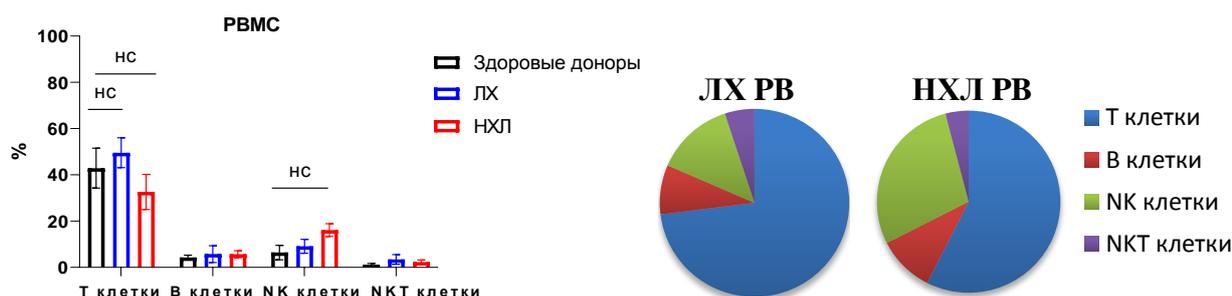


Рисунок 1. Ключевые и диагностически значимые HSP биомаркеры в моче раковых больных. (А) Матрица путаницы (Confusion matrix) (Б) Тепловая карта нормализованных по z-оценке уровней HSP в моче пациентов с различными типами рака. (В) Сводные графики SHAP для модели прогнозирования рака. (из работы Albakova, *et al.* 2021. *Frontiers in Medicine*)

Анализ иммунных клеток в периферической крови и костном мозге первичных пациентов с лимфомой Ходжкина и неходжкинскими лимфомами

Первичные пациенты с лимфомой Ходжкина (ЛХ) и неходжкинскими лимфомами (НХЛ) различались по частоте иммунных клеток в периферической крови и костном мозге (Рис. 2). Так, у пациентов с ЛХ была выявлена более высокая частота Т клеток (CD3+CD56-) и NKT (CD3+CD56+) клеток в периферической крови и костном мозге по сравнению с пациентами с НХЛ (Рис 2А). Повышенная частота В клеток (CD19+CD3-) и сниженная частота NK клеток (CD56+CD3-) наблюдались в костном мозге по сравнению с периферической кровью при лимфомах ЛХ и НХЛ (Рис. 2Б).

А



Б

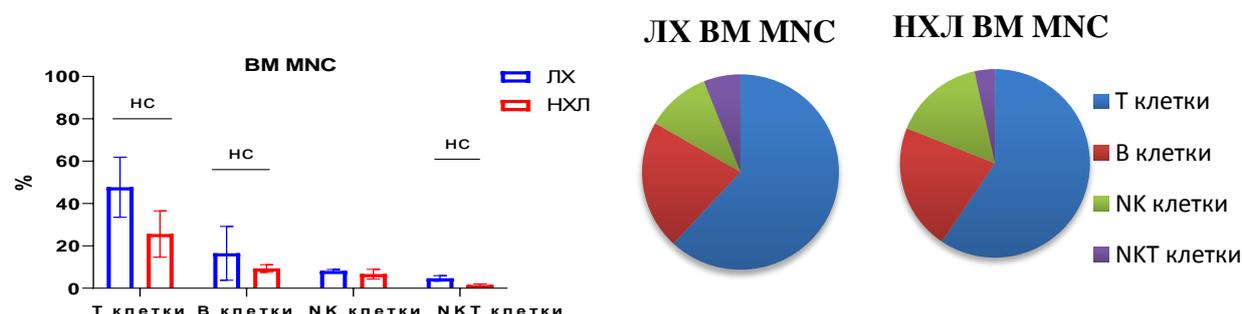


Рисунок 2. Процент лимфоцитов в образцах периферической крови и костного мозга пациентов с ЛХ и НХЛ. Процент Т клеток (CD3+ CD56-), В клеток (CD3-CD19+), NK клеток (CD3-, CD56+) и NKT клеток (CD3+CD56+) в периферической крови (А) пациентов с ЛХ, НХЛ и здоровых доноров и образцах костного мозга (Б), пациентов с ЛХ и НХЛ. Графики показывают среднее \pm SEM. нс, недостоверные различия, PBMC, мононуклеарные клетки периферической крови; BM MNC, мононуклеарные клетки костного мозга. (из работы *Albakova, et al. 2022, Frontiers in Immunology*)

Анализ внутриклеточных и внеклеточных HSP в лимфоцитах периферической крови и костного мозга первичных пациентов с лимфомой Ходжкина и неходжкинскими лимфомами

В-лимфоциты показали более высокое содержание внутриклеточного HSP90 β (iHSP90 β) по сравнению с другими лимфоцитами периферической крови пациентов с лимфомами (Рис. 3А). iHSP90 β и iSTIP1 были повышены в периферических В клетках пациентов с ЛХ по сравнению со здоровыми донорами (Рис. 3А, В). В-лимфоциты костного мозга показали более низкие iHSP90 β и iSTIP1 по сравнению с периферическими В клетками у пациентов с ЛХ (Рис. 3Г, Е). В-клетки

периферической крови показали повышенный iSTIP1 у пациентов с НХЛ (Рис. 3И). iTRAP1 был понижен в лимфоцитах периферической крови у пациентов с лимфомами по сравнению со здоровыми донорами (Рис. 3Б). STIP1 был повышен на поверхности В клеток (sSTIP1) периферической крови пациентов с ЛХ по сравнению со здоровыми донорами и пациентами с НХЛ (Рис. 3К). sHSP90 β был значительно повышен на В клетках костного мозга в сравнении с В клетками периферической крови пациентов с ЛХ, в то время как sSTIP1 был значительно повышен на В клетках периферической крови по сравнению с В клетками костного мозга у пациентов с ЛХ (Рис. 3Л). Эти данные свидетельствуют о том, что HSP90 β и STIP1 аберрантно экспрессируются в В клетках и, что поверхностное и внутриклеточное содержание HSP90 β различается между В клетками периферической крови и костного мозга первичных пациентов с лимфомами.

