

Институт биоорганической химии им. академиков М.М.Шемякина и Ю.А.
Овчинникова Российской академии наук

На правах рукописи



Албакова Зарема

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

3.2.7 – Аллергология и иммунология

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:

доктор биологических наук, профессор

Сапожников Александр Михайлович

Москва - 2022

Оглавление

Список сокращений	4
Введение	7
Глава 1. Обзор литературы	12
HSP и иммунная система	13
Макрофаги и дендритные клетки	15
NK-клетки	17
Т-клетки.....	18
В-клетки	19
HSP и лимфома	19
HSP и иммунотерапия рака	24
HSP вакцины.....	25
HSP и иммунные контрольные точки	27
HSP и адоптивная Т/NK-клеточная терапия.....	28
Глава 2. Материалы и Методы	29
Клонирование и выделение стресс-индуцированной изоформы HSP70	29
Молекулярный докинг	31
Тестирование гипотезы и машинное обучение	31
Образцы пациентов	33
Антитела и проточная цитофлуориметрия	34
Поверхностное и внутриклеточное окрашивание HSP90 β , TRAP1 и STIP1	34
Анализ реаранжировки генов IgH	34
Активация Т клеток.....	34
Активация Т клеток - антитела HSP, PD-1, CTLA-4 и STAT3	35
Смешанная лимфоцитарная реакция (MLR)	35
Анализ дегрануляции Т клеток.....	36
Ингибирование HSP90 в Т клетках - экспрессия PD-1 и CTLA-4.....	36
Стимуляция NK клеток, ингибирование HSP90, анализ CD107a/Granzyme B и IFN γ	36
Статистический анализ	36
Глава 3. Результаты	37
Определение оптимальных условий для выделения стресс-индуцированной изоформы HSP70.....	37
Анализ взаимодействия потенциальных иммунных рецепторов с HSP70.....	38
Определение ключевых гомологов HSP в раковых заболеваниях	39

Анализ иммунных клеток в периферической крови и костном мозге первичных пациентов с лимфомой Ходжкина и неходжкинскими лимфомами.....	42
Анализ внутриклеточных и внеклеточных HSP90 β , TRAP1 и STIP1 в лимфоцитах периферической крови и костного мозга первичных пациентов с ЛХ и НХЛ	43
Анализ В-клеточной клональности периферической крови и костного мозга первичных пациентов с ЛХ и НХЛ	45
Анализ внутриклеточных и внеклеточных HSP, PD-1 и CTLA-4 в активированных Т клетках первичных пациентов с индолентными и агрессивными типами В-клеточных лимфом	46
Влияние комбинированной блокировки HSP90 и иммунных контрольных точек на дегрануляцию Т клеток <i>in vitro</i>	47
Влияние блокировки HSP90 на внутриклеточные PD-1 и CTLA-4.....	49
Влияние блокировки HSP90 на NK-клеточную дегрануляцию и продукцию IFN γ у пациентов с В-клеточными лимфомами	50
Влияние анти-PD-1 иммунотерапии на внутриклеточные и внеклеточные HSP90 в лимфоцитах пациентов с рефрактерной и рецидивной лимфомой Ходжкина	52
Глава 4. Обсуждение	55
Выводы.....	59
Благодарности.....	60
Список цитируемой литературы.....	62
Приложение 1	83
Приложение 2	85
Приложение 3	87

Список сокращений

HSP – белок теплового шока

GRP78/BiP - белок регулируемый глюкозой 78; белок, связывающий иммуноглобулин

HIF-1 - индуцируемый гипоксией фактор 1

CDC – комплемент-зависимая цитотоксичность

hnRNP-K - гетерогенный ядерный рибонуклеопротеин K

NBD - нуклеотид-связывающий домен

SBD α/β - субстрат-связывающий домен

NEF- фактор обмена нуклеотидов

MDSC - супрессорные клетки миелоидного происхождения

GzmB (Granzyme B)- гранзим B

IFN γ - интерферон γ

BAG -BCL2-ассоциированный атаноген

IL-6 - Интерлейкин-6

TNF- фактор некроза опухоли

VEGF - фактор роста эндотелия сосудов

TGF- β -трансформирующий фактор роста β

PI3K/AKT- фосфатидилинозитол-3-киназа (PI3K)-серин/треонинпротеинкиназа (AKT)

JNK- c-Jun N-концевая киназа

STAT3- преобразователь сигнала и активатор транскрипции 3

TRAP1 - белок 1, ассоциированный с рецептором фактора некроза опухоли

STIP1/HOP - HSP70/HSP90 организующий белок

PD-1 – рецептор программируемой смерти клеток

CTLA-4 – белок 4, ассоциированный с цитотоксическими Т лимфоцитами

NK – натуральные киллеры

NKT- натуральные киллеры Т клетки

мо-ДК- дендритные клетки моноцитарного происхождения

MLR – смешанная лимфоцитарная реакция
PBMC – мононуклеарные клетки периферической крови
BM MNC - мононуклеарные клетки костного мозга
PE –фикоэритрин
TLR –Толл - подобные рецепторы
DMSO – диметилсульфоксид
ПЦР – полимеразная цепная реакция
EV – внеклеточные везикулы
CTD1 - С-концевой пептид-связывающий домен 1
CAR T – Т клетки, модифицированные химерным антигенным рецептором
MAPK – митоген-активируемая протеинкиназа
ERK - киназа, регулируемая внеклеточным сигналом
HRS – клетки Ходжкина и Рида-Штернберга
NF-κB – транскрипционный ядерный фактор каппа-цепи активированных В клеток
BC – рак мочевого пузыря
GC – рак желудка
ССА – рак шейки матки
COPD – хроническая обструктивная болезнь легких
LC- рак легкого
CRC- колоректальный рак
PM - пневмония
EC- рак пищевода
κLX – классическая лимфома Ходжкина
p/p – рецидивная или рефрактерная лимфома
с-Мус – с-миелоцитоматоз
EMT – эпителиально- мезенхимальный переход
TME – микроокружение опухоли
ЭПР – эндоплазматический ретикулум
JDP – белки, содержащие J домен

НХЛ – неходжкинские лимфомы

ДВККЛ - диффузная крупноклеточная В-клеточная лимфома

ISRT - лучевая терапия пораженных мест

АТГСК - аутологичная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток;

НЛХЛП - нодулярный вариант лимфомы Ходжкина с лимфоидным преобладанием

ПТКЛ - периферическая Т-клеточная лимфома

ХЛЛ - хронический лимфоцитарный лейкоз

ЛМЛ- лимфома из малых лимфоцитов

МКЛ - мантийноклеточная лимфома

ПМВКЛ - первичная медиастинальная В-клеточная лимфома

ФЛ – фолликулярная лимфома

РВ – периферическая кровь

ВМ – костный мозг

Нip - белок, взаимодействующий с Hsp70

HSF - фактор теплового шока

СМА - шаперон-опосредованная аутофагия

Bclaf1 - транскрипционный фактор 1, ассоциированный с В-клеточной лимфомой 2

MAST1 - серин/треонинкиназа 1, ассоциированная с микротрубочками

TPR - тетратрико-пептидные повторы

АТФ/АТР - аденозинтрифосфат

АДФ/ADP – аденозиндифосфат

SDS-PAGE – электрофорез белков в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия

rhIL-2 – рекомбинантный человеческий интерлейкин -2

FBS – эмбриональная бычья сыворотка

Введение

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. Блокировка HSP на дисрегулированных Т-клетках может быть многообещающей стратегией для лечения пациентов с лимфомой.

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 aberrантное 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. Иммуноterapia 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.

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)

Глава 1. Обзор литературы

Белки теплового шока (HSP) представляют собой молекулярные шапероны, играющие критическую роль в фолдинге и ремоделинге белков [1,2]. HSP подразделяются на несколько семейств, таких как HSP110, HSP90, HSP70, HSP40, шаперонины и HSPB [3]. HSP распределены по всей клетке, включая цитозоль, митохондрии и эндоплазматический ретикулум (ЭПР) [1,4]. При различных стрессах, HSP могут менять свое основное местоположение внутри клетки и секретироваться во внеклеточную среду [5].

HSP играют важную роль в регуляции различных признаков рака, включая устойчивость к апоптозу, ангиогенез, инвазию, эпителиально-мезенхимальный переход и иммунную эвазию (Рис. 1) [6]. Аберрантная экспрессия внеклеточных HSP наблюдалась у пациентов с различными опухолями и ассоциировалась с неблагоприятным клиническим прогнозом [7-9]. HSP также были обнаружены в плазме, моче, сыворотке онкологических больных [10].

HSP регулируют ключевые сигнальные каскады, включая с-миеломатоз (с-Мус), преобразователь сигнала и активатор транскрипции (STAT3), киназу, регулируемую внеклеточным сигналом (ERK), киназы семейства Src и фосфатидилинозитол-3-киназу (PI3K) [11]. В настоящее время, проводятся клинические исследования различных ингибиторов HSP, иммунотерапевтических препаратов на основе HSP и биомаркеров HSP. Тем не менее, наши общие знания о функциях HSP в онкогенезе все еще ограничены.

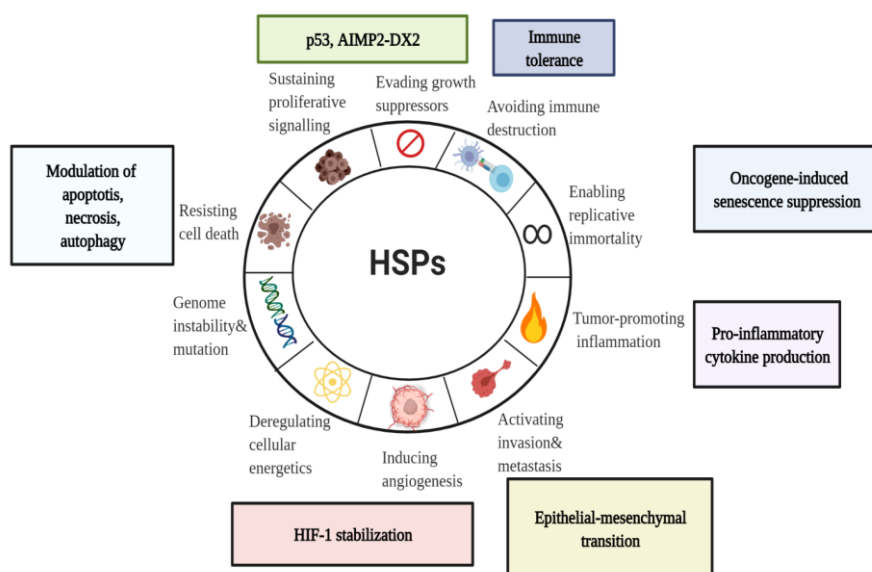


Рисунок 1. Белки теплового шока и признаки рака (с модификациями из работы *Albakova, et al., 2020, Cells*) [6]. HSP стимулируют рост опухоли, поддерживая развитие различных признаков рака. HSP участвуют в регуляции апоптоза, инвазии, ангиогенезе,

метастазирования, ЭМП, клеточном энергетическом метаболизме и опухолевом иммунитете. ЭМП, эпителиально-мезенхимальный переход; AIMP-DX2, многофункциональный белок 2, взаимодействующий с РНК-синтетазой, переносящей аминоксил (AIMP2), без экзона 2; HIF-1, индуцируемый гипоксией фактор 1; CDC, комплемент-зависимая цитотоксичность; hnRNP-K, гетерогенный ядерный рибонуклеопротеин К.

HSP и иммунная система

Первоначальная связь HSP с иммунной системой возникла на основе наблюдений, которые показали, что HSP, полученные из опухоли, могут индуцировать опухоль-специфический Т-клеточный ответ [12-15]. Дополнительные исследования показали, что иммуногенность белков HSP, изолированных из опухоли, связана с их пептидами-клиентами, что в дальнейшем привело к разработке различных вакцин на основе HSP [16,17,13,6,14,18].

HSP могут модулировать иммунный ответ посредством своей шаперонной активности. Например, белок регулируемый глюкозой 94 (GRP94), функционирует как шаперон для комплекса рецептора тромбоцитов гликопротеина Ib-IX-V (GPIb-IX-V), экспрессирующегося в тромбоцитах, мегариоцитах и некоторых линиях раковых клеток [19,20]. Нарушенная экспрессия GPIb α , субъединицы комплекса GPIb-IX-V, связана с трансформацией раковых клеток, устойчивостью к апоптозу и p53-зависимым старением [20,21]. GRP94 также является шапероном для стыковочного рецептора трансформирующего фактора роста β (TGF β) - GARP [23,24]. Помимо функции шаперона, GRP94 также играет критическую роль в иммунной толерантности кишечной микробиоты [22,23]. Таким образом, GRP94 может поддерживать развитие опухоли, модулируя комплекс GPIb-IX-V, GARP и микробиоту кишечника.

HSP также участвуют в презентации антигенов. Экзогенные комплексы HSP90-пептид могут кросс-презентироваться посредством МНС класса I дендритными клетками, происходящими из костного мозга (BMDC) [24,25]. HSP90 α -дефицитные BMDC были менее эффективными в кросс-презентации антигенов [28]. Помимо МНС класса I, HSP также играют важную роль в презентации антигена МНС класса II. В нескольких исследованиях сообщалось, что ингибитор HSP90 блокирует презентацию антигенов МНС класса II, в то время как конститутивная изоформа HSP70 (HSC70) способствует транслокации цитоплазматических антигенов [26,25,27].

HSP также участвуют в модуляции инфламмосомы Nod-подобного рецепторного белка 3 (NLRP3) [28]. NLRP3 инфламмосома была обнаружена в различных популяциях

иммунных клеток, включая макрофаги, дендритные клетки и CD4⁺ Т-клетки [29,30]. Погибающие опухолевые клетки выделяют АТФ, который запускает сборку NLRP3 инфламмосомы, что приводит к секреции провоспалительных цитокинов, таких как IL-1 β и IL-18 [30,31]. Было показано, что снижение HSP70 активирует NLRP3 инфламмосому, в то время как подавление HSP90 ингибирует инфламмосому [28,32]. Так как HSP90 необходим для активности комплекса IKK, ингибирование HSP90 также повлияет и на NF- κ B [33,34,16].

HSP также играют важную роль в регуляции фенотипа и функциональной активности NK- и Т-клеток. Ингибитор HSP90 подавляет экспрессию активирующих рецепторов и снижает цитотоксическую активность NK-клеток [35]. Ингибирование HSP90 влияет на уровень экспрессии мРНК CD2 и CD94 NK-клеток [35]. HSP90 регулирует поверхностную экспрессию критических антигенов (CD3, CD4, CD8, CD25), ко-стимулирующих молекул (CD40L, CD28) и Т-клеточного рецептора (TCR) $\alpha\beta$ на Т-клетках [35,5]. Таким образом, ингибирование HSP90 подавляет поверхностные антигены на Т-клетках и нарушает пролиферацию Т-клеток и продукцию IFN γ [35]. Интересно, что повышенная экспрессия CD69⁺/CD8⁺ Т-клеток наблюдалась у мышей, получавших ингибитор HSP90 (ганетеспиб) и анти-PD-L1 [36]. Ранние исследования показали, что ингибирование HSP90 повышает чувствительность раковых клеток к опосредованному Т-клетками уничтожению за счет активации генов интерферон-индуцированного белка с тетраатрикопептидными повторами (*IFIT*) [37]. Кроме того, комбинированная терапия ганетеспибом и анти-PD1 или анти-CTLA4 улучшала выживаемость и противоопухолевый ответ у мышей, инокулированных опухолями MC38-gp100 [37]. Лечение ганетеспибом и анти-CTLA4 также увеличивало количество CD8⁺ Т-клеток, усиливало продукцию IFN γ CD8⁺ Т-клетками, увеличивало экспрессию хемокинов CXCL9, CXCL10 и уменьшало количество Т-регуляторных клеток (T-regs) [37]. Другие исследования показали, что ингибитор HSP90 может увеличивать количество CD8⁺ Т-клеток и снижать количество Т-регуляторных клеток [38].

Помимо Т- и NK-клеток, HSP также участвуют в регуляции макрофагов. Моралес и соавторы (2014) показали, что у мышей с генетической делецией *GRP94* в макрофагах наблюдалось снижение колита и онкогенеза толстой кишки, а также снижение экспрессии провоспалительных цитокинов, таких как IL-17, IL-23 и TNF- α [39]. Интересно, что блокировка гомолога ER HSP70 GRP78 повышала уровень моноцитарного хемотаксического белка 1 (MCP-1) в сыворотке, усиливало инфильтрацию макрофагов, а также снижала экспрессию CD47 у мышей с ксенотрансплантатом LCC9 [40].

Высокая экспрессия различных HSP в крови ассоциирована с различными видами рака [41-44]. В нескольких исследованиях сообщалось, что опухолевые клетки могут

секретировать HSP во внеклеточную среду (Рис.2). Иммунные клетки, включая НК-клетки, Т-клетки, дендритные клетки (ДК), нейтрофилы и тромбоциты, также могут экспортировать HSP во внеклеточные везикулы (EV) [41]. В данном разделе будет рассмотрена роль внеклеточных HSP (eHSP) в регуляции различных компонентов иммунной системы.

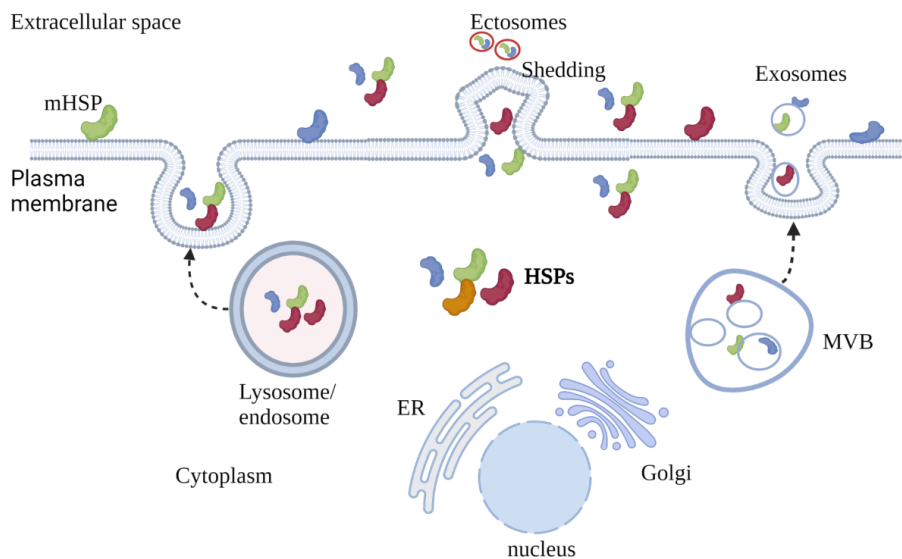


Рисунок 2. Высвобождение HSP во внеклеточную среду. HSP могут секретироваться во внеклеточное пространство различными путями. Слияние лизосомы или эндосомы с плазматической мембраной приводит к секреции внеклеточных HSP [8,45,46]. HSP также могут экспортироваться в экзосомы посредством слияния мультивезикулярных тел (MVB) с плазматической мембраной [47-50]. Шеддинг микровезикул/эктосом с поверхности также приводит к секреции внеклеточных HSP [51,8]. Взаимодействие HSP с глоботриослицерамидом или фосфатидилсерином обеспечивает закрепление HSP на мембране [52,53,5].