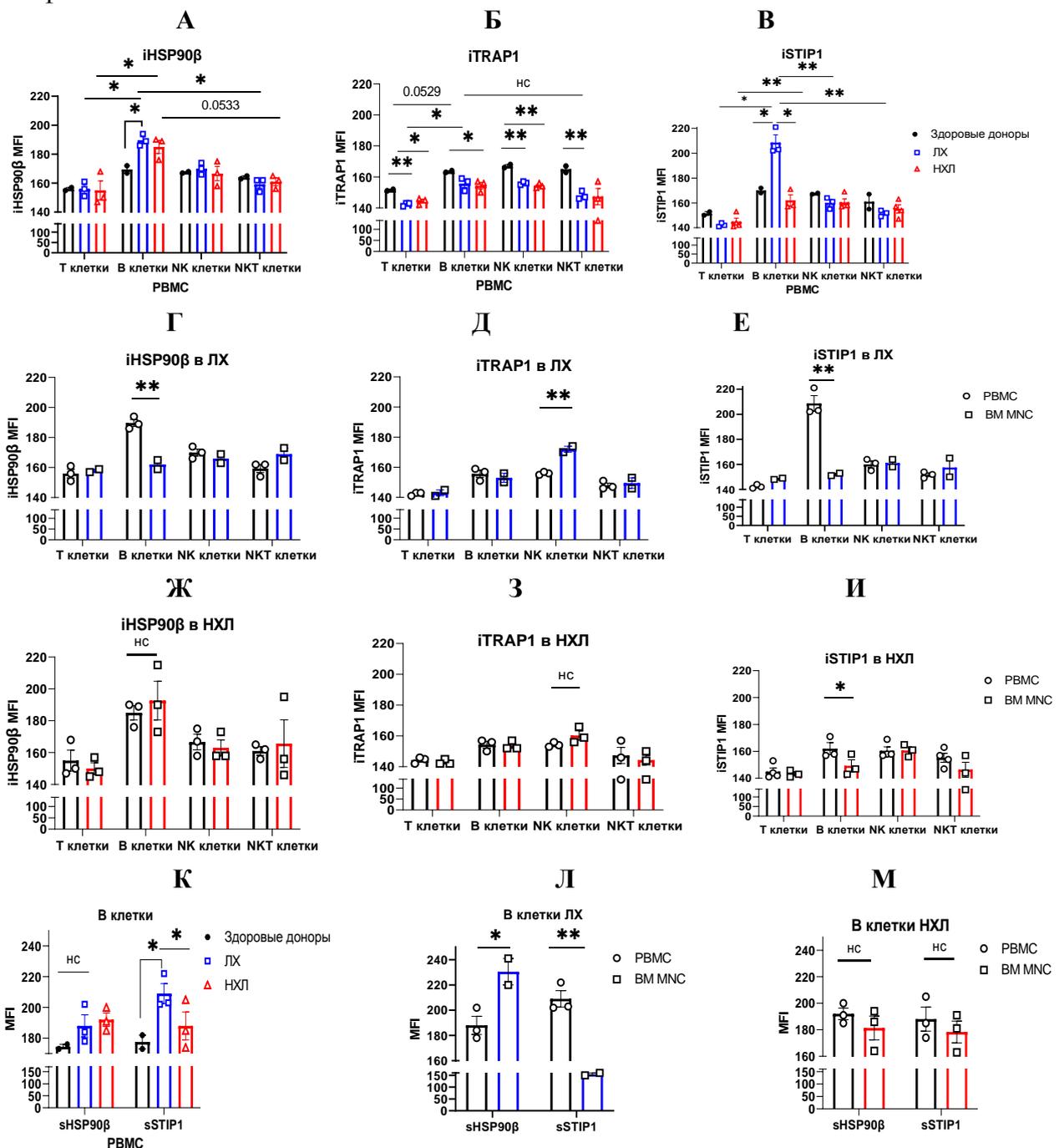


Рисунок 3. Внутриклеточные и внеклеточные HSP90 β , TRAP1 и STIP1 в лимфоцитах периферической крови и костного мозга у пациентов с ЛХ и НХЛ. Средний уровень внутриклеточных HSP90 β (iHSP90 β) (А), iTRAP1 (Б) и iSTIP1 (В) (как средняя интенсивность флуоресценции; (MFI) в лимфоцитах периферической крови пациентов с ЛХ (n=3), НХЛ (n=3) и здоровых доноров (n = 2). iHSP90 β (Г), iTRAP1 (Д) и iSTIP1 (Е) в лимфоцитах костного мозга пациентов с ЛХ (n=2) и iHSP90 β (Ж), iTRAP1 (З) и iSTIP1 (И) в НХЛ (n=3) пациентов. (К-М) sHSP90 β и sSTIP1 на В лимфоцитах периферической крови и костного мозга пациентов с лимфомой. (К) sHSP90 β и sSTIP1 на В клетках периферической крови пациентов с ЛХ (n = 3), пациентов с НХЛ (n = 3) и здоровых доноров (n = 2). (Л) sHSP90 β и sSTIP1 на В клетках периферической крови и костного мозга пациентов с ЛХ (n = 2). (М) sHSP90 β и sSTIP1 на В клетках периферической крови и костного мозга пациентов с НХЛ (n = 3). iHSP, внутриклеточный HSP; sHSP, поверхностный HSP. Графики показывают среднее \pm SEM. нс, недостоверное различие, *p<0.05, **p<0.01. (из работы Albakova, et al. 2022, *Frontiers in Immunology*)

Анализ В-клеточной клональности периферической крови и костного мозга первичных пациентов с лимфомой Ходжкина и неходжкинскими лимфомами

В периферической крови и костном мозге пациентов с ЛХ и НХЛ не было обнаружено злокачественных клонов В клеток (Рис. 4А-Г), что позволяет предположить, что aberrантная экспрессия HSP90 и STIP1 в В клетках не связана с их злокачественным фенотипом.