Макрофаги и дендритные клетки

eGRP94 способствует созреванию дендритных клеток (ДК), повышая экспрессию молекул МНС класса II, CD83 и CD86 и усиливая продукцию IL-12 и TNF- α через Toll-подобный рецептор 2 (TLR2) и TLR4 [54,55]. ДК, обработанные GRP94, полученные из опухоли, показали сильную противоопухолевую активность, опосредованную NK и CD8⁺ Т-клетками [59]. Недавние исследования показали, что GRP94 экспрессируется на поверхности макрофагов M2, но не на M1 макрофагах [23]. При стрессе в эндоплазматическом ретикулуме (ER), макрофаги M2 понижают экспрессию GRP94 на поверхности и увеличивают секрецию eGRP94, что приводит к продукции воспалительных цитокинов, таких как IFN γ , IL-6, TNF α и IL-1 β [23]. Также было показано, что ER стресс усиливает взаимодействие GRP94 с компонентом C3 [56,23].

При ER стрессе, GRP78 перемещается из ER на плазматическую мембрану [57,58]. GRP78 служит поверхностным рецептором для активированного $\alpha 2$ -макроглобулина в макрофагах [59,60]. eGRP78 также подавляет МНС класса II и CD83 и повышает экспрессию B7-H3 и B7-H4 на ДК [61]. Таким образом, сверхэкспрессия eGRP78 ингибирует активацию ДК и способствует M2-подобной поляризации в макрофагах [62]. Кроме того, ДК, обработанные GRP78, продуцируют высокий уровень IL-10, низкие уровни TNF α и оксида азота в ответ на липополисахарид (LPS) [61].

Подобно eGRP94, HSP60 стимулирует созревание ДК, продукцию IL-12, TNF- α , IL-1 β через TLR4 и усиливает пролиферацию Т-клеток [5,63]. HSP60 способствует фосфорилированию I κ B, p38 MAPK, JNK, raf-1 и киназы, регулируемой внеклеточным сигналом (ERK) ERK1/2 в ДК [63]. Ранние исследования показали, что eHSP60 действует посредством TLR2 и TLR4 и индуцирует киназу JNK 1/2, p38, ERK 1/2 и I κ B в макрофагах [64]. Подобно eHSP90 и eHSP60, eHSP70 также действует через TLR2 и TLR4 и активирует NF- κ B, что приводит к продукции провоспалительных цитокинов дендритными клетками [65,5]. Интересно отметить, что HSP используют один и тот же механизм, как для иммуномодуляции ДК/макрофагов, так и для регуляции апоптоза и EMT, поскольку HSP70 может также блокировать JNK, что приводит к ингибированию апоптоза, тогда как комплексы HSP70-пептид, выделенные из опухоли, способствуют EMT через p38 MAPK [66,67]. Было показано, что HSP70 может также подавлять LPS-индуцированную активацию NF- κ B путем стабилизации фактора 6, ассоциированного с рецептором фактора некроза опухоли (TRAF6), в макрофагах, предполагая, что эффект HSP70 на NF- κ B зависит от локализации HSP70 (внутриклеточные/внеклеточные) [68].

Было показано, что экзосомы, полученные из линии клеток HSP миеломы J558 с эндогенно экспрессированным опухолевым антигеном P1A и мембрано-связанным HSP70, индуцируют созревание ДК, что приводит к повышенной экспрессии молекул CD40, CD80 и продукции воспалительных цитокинов, включая IL-1 β , IL -12, IFN γ и TNF α DCs [5,69]. Интересно, что eHSP27 ингибирует дифференцировку моноцитов в ДК и снижает экспрессию CD86 посредством TLR4-p38 MAPK [70]. Действуя через TLR4, eHSP110 также влияет на поляризацию макрофагов, способствуя образованию M2 макрофагов в микроокружении опухоли [71,72]. Такие M2 макрофаги способствуют ангиогенезу, прогрессированию опухоли и активации Т-хелперов 2 типа [71,72]. Гомолог HSP110, называемый GRP170, секретируемый клетками меланомы, стимулирует высвобождение TNF α и IL-1 β ДК [73,74,5]. Примечательно, что нанопитины, нацеленные на HSP110,

ингибировали образование M2 макрофагов, в то время как комбинация нанопитина А-С2 и анти-PD-L1 уменьшала рост опухоли [72].

NK-клетки

Стимуляция NK-клеток с помощью HSP70 или пептида TKD, полученного из HSP70, в сочетании с IL-2 или IL-15 усиливает цитолитическую активность NK-клеток [75,76]. Кроме того, мембрано-связанный HSP70 действует как структура распознавания для NK-клеток [77]. Адаптивный перенос *ex vivo* IL-2/TKD-стимулированных NK-клеток в сочетании с анти-PD-1 замедлял рост опухоли в сингенной мышшиной модели глиобластомы [78]. Также было показано, что NK-клетки, стимулированные TKD, мигрируют к HSP70-мембрано-положительным опухолям [79]. Кроме того, ко-экспрессия HSP70 и ко-шаперона, ассоциированного с BCL2, атаногена 4 (BAG4) на опухолевых экзосомах стимулировала миграцию и цитолитическую активность в NK-клетках [80]. Также было показано, что HSP-содержащие экзосомы, секретируемые опухолевыми клетками в ответ на противораковые препараты, индуцируют цитолитическую активность NK-клеток и секрецию гранзима В [81]. Кроме того, у пациентов, завершивших химиотерапию, на поверхности NK-клеток наблюдалась высокая экспрессия гомолога ER HSP70 GRP78 [82].

eGRP94 может также активировать NK-клетки через APC, избирательно усиливая продукцию цитокинов NK-клетками [83]. Было показано, что иммунизация GRP94, выделенным из опухоли, увеличивает количество NK-клеток в периферической крови больных раком [84,5]. Напротив, секретируемый опухолью GRP78 ингибировал активацию NK-клеток [62]. Было показано, что анти-GRP78 антитело, называемое PAT-SM6, увеличивает количество NK-клеток у пациентов с рецидивирующей/рефрактерной множественной миеломой [85]. Дейди и соавторы (2017) продемонстрировали, что антитела против GRP78 ингибируют пролиферацию клеток и индуцируют апоптоз в клеточных линиях немелкоклеточной карциномы легкого и глиобластомы [86]. В 2021 году было разработано новое нанотело под названием V80, которое специфически нацелено на поверхностный GRP78, тем самым поддерживая разработку поверхностных нанотел, нацеленных на GRP78 [87]. Также было показано, что аутоантитела против GRP78, выделенные из сыворотки больных раком, взаимодействуют с клетками, экспрессирующими GRP78, что приводит к увеличению клеточной пролиферации и прокоагулянтной активности тканевого фактора [88,89].

Т-клетки

eGRP94, eHSP70 и eGRP170 облегчают кросс-презентацию рестриктивных пептидов МНС класса I, эффективно праймируя CD8⁺ Т-клетки [90-93]. Интересно, что, хотя eGRP94 также способствует презентации МНС класса II-рестриктивных эпитопов, что приводит к пролиферации CD4⁺ Т-клеток. Однако, эти CD4⁺ Т-клетки неспособны секретировать цитокины IFN γ или IL-4 [90]. eGRP94 усиливает пролиферацию и экспрессию IL-10, трансформирующего фактора роста – β 1 (TGF- β 1) и Foxp3 в Т-регуляторных клетках посредством активации TLR2/TLR4-зависимой передачи сигналов NF- κ B [94]. Также было показано, что экспрессия другого гомолога HSP90, HSP90 α , на поверхности аутофагосом, высвобождаемых опухолевыми клетками, индуцирует секрецию IL-6 CD4⁺ Т-клетками через TLR2-опосредованную передачу сигналов NF- κ B, где аутокринный IL-6 дополнительно способствует секреции IL-10 и IL-21 CD4⁺ Т-клетками посредством STAT3 [95,5].

eHSP70 индуцирует экспрессию IFN γ , IL-6 и IL-8 CD4⁺Т-клетками и IL-8 CD8⁺ Т-лимфоцитами, а при стимуляции IL-12 также индуцирует секрецию гранзима В CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитами [96,5]. Подобно eGRP94, eHSP70 способствует секреции IL-10, TGF- β , фосфорилированию PI3K/АКТ, JNK и p38 MAPK в Т-регуляторных клетках [97]. Было показано, что Т-клетки, культивированные с GRP78-стимулированными ДК, усиливают экспрессию CD4⁺CD25^{high}CD27^{high} и цитотоксического Т-лимфоцитарного антигена 4 (CTLA-4), в то время как увеличение Foxp3 не наблюдалось [98]. В совокупности эти исследования показывают, что HSP могут не только напрямую модулировать функцию Т регуляторных клеток, но и через ДК.

eHSP60, секретируемые опухолевыми клетками, стимулируют высвобождение иммуносупрессивных цитокинов и хемокинов во внеклеточную среду [99,100,5]. Кроме того, апоптотические опухолевые клетки также экспрессируют eHSP60 и eHSP70, которые способствуют образованию цитотоксических Т-клеток [101,5]. HSP60-стимулированные ДК могут также активировать Т-клетки, что приводит к секреции IFN γ [63]. Напротив, Т-клетки, предварительно стимулированные HSP60, ингибируют несколько факторов транскрипции, включая T-bet, NFAT ρ и NF- κ B, и активируют фактор транскрипции GATA-3, тем самым ингибируя секрецию IFN γ и TNF α и повышая регуляцию IL-10, IL-4 и IL-13 (Рис 3) [102,5]. HSP60 также может презентироваться активированными Т-клетками антиэрготипическим Т-регуляторным клеткам в контексте МНС, что приводит к секреции IFN γ и TGF- β 1 антиэрготипическими Т-клетками [103,104,5].

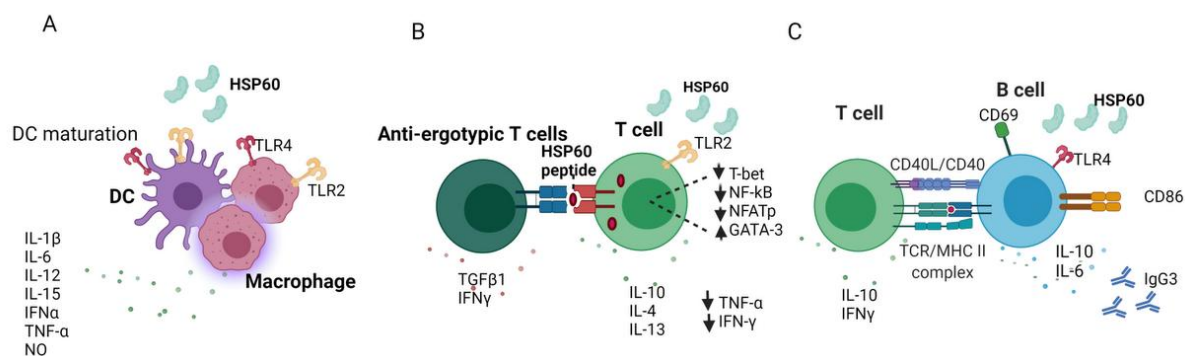


Рисунок 3. Внеклеточная иммунная сеть HSP60 (из работы *Albakova, et al., 2021, Frontiers in Immunology*)[5]. (A) HSP60 индуцирует созревание ДК и секрецию воспалительных цитокинов [63,103,105]. (B) eHSP60 подавляет Th1-ассоциированные факторы транскрипции (T-bet, NF- κ B, NFATp) и активирует GATA3, что приводит к снижению секреции TNF- α и IFN- γ и увеличению секреции IL-10, IL-4, IL -13 [102]. Активированные Т клетки могут презентировать HSP60 посредством МНС анти-эрготипическим Т клеткам, что приводит к продукции IFN γ и TGF β 1 анти-эрготипическими Т регуляторными клетками [104]. (C) HSP60 активирует В клетки через сигнальный путь TLR4-MyD88, что приводит к продукции IL-10, IL-6 и IgG3 [106]. TLR4, Toll-подобный рецептор 4; NO, оксид азота, CD40L; лиганд CD40; TCR, Т-клеточный рецептор; МНС II, главный комплекс гистосовместимости; IgG3, иммуноглобулин G3; Nf- κ B; ядерный фактор каппа В; NFAT, ядерный фактор активированных Т клеток.

В-клетки

eGRP78 повышает экспрессию молекул CD19+, PD-L1 и FasL и продукцию IL-10 в В-клетках [107]. Кроме того, В-клетки, предварительно стимулированные GRP78 и анти-CD40, ингибируют пролиферацию Т-клеток, что позволяет предположить, что eGRP78 может способствовать регуляторному фенотипу В-клеток [107,5].

Интересно, что В-клетки, стимулированные HSP60, усиливают экспрессию МНС класса II, CD86, CD40 и CD69, продуцируют высокий уровень IL-10 и IL-6 посредством TLR4-MyD88 [106]. Более того, эти HSP60-стимулированные В-клетки индуцируют пролиферацию и усиливают продукцию IFN γ и IL-10 Т-клетками [106].

HSP и лимфома

Лимфома представляет собой гетерогенный тип рака, подразделяющийся на два основных субтипа, такие как лимфома Ходжкина (ЛХ) и неходжкинская лимфома (НХЛ)[108]. В онкологических исследованиях стратегии лечения лимфомы отличаются от других раковых заболеваний, поскольку выбор лечения в значительной степени основан на

результатах, полученных в ходе проспективных клинических испытаний [108]. Стандартная схема лечения включает в себя химиотерапию и лучевую терапию для лечения пациентов с ЛХ и химиотерапию в сочетании с анти-CD20-антителами для пациентов с НХЛ [108,109]. Несмотря на то, что уровень клинического ответа высок, токсичность, связанная с лечением, такая как индукция второго злокачественного новообразования и кардиотоксичность, вызывает серьезную озабоченность [108]. После первоначального лечения у 10-30% пациентов с лимфомой развивается рефрактерное или рецидивное (р/р) заболевание, которое лечится высокодозной химиотерапией с последующей аутологичной трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток (АТГСК) [108,109]. Общая цель существующих и новых методов лечения ЛХ и НХЛ состоит в лечении заболевания и минимизации токсичности, связанной с терапией [108,109]. Текущие методы лечения пациентов с лимфомой представлены в Таблице 1. Недавно одобренные методы лечения подтипов р/р ЛХ и НХЛ включают конъюгат анти-CD30 антитело-лекарственное средство брентуксимаб ведотин, ингибиторы PD-1 (пембролизумаб и ниволумаб), ингибиторы тирозинкиназы Брутона (ибрутиниб и акалабрутиниб), ингибиторы фосфоинозитид-3-киназы γ и/или δ (иделалисиб, копанлисиб и дювелисиб) и Т-клеточную терапию химерным антигенным рецептором (CAR) CD19 (тисагенлеклеуцел и аксикабтаген цилолеуцел) (Таблица 1) [108-110].

Лимфома Ходжкина (ЛХ) представляет собой В-клеточную лимфому, подразделяемую на классическую ЛХ (кЛХ) и нодулярный вариант лимфомы Ходжкина с лимфоидным преобладанием (НЛХЛП) [108]. Гистологически кЛХ делится на четыре типа: нодулярный склероз (NSHL), смешанно-клеточный (MCHL), богатый лимфоцитами (LRHL) и лимфоидное истощение (LDHL)[108].

Таблица 1. Стратегии лечения ЛХ и НХЛ

Лимфома Ходжкина		
Тип лимфомы	Стандартный режим лечения	
кЛХ	Химиотерапия + ISRT	[108,111,112]
р/р кЛХ	Высокодозная химиотерапия +АТГСК	[108,112-115]
НЛХЛП	Ритуксимаб	[111,116]
Новые препараты		
кЛХ, включая р/р кЛХ	Брентуксимаб ведотин	[108,111,117]
	Ниволумаб	[111,118]
	Пембролизумаб	[111,119]
Неходжкинские лимфомы		
	Стандартный режим лечения	
НХЛ, включая р/р НХЛ	Ритуксимаб+химиотерапия	[109]
	Леналидомид+Ритуксимаб	[109]

	Высокодозная химиотерапия +АТГСК	[109]
	Новые препараты	
ПТКЛ	Брентуксимаб ведотин	[120]
ХЛЛ/ЛМЛ	Ибрутиниб+ Ритуксимаб	[121,122]
ХЛЛ/ЛМЛ; МКЛ	Акалабрутиниб	[123-128]
ФЛ и ЛМЛ	Иделалисиб	[129]
ФЛ	Копанлисиб	[130]
р/р ХЛЛ/ЛМЛ	Дувелисиб	[131]
р/р ПМВКЛ	Пембролизумаб	[132,133]
р/р ДВККЛ	Тисагенлеклейсел	[134]
р/р ДВККЛ	Акситаптаген силолейсел	[135,136]

ISRT, лучевая терапия пораженных мест; АТГСК, аутологичная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток; кЛХ, классическая лимфома Ходжкина; НЛХЛП, нодулярный вариант лимфомы Ходжкина с лимфоидным преобладанием; р/р, рефрактерное или рецидивное заболевание; ПТКЛ, периферическая Т-клеточная лимфома; ХЛЛ, хронический лимфоцитарный лейкоз (ХЛЛ); ЛМЛ, лимфома из малых лимфоцитов; МКЛ, мантийноклеточная лимфома; ПМВКЛ, первичная медиастинальная В-клеточная лимфома.

кЛХ характеризуется наличием злокачественных клеток Ходжкина и Рида-Штернберга (HRS), которые составляют ~ 1% опухолевой массы [137]. Большая часть инфильтрата, окружающего клетки HRS, представлена различными типами иммунных клеток, такими как дендритные клетки, макрофаги, лимфоциты, тучные клетки, нейтрофилы, эозинофилы и фибробласты, которые формируют микроокружение опухоли (TME) [137,108]. Несмотря на то, что клетки HRS - это В клетки, происходящие из зародышевого центра (GC), они представляют иммунофенотип, который не ассоциируется ни с какими известными клетками гемопоэтического происхождения (Рис. 4) [138]. В частности, клетки HRS редко экспрессируют типичные маркеры линии В клеток, такие как CD19, CD20, CD22, CD79, CD79B, но экспрессируют маркеры дендритных клеток (CD83), миелоидные маркеры (CD15) и маркеры Т клеток (CD2, CD3, CD4) [108,138-140]. Кроме того, члены семейства факторов некроза опухоли, такие как CD30 и CD40, экспрессируются на клетках HRS [139]. Микроокружение кЛХ состоит из варибельной клеточности, которая различна для каждого подтипа кЛХ [108]. NSHL богат фибробласто-подобными клетками и фиброзом, MCHL состоит из В клеток, Т клеток, нейтрофилов, гистиоцитов, плазматических клеток и тучных клеток; LRHL характеризуется клетками HRS, окруженными В клетками мантийной зоны и гистиоцитами, тогда как LDHL преимущественно состоит из CD4+ Т клеток, гистиоцитов и фиброза [108].

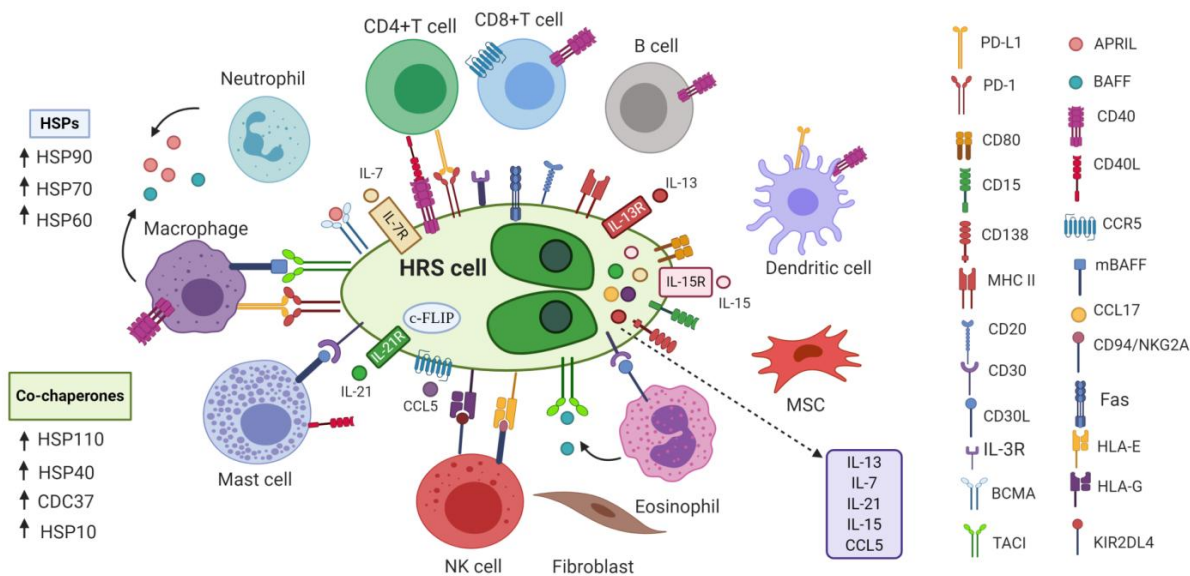


Рисунок 4. Микроокружение опухоли при ЛХ (из работы *Albakova et al., 2021, Frontiers in Immunology*)[11]. Клетки HRS окружены иммунными и стромальными клетками. Иммунные клетки секретируют цитокины, члены семейства некроза опухоли (CD40L, CD30L) и другие молекулы (APRIL, BAFF), которые связываются с белками на поверхности клеток HRS, способствуя росту и выживанию клеток [108,141]. Клетки HRS экспрессируют различные маркеры В клеток, Т клеток, миелоидные маркеры, маркеры дендритных клеток [138]. Для того чтобы избежать противоопухолевого иммунного ответа, клетки HRS экспрессируют PD-L1 [139]. Клетки HRS экспрессируют Fas, но уклоняются от FasL-опосредованного апоптоза за счет сверхэкспрессии с-FLIP [139,142,143]. Клетки HRS экспрессируют FasL, что приводит к апоптозу Fas-экспрессирующих NK клеток [142,144]. Шапероны HSP и их ко-шапероны высоко экспрессируются в клетках HRS, что дополнительно способствует иммуносупрессивному TME [145,146]. HRS, клетки Ходжкина и Рида-Штернберга; BCMA, антиген созревания В клеток; APRIL, лиганд, индуцирующий пролиферацию; BAFF, фактор активации В клеток; PD-L1, лиганд 1 запрограммированной смерти; CD30L, лиганд CD30; CD40L, лиганд CD40; CCL5, CC-хемокиновый лиганд 5; IL-3R, рецептор интерлейкина-3; TACI, интерактор трансмембранного активатора и модулятора кальция и лиганда циклофилина; HSP, белок теплового шока; MSC, мезенхимальные стромальные клетки; mBAFF, мембраносвязанный фактор активации В клеток; MHC II, главный комплекс гистосовместимости, класс II; HLA-E/G, человеческий лейкоцитарный антиген-E/G; KIR2DL4, член семейства иммуноглобулиноподобных рецепторов клеток-киллеров; с-FLIP, клеточный белок, ингибирующий FLICE; NHL, классическая лимфома Ходжкина; NK клетки, естественные клетки-киллеры.

В дополнение к уникальному иммунофенотипу и множеству нерегулируемых сигнальных путей, клетки HRS экспрессируют высокий уровень HSP. Hsu *et al.* исследовали экспрессию HSP в фиксированных формалином и залитых парафином тканях, полученных от пациентов с различными подтипами кЛХ [146]. Высокая цитоплазматическая экспрессия HSP90 и HSP60 в клетках HRS была обнаружена в NSHL, MCHL, LRHL и LDHL [146]. Напротив, не было обнаружено экспрессии белка HSP27 в клетках HRS при LRHL, а в LDHL уровень HSP27 был низким, в то время как у 20% пациентов с NSHL и MCHL была обнаружена высокая экспрессия HSP27 [146]. Позже, Santon *et al.* использовали тканевый микрочип для

анализа иммуногистохимической экспрессии HSP в клетках HRS у пациентов с кЛХ [145]. Более чем у 90% пациентов с кЛХ в клетках HRS была обнаружена высокая цитоплазматическая экспрессия HSP60, HSP10, HSP90 и CDC37, ядерный HSF1, тогда как HSP110 показал высокую экспрессию в ядре и цитоплазме клеток HRS [145]. Положительное цитоплазматическое окрашивание HSP70 и цитоплазматическая/ядерная экспрессия HSP40 наблюдались у 78% пациентов с кЛХ, тогда как у 54% была положительная цитоплазматическая экспрессия HSP27 [145]. Экспрессии HSP90 и HSP70 положительно коррелировали с экспрессией их ко-шаперонов CDC37 и HSP40, соответственно [145]. Также, экспрессия HSP40 положительно коррелировала с экспрессией p53, каспазой 9 и клеточным FLICE-ингибирующим белком (с-FLIP), тогда как экспрессия HSP70 коррелировала с экспрессией каспазы 3 [145]. В другом исследовании, высокая цитоплазматическая экспрессия HSP60 наблюдалась в клетках HRS в 100% случаев в типах NSHL и MCHL [147].

Неходжкинские лимфомы (НХЛ) включают в себя В-, Т- и NK-клеточные лимфомы [148]. НХЛ подразделяют на индолентные (медленнорастущие) и агрессивные (быстрорастущие) лимфомы. Наиболее распространенной индолентной лимфомой является фолликулярная лимфома (ФЛ), в то время как другие медленнорастущие подтипы включают лимфому маргинальной зоны (МЗЛ), хронический лимфоцитарный лейкоз (ХЛЛ)/лимфома из малых лимфоцитов (ЛМЛ) и лимфоплазмоцитарную лимфому [149]. Наиболее распространенный агрессивный подтип НХЛ представлен диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомой (ДВККЛ), в то время как другие агрессивные подтипы лимфомы включают мантийноклеточную лимфому (МКЛ), лимфому Беркитта и первичную выпотную (эффузионную) лимфому [149].

Различные члены семейства HSP показали высокую экспрессию при НХЛ. Valbuena *et al.* сообщали об умеренной или сильной цитоплазматической экспрессии HSP90 в 100% случаев у пациентов с лимфомой Беркитта, 61% пациентов с ФЛ, 59% с ДВККЛ, 38% с экстранодальными МЗЛ, 33 % случаев с ХЛЛ/ЛМЛ и 30 % случаев с лимфоплазмоцитарной лимфомой [150]. Слабая цитоплазматическая экспрессия HSP90 наблюдалась в 43% случаев экстранодальной В-клеточной лимфомы маргинальной зоны лимфоидной ткани, ассоциированной со слизистой оболочкой [150]. У пациентов с Т-клеточной лимфомой наблюдалась умеренная/сильная цитоплазматическая экспрессия HSP90 [150]. HSP60 также продемонстрировал высокую экспрессию при ДВККЛ и высокодифференцированной ФЛ, тогда как HSP60 не был обнаружен при низкодифференцированной ФЛ [147]. NK/Т-

клеточные лимфомы показали положительную цитоплазматическую экспрессию HSP60 [147].

Недавние исследования подчеркнули роль HSP110 в агрессивных подтипах В-клеточных НХЛ, таких как ДВККЛ и лимфома Беркитта (ЛБ) [151]. Инактивация HSP105/HSPH1 приводила к подавлению с-Мус и Vcl-6 [151]. Было показано, что HSP105 взаимодействует с с-Мус и Vcl-6 в ядре клеток ДВККЛ и ЛБ, что предполагает что HSP105 может быть шапероном как для с-Мус, так и для Vcl-6 [151].

В 2022 году были проведены клинические испытания II фазы для оценки безопасности и эффективности ингибитора HSP90 AUY922 у пациентов с р/р ДВККЛ и периферической Т-клеточной лимфомой (ПТКЛ) [147]. В исследование было включено 14 пациентов с ДВККЛ и 6 с ПТКЛ, где 1 пациент с ДВККЛ достиг полного ответа (ПО) и 1 пациент с ПТКЛ достиг частичного ответа [152]. Побочные эффекты, связанные с лечением, включали утомляемость, нарушение зрения (которое было полностью обратимым), и анемию [152]. Несколько исследований по оценке комбинации ингибиторов HSP90 с химиотерапевтическими препаратами, такими как флударабин, доксорубин, цитарабин, мелфалан или ингибиторы HDAC, продемонстрировали многообещающие результаты при онкогематологических заболеваниях [152-156]. Таким образом, подтипы НХЛ имеют высокую экспрессию специфических членов семейства HSP, однако использование комбинаторного подхода у пациентов с НХЛ требует дальнейшего изучения.

HSP и иммунотерапия рака

Различные виды иммунотерапии, в том числе токсины Коли, бациллы Кальметта-Герена, высокие дозы интерферона альфа-2b, интерлейкина-2 (IL-2), противораковые вакцины, ингибиторы контрольных точек и химерные антигенные рецепторы (CAR) Т-клетки улучшили возможности лечения онкологических больных [157-161]. Подходы, основанные на иммунотерапии, продемонстрировали многообещающие результаты и улучшили клинические исходы у онкологических больных [162]. Некоторые из этих иммунных подходов также включают использование белков HSP. В данном разделе рассматривается эффективность HSP вакцин, участие HSP в адоптивной Т/NK-клеточной терапии и использование ингибиторов HSP в сочетании с ингибиторами иммунных контрольных точек. Дальнейшее понимание того, как HSP модулируют различные иммунные ответы в контексте иммунотерапии на основе HSP, может стать основой для разработки более безопасных и эффективных подходов к лечению раковых больных.

HSP вакцины

В 1986 г. Ульрих и коллеги изолировали опухоль-специфический антиген, который они идентифицировали как HSP90 шаперон [15]. Другая группа исследователей идентифицировала антиген отторжения опухоли в саркомах Meth A и CMS5, который позже был признан гомологом ER HSP90 GRP94/gp96 [163,16,164,165]. Было показано, что в отличие от нормальных тканей иммунизация мышей препаратами HSP, извлеченными из опухолей, вызывает противоопухолевый ответ [91,166,16]. Комплексы HSP-пептид, выделенные из опухолевых клеток, взаимодействуют с антиген презентующими клетками (APC), что приводит к последующей активации CD8+ Т-клеток [166,14,167]. Способность комплексов HSP-пептид стимулировать защитный противоопухолевый иммунный ответ привела к разработке HSP вакцин. В настоящее время несколько вакцин HSP проходят клинические испытания. Новый подход был предложен Ямазаки *et al.*, которые разработали секретлируемую форму ER HSP90, гомолога gp96, где сигнал удержания ER gp96 был заменен Fc-доменом мышиного IgG1 [168]. Иммунизация мышей опухолевыми клетками, секретующими gp96-Ig, приводила к CD8+Т-зависимому отторжению опухоли *in vivo* [168,169]. Впоследствии были проведены клинические исследования фазы I (NCT00503568) и фазы II (NCT02117024) для оценки безопасности и эффективности вакцины gp96-Ig под названием HS110 у пациентов с немелкоклеточной карциномой легкого (НМРЛ). Кроме того, комбинированная терапия HS-110 и PD-1 ингибитором также оценивалась в клинических испытаниях (NCT02439450). Предварительные данные показали, что комбинированное лечение HS-110 и ингибитором PD-1 хорошо переносилось пациентами с запущенной аденокарциномой легкого [170]. HS-110 в сочетании с Ниволумабом приводил к увеличению общей выживаемости у пациентов с PD-L1+ с распространенным НМРЛ [171].

Кране и соавторы использовали аутологичный изолированный из опухоли gp96 для иммунизации пациентов с рецидивирующей глиобластомой [172]. До операции и после вакцинации лейкоциты периферической крови (ЛПК) повторно стимулировали либо аутологичной вакциной gp96 (agr96), либо рекомбинантной вакциной gp96 (rgp96) [172,173]. Результаты показали, что agr96 индуцирует 14,1-кратное увеличение экспрессии IFN γ [37]. Также стоит отметить, что респондеры показали лучшую выживаемость и имели увеличенное количество периферических НК-клеток и ослабленную частоту регуляторных Т-клеток CD4+CD25+ FoxP3+ [172]. Блох и коллеги оценили эффективность аутологичного препарата gp96, полученного из опухоли, в сочетании со стандартной терапией у пациентов с глиобластомой в исследовании II фазы [174]. Вакцинация препаратом gp96 в сочетании со

стандартной лучевой и химиотерапией улучшала выживаемость пациентов с низкой экспрессией PD-L1 [174]. В другом исследовании ДК, примированные gr96 опухолевого происхождения, вызывали сильный противоопухолевый эффект, который в значительной степени зависел от CD8+ Т- и NK-клеток [175]. Вакцинация другим шапероном ER GRP170 также показала многообещающие результаты на моделях мышей. Иммунизация мышей аутологичным GRP170, полученным из опухоли, подавляла рост опухоли и уменьшала метастазы [92]. Мыши, иммунизированные B16F10-grp170, показали сильный опухолеспецифический цитотоксический Т-клеточный ответ, предполагая, что использование комплексов ER HSP-пептид может быть эффективным для разработки противораковых вакцин [92].

Помимо ER HSP, цитозольные члены HSP также использовались для разработки вакцины на основе HSP. Комплексы HSP70-пептид, полученные из слияния опухолевых и ДК, показали повышенную иммуногенность по сравнению с препаратом, полученным только из опухолевых клеток [18].

Гранер и коллеги продемонстрировали, что вакцина с несколькими шаперонами, называемая «богатый шаперонами клеточный лизат» (CRCL), которая содержит ER и цитоплазматические HSP, активирует ДК, что приводит к высокой экспрессии CD40, МНС класса II и высвобождению IL-12 и индукции мощных противоопухолевый Т-клеточный ответ [176,177]. В другом исследовании было показано, что CRCL-стимулированные ДК усиливают экспрессию CD70, iNOS, NF-kB и фосфорилирование STAT1, STAT5, ERK1/2 и AKT [178]. Соответственно, делеция шаперонов (HSP70, HSP90, gr96 и кальретикулин) из CRCL снижало способность ДК стимулировать Т-клетки [177,176]. Зенг и коллеги продемонстрировали, что CRCL индуцирует секрецию провоспалительных цитокинов и хемокинов NK-клетками [179]. Другая вакцина с несколькими шаперонами (mHSP/пептидная вакцина), которая содержит несколько HSP, включая HSP60, HSP70, HSP110 и gr96, также была предложена в качестве противораковой вакцины. Иммунизация мышей mHSP/пептидной вакциной, полученной из клеток саркомы S180, в сочетании с циклофосфамидом и IL-12 ослабляла рост опухоли и улучшала выживаемость [180]. Недавно та же исследовательская группа показала, что вакцина mHSP/пептид, полученная из опухолей, вызывает более сильный противоопухолевый ответ, чем вакцина gr96/пептид [181]. Кроме того, комбинация mHSP/пептидной вакцины с ингибитором PD-L1 увеличивала продукцию IFN γ , TNF- α , IL-2 и IL-10 на 14-й день, хотя влияние на IFN γ , IL-2 и IL-10 уменьшалось на 28-й день [181].

В 2011 году FDA одобрило первый ингибитор иммунных контрольных точек под названием Ипилимумаб, антитело, которое ингибирует связывание антигена 4 цитотоксических Т-лимфоцитов (CTLA4) с молекулами CD80 и CD86, для лечения пациентов с меланомой на поздних стадиях [160,182]. Несколько лет спустя были одобрены антитела против запрограммированной смерти-1 (PD-1), такие как ниволумаб и пембролизумаб, и анти-PD-L1, а именно атезолизумаб и дурвалумаб [11,183]. В настоящее время применяются различные комбинированные методы лечения, нацеленные на костимулирующие иммунные контрольные точки, включая глюкокортикоид-индуцированный белок, родственный семейству рецепторов TNF (GITR), OX40, 4-1BB, индуцируемый Т-клеточный костимулятор (ICOS) и коингибирующие иммунные контрольные точки, такие как CTLA4, PD-1, ген 3 активации лимфоцитов (LAG3), Т-клеточный иммуноглобулин и домен муцина, содержащий 3 (TIM-3), Т-клеточный иммуноглобулин и домен ингибирующего мотива на основе тирозина иммунорецептора (TIGIT), а также В- и Т-клеточный лимфоцит аттенюатор (BTLA), оцениваются в клинических испытаниях [160]. Влияние появляющихся комбинированных иммунных контрольных точек на экспрессию HSP пока неизвестно и требует дальнейшего изучения. Недавно было показано, что ингибитор HSP90 подавляет поверхностный PD-L1 [36]. Механически, сайленсинг HSP90 ингибирует с-Мус и преобразователь сигнала и активатор транскрипции 3 (STAT3), что приводит к подавлению PD-L1 на клеточной поверхности [36]. Также было показано, что нуклеофосмин/киназа анапластической лимфомы (NPM/ALK) способствует экспрессии PD-L1 посредством активации STAT3 [184]. Кроме того, ингибирование сплайсированной формы кошаперона HSP90 FKBP51 также снижает экспрессию PD-L1 при глиоме [185]. Следовательно, HSP90 может модулировать поверхностную экспрессию PD-L1 посредством регуляции его клиентов (с-Мус и NPM/ALK) и его кошаперонов. Это было дополнительно подтверждено обнаружением того, что ингибирование стресс-индуцируемого гомолога HSP90, HSP90 α , повышает чувствительность иммунорезистентных опухолевых клеток к терапии анти-PD-1 [186]. Комбинация ингибитора HSP90 с анти-PD-L1, анти-PD-1 или анти-CTLA4 улучшала противоопухолевый эффект в моделях на мышах [187,188]. Комбинированное использование ингибитора HSP90 с ингибиторами PD-L1 или CTLA4 увеличивало количество CD69+/CD8+ Т-клеток [36,188]. Помимо CD8+ Т-клеток, комбинация ингибитора HSP90 с анти-CTLA4 также повышала экспрессию CXCL9, CXCL10 и подавляла экспрессию Т-регуляторных клеток [188].