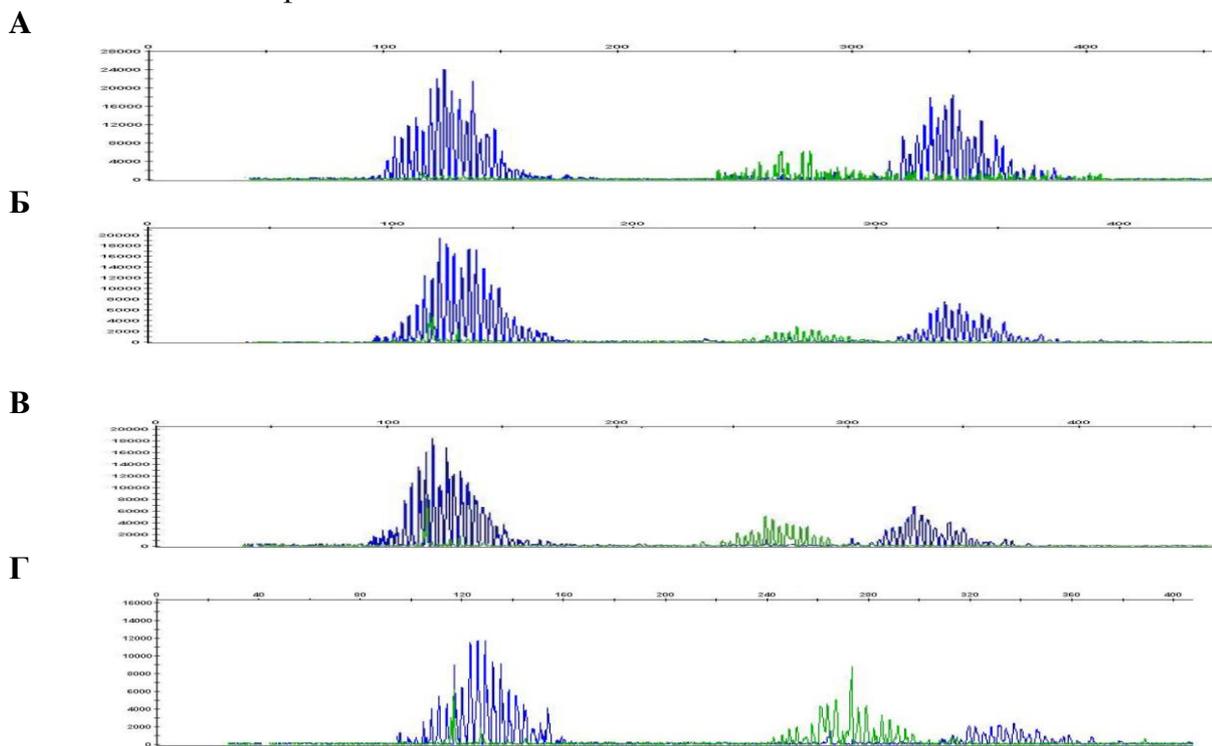


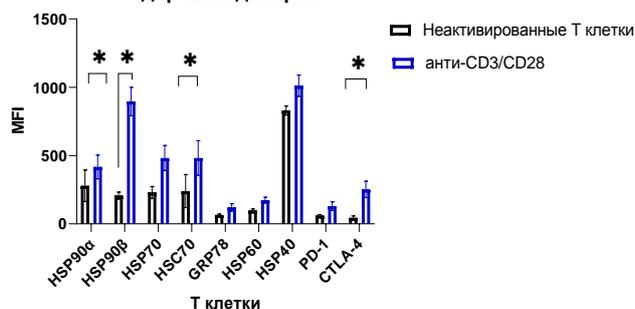
Рисунок 4. Анализ В-клеточной клональности (анализ реарранжировки генов IgH) в периферической крови и костном мозге пациентов с ЛХ и НХЛ. Репрезентативные графики, показывающие Гауссово распределение множественных пиков в (А) периферической крови и (Б) костном мозге у пациента с НХЛ и (В) периферической крови и (Г) костном мозге у пациента с ЛХ. (из работы Albakova, et al. 2022, *Frontiers in Immunology*)

Анализ внутриклеточных и внеклеточных HSP, PD-1 и CTLA-4 в активированных Т клетках первичных пациентов с агрессивными и индолентными типами В-клеточных лимфом

Мы исследовали влияние CD3/CD28 активации на внутриклеточное и внеклеточное содержание цитозольных гомологов (HSP90 α , HSP90 β , HSP70, HSC70 и HSP40/DNAJB1), эндоплазматического ретикулума (GRP78) и митохондриального (HSP60) HSP в Т клетках здоровых людей и первичных пациентов с индолентными лимфомами (фолликулярными лимфомами) и агрессивными лимфомами (диффузными крупноклеточными В-клеточными лимфомами и первичными медиастинальными В-клеточными лимфомами). Следует отметить, что HSP90 α , HSP70, GRP78 и HSP40/DNAJB1 являются стресс-индуцированными гомологами, тогда как HSP90 β , HSC70 и HSP60 являются конститутивно-экспрессируемыми гомологами HSP. Внутриклеточные HSP были повышены в Т клетках после 48 часов стимуляции CD3/CD28 и IL-2 у здоровых доноров, однако только HSP90 α , HSP90 β и HSC70 достигли статистической значимости ($p < 0,05$) (Рис. 5А). Эти данные подтверждаются предыдущими исследованиями, которые показали, что стимуляция фитогемагглютинином (PHA) и IL-2 повышает уровень HSP90 и HSP70 в Т клетках (Ferris, *et al.*, 1988). Не было обнаружено статистической разницы по внеклеточным HSP в активированных Т клетках здоровых доноров (Приложение 3 Рис. S4Б). Напротив, у пациентов с индолентной лимфомой содержание внеклеточных HSP было выше по сравнению со здоровыми донорами, хотя разница не была статистически значимой (Рис. 5В, Приложение 3 Рис. S4Б). В сравнении со здоровыми донорами, активация Т клеток не приводила к значительному повышению STAT3 в Т клетках пациентов с В - клеточными лимфомами (Рис. 5Г). Эти данные свидетельствуют о том, что повышение внутриклеточных HSP является нормальным клеточным ответом на активацию Т клеток, и что этот ответ нарушен в Т клетках у пациентов с лимфомой, что также подтверждается нарушением регуляции экспрессии иммунных контрольных точек и STAT3 у пациентов с лимфомой. Эти данные также предполагают, что aberrantная экспрессия HSP на поверхности CD3/CD28-активированных Т-клеток связана с В-клеточными лимфомами, однако, необходимы дальнейшие исследования для оценки влияния Т-клеточной активации на экспрессию внеклеточных HSP. Блокировка HSP на дисрегулированных Т-клетках может быть многообещающей стратегией для лечения пациентов с В-клеточными лимфомами.

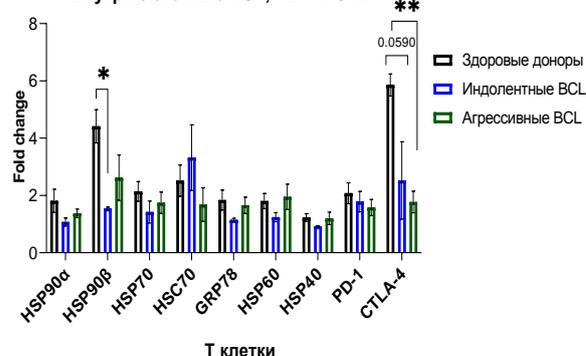
А

Внутриклеточные HSP, PD-1 и CTLA-4 в Т клетках здоровых доноров



Б

Внутриклеточные HSP, PD-1 и CTLA-4**



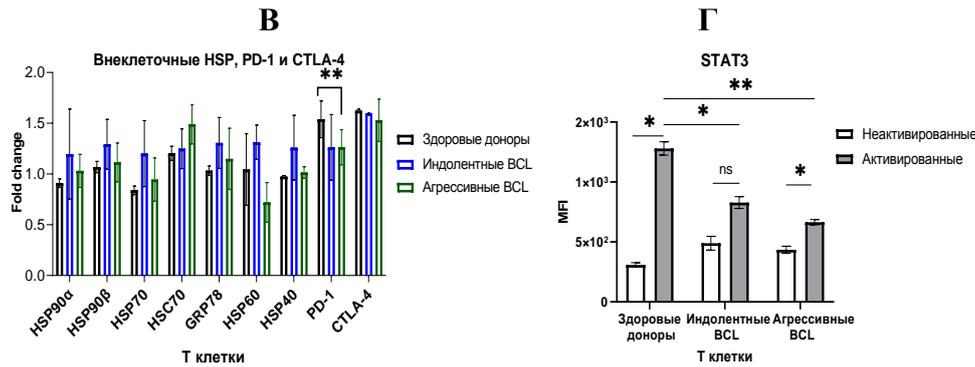


Рисунок 5. HSP, PD-1, CTLA-4 и STAT3 в активированных Т клетках. (А). Внутриклеточные HSP, PD-1 и CTLA-4 в активированных Т клетках у здоровых доноров. Рап Т клетки выделяли из здоровых PBMC (n=4) и стимулировали анти-CD3/CD28 или не стимулировали (в состоянии покоя) в течение 48 часов. (Б). Внутриклеточные HSP, PD-1 и CTLA-4 у пациентов с индолентной (n=3) и агрессивной (n=4) лимфомой. Кратность изменения MFI рассчитывали путем нормализации активированных Т-клеток к неактивированным. (В). Внеклеточные HSP, PD-1 и CTLA-4 у пациентов с индолентной и агрессивной лимфомой. (Г). STAT3 в неактивированных и активированных Т клетках у здоровых доноров и пациентов с лимфомой. Данные показывают среднее значение ± SEM. ns, недостоверно, *p<0,05, **p<0,01 (из работы *Albakova, et al. 2022, Biomedicines*)