Гомологи HSP70 также участвуют в регуляции иммунных контрольных точек. Недавнее исследование показало, что ингибирование GRP78 снижает экспрессию PD-L1 при раке молочной железы [189]. Кроме того, GRP78 играет важную роль в регуляции контрольной точки врожденного иммунитета CD47, высокая экспрессия которой коррелирует с неблагоприятным клиническим исходом [190,191]. На поверхности опухолевых клеток CD47 действует как антифагоцитарный сигнал «не ешь меня» [192]. CD47 взаимодействует с сигнальным регуляторным белком α (SIRP α), который преимущественно экспрессируется в фагоцитирующих клетках [148,192]. Блокирование взаимодействия CD47 с SIRP α анти-CD47 приводило к фагоцитозу клеток острого миелоидного лейкоза [190]. Кроме того, комбинированная терапия ингибитором CD47 и ритуксимабом показала многообещающие эффекты у пациентов с Неходжкинской лимфомой [193]. Интересно, что ингибирование GRP78 подавляло CD47 в раковых клетках, в то время как совместная экспрессия GRP78 и CD47 коррелировала с плохой выживаемостью у пациентов с раком молочной железы [194,195]. Отмечалось, что блокировка Мус, клиентского белка HSP90, подавляет CD47 и PD-L1 [196,197]. Таким образом, необходимы дальнейшие исследования, чтобы понять роль HSP в регуляции иммунных контрольных точек и влияние новых методов лечения контрольных точек на высвобождение HSP в опухолевое микроокружение.

HSP и адоптивная T/NK-клеточная терапия

Адоптивная T- или NK-клеточная терапия включает использование аллогенных или аутологичных T- или NK-клеток [198]. Этот подход был первоначально описан Southam *et al.* (1966), которые продемонстрировали, что совместная трансплантация аутологичных клеток, полученных из опухоли, и лейкоцитов, полученных от пациентов, ингибировала рост опухоли у половины пациентов с раком [199]. В нескольких исследованиях предлагалось использовать адоптивную NK-клеточную терапию для лечения пациентов с гематологическими злокачественными новообразованиями [200]. NK-клетки можно получить из периферической крови или дифференцировать из стволовых клеток, впоследствии размножить и активировать *ex vivo*. Несколько исследований показали, что HSP70 или 14-членный производный HSP70 пептид TKD вместе с IL-2 или IL-15 могут эффективно активировать NK-клетки [76,201,202]. Дополнительные исследования показали, что NK-клетки, предварительно стимулированные TKD и IL-2, распознают опухоли, экспрессирующие мембрано-связанный HSP70 (mHSP70) [76]. Так как агрессивность опухоли связана с активацией HSP70 и что радио- и/или химиотерапия могут дополнительно

усиливать экспрессию mHSP70, эта стратегия может оказаться эффективной для лечения mHSP70-позитивных опухолей [203-205]. В исследовании II фазы аутологичные NK-клетки, предварительно активированные TKD и IL-2, использовались у пациентов с mHSP70-экспрессирующим НМРЛ после радиохимиотерапии [206]. Адоптивная терапия NK-клетками хорошо переносилась и сопровождалась увеличением количества активированных NK-клеток в кровотоке [206]. Та же исследовательская группа показала, что IL-2/TKD-активированные NK-клетки в сочетании с анти-PD-1 ингибируют рост опухоли *in vivo* [78].

T-клетки, полученные от пациента или донора, могут быть генетически модифицированы для экспрессии химерного антигенного рецептора (CAR), а затем размножены *ex vivo* и введены пациенту [198]. CAR представляет собой синтетический рецептор, состоящий из антигенсвязывающего домена, представленного одноцепочечным переменным фрагментом (scFv), шарнирной области и трансмембранного и внутриклеточного сигнальных доменов [207,11]. Важно отметить, что связывание CAR с поверхностными антигенами не зависит от МНС, что приводит к активации T-клеток и сильному противоопухолевому ответу [207]. Несколько исследователей предложили использовать CAR против mHSP70, чтобы можно было нацеливаться на mHSP70-позитивные клетки [208]. Таким образом, сконструированные CAR T/NK-клетки, экспрессирующие scFv, полученные из анти-HSP70-антитела, могут быть многообещающей стратегией лечения агрессивных HSP70-позитивных опухолей.

Глава 2. Материалы и Методы

Клонирование и выделение стресс-индуцированной изоформы HSP70

Тотальную РНК выделяли из РВМС с помощью реагента Trizol (Ambion), в соответствии с инструкцией производителя. Анализ препарата РНК проводили с помощью гелелектрофореза. Обратную транскрипцию проводили с помощью RevertAid First Strand cDNA Synthesis kit (Thermo Scientific). *HSPA1A* был субклонирован в pJet1.2, затем клонирован в вектор pQE30 (Рис. 5). Плазмидную ДНК выделяли с помощью набора GeneJet plasmid Miniprep Kit (Fermentas). Скрининг колоний проводили методом ПЦР. Трансформацию проводили в компетентные клетки – *Escherichia coli* M15. Общая схема эксперимента указана на Рисунке 4.



Рисунок 4. Общая схема эксперимента по клонированию и выделению HSP70 (*HSPA1A*). *HSPA1A* был субклонирован в pJet1.2 и клонирован в вектор PQE30 по сайтам KpnI-HindIII. Плазмидная ДНК pQE30-HSP70 была трансформирована в компетентные клетки M15 для последующего выделения белка HSP70 путем аффинной хроматографии.

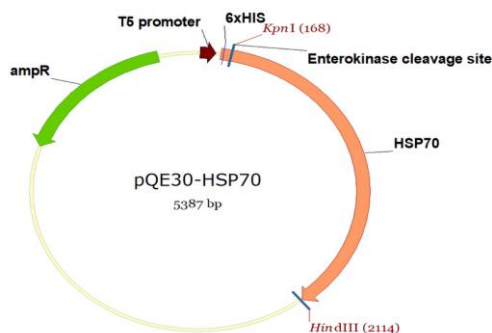


Рисунок 5. Схема плазмиды, кодирующей стресс-индуцированную изоформу HSP70/*HSPA1A*, для последующего выделения рекомбинантного белка HSP70.

Скрининг условий для выделения рекомбинантного белка HSP70

Для выделения использовалась Ni-NTA агароза (Qiagen). Для оптимального выделения белка HSP70 был проведен скрининг следующих условий:

1. 100мМ NaCl;
2. 100мМ KCl;
3. 300мМ NaCl;

4. 0.5M Мочевина;
5. 1M Мочевина;
6. 1% Tween-20;
7. 1% Triton X-100;
8. 1% CHAPS;
9. 10% глицерин

SDS-PAGE и Вестерн-блоттинг

Для SDS-PAGE и вестерн-блоттинга использовалась камера Bio-Rad. Для определения молекулярной массы, использовался маркер (ThermoFisher Scientific). Белки разделяли с помощью 4% концентрирующего геля и 10% разделяющего геля. Для окрашивания использовали PageBlue™ Protein Staining Solution (ThermoFisher Scientific).

Для Вестерн-блоттинга использовались моноклональные антитела к белку HSP70 (BRM-22, Sigma-Aldrich) и антитела к IgG мыши, конъюгированные с HRP (ThermoFisher Scientific). Визуализацию проводили с помощью Bio-Rad Gel Doc EZ Imager.

Молекулярный докинг

Для того, чтобы исследовать потенциальные взаимодействия доменов HSP70 с различными иммунными рецепторами, мы применили метод молекулярного докинга. Мы использовали структуры двух основных доменов HSP70, таких как NBD и SBD, в их связанной и свободной конформациях. Структуры доменов HSP70 и всех белков/рецепторов, используемых для докинга, были получены из банка данных белков (PDB) и указаны в Таблице S1 (Приложение 1) [209-247]. Структуры молекул были извлечены из моделей в соответствии с идентификатором пептидной цепи (Таблица S1 в Приложении 1). Линкерные области HSP70, мембранные области и другие ненужные области молекул-мишеней были исключены из поиска областей связывания. Все пары HSP70-мишени подвергали процедуре молекулярного докинга с использованием программы ZDOCK (поиск по 6 степеням свободы из 1000 поз) [248]. Результаты ранжировали по энергии с помощью программы ZRANK, где комплексы с наименьшей энергией были выбраны как наиболее стабильные [249]. Все энергии затем использовались для усреднения взаимодействующих молекул внутри класса и были переведены в Z-оценку.

Тестирование гипотезы и машинное обучение

Мы использовали масс-спектрометрические данные из открытого доступа, которые содержат образцы 231 донора (ProteomeXchange PXD008846) [250]. В работе Zhang *et al.* (2018),

образцы мочи были получены от пациентов с раком желудка (GC) (n = 47), раком пищевода (EC) (n = 14), раком легкого (LC) (n = 33), раком мочевого пузыря (BC) (n = 17), раком шейки матки (CCA) (n = 25), колоректального рака (CRC) (n = 22) и пациентов с доброкачественными заболеваниями легких (LD), такими как хроническая обструктивная болезнь легких (COPD) (n = 17) и пневмония (PM) (n = 23), а также от здоровых доноров (CTL) (n = 33) [250]. В работе Zhang *et al.* (2018), образцы мочи центрифугировали при 200 000 g в течение 70 минут, а абсолютное количество белка измеряли с помощью жидкостной хроматографии/тандемной масс-спектрометрией (LC-MS/MS) и представляли в виде общей доли на основе интенсивности (iFOT; отображается в 10^5), представляющей нормализованную интенсивность для каждого белка [250]. В анализ были включены HSP, такие как HSP70, HSP90, HSP40, HSP27, HSP110, шаперонины и ко-шапероны. Белки, которые имели $> 30\% \cdot 0,0099$ (отсутствующие значения), были исключены из анализа.

Уровень белка измеряли для CTL и шести групп рака (LC, BC, CCA, CRC, EC и GC). Поскольку данные не имели нормального распределения, использовались непараметрические тесты. Процедура была разделена на две стадии, такие как тест Крускала-Уоллиса (KW) для всех белков, за которым следовал апостериорный тест Данна с использованием CTL в качестве референсного значения [251]. Также использовалась коррекция теста множественных сравнений Бонферрони (MCT) в его многоступенчатом варианте, известном как коррекция Холма-Бонферрони [252].

Принимая во внимание, что HSP расположены в разных клеточных компартментах, а также существуют в разных формах (конститутивной/стресс-индуцируемой) и взаимодействуют с ко-шаперонами для своих функциональных циклов, а также работают в сетях, мы ввели в модель различные комбинации простых соотношений и стратегии умножения. Например, мы использовали соотношение между уровнем цитозольного гомолога HSP90 и уровнем митохондриального гомолога HSP90 в простом соотношении HSP90AA1/TRAP1, конститутивной изоформы HSP90 к стресс-индуцируемому HSP90 в простом соотношении HSP90AB1/HSP90AA1, ко-шаперона к HSP90 α в простом соотношении FKBP4/HSP90AA1 и т. д. В результате была создана модель прогнозирования рака с помощью XGBoost. Модель бинарной классификации была построена для того, чтобы различить пациентов с раком (LC, BC, CCA, CRC, EC и GC) от группы без рака (LD и CTL). Эффективность метода оценивалась посредством 10-кратной стратифицированной перекрестной проверки. Разделив данные на 10 раз, итеративно обучая 9 раз и тестируя оставшуюся часть, мы имитировали эффект 10 различных наборов данных. Это позволило нам предотвратить переобучение, тем самым гарантируя, что модель будет хорошо обобщать новые данные. Для настройки

гиперпараметров использовалась Байесовская оптимизация. Мы рассчитали важность функций, используя показатель усиления, который измеряет снижение потерь при добавлении разделения с этой функцией. Подробный алгоритм построения модели указан в Работе [10].

Несмотря на то, что модели машинного обучения дают отличные прогностические результаты, их часто критикуют за то, что они являются ‘черными ящиками’, поскольку они принимают входные данные и производят выходные данные, что дает практикам очень мало информации о внутренней механике, которая генерировала эти результаты. Это особенно верно для нелинейных моделей, таких как XGBoost, и нейронных сетей. Для того, чтобы открыть ‘черный ящик’, мы использовали SHAP (*Shapely Addictive exPlanations*), который использует подход, основанный на теории игр. Данный подход позволяет определить, какие функции больше всего повлияли на окончательное решение.

Значения SHAP предлагают 3 полезных свойства: глобальная интерпретируемость, показывающая совокупное положительное или отрицательное влияние предиктора на определение цели (позволяет создавать сводные графики); локальная интерпретируемость, показывающая, как каждая функция способствовала принятию моделью решения для каждого пациента; точные вычисления для древовидных моделей, таких как XGBoost.

Образцы пациентов

Образцы периферической крови и костного мозга были собраны у пациентов с В-НХЛ (n=5), кЛХ (n=3) и у здоровых доноров (n=4). В группу В-НХЛ вошли пациенты с диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомой (ДВККЛ, n=3) и первичной медиастинальной крупноклеточной В-клеточной лимфомой (ПМВКЛ, n=2), а в группу кЛХ вошли пациенты с нодулярным склерозом (n=3). Пациенты с ЛХ и В-НХЛ, включенные в исследование, были первичными пациентами без предшествующего лечения, если не указано иное. Образцы также были получены от пациентов с рецидивной или рефрактерной кЛХ (n = 3) до терапии и через 24 часа после терапии Ниволумабом (Opdivo, Bristol-Myers Squibb). Для эксперимента с Т-клеточной активацией, были собраны образцы крови у 4 пациентов с индолентной лимфомой (фолликулярной лимфомой), 5 пациентов с агрессивной лимфомой, включая диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому и первичную медиастинальную крупноклеточную В-клеточную лимфому. Образцы также были собраны у 4 здоровых доноров. Все пациенты были отрицательными по вирусу Эпштейна-Барр (ВЭБ) для исключения ВЭБ-ассоциированных лимфом. Средний возраст больных составил 42 года. Мононуклеарные клетки периферической крови (РВМС) и мононуклеарные клетки костного

мозга (BM MNC) выделяли с помощью центрифугирования в градиенте плотности Ficoll-Paque.

Антитела и проточная цитофлуориметрия

Клетки окрашивали следующими антителами: APC/Cy7 анти-CD3 (HIT3a), APC анти-CD19 (H1B19), Pacific Blue анти- CD3 (HIT3a), FITC анти- IFN γ (4S.B3) (Sony Biotechnology), PE-Vio 770 анти-CD56 (REA196), FITC анти-Granzyme B (REA226), APC/Cy7 анти-CD107a (LAMP-1) (H4A3) (Miltenyi Biotec).

Поверхностное и внутриклеточное окрашивание HSP90 β , TRAP1 и STIP1

Клетки окрашивали антителами анти-TRAP1-RPE человека (3H4-2H6, Sigma-Aldrich), первичными антителами к HSP90 β (EPR16621), STIP1 (EPR6605) и предварительно адсорбированными вторичными антителами анти-кроличьего IgG H&L PE (все Abcam). В качестве изотипических контролей использовали мышинный изотипический контроль IgG1-PE (Invitrogen) и кроличий изотипический контроль IgG-PE (Abcam). Блокирующий реагент FcR (Miltenyi Biotec) использовали для блокировки неспецифического связывания. Для внутриклеточного окрашивания, клетки фиксировали и пермеабелизировали с помощью Cytofix/Сytoperm (BD Biosciences) и окрашивали антителами к внутриклеточным белкам. Для поверхностного и внутриклеточного окрашивания, мертвые клетки исключали из гейтирования с использованием Sytox Blue и Fixable Viability Dye eFluor 506 (Invitrogen), соответственно.

Анализ реаранжировки генов IgH

Анализ реаранжировки генов IgH проводили, как описано ранее [253]. Реакционная смесь содержала 100–200 нг ДНК. Условия ПЦР: начальная денатурация при 95 °C (5 мин), 35 циклов ПЦР при 92 °C (35 с), 60 °C (35 с) и 72 °C (35 с) и элонгация при 72 °C (10 мин). ПЦР проводили на термоциклере DNA Engine (BioRad, Hercules). Для анализа фрагментов продуктов ПЦР использовали ABI PRISM 3130 (Applied Biosystems). Результаты визуализировали с помощью GeneMapper v. 4.0 (Applied Biosystems).

Активация Т клеток

Т клетки выделяли с использованием набора для выделения Pan Т клеток (Miltenyi Biotec) и активировали в течение 48 часов с помощью Т cell TransAct (Miltenyi Biotec), в соответствии

с инструкцией производителя. Клетки инкубировали в среде RPMI 1640 с L-глутамином, 10% FBS, пенициллином/стрептомицином (Cargilorn Scientific) и IL-2 человека (60 ME/мл, Miltenyi Biotec). Для экспериментов с более длительным временем активации к Т клеткам добавляли свежую среду и hIL-2 через 72 часа после первоначальной активации. Неактивированные Т клетки инкубировали только в среде без добавления анти-CD3/CD28 или hIL-2.

Активация Т клеток - антитела HSP, PD-1, CTLA-4 и STAT3

Т клетки окрашивали первичными антителами к HSP90 α (2G5.G3, Abcam), HSP90 β (EPR16621, Abcam), HSP70 (C92F3A-5, Enzo Life Sciences), HSC70 (1B5, Stressgen), HSP40 (3B9.E6, Abcam), GRP78 (StressMarq Biosciences), HSP60 (StressMarq Biosciences). Вторичными антителами были - предварительно адсорбированные козы анти-кроличьи IgG H&L (PE) (Abcam), анти-мышинные IgG1 (PE) (Miltenyi Biotec) и анти-крысиные F(ab')₂ (PE) (Sony Biotechnology). Т клетки также окрашивали антителами к CD279/PD-1 (REA1165) (PE), CD152/CTLA-4 (REA1003, Miltenyi Biotec), первичными антителами к STAT3 (4G4B45, Sony Biotechnology) и вторичными антителами к IgG1 мыши (PE) (Miltenyi Biotec). Блокирующий реагент FcR (Miltenyi Biotec) и изотипические контроли использовали для исключения неспецифического связывания. Для внутриклеточного окрашивания, клетки фиксировали и пермеабелизировали с помощью Cytofix/Cytoperm. Клетки анализировали с помощью проточной цитометрии.

Смешанная лимфоцитарная реакция (MLR)

Для аллогенной MLR, моноциты выделяли с использованием микрогранул CD14 (Miltenyi Biotec) и культивировали в течение 5 дней в присутствии IL-4 и GM-CSF (Miltenyi Biotec). Т клетки BCL пациентов и здоровых доноров инкубировали с аллогенными дендритными клетками моноцитарного происхождения (мо-ДК) в присутствии 0,1 μ M ингибитора HSP90 (гелданамицин, GA) (Abcam) и 10 мкг/мл ниволумаба/анти-PD-1 (Opdivo, Bristol-Myers Squibb) в течение 4 дней. Пембролизумаб/анти-PD-1 (10 мкг/мл, Keytruda, MSD) и IgG4 (10 мкг/мл) использовали в качестве положительного и отрицательного контроля, соответственно. Для сравнения также использовали ипилимумаб/анти-CTLA-4 (10 мкг/мл, Yervoy, Bristol-Myers Squibb).

Анализ дегрануляции Т клеток

Монензин (Sony Biotechnology) и анти-CD107a APC-Cy7 (Sony Biotechnology) добавляли к клеткам в течение последних 5 часов инкубации. Затем клетки собирали и окрашивали на CD3 (Pacific Blue), CD4 (FITC), CD8 (PE/Cy5) (все Sony Biotechnology) и анализировали с помощью проточной цитометрии. Поскольку ингибитор HSP90 может воздействовать на аллогенные мо-ДК, аналогичный эксперимент был проведен с использованием стимуляции анти-CD3/CD28.

Ингибирование HSP90 в Т клетках - экспрессия PD-1 и CTLA-4

Т клетки инкубировали с анти-CD3/CD28 и hIL-2 в течение 48 часов в полной среде RPMI при 37°C, а затем инкубировали с 0,1 μМ гелданамицина или DMSO в течение дополнительных 24 часов. Затем Т клетки окрашивали на внутриклеточные PD-1, CTLA-4 и STAT3.

Стимуляция NK клеток, ингибирование HSP90, анализ CD107a/Granzyme B и IFN γ

NK клетки стимулировали, как описано ранее, с некоторыми изменениями [254]. PBMC и BM MNC инкубировали в среде RPMI 1640 с L-глутамином (Capricorn Scientific), с 10% эмбриональной бычьей сывороткой (FBS, Capricorn Scientific) и пенициллином/стрептомицином (Capricorn Scientific) и ингибитором HSP90 - гелданамицином (GA, 0,1 μМ) (Abcam) или DMSO в присутствии или в отсутствие рекомбинантного человеческого (rh) IL-2 (100 МЕ/мл) (Miltenyi Biotec) и rhIL-15 (10 нг/мл) (Miltenyi Biotec) в течение ночи при 37°C 5% CO₂, перед добавлением анти-CD107a APC-Cy7 (Miltenyi Biotec). Затем клетки стимулировали анти-NKp46/анти-CD2 (набор для активации/экспансии NK клеток человека, Miltenyi Biotec) в течение 5 часов при 37°C, в соответствии с инструкцией производителя. Инкубацию проводили в полной среде RPMI с добавлением брэфельдина А (Sony Biotechnology) в конечном разведении 1/1000. Затем клетки окрашивали на поверхностные маркеры и внутриклеточный гранзим В (Miltenyi Biotec) или IFN γ (Sony Biotechnology) и анализировали с помощью проточной цитометрии.

Статистический анализ

Все статистические анализы проводились с использованием GraphPad Prism 9. Результаты представлены как среднее \pm стандартная ошибка среднего (SEM). Для анализа данных

использовались параметрические тесты, включая двухвыборочный t-test и ANOVA, а также непараметрические методы, включая критерий Манна-Уитни. Значения $P < 0.05$ считались статистически значимыми.

Глава 3. Результаты

Определение оптимальных условий для выделения стресс-индуцированной изоформы HSP70

В рамках работы, были подобраны оптимальные условия для выделения стресс-индуцированной изоформы HSP70. Для этого, *HSPA1A* был субклонирован в вектор pJet 1.2, секвенирован и далее клонирован в экспрессионный вектор pQE30, путем рестрикции и дальнейшего лигирования гена *HSPA1A* и экспрессионного вектора pQE30. После этого, была проведена трансформация в компетентные клетки XL-1Blue, проведен отбор клонов методом ПЦР и наработана плазмидная ДНК, после чего была проведена аналитическая рестрикция клонов. Далее, плазмидная ДНК *pQE30-HSP70* была трансформирована в компетентные клетки M-15, были отобраны клоны методом ПЦР и наработана масса для выделения белка. После этого, были подобраны условия для оптимального выделения белка HSP70, которые включали добавление 1% Tween-20 (Рис 6А). Лизаты были нанесены на Ni-NTA агарозу и элюированы в растворимой форме. Выход растворимого белка составил 40 мг/л (Рис 6В).

Стресс-индуцированную изоформу HSP70 предполагалось использовать для исследования роли HSP70 в модулировании иммунных клеток. Однако, на момент получения нами рекомбинантного HSP70, были опубликованы исследования Rigo *et al.* (2020), показывающие, что различные экспрессионные системы (*Escherichia coli* и *Pichia pastoris*) могут влиять на иммуномодулирующий потенциал HSP70 [255]. Так как целью данного проекта являлось исследование иммуномодулирующих эффектов HSP, использование рекомбинантного HSP было приостановлено. В дальнейшем планируется использовать данный белок для целей, не связанных с исследованиями иммунологических функций HSP.

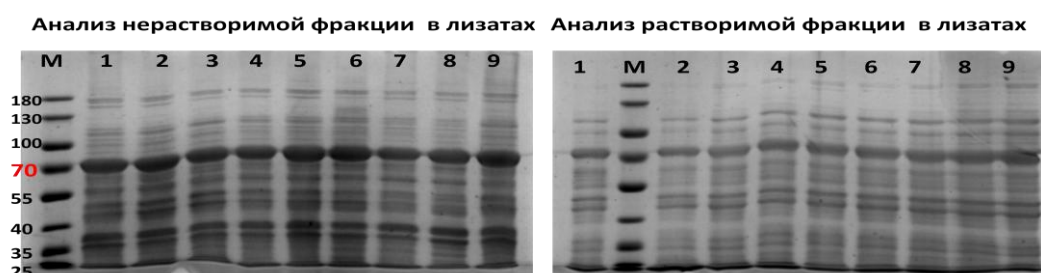
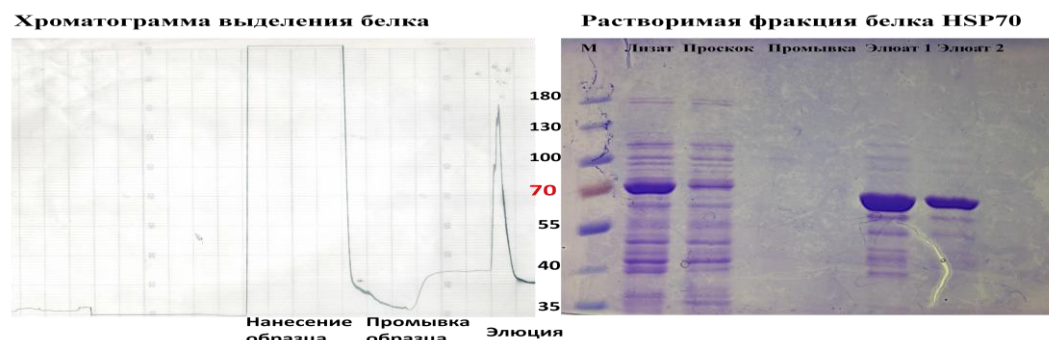
А**В**

Рисунок 6. Выделение рекомбинантного HSP70. **А.** Скрининг условий для выделения стресс-индуцированной изоформы HSP70. 1. 100mM NaCl; 2. 100mM KCl; 3. 300mM NaCl; 4. 0.5M Мочевина; 5. 1M Мочевина; 6 . 1% Tween-20; 7. 1% Triton X-100; 8. 1% CHAPS; 9. 10% глицерин. **В.** Выделение белка методом аффинной хроматографии. Выход белка – 40 мг/л.

Анализ взаимодействия потенциальных иммунных рецепторов с HSP70

Используя молекулярный докинг, было установлено, что NBD в свободной форме в среднем показал слабое связывание с потенциальными мишенями, чем NBD в формах, связанных с АТФ или АДФ (Рис 7). Для SBD было установлено, что свободная форма имеет самую низкую энергию, представляя самую высокую возможность взаимодействия. Таким образом, HSP70, связанный с пептидом, может взаимодействовать с различными рецепторами, и это взаимодействие опосредовано NBD. Поскольку J-домен HSP40 способен связываться с доменом HSP70-NBD, можно предположить, что аналогичный механизм связывания используется HSP70 для взаимодействия с различными рецепторами [256]. Так как HSP70 не обладает высокой специфичностью к клиентским белкам, можно предположить, что несвязанный HSP70 обладает потенциалом связывания с рецепторами, и это опосредовано его SBD доменом. Важно отметить, что молекулярный докинг не позволяет однозначно обнаруживать взаимодействия во всех случаях, но такие предсказания позволяют сузить набор кандидатов для дальнейшего экспериментального скрининга взаимодействий. Прогнозы молекулярного докинга могут дать важную информацию для понимания возможных взаимодействий HSP70.

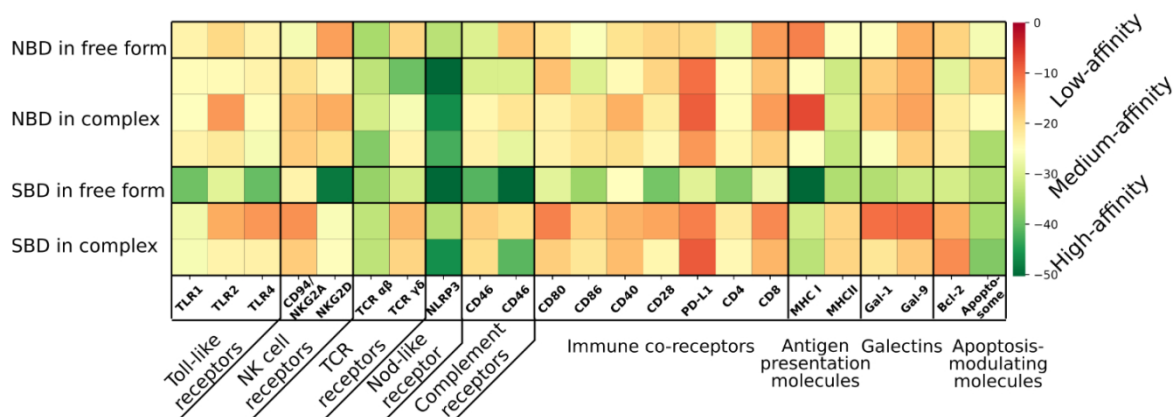


Рисунок 7. Тепловая карта молекулярного докинга различных молекул с доменами HSP70 в связанной и свободной конформациях. Цветовые значения соответствуют энергии связывания, оцениваемой с помощью функции ZRANK (более низкие энергии соответствуют более высокой вероятности образования комплекса). NBD, нуклеотид-связывающий домен; SBD, субстрат-связывающий домен.

Определение ключевых гомологов HSP в раковых заболеваниях

Для определения ключевых HSP в раковых заболеваниях, были проанализированы данные пациентов с различными типами рака. Белки теплового шока и ко-шапероны, включая HSP90AB1, TRAP1, FKBP4, HSPA9, HSPB5, CCT1 и CCT5, были идентифицированы как дифференциально экспрессирующиеся белки (Таблица 2). CCT1, CCT5 и FKBP4 показали значительно более низкий уровень у больных раком по сравнению со здоровыми донорами, тогда как HSPA9 и TRAP1 показали значительно более высокий уровень у больных раком по сравнению с контрольной группой для большинства типов рака. HSPB5 показал значительно более высокий уровень только у пациентов с ССА по сравнению со здоровыми донорами (Таблица 2). HSP90AB1 показал значительно более низкий уровень у пациентов с GC и CRC по сравнению с CTL (Таблица 2).

Таблица 2. HSP и ко-шапероны в моче онкологических 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 HSP и ко-шаперонах, привела к ~ 90% точности и сбалансированной точности 84,61% (точность 87,041%), усредненной по 10-кратным тестам перекрестной проверки (Рис. 8А). Для идентификации белков, которые положительно влияли на модель прогнозирования рака, мы внедрили подход SHAP - Shapely Addictive Explanations. Низкие уровни HSP90AB1/TRAP1, HSPA6/TRAP1 и HSP90AA1/TRAP1 в моче повышали вероятность наличия у пациента рака (Рис. 8С). Для оценки различий в уровне HSP при разных типах рака, была построена тепловая карта, представляющая z-оценку HSP для каждого пациента (Рис. 8В). HSP90AA1 и HSPD1 показали высокий уровень при BC; HSPB1 и HSBP5 в CCA; ST13, DNAJA1 и HSPA8 в LC; FKBP4 и HSPA8 в EC (Рис. 8В). HSPA2 и HSPA4, по-видимому, не изменялись при различных типах рака (Рис. 8В).

Более высокие уровни как конститутивных, так и стресс-индуцируемых изоформ HSP90, по сравнению с митохондриальной изоформой HSP90 TRAP1, связаны с доброкачественными заболеваниями легких, такими как РМ и COPD, тогда как более высокий уровень TRAP1, по сравнению с HSP90AA1 и HSP90AB1, связан с раком легкого (Рис. 8D, E). В отличие от пациентов с РМ, низкий уровень CCT5 и высокие уровни HSPA9 *TRAP1 и CCT / HSP90AA1 связаны с LC (Рис. 8E). Более низкий уровень HSP90AA1/TRAP1 и HSP90AB1/TRAP1 положительно влиял на LC по сравнению с более высоким уровнем HSP90AA1/TRAP1 и HSP90AB1/TRAP1 у пациентов с COPD (Рис. 17E). В целом, образцы мочи содержат характерные для рака сигнатуры HSP. Таким образом, эти

HSP сигнатуры могут использоваться для того, чтобы отличить раковых больных от здоровых доноров и пациентов с доброкачественными заболеваниями, однако это требует дальнейшего изучения и валидации на независимой выборке. Эти данные согласуются с предыдущими исследованиями, которые показали, что HSP могут использоваться в качестве биомаркеров рака [42,43,257-278].

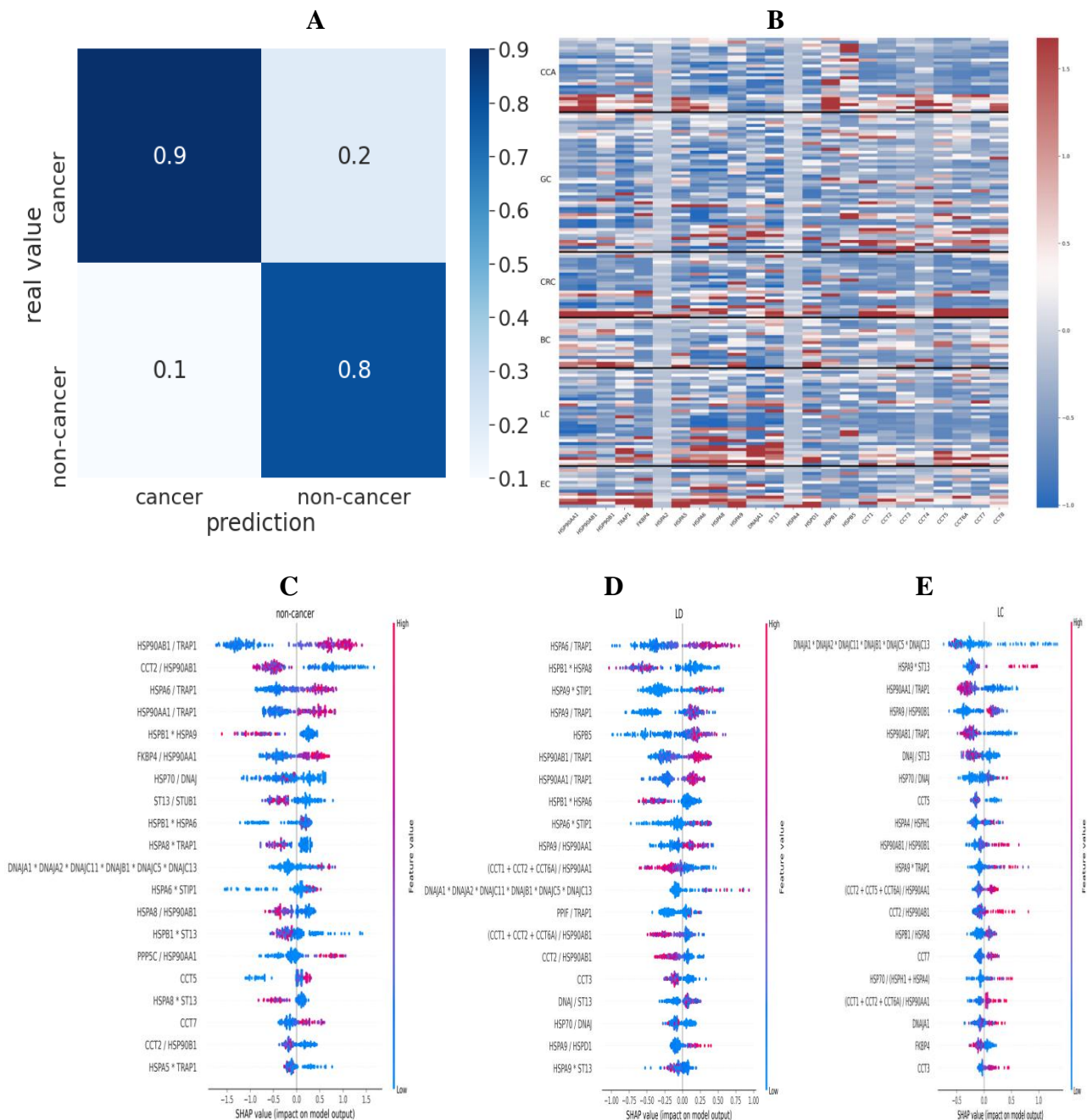


Рисунок 8. HSP в моче как биомаркеры рака. (A) Модель прогнозирования рака. (B) Тепловая карта нормализованных по z-оценке уровней HSP в моче пациентов с различными типами рака. Значения были обрезаны до 1-го перцентиля z-оценке и до 97-го перцентиля. (C) HSP и ко-шапероны в раке. Отрицательные значения указывают на положительный вклад специфичных белков в вероятность того, что у пациента рак. Положительные значения SHAP указывают на то, что соответствующие значения белков связаны с более низкими

шансами рака. Для простоты, мы представили HSPA2+HSPA6+HSPA8+HSPA12+HSPA5 как «HSP70», а DNAJA1+DNAJA2+DNAJC11+DNAJB1+DNAJC5+DNAJC13 как «DNAJ». (D, E) Сводные графики SHAP для модели прогнозирования рака. HSP в моче использовали для определения критических белков и соотношений белков у пациентов с доброкачественными заболеваниями легких (LD), такими как РМ и COPD (D), и у пациентов с LC (E). HSP, белки теплового шока; РМ, пневмония; COPD, хроническая обструктивная болезнь легких; LC, рак легкого.

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. 9). Так, у пациентов с ЛХ была выявлена более высокая частота Т клеток (CD3+CD56-) и НКТ (CD3+CD56+) клеток в периферической крови и костном мозге по сравнению с пациентами с НХЛ (Рис 9А). Повышенная частота В клеток (CD19+CD3-) и сниженная частота НК клеток (CD56+CD3-) наблюдались в костном мозге по сравнению с периферической кровью при лимфомах ЛХ и НХЛ (Рис. 9).