Влияние комбинированной блокировки HSP90 и иммунных контрольных точек на дегрануляцию Т клеток *in vitro*

Поскольку экспрессия белков теплового шока и иммунных контрольных точек связана с активацией Т клеток, мы проанализировали влияние ингибирования HSP90, а также комбинированной блокировки HSP90 и иммунных контрольных точек (PD-1, CTLA-4) на реакцию дегрануляции Т клеток у пациентов с В-клеточными лимфомами. Для исследования комбинированной блокировки HSP90, PD-1 и CTLA4 использовали аллогенную смешанную лимфоцитарную реакцию (MLR). Так как ингибитор HSP90 может также влиять на дендритные клетки во время MLR, в параллельном эксперименте проводили CD3/CD28 стимуляцию. Было установлено, что ингибитор HSP90 снижает CD4 и CD8 на поверхности Т клеток у здоровых доноров и пациентов с лимфомой (Рис. 6). Эти результаты согласуются с предыдущими данными, показывающими, что ингибитор HSP90 снижает поверхностную экспрессию CD4 и CD8 на Т клетках (Вае, *et al.*, 2013). Кроме того, было показано, что ингибирование HSP90 снижает CD107a на CD4+Т клетках у здоровых доноров во время стимуляции MLR и анти-CD3/CD28 (Рис. 7А, 7Б). Напротив, ингибирование HSP90 повышало экспрессию CD107a на поверхности CD4+ Т клеток, а анти-PD-1 и анти-CTLA-4 не отменяли этот эффект как при аллогенной стимуляции ДК, так и при стимуляции анти-CD3/CD28 (Рис. 7А, 7Б). Как и в случае с CD4+ Т клетками, ингибирование HSP90 снижало CD107a на CD8+ Т клетках здоровых доноров, хотя разница не достигала статистической значимости (Рис. 7В, 7Г). По сравнению со здоровыми донорами, CD8+ Т клетки пациентов с лимфомой показали повышенный CD107a как при добавлении одного только ингибитора HSP90, так и при комбинированной блокировке HSP90 и PD-1 (Рис. 7В). Здоровые доноры показали снижение CD107a на поверхности CD8+ Т клеток при

комбинированной блокинровке HSP90 и PD-1 (Рис. 7В). Различные стимуляции по-разному влияли на дегрануляцию CD8⁺ Т клеток во время комбинированной блокинровки HSP90 и иммунных контрольных точек (Рис. 7В, 7Г). Следует отметить, что в данной работе изучались только ко-ингибирующие иммунные контрольные точки (PD-1 и CTLA-4). Дальнейшие исследования по изучению такой комбинированной терапии должны также включать ко-стимулирующие иммунные контрольные точки, такие как GITR, OX40, 4-1BB и индуцируемый костимулятор Т-клеток (ICOS). Нацеливание на специфический гомолог HSP и ко-ингибирующие/ко-стимулирующие иммунные контрольные точки на Т-клетках может быть потенциальной терапевтической стратегией для больных раком, однако это требует дальнейшего изучения.

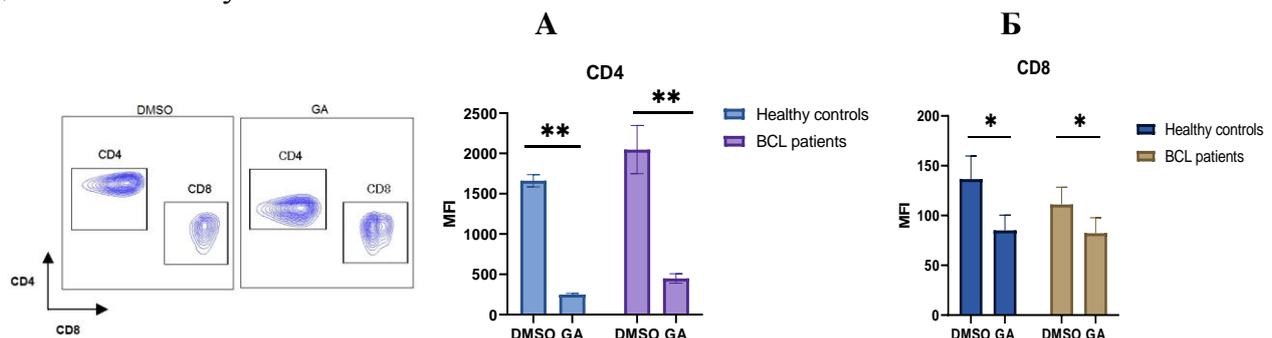


Рисунок 6. Блокировка HSP90 снижает CD4 (А) и CD8 (Б) на поверхности Т клеток. Т клетки инкубировали в течение 4 дней с аллогенными мо-ДК в присутствии 0.1 μ M гелданамицина (GA). Репрезентативные графики проточной цитометрии слева, показывающие снижение CD4 и CD8 на поверхности Т клеток в ответ на GA в MLR. Данные представляют собой среднее значение \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. (из работы *Albakova, et al. 2022, Biomedicines*)

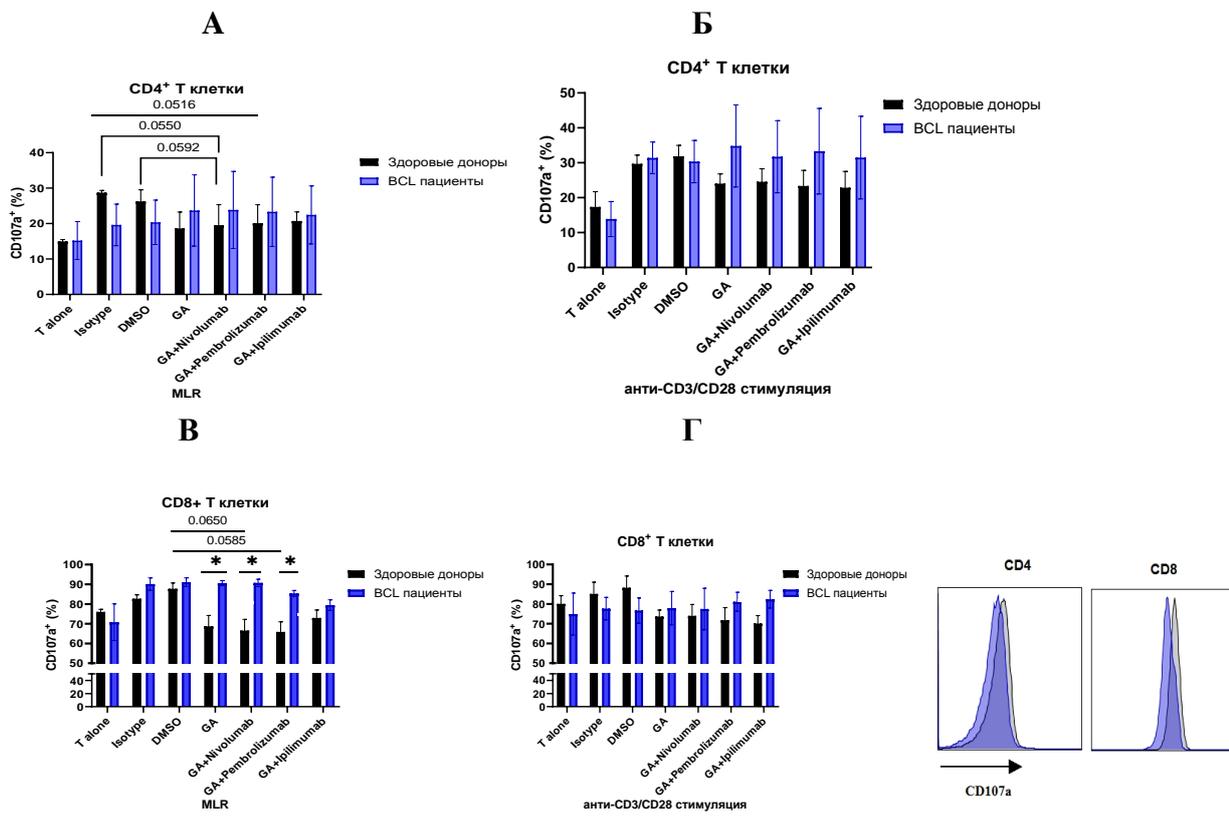


Рисунок 7. Ингибирование HSP90 влияет на реакцию дегрануляции CD4+ и CD8+ Т клеток. Реакция дегрануляции, измеренная по поверхностному CD107a на CD4+ Т клетках (А, Б) и CD8+ Т клетках (В, Г) у здоровых доноров и пациентов с ВСЛ. Выделенные Т клетки стимулировали аллогенными мо-ДК (А, В) или анти-CD3/CD28 (Б,Г) в присутствии 0,1 μ M гелданамицина, 10 мкг/мл анти-PD-1 (пембролизумаб/ниволумаб), 10 мкг/мл анти-CTLA-4 (ипилимумаб). Репрезентативные графики проточной цитометрии справа показывают снижение CD107a на CD4+ и CD8+ Т клетках у здоровых доноров после ингибирования HSP90. Данные показывают среднее \pm SEM. ns, недостоверное различие, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. (из работы *Albakova, et al. 2022, Biomedicines*)

Влияние блокировки HSP90 на внутриклеточные PD-1 и CTLA-4 *in vitro*

Мы проанализировали влияние ингибирования HSP90 на содержание внутриклеточных PD-1 и CTLA-4. Ингибирование HSP90 не изменяло содержание PD-1 и CTLA-4 в активированных Т клетках ($p > 0,05$) (Рис. 8). Эти данные свидетельствуют о том, что HSP90, PD-1 и CTLA-4 могут регулироваться посредством различных сигнальных каскадов во время Т-клеточной активации, однако это требует дополнительных исследований.

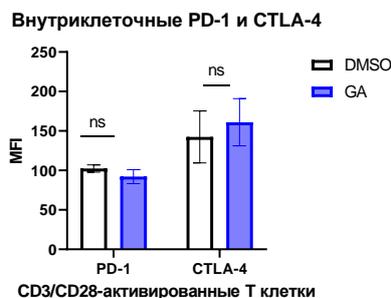
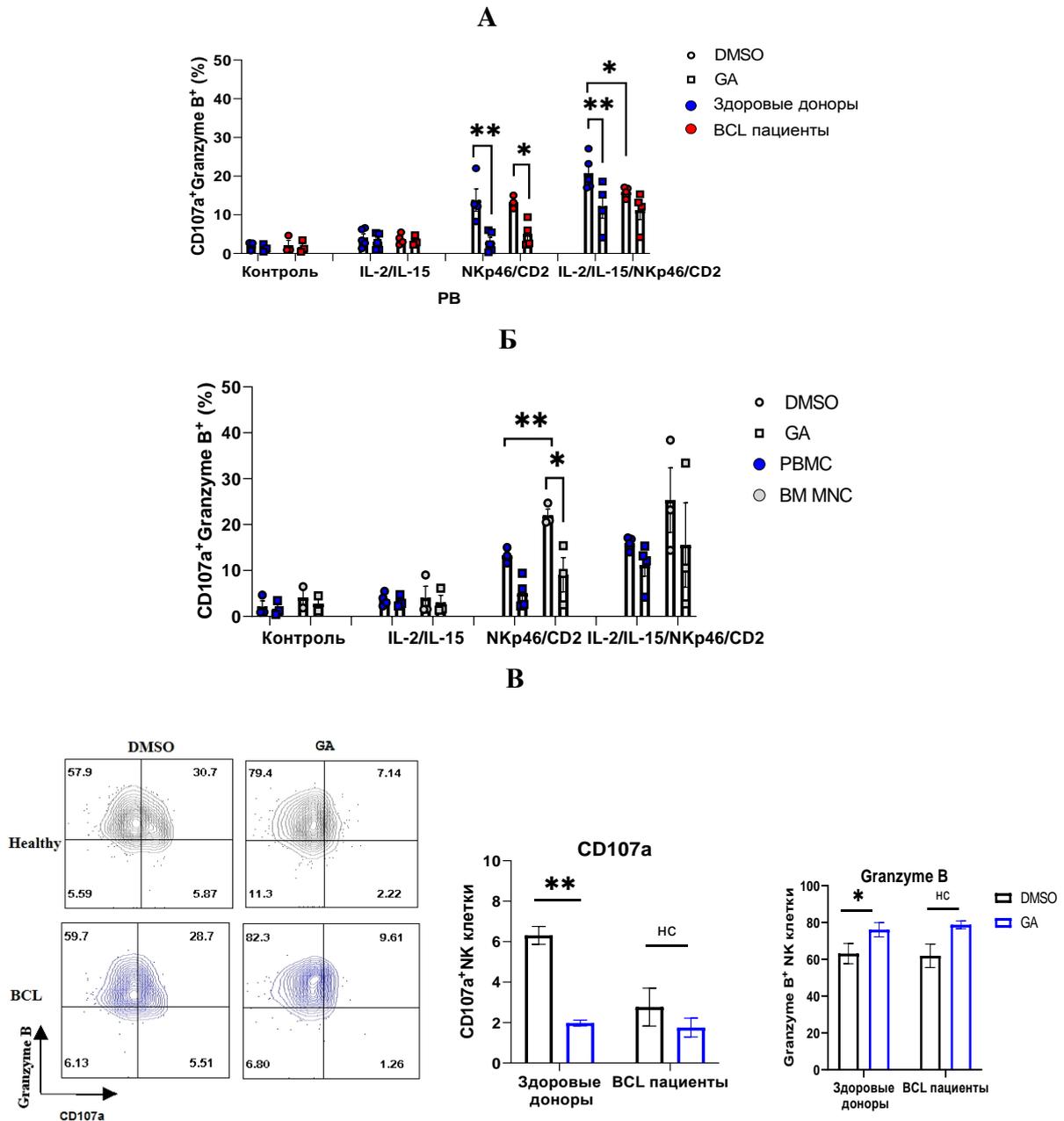


Рисунок 8. Ингибирование HSP90 и внутриклеточные PD-1, CTLA-4 и STAT-3. Т клетки стимулировали в течение 48 часов анти-CD3/CD28 и hIL-2. Через 48 часов инкубации добавляли 0,1 μ M GA или DMSO и клетки инкубировали еще 24 часа. График показывает среднее \pm SEM, ns, недостоверное различие. GA, гелданамицин. (из работы *Albakova, et al. 2022, Biomedicines*)

Влияние блокировки HSP90 на NK-клеточную дегрануляцию и продукцию IFN γ у первичных пациентов с агрессивными типами В-клеточных лимфом *in vitro*