А



В

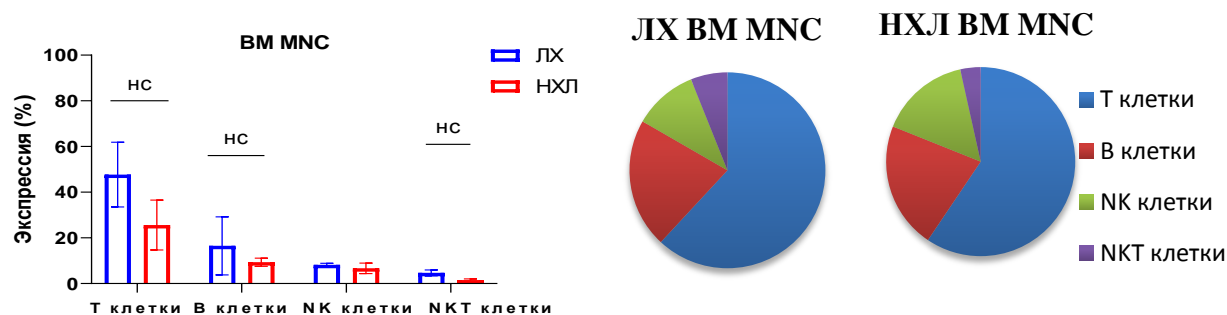


Рисунок 9. Процент лимфоцитов в образцах периферической крови и костного мозга пациентов с ЛХ и НХЛ. Процент Т клеток (CD3+ CD56-), В клеток (CD3-CD19+), НК клеток (CD3-, CD56+) и НКТ клеток (CD3+CD56+) в периферической крови (А) пациентов с ЛХ, НХЛ и здоровых доноров и образцах костного мозга (В), пациентов с ЛХ и НХЛ. Графики

показывают среднее \pm SEM. нс, недостоверные различия, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. РВМС, мононуклеарные клетки периферической крови; ВМ МНС, мононуклеарные клетки костного мозга.

Анализ внутриклеточных и внеклеточных HSP90 β , TRAP1 и STIP1 в лимфоцитах периферической крови и костного мозга первичных пациентов с ЛХ и НХЛ

Содержание внутриклеточных HSP90 β (iHSP90 β), iTRAP1 и iSTIP1 варьировало в лимфоцитах периферической крови больных НХЛ и ЛХ. В-клетки показали значительно более высокий уровень iHSP90 β по сравнению с другими лимфоцитами периферической крови (Т, NK и NKT клетками) у пациентов с лимфомой (Рис. 10А). iHSP90 β и iSTIP1 были значительно повышены в периферических В клетках пациентов с ЛХ по сравнению со здоровыми донорами (Рис. 10А, 10С). В лимфоциты костного мозга показали значительно более низкие iHSP90 β и iSTIP1 по сравнению с периферическими В клетками пациентов с ЛХ (Рис. 10D, 10F). Напротив, iHSP90 β был сопоставим в В клетках костного мозга и периферической крови пациентов с НХЛ (Рис. 10G). В клетки периферической крови показали повышенный iSTIP1 у пациентов с НХЛ (Рис. 10I). iTRAP1 был значительно снижен в лимфоцитах периферической крови у пациентов с лимфомами по сравнению со здоровыми донорами (Рис. 10B). Пациенты с ЛХ показали более высокий iTRAP1 в NK клетках костного мозга по сравнению с NK клетками периферической крови (Рис. 10E). STIP1 был значительно повышен на поверхности В клеток (sSTIP1) периферической крови пациентов с ЛХ по сравнению со здоровыми донорами и пациентами с НХЛ (Рис. 10J). sHSP90 β был значительно повышен на В клетках костного мозга в сравнении с В клетками периферической крови пациентов с ЛХ, в то время как уровень sSTIP1 был значительно повышен на В клетках периферической крови по сравнению с В клетками костного мозга у пациентов с ЛХ (Рис. 10K). Напротив, sHSP90 β и sSTIP1 были снижены на В клетках костного мозга, по сравнению с В клетками периферической крови у пациентов с НХЛ, однако разница была статистически незначимой ($p > 0,05$) (Рис. 10L). Эти данные свидетельствуют о том, что поверхностное и внутриклеточное содержание HSP90 β различается между В клетками периферической крови и костного мозга и, что лимфомы ЛХ и НХЛ различаются по внутриклеточным и внеклеточным HSP90 β и STIP1 в В лимфоцитах.

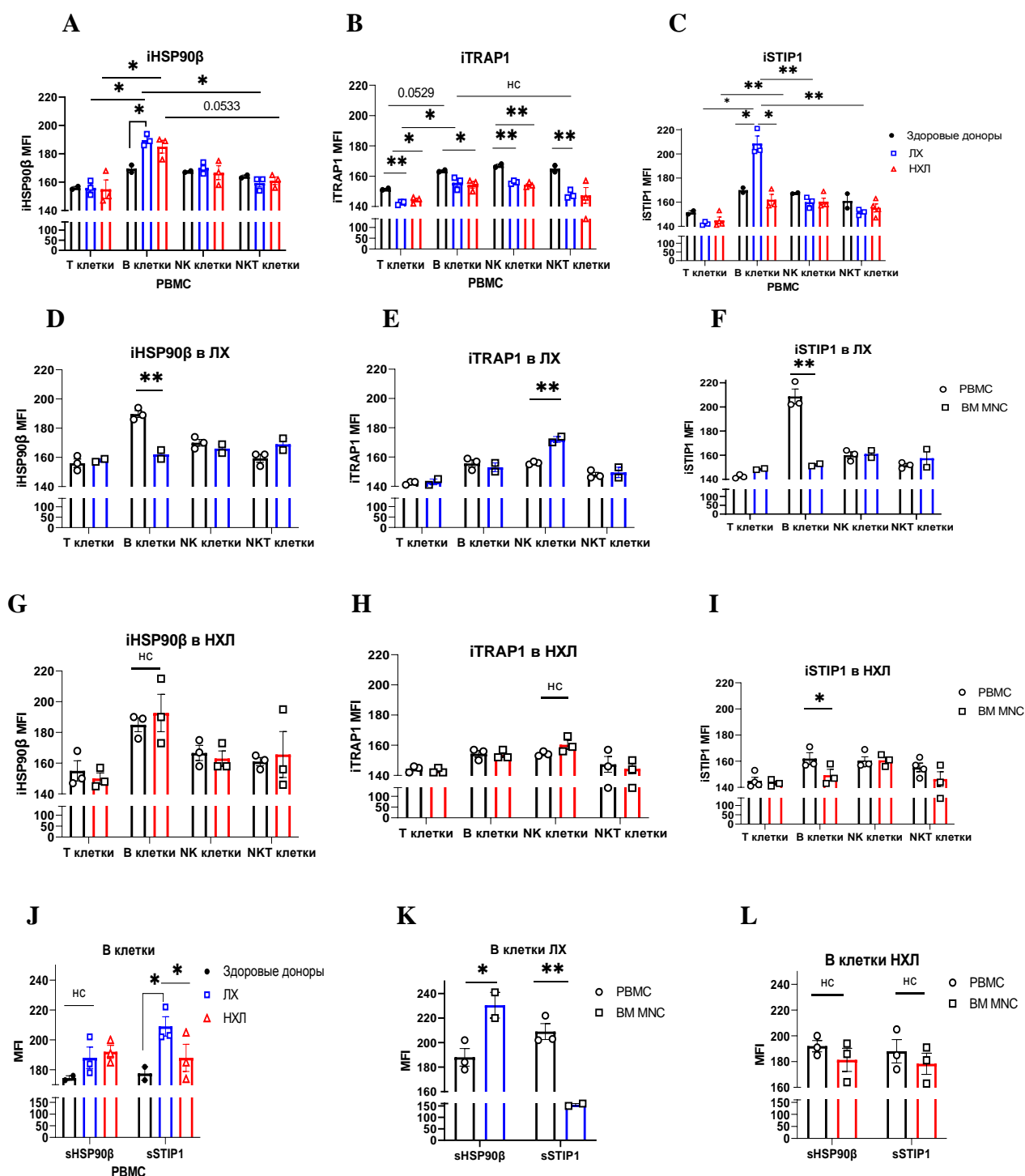


Рисунок 10. Внутриклеточные и внеклеточные HSP90β, TRAP1 и STIP1 в лимфоцитах периферической крови и костного мозга пациентов с лимфомой. Средний уровень внутриклеточных HSP90β (iHSP90β) (A), iTRAP1 (B) и iSTIP1 (C) (как средняя интенсивность флуоресценции; (MFI) в лимфоцитах периферической крови пациентов с ЛХ (n=3), НХЛ (n=3) и здоровых доноров (n = 2). iHSP90β (D), iTRAP1 (E) и iSTIP1 (F) в лимфоцитах костного мозга пациентов с ЛХ (n=2) и iHSP90β (G), iTRAP1 (H) и iSTIP1 (I) в НХЛ (n=3) пациентов. (J-L) HSP90β и STIP1 на поверхности В клеток периферической крови и костного мозга пациентов с лимфомой. (J) sHSP90β и sSTIP1 на В клетках периферической крови пациентов с ЛХ (n = 3), пациентов с НХЛ (n = 3) и здоровых доноров (n = 2). (К) sHSP90β и sSTIP1 на В клетках периферической крови и костного мозга пациентов с ЛХ (n = 2). (L) sHSP90β и sSTIP1 на В клетках периферической крови и костного мозга пациентов с

НХЛ (n = 3). Графики показывают среднее \pm SEM. нс, недостоверное различие, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. iHSP, внутриклеточный HSP; sHSP, поверхностный HSP.

Анализ В-клеточной клональности периферической крови и костного мозга первичных пациентов с ЛХ и НХЛ

Анализ В-клеточной клональности (анализ перестройки генов IgH) показал, что в периферической крови и костном мозге пациентов с ЛХ и НХЛ не было обнаружено злокачественных клонов В клеток (Рис. 11А-Д), что позволяет предположить, что высокое содержание HSP90 в В клетках не связано с их злокачественным фенотипом.

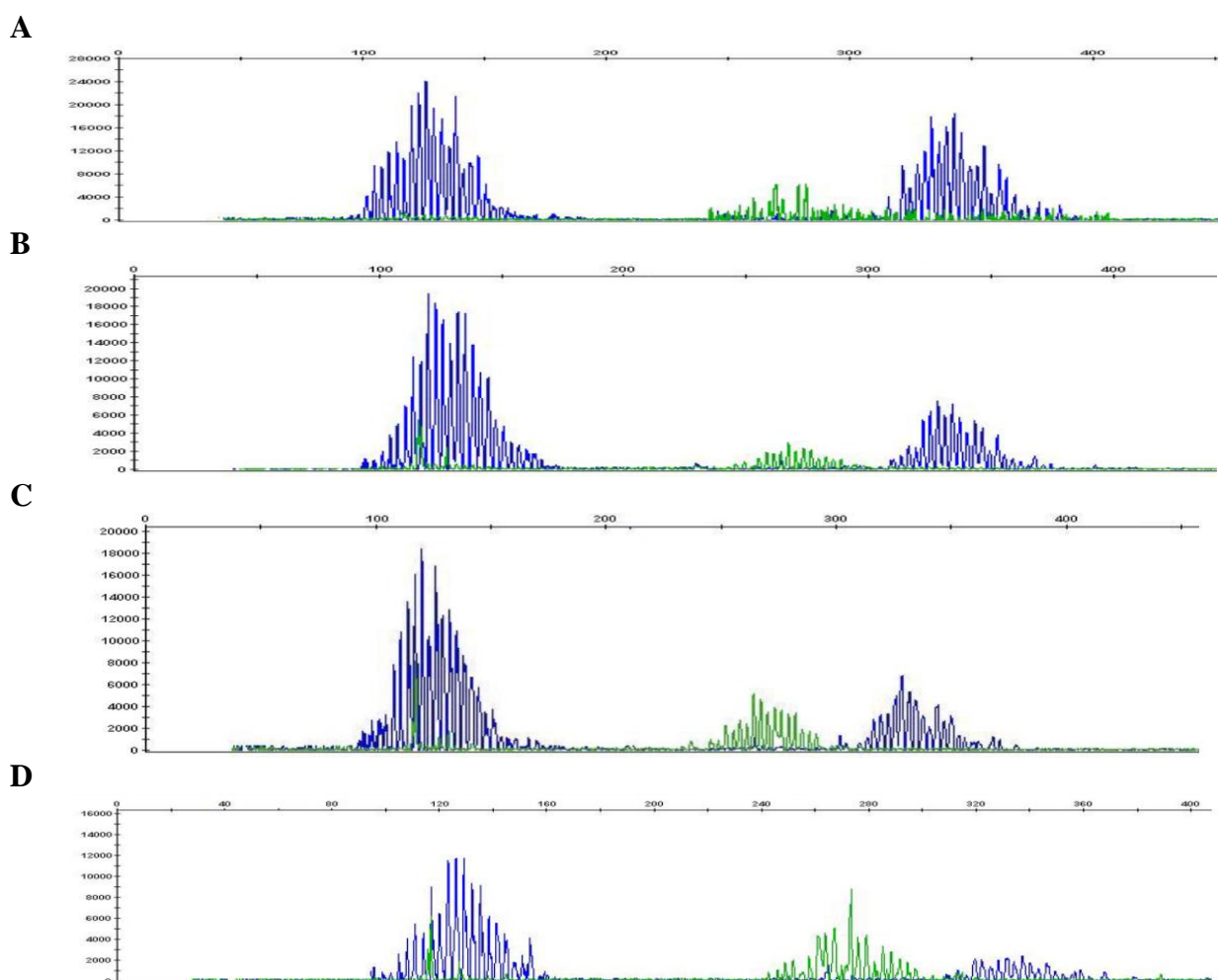


Рисунок 11. Анализ клональности В клеток (реаранжировки генов IgH) в периферической крови и костном мозге пациентов с ЛХ и НХЛ. Репрезентативные графики, показывающие гауссово распределение множественных пиков в (А) периферической крови и (В) костном мозге у пациента с НХЛ и (С) периферической крови и (D) костном мозге у пациента с ЛХ.

Анализ внутриклеточных и внеклеточных HSP, PD-1 и CTLA-4 в активированных Т клетках первичных пациентов с индолентными и агрессивными 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. 12А). Эти данные подтверждаются предыдущими исследованиями, которые показали, что стимуляция фитогемагглютинином (РНА) и IL-2 повышает уровень HSP90 и HSP70 в Т клетках [279]. 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. 12С, 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. 12D). 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 aberrантная 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.

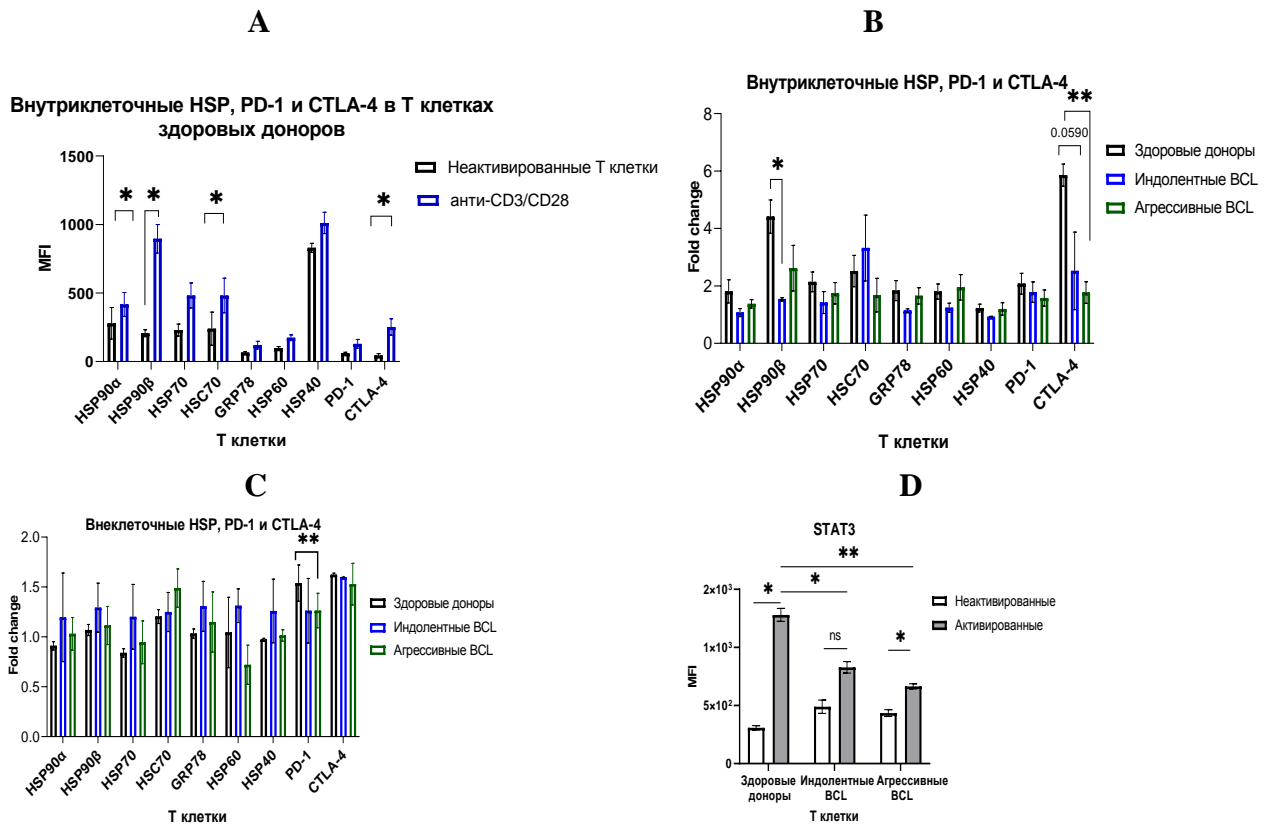


Рисунок 12. HSP, PD-1, CTLA-4 и STAT3 в активированных Т клетках. (А). Внутриклеточные HSP, PD-1 и CTLA-4 в активированных Т клетках у здоровых доноров. Рап Т клетки выделяли из здоровых PBMC (n=4) и стимулировали анти-CD3/CD28 или не стимулировали (в состоянии покоя) в течение 48 часов. (В). Внутриклеточные 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. (С). Внеклеточные HSP, PD-1 и CTLA-4 у пациентов с индолентной и агрессивной лимфомой. (D). STAT3 в неактивированных и активированных Т клетках у здоровых доноров и пациентов с лимфомой. Данные показывают среднее значение \pm SEM. нс, недостоверно, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$

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. 13). Эти результаты согласуются с предыдущими данными, показывающими, что ингибитор HSP90 снижает поверхностную экспрессию CD4 и CD8 на Т клетках [35]. 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. 14А, 14В). 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. 14А, 14В). 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. 14С, 14D). 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 блокаде HSP90 и PD-1 (Рис. 14С). Здоровые доноры показали снижение CD107a на поверхности CD8+ Т клеток при комбинированной блокаде HSP90 и PD-1 (Рис. 14С). Различные стимуляции по-разному влияли на дегрануляцию CD8+ Т клеток во время комбинированной блокаде HSP90 и иммунных контрольных точек (Рис. 14С, 14D). 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.