Мы исследовали влияние блокировки HSP90 на функциональную активность NK клеток периферической крови и костного мозга первичных пациентов с агрессивными типами В-клеточных лимфом (диффузными крупноклеточными В-клеточными лимфомами и первичными медиастинальными В-клеточными лимфомами). IL-2/IL-15-активированные NK клетки здоровых доноров были более чувствительны к стимуляции анти-NKp46/анти-CD2, что приводило к более высокой частоте CD107a+ Granzyme B+ NK клеток по сравнению с NK клетками пациентов с В-клеточными лимфомами (ВСЛ) (Рис. 9А). Напротив, стимуляция IL-2/IL-15/анти-NKp46/анти-CD2 приводила к увеличению CD107a+IFN γ + NK клеток у пациентов с ВСЛ по сравнению со здоровыми донорами (Рис. 9Г). Ингибирование HSP90 снижало частоту CD107a+Granzyme B+ NK клеток здоровых доноров, а также NK клеток костного мозга и периферической крови ВСЛ пациентов за счет того, что CD107a+ Granzyme B+ NK клетки понижали процент CD107a+ NK клеток и становились Granzyme B+ NK клетками при стимуляции (Рис. 9А-В). Блокировка HSP90 также снижала процент

CD107a⁺IFN γ ⁺ NK клеток в ответ на стимуляцию IL-2/IL-15 и анти-NKp46/анти-CD2 (Рис. 9Г). Эти данные свидетельствуют о том, что подавление HSP90 может нарушать дегрануляцию NK клеток и продукцию IFN γ у пациентов с В - клеточными лимфомами.



Г

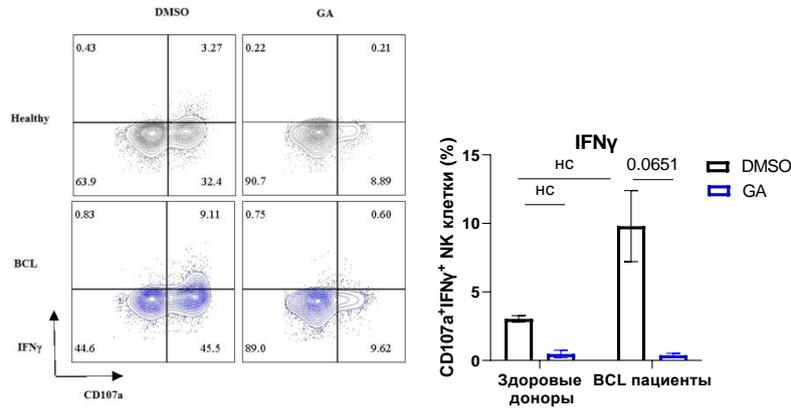


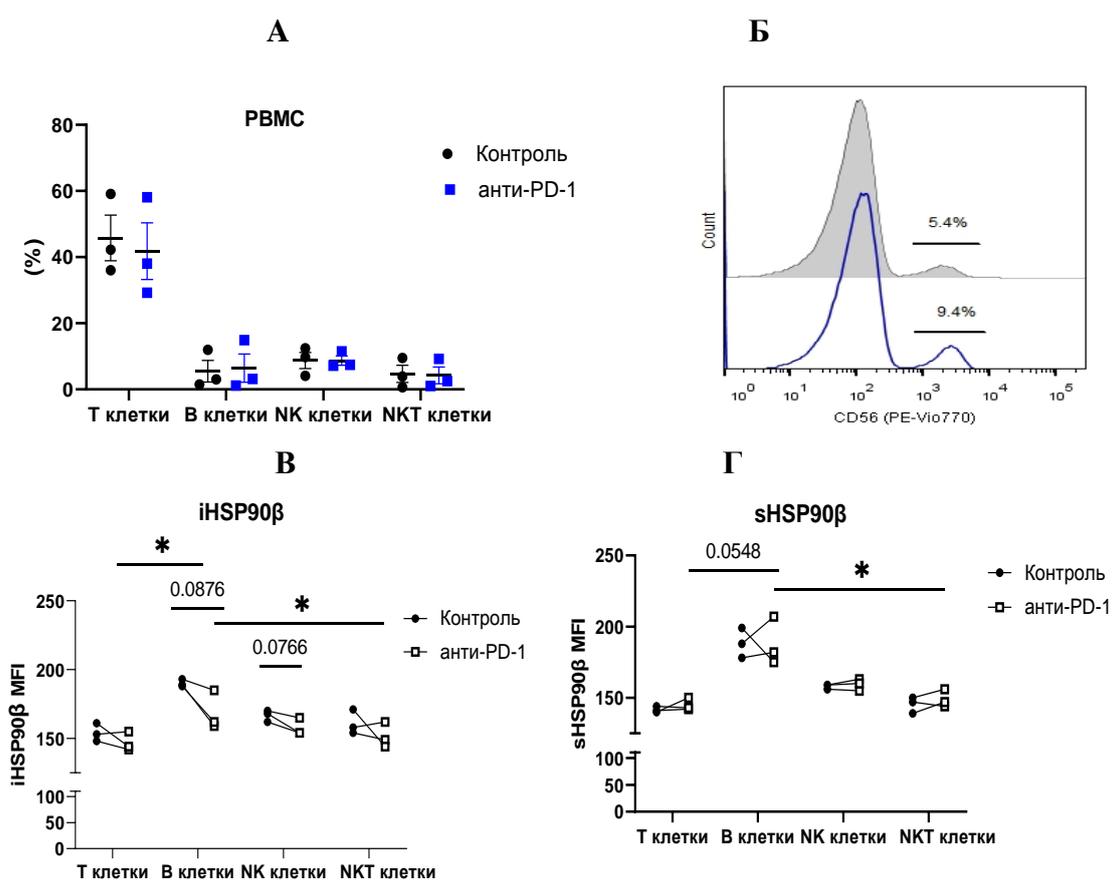
Рисунок 9. Влияние блокировки HSP90 на дегрануляцию NK клеток, продукцию Granzyme B и IFN γ у пациентов с В - клеточными лимфомами. Дегрануляция NK клеток, измеренная по поверхностному CD107a, и продукция Granzyme B/IFN γ NK клетками периферической крови (n = 4) пациентов с лимфомой и здоровых доноров (n = 5) и костного мозга (n = 3) пациентов с лимфомой. PBMC (А) и BM MNC (Б) предварительно обрабатывали гелданамицином (0.1 μ M) или DMSO в присутствии IL-2 (100 МЕ/мл) и IL-15 (10 нг/мл) и стимулировали анти-NKp46/анти-CD2. (В) Репрезентативные графики проточной цитометрии CD107a+/Granzyme B+ NK клеток слева и процент CD107a+ и Granzyme B+ NK клеток в ответ на IL-2/IL-15 и анти-NKp46/анти-CD2 стимуляцию (Г) Репрезентативные графики проточной цитометрии CD107a+ IFN γ + NK клеток слева и процент CD107a+IFN γ + NK клеток в ответ на стимуляцию IL-2/IL-15 и анти-NKp46/анти-CD2. Графики показывают среднее \pm SEM. нс, недостоверное различие, *p<0.05, **p<0.01. GA, гелданамицин; BCL, В-клеточная лимфома; PB, периферическая кровь; BM, костный мозг. (из работы Albakova, et al. 2022, *Frontiers in Immunology*)