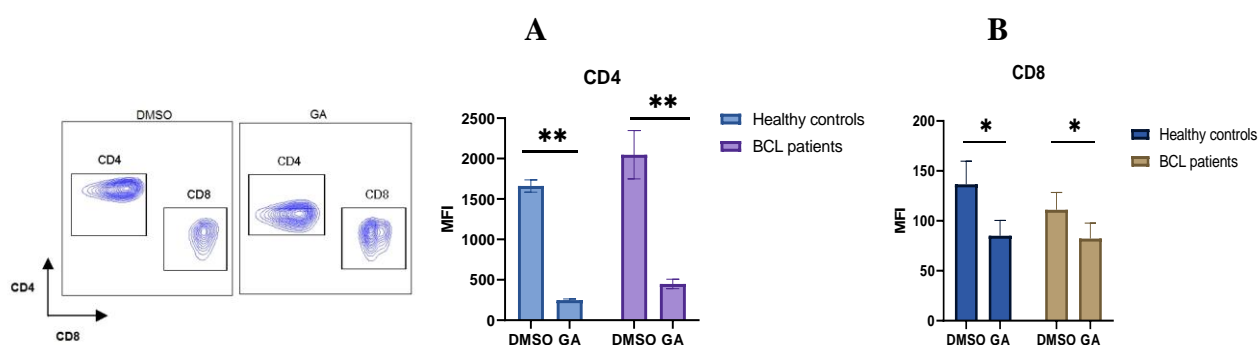


Рисунок 13. Блокировка HSP90 снижает CD4 (А) и CD8 (Б) на поверхности Т клеток. Т клетки инкубировали в течение 4 дней с аллогенными мо-ДК в присутствии 0.1 μM гелданамицина (GA). Репрезентативные графики проточной цитометрии слева, показывающие снижение CD4 и CD8 на поверхности Т клеток в ответ на GA в MLR. Данные представляют собой среднее значение \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

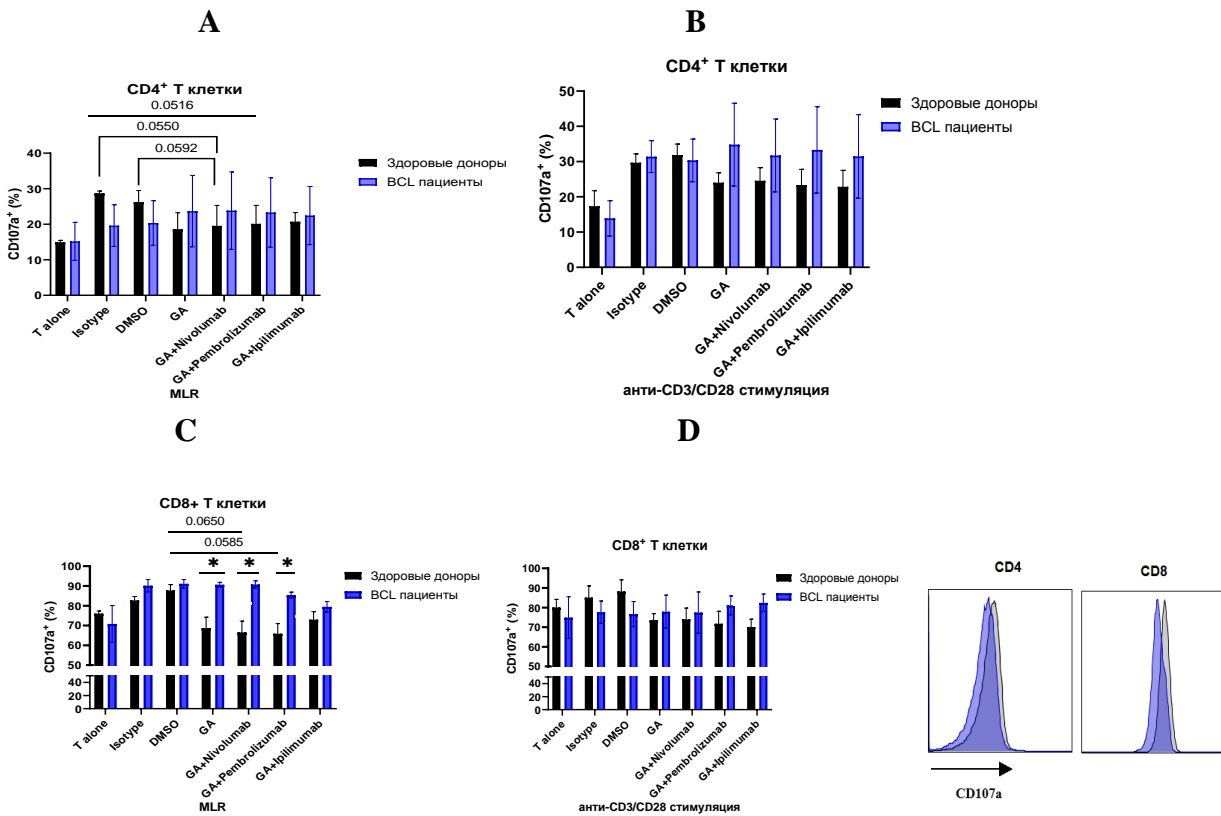


Рисунок 14. Ингибирование HSP90 влияет на реакцию дегрануляции CD4⁺ и CD8⁺ Т клеток. Реакция дегрануляции, измеренная по поверхностному CD107a на CD4⁺ Т клетках (A, B) и CD8⁺ Т клетках (C, D) у здоровых доноров и пациентов с BCL. Выделенные Т клетки стимулировали аллогенными мо-ДК (A, C) или анти-CD3/CD28 (B, D) 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, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Влияние блокировки HSP90 на внутриклеточные PD-1 и CTLA-4

Мы проанализировали влияние ингибирования HSP90 на внутриклеточные PD-1 и CTLA-4. Ингибирование HSP90 приводило к небольшому снижению PD-1 и небольшому увеличению CTLA-4 ($p > 0,05$) (Рис. 15).

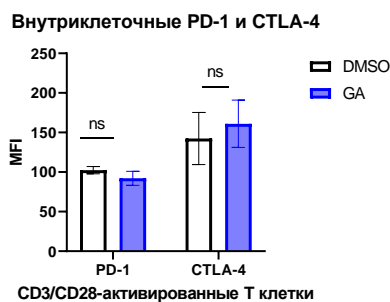
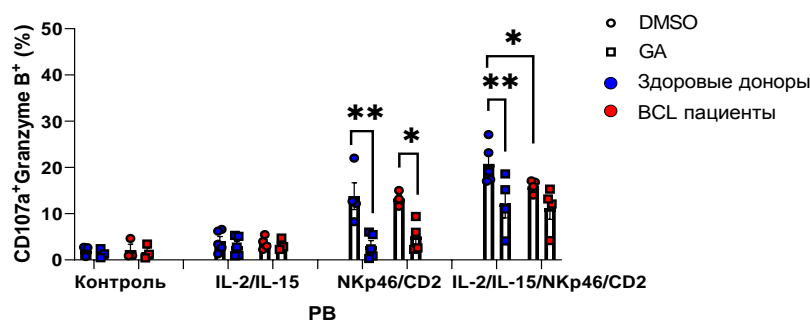


Рисунок 15. Ингибирование HSP90 и внутриклеточные PD-1, CTLA-4 и STAT-3. Т клетки стимулировали в течение 48 часов анти-CD3/CD28 и hIL-2. Через 48 часов инкубации добавляли 0,1 μ M GA или DMSO и клетки инкубировали еще 24 часа. График показывает среднее \pm SEM, ns, недостоверное различие. GA, гелданамицин.

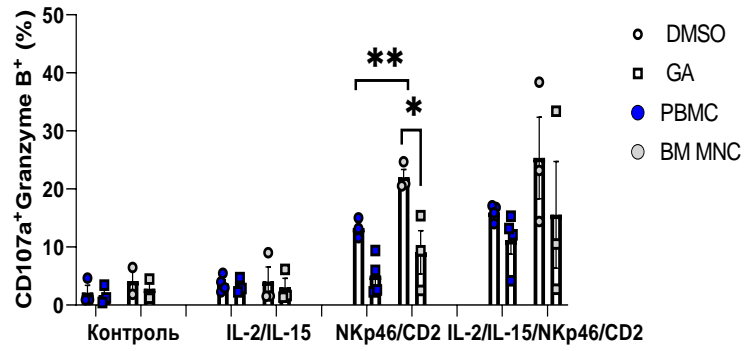
Влияние блокировки HSP90 на NK-клеточную дегрануляцию и продукцию IFN γ у пациентов с В-клеточными лимфомами

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 (BCL) (Рис. 16А). Напротив, стимуляция IL-2/IL-15/анти-NKp46/анти-CD2 приводила к увеличению CD107a+IFN γ + NK клеток у пациентов с BCL по сравнению со здоровыми донорами (Рис. 16D). Ингибирование HSP90 снижало частоту CD107a+/Granzyme B+ NK клеток здоровых доноров, а также NK клеток костного мозга и периферической крови пациентов с BCL (Рис. 16А, 16В). Ингибирование HSP90 снижало CD107a на поверхности NK клеток костного мозга и периферической крови, что приводило к тому, что CD107a+ Granzyme B+ NK клетки, теряли CD107a и становились Granzyme B+ NK клетками при стимуляции (Рис. 16С). Ингибирование HSP90 также снижало процент CD107a+IFN γ + NK клеток в ответ на стимуляцию IL-2/IL-15 и анти-NKp46/анти-CD2 (Рис. 16D). Эти данные свидетельствуют о том, что подавление HSP90 может нарушать дегрануляцию NK клеток и продукцию IFN γ у пациентов с В - клеточными лимфомами.

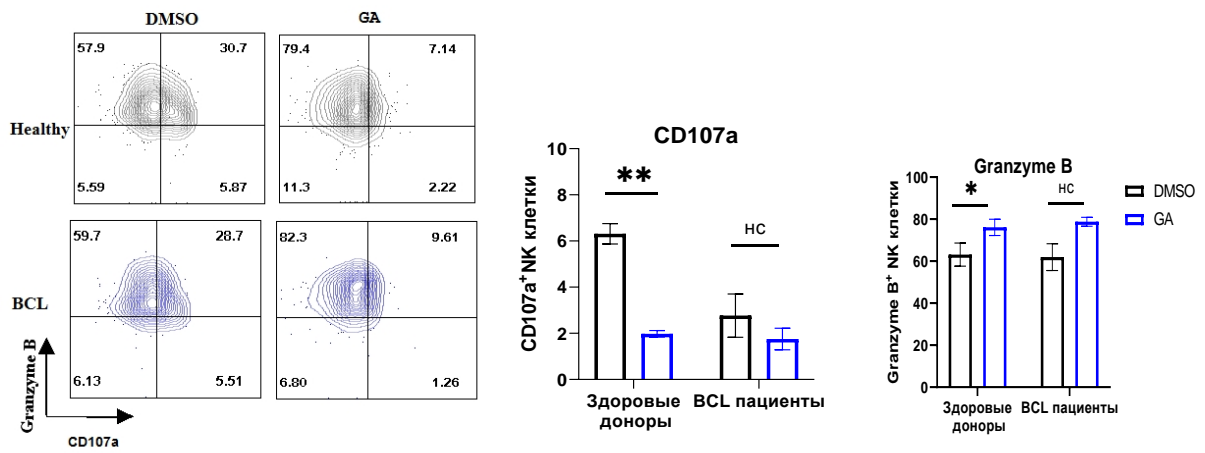
А



B



C



D

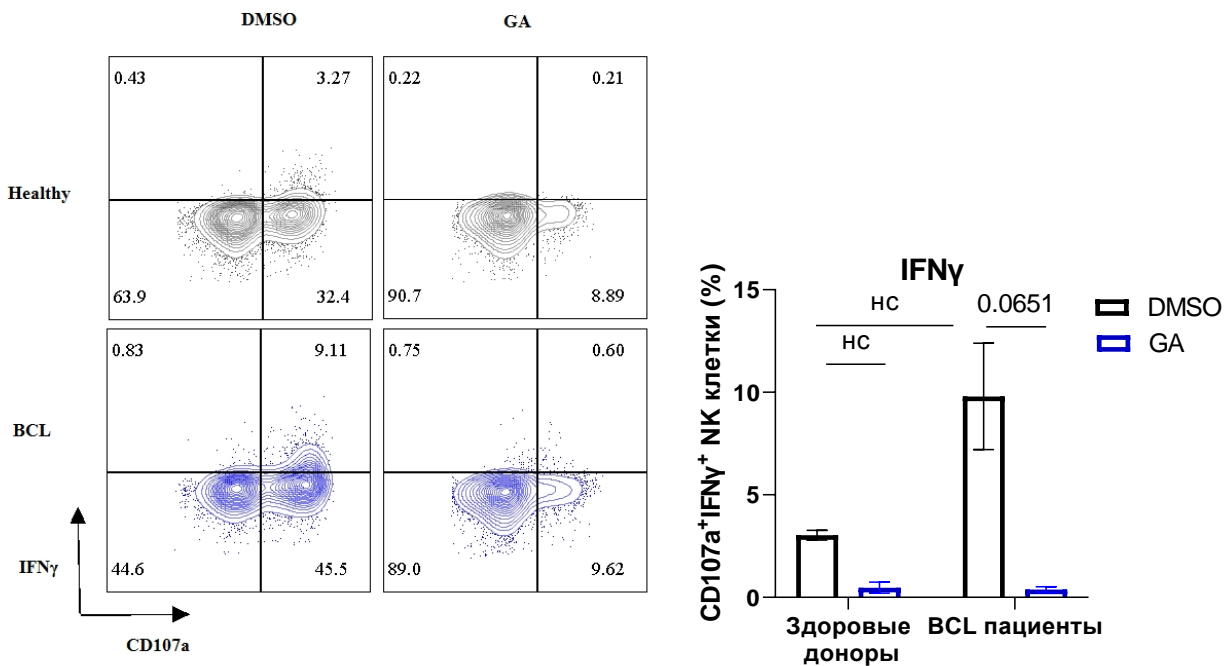


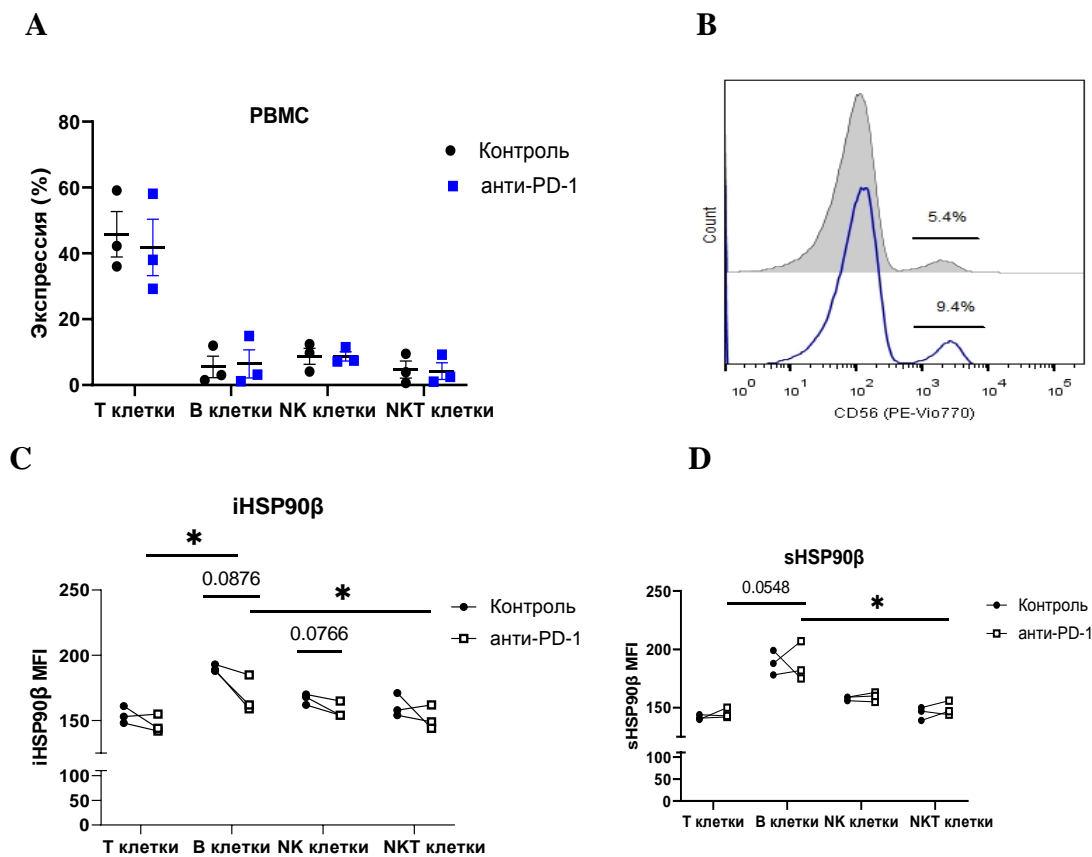
Рисунок 16. Влияние блокировки HSP90 на дегрануляцию NK клеток, продукцию Granzyme B и IFN γ у пациентов с В - клеточными лимфомами. Дегрануляция NK клеток, измеренная по поверхностному CD107a, и продукции Granzyme B/IFN γ в PB (n = 4) пациентов с лимфомой и здоровых доноров (n = 5) и BM (n = 3) пациентов с лимфомой. PBMC (A) и BM MNC (B) предварительно обрабатывали гелданамицином (0,1 μ M) или DMSO в присутствии IL-2 (100 ME/мл) и IL-15 (10 нг/мл) и стимулировали анти-NKp46. /анти-CD2. (C) Репрезентативные графики проточной цитометрии CD107a+/Granzyme B+ NK клеток слева, процент CD107a + NK клеток и Granzyme B+ NK клеток в ответ на IL-2/IL-15 и анти-NKp46/анти-CD2 стимуляцию (D) 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.

Влияние анти-PD-1 иммунотерапии на внутриклеточные и внеклеточные HSP90 в лимфоцитах пациентов с рефрактерной и рецидивной 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. В рамках нашей работы, мы исследовали влияние анти-PD-1-терапии на HSP90 β , TRAP1 и STIP1 в T, B, 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 терапии (Рис 17А). Средний процент T клеток уменьшался через 24 часа лечения анти-PD-1 (Рис 17А). У одного пациента был повышен процент NK клеток в периферической крови (Рис. 17А). Увеличение количества NK клеток после анти-PD-1-терапии также было показано ранее у онкологических больных [280].