Влияние анти-PD-1 иммунотерапии на внутриклеточные и внеклеточные HSP90 в лимфоцитах пациентов с рефрактерной и рецидивной классической лимфомой Ходжкина

У пациентов с рефрактерной или рецидивной (p/p) классической ЛХ (p/p кЛХ), при постановке диагноза, были обнаружены конгломераты лимфатических узлов, пациентам было назначено лечение Ниволумабом (анти-PD-1). В рамках настоящей работы, мы исследовали влияние анти-PD-1-терапии на HSP90 β , TRAP1 и STIP1 в Т, В, NK и NKT клетках до и после 24-часового лечения пациентов с p/p кЛХ. Блокировка PD-1 влияла на процент популяции иммунных клеток в периферической крови через 24 часа после введения Ниволумаба (Рис 10А). Средний процент Т клеток уменьшался через 24 часа лечения анти-PD-1 (Рис 10А). У одного пациента был повышен процент NK клеток в периферической крови (Рис. 10А). Увеличение количества NK клеток после анти-PD-1-терапии также было показано ранее у онкологических больных (Youn, et al., 2020).

iHSP90 β снижался в Т, В, NK и NKT клетках после введения Ниволумаба (Рис 10В). У двух пациентов наблюдалось повышение HSP90 β на поверхности В клеток периферической крови (Рис. 10Г). Блокада PD-1 не влияла на iTRAP1, но увеличивала sTRAP1 (Рис. 10Д, Е). Блокада PD-1 не влияла на iSTIP1 в лимфоцитах, хотя у 1 пациента было выявлено повышение iSTIP1 в NK клетках (Рис. 10Ж, 3). sSTIP1 был понижен на поверхности лимфоцитов после анти-PD-1 терапии (Рис. 10Ж, 3).

Дополнительно, мы исследовали внутриклеточные и внеклеточные HSP90 β , TRAP1 и STIP1 в лимфоцитах костного мозга пациента до и после анти-PD-1 терапии и сравнили их с уровнями HSP90 в периферической крови этого же пациента (Рис. 11). Блокада PD-1 повышала iHSP90 β и понижала sHSP90 β в В клетках костного мозга (Рис. 11А, 11Б). Напротив, блокада анти-PD-1 понижала iSTIP1 и повышала sSTIP1 в В клетках костного мозга (Рис. 11Д, 11Е). Блокада PD-1 также понижала внутриклеточные и поверхностные HSP90 β и STIP1 в NKT клетках костного мозга (Рис. 11А-Б, Д-Е). sHSP90 β снижался на В клетках периферической крови и костного мозга после анти-PD-1 терапии (Рис. 11Б). PD-1 ингибитор приводил к понижению iTRAP1 в NK клетках костного мозга (Рис. 11В). Интересно отметить, что В клетки периферической крови и костного мозга различались по содержанию iHSP90 β после введения Ниволумаба (Рис 11А). Эти данные свидетельствуют о том, что анти-PD-1 терапия влияет на внутриклеточный и внеклеточный пул HSP90 у пациентов с р/р кЛХ, однако необходимы дальнейшие исследования для оценки влияния анти-PD-1 терапии на экспрессию и локализацию гомологов HSP90 в лимфоцитах костного мозга и периферической крови пациентов с лимфомами.



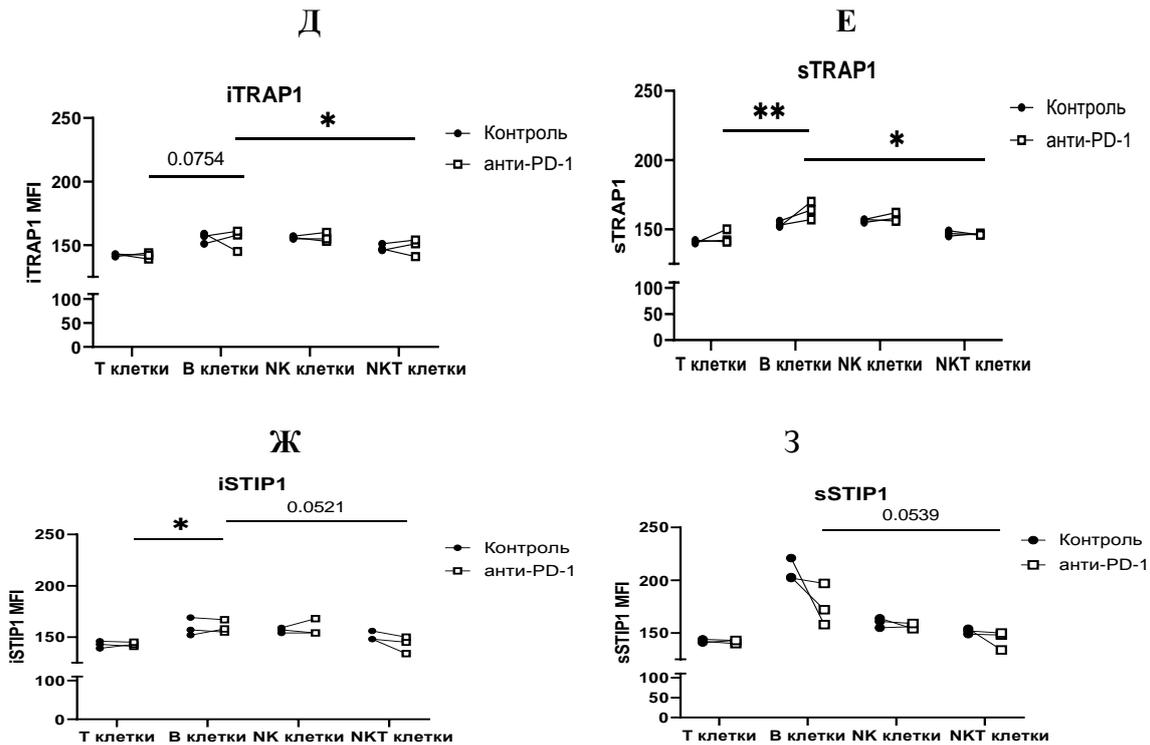
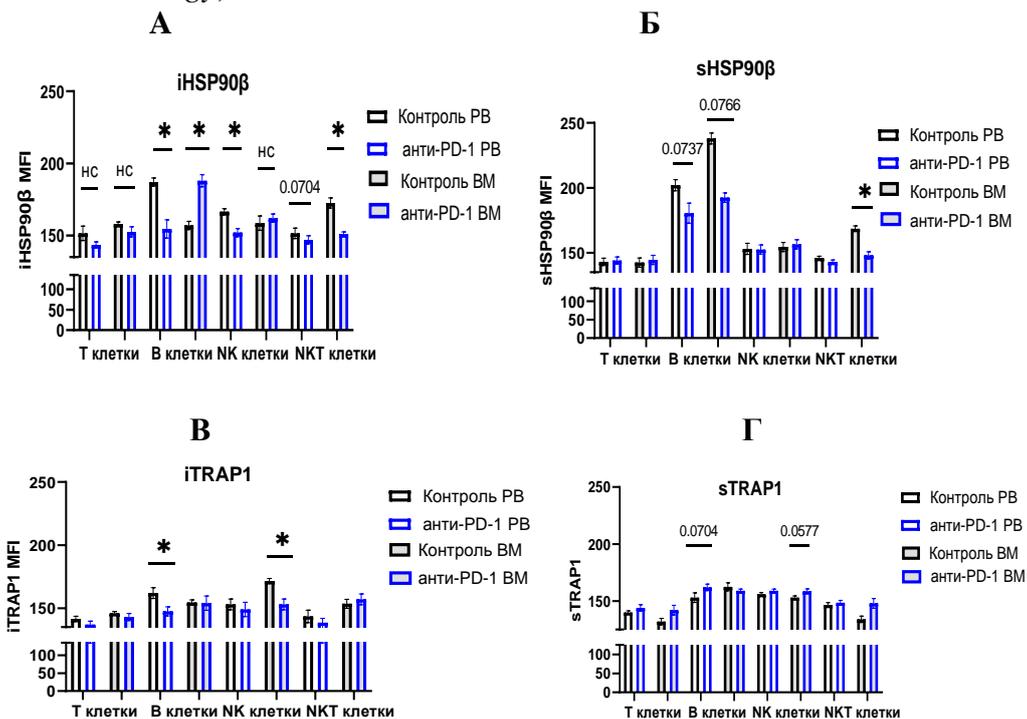


Рисунок 10. Влияние анти-PD-1 терапии на HSP90 в лимфоцитах периферической крови у пациентов с р/р кЛХ. (А) Процент Т, В, NK и NKT клеток после 24-часового введения Ниволумаба у пациентов с р/р кЛХ (n = 3). (Б) Репрезентативная гистограмма, показывающая увеличение частоты NK клеток после 24-часового лечения Ниволумабом. iHSP90 β (В) и sHSP90 β (Г), iTRAP1 (Д) и sTRAP1 (Е), iSTIP1 (Ж) и sSTIP1 (З) в лимфоцитах периферической крови пациентов с р/р кЛХ через 24 часа лечения Ниволумабом (n=3). iHSP, внутриклеточный HSP; sHSP, поверхностный HSP. нс, недостоверное различие, *p<0.05, **p<0.01. (из работы Albakova, et al. 2022, *Frontiers in Immunology*).



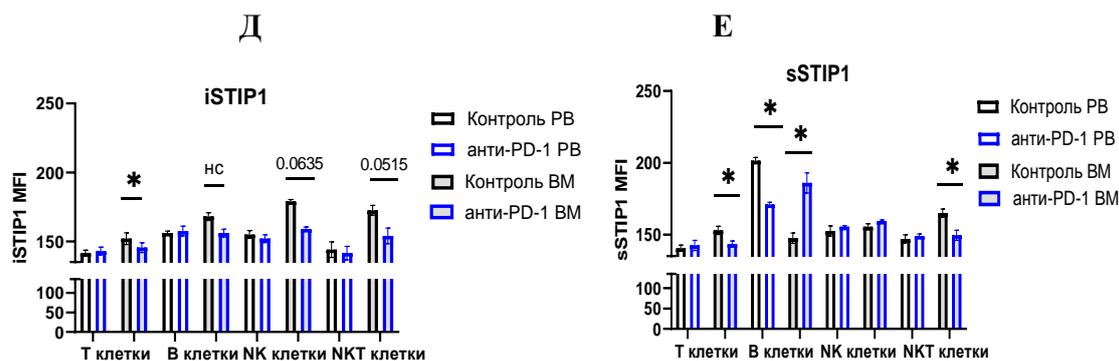


Рисунок 11. Влияние анти-PD-1 на HSP90 в лимфоцитах периферической крови и костного мозга пациента с р/р кЛХ. Внутриклеточные (А,В,Д) и поверхностные (Б,Г,Е) HSP90 β (А,Б), TRAP1 (В,Г) и STIP1 (Д,Е) в лимфоцитах периферической крови и костного мозга пациента с р/р ЛХ (n=1). Графики показывают среднее значение \pm SEM. iHSP, внутриклеточный HSP; sHSP, поверхностный HSP. нс, недостоверное различие, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. PB, периферическая кровь; BM, костный мозг. (из работы *Albakova, et al. 2022, Frontiers in Immunology*)

Выводы

1. Присутствие гомологов HSP90 в моче пациентов коррелирует с наличием у них ракового заболевания.
2. Первичные пациенты с В-клеточными лимфомами имеют aberrантное содержание HSP90 и ко-шаперона STIP1 в В клетках периферической крови и костного мозга. Повышенный HSP90 в В клетках периферической крови и костного мозга не связан с их злокачественным фенотипом.
3. У первичных пациентов с В-клеточной лимфомой нарушено содержание внутриклеточных и внеклеточных HSP, иммунных контрольных точек (PD-1, CTLA-4) и STAT3 в активированных Т клетках.
4. Модулирование содержания HSP90 влияет на функциональную активность стимулированных NK и Т клеток первичных пациентов с В-клеточными лимфомами.
5. PD-1 ингибитор (Ниволумаб) приводит к изменению внутриклеточного и внеклеточного пула гомологов HSP90 и STIP1 ко-шаперона в иммунных клетках пациентов с рефрактерной или рецидивной формой лимфомы Ходжкина.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

Статьи в журналах, индексируемых в международных системах цитирования (Web of Science, Scopus):

1. **Albakova, Z.**; Mangasarova, Y.; Sapozhnikov, A. (2022). Impaired Heat Shock Protein Expression in Activated T Cells in B-Cell Lymphoma. **Biomedicines**, 10, 2747, PP 1-11, IF=4.757 (WoS).
2. **Albakova Z**, Mangasarova Y, Albakov A, Nikulina E, Kravchenko S, Sapozhnikov A (2022) Aberrant HSP90 Expression in Lymphocytes and HSP90 Response to Anti-PD-1 Therapy in Lymphoma Patients. **Frontiers in Immunology**, V.13., PP. 1-12. IF = 8.786 (WoS)
3. **Albakova Z**, Mangasarova Y, Albakov A, Gorenkova L (2022) HSP70 and HSP90 in Cancer: Cytosolic, Endoplasmic Reticulum and Mitochondrial Chaperones of Tumorigenesis. **Frontiers in Oncology**, V.12, PP. 1-14. IF= 5.738 (WoS)
4. **Albakova Z**, Norinho DD, Mangasarova Y, Sapozhnikov A (2021) Heat Shock Proteins in Urine as Cancer Biomarkers. **Frontiers in Medicine** (Lausanne), V.8, PP. 1-6. IF = 5.058 (WoS)
5. **Albakova Z**, Mangasarova Y (2021) The HSP Immune Network in Cancer. **Frontiers in Immunology**, V.12, PP. 1-11. IF = 8.786 (WoS)
6. **Albakova Z**, Siam MKS, Sacitharan PK, Ziganshin RH, Ryazantsev DY, Sapozhnikov AM (2021) Extracellular heat shock proteins and cancer: New perspectives. **Translational Oncology** V.14 (2), PP. 1-16 . IF = 4.803 (WoS)
7. **Albakova Z**, Mangasarova Y, Sapozhnikov A (2021) Heat Shock Proteins in Lymphoma Immunotherapy. **Frontiers in Immunology**, V. 12 (769), PP.1-16. IF = 8.786 (WoS)
8. **Albakova Z**, Armeev GA, Kanevskiy LM, Kovalenko EI, Sapozhnikov AM (2020) HSP70 Multi-Functionality in Cancer. **Cells**, V.9 (3), PP. 1-26. IF = 7.666 (WoS)