Было установлено, что внутриклеточный HSP90 β (iHSP90 β) снижался в T, B, NK и NKT клетках после введения Ниволумаба. У двух пациентов наблюдался повышенный HSP90 β на поверхности (sHSP90 β) B клеток периферической крови (Рис. 17С, D). Блокада PD-1 не влияла на iTRAP1, но увеличивала sTRAP1 (Рис. 17Е, F). Блокада PD-1 не влияла на iSTIP1 в лимфоцитах, хотя у 1 пациента было выявлено повышение iSTIP1 в NK клетках (Рис. 17G, H). sSTIP1 был снижен на поверхности лимфоцитов после анти-PD-1 терапии (Рис. 17G, H). Поскольку блокада PD-1 влияла на содержание HSP90 в лимфоцитах периферической крови, мы проанализировали, происходят ли аналогичные изменения в лимфоцитах костного мозга. Для этого, мы исследовали внутриклеточные и внеклеточные HSP90 β , TRAP1 и STIP1 в лимфоцитах костного мозга пациента 1 до и после анти-PD-1 терапии и сравнили их с уровнем HSP90 в периферической крови этого же пациента (Рис. 18). Блокада PD-1

повышала внутриклеточный и понижала поверхностный HSP90 β в В клетках костного мозга (Рис. 18А, 18В). Напротив, блокада анти-PD-1 понижала внутриклеточный и повышала поверхностный уровень STIP1 в В клетках костного мозга (Рис. 18Е, 18F). Блокада PD-1 также понижала внутриклеточные и поверхностные HSP90 β и STIP1 в NKT клетках костного мозга (Рис. 18А-В, Е-F). sHSP90 β снижался на В клетках периферической крови и костного мозга после анти-PD-1 терапии (Рис. 18В). Анти-PD-1 терапия приводила к снижению iTRAP1 в NK клетках костного мозга (Рис. 18С). Также интересно отметить, что В клетки периферической крови и костного мозга различались по содержанию iHSP90 β после введения Ниволумаба (Рис 18А). Эти данные свидетельствуют о том, что анти-PD-1 терапия влияет на количество лимфоцитов и их внутриклеточный и внеклеточный пул HSP90 у пациентов с р/р кЛХ, однако необходимы дальнейшие исследования для оценки влияния анти-PD-1 терапии на локализацию и содержание HSP90 в лимфоцитах костного мозга и периферической крови пациентов с лимфомами.



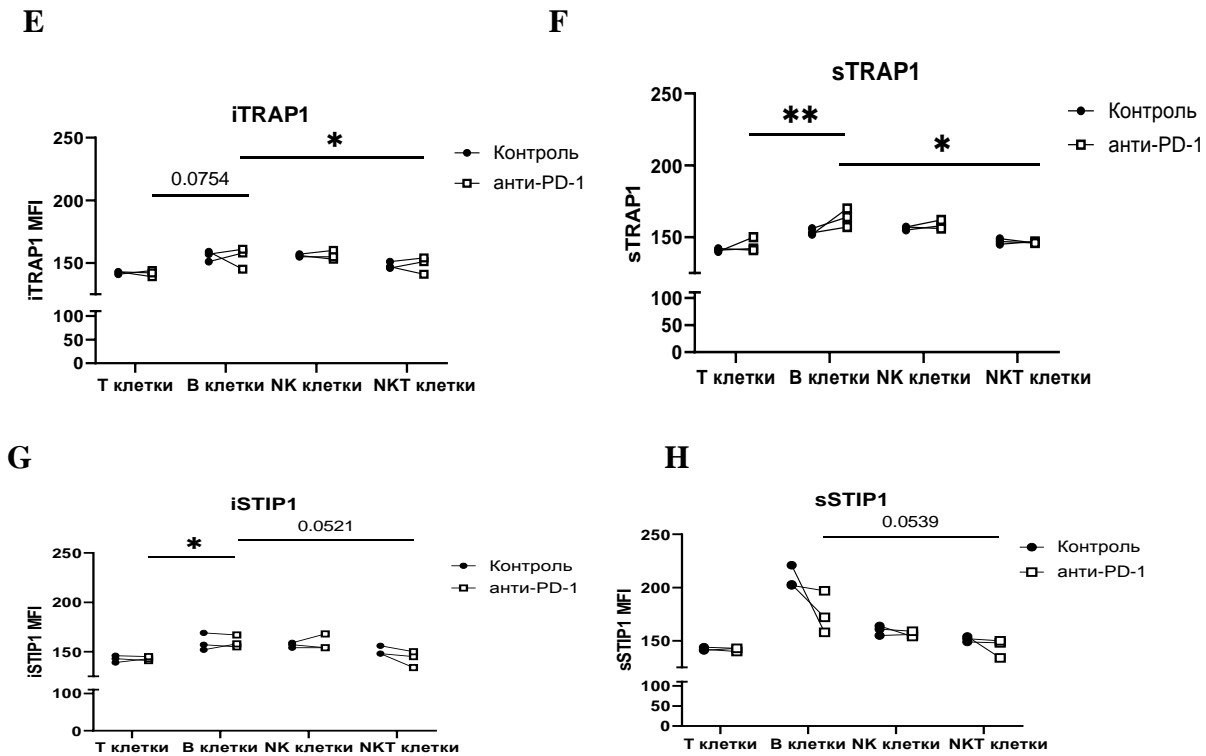
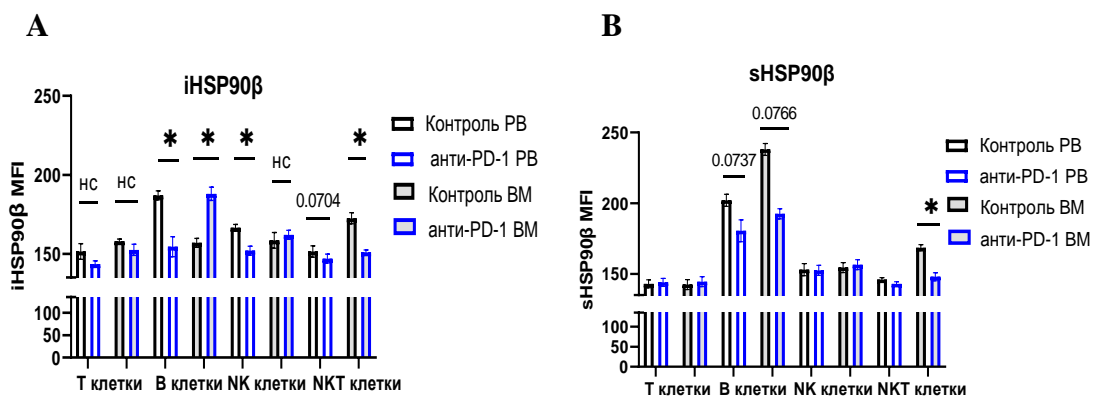


Рисунок 17. Влияние анти-PD-1 терапии на HSP90 в лимфоцитах периферической крови у пациентов с р/р кЛХ. (А) Процент Т, В, NK и NKT клеток после 24-часового введения Ниволумаба у пациентов с р/р кЛХ (n = 3). (В) Репрезентативная гистограмма, показывающая увеличение частоты NK клеток после 24-часового лечения Ниволумабом. iHSP90 β (С) и sHSP90 β (D), iTRAP1 (E) и sTRAP1 (F), iSTIP1 (G) и sSTIP1 (H) 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, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.



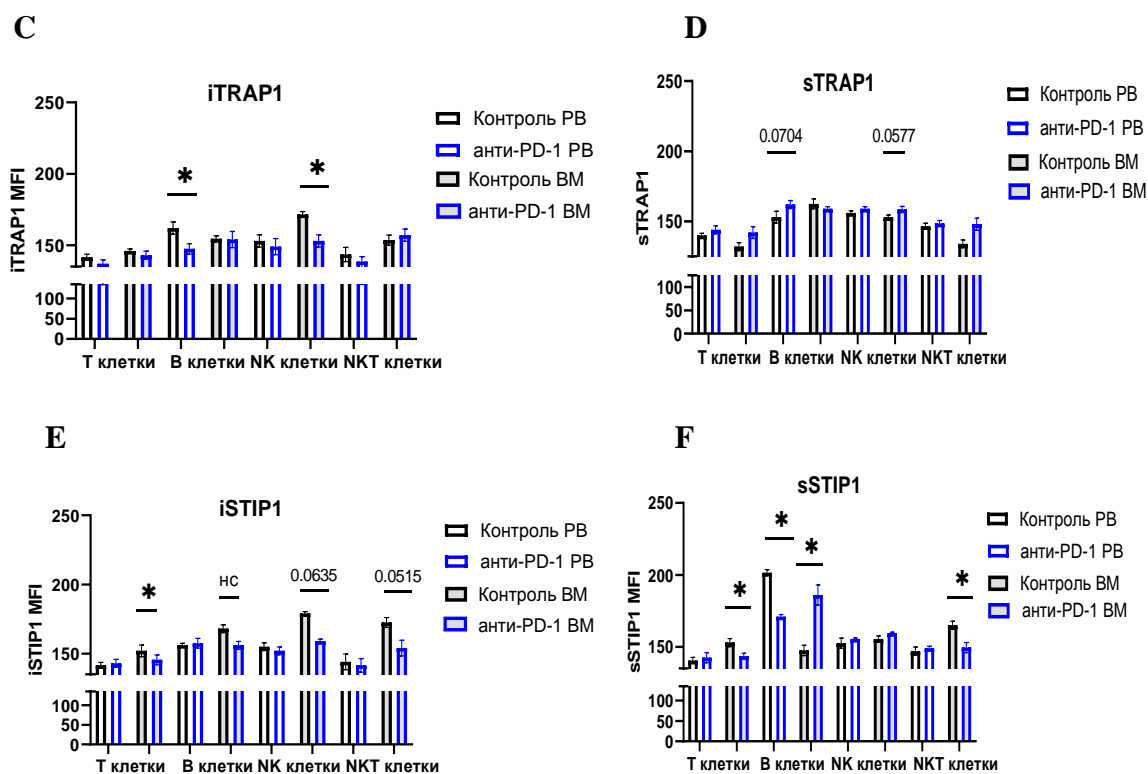


Рисунок 18. Влияние анти-PD-1 на HSP90 в лимфоцитах периферической крови и костного мозга пациента с р/р КЛХ. Внутриклеточные (А,С,Е) и поверхностные (В,Д,Ф) HSP90 β (А,В), TRAP1 (С,Д) и STIP1 (Е,Ф) в лимфоцитах периферической крови и костного мозга пациента с р/р ЛХ (n=1). Графики показывают среднее значение \pm SEM. нс, недостоверное различие, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. iHSP, внутриклеточный HSP; sHSP, поверхностный HSP. PB, периферическая кровь; BM, костный мозг.

Глава 4. Обсуждение

Белки теплового шока HSP – это молекулярные шапероны, играющие важную роль в развитии рака [281]. В нескольких исследованиях сообщалось об изменении экспрессии HSP в злокачественных клетках [262,42]. Кроме того, сверхэкспрессия HSP была связана с агрессивностью опухоли, метастазированием и неблагоприятным прогнозом [282-284]. В настоящей работе мы показали, что разные изоформы HSP по-разному представлены в различных типах рака, предполагая, что определенный тип рака имеет определенные сигнатуры HSP. Также, нами была разработана модель прогнозирования рака, которая отражает, как работают сети шаперонов HSP. Так как HSP расположены в разных клеточных компартментах, бывают конститутивными/стресс-индуцируемыми и взаимодействуют с ко-шаперонами во время своих функциональных циклов, мы ввели в модель различные

комбинации простых соотношений и стратегии умножения. Например, мы использовали соотношение между уровнем цитозольного гомолога HSP90 и уровнем митохондриального гомолога HSP90 в простом соотношении HSP90AA1/TRAP1 (или HSP90AB1/TRAP1), конститутивной изоформы HSP90 к стресс-индуцируемому HSP90 в простом соотношении HSP90AB1/HSP90AA1, ко-шаперона к HSP90AA1 в простом соотношении FKBP4/HSP90AA1 и т. д. Используя машинное обучение, мы смогли зафиксировать сдвиг в определенных соотношениях HSP у больных раком по сравнению со здоровыми донорами и пациентами с доброкачественными заболеваниями. Используя этот подход, мы смогли предсказать рак с точностью ~90%. Кроме того, наша модель прогнозирования рака могла различать различные типы рака на основе содержания HSP гомологов в образцах мочи, что может помочь в диагностике определенных подтипов рака среди гетерогенной группы опухолей, таких как лимфома или рак молочной железы. В связи с этим, Klimczak *et al.* показали, что экспрессия шести HSP, включая *HSPA2*, *DNAJC20*, *HSP90AA1*, *CCT1*, *CCT2* и *CCT6A*, может использоваться для прогнозирования клинического исхода пациентов с раком молочной железы [285]. Тем не менее, идентификация специфичных сигнатур HSP в гетерогенной группе опухолей требует дальнейшего изучения и валидации на большой независимой выборке.

В рамках нашей работы, мы оценили содержание конститутивного и митохондриального HSP90 и ко-шаперона HSP90 STIP1/HOP в двух основных типах лимфомы - лимфоме Ходжкина и неходжкинской лимфоме. Мы установили, что лимфомы различаются по содержанию внутриклеточных и поверхностных HSP90 β и STIP1 в лимфоцитах периферической крови и костного мозга. Интересно, что В клетки периферической крови были основным типом лимфоцитов с aberrантным содержанием HSP90 внутри и на их поверхности у пациентов с лимфомой. HSP90 β и STIP1 также были повышены на поверхности В клеток костного мозга у пациентов с лимфомой. Поскольку повышенный уровень HSP90 может быть связан с циркулирующими клонами злокачественных В клеток, мы провели анализ В-клеточной клональности. В крови и костном мозге пациентов с ЛХ и НХЛ не было обнаружено злокачественных клонов В клеток, что позволяет предположить, что высокая экспрессия HSP90 в В клетках может быть не связана с их злокачественным фенотипом. В нескольких исследованиях сообщалось, что внеклеточные HSP связаны с регуляторным фенотипом В клеток [107,106]. Wang *et al.* установили, что регуляторные В клетки имеют повышенную экспрессию HSP70 [286]. Tang *et al.* показали, что внеклеточный ViP/GRP78 индуцирует регуляторный фенотип В клеток [107]. Внеклеточные HSP60 стимулируют продукцию IL-10 и IL-6 В клетками, в то время как

HSP60-стимулированные В клетки индуцируют пролиферацию Т клеток и продукцию IFN γ и IL-10 Т клетками [106]. Эти данные свидетельствуют о том, что aberrантная экспрессия HSP90 в В клетках может влиять на В-клеточный ответ в костном мозге и периферической крови больных лимфомой.

В рамках настоящей работы, мы также оценили содержание различных семейств HSP (HSP90, HSP70, HSP40, HSP60), иммунных контрольных точек (PD-1, CTLA-4) и STAT3 в неактивированных и CD3/CD28-стимулированных Т клетках у здоровых доноров и пациентов с В-клеточными лимфомами. Мы показали, что содержание гомологов HSP изменяется в ответ на стимуляцию CD3/CD28 и IL-2. Эти данные подтверждаются предыдущими исследованиями, которые показали, что стимуляция фитогемагглютинином (PHA) и IL-2 повышает экспрессию HSP90 и HSP70 в Т клетках [279]. Кроме того, мы показали, что у пациентов с BCL нарушено содержание внутриклеточных и внеклеточных HSP в CD3/CD28-стимулированных Т клетках. Принимая во внимание, что HSP и иммунные контрольные точки связаны с активацией Т клеток, а текущие и новые методы лечения пациентов с лимфомой включают ингибиторы иммунных контрольных точек, мы также оценили эффект комбинированной блокировки HSP90 и иммунных контрольных точек (PD-1 и CTLA-4). Во-первых, мы установили, что ингибирование HSP90 подавляет CD4 и CD8 на поверхности Т клеток у здоровых доноров и пациентов с BCL. Эти результаты согласуются с предыдущими данными, показывающими, что ингибитор HSP90 снижает поверхностную экспрессию CD4 и CD8 на Т клетках [35]. Также, мы показали, что ингибирование HSP90 снижает CD107a у здоровых доноров, предполагая, что нормальные Т клетки должны снижать CD107a на поверхности в ответ на блокировку HSP90. Однако, ингибирование HSP90 не подавляло CD107a на Т клетках пациентов с BCL, а скорее повышало CD107a на поверхности, что позволяет предположить, что ответ HSP на активацию Т клеток у пациентов с BCL нарушен. Более того, блокировка иммунных контрольных точек не отменяла этот эффект в CD4+ и CD8+ Т клетках у пациентов с BCL. Также интересно отметить, что стимуляции аллогенными мо-ДК и CD3/CD28 показали немного отличающийся уровень CD107a в ответ на HSP90 и ингибирование иммунных контрольных точек в CD8+ Т клетках, что позволяет предположить, что роль комбинаторной блокировки следует оценивать с использованием различных стимуляций Т клеток. В связи с этим, Trojandt *et al.* установили, что ингибитор HSP90 может влиять на мо-ДК, предполагая, что, хотя реакция MLR эффективна при изучении влияния блокады иммунных контрольных точек на Т клетки, однако иммуномодулирующие функции HSP также следует принимать во внимание при изучении комбинированной терапии [287].

Мы также проанализировали влияние ингибирования HSP90 на внутриклеточную экспрессию PD-1 и CTLA-4 в CD3/CD28-стимулированных Т-клетках. Ингибитор HSP90 не влиял на уровень иммунных контрольных точек в активированных Т-клетках. Эти данные свидетельствуют о том, что HSP90, PD-1 и CTLA-4 могут функционировать через разные механизмы во время активации Т-клеток, однако это требует дополнительных исследований.

Мы также оценили влияние блокировки HSP90 на реакцию дегрануляции, продукцию гранзима В и IFN γ в НК клетках пациентов с агрессивными типами лимфом. Мы обнаружили, что ингибирование HSP90 снижает CD107a и продукцию IFN γ в НК клетках при стимуляции. Эти результаты согласуются с предыдущими данными, показывающими, что ингибиторы HSP90 подавляют секрецию IFN γ НК клетками [288]. Важно отметить, что гелданамицин блокирует активность АТФазы HSP90 и, таким образом, ингибирует все четыре изоформы HSP90, включая HSP90 α , HSP90 β , TRAP1 и GRP94 в НК клетках. Поэтому крайне важно идентифицировать специфический гомолог HSP90, ответственный за регуляцию CD107a и продукции IFN γ в НК клетках. Недавние исследования показали, что клеточный метаболизм играет критическую роль в функциональной активности НК клеток [289]. Wang *et al.* установили, что ингибирование гликолиза подавляет продукцию IFN γ НК клетками и экспрессию CD107a [290]. Ингибирование гликолиза снижало продукцию гранзима В, в то время как ингибирование окислительного фосфорилирования (OXPHOS) не влияло на продукцию гранзима В НК клетками [290]. В нашем исследовании мы показали, что гелданамицин ингибирует CD107a и продукцию IFN γ , в то время как продукция гранзима В не изменяется, предполагая, что ингибитор HSP90 может влиять как на гликолиз, так и на OXPHOS. Известно, что митохондриальный гомолог HSP90 TRAP1 является критическим регулятором OXPHOS и гликолиза, предполагая, что TRAP1 может быть потенциальной изоформой, ответственной за снижение CD107a и продукции IFN γ в НК клетках, однако это требует дальнейшего изучения [291,292].

Zavareh *et al.* показали, что ингибиторы HSP90 подавляют PD-L1 в мышечных моделях, посредством регуляции клиентов HSP90 (с-Мус и STAT3) [36]. Ингибирование HSP90 также улучшало противоопухолевую активность анти- PD-1 и анти-CTLA-4 *in vivo* [186,188]. В настоящей работе мы установили, что анти-PD-1 терапия может влиять на локализацию и содержание HSP90 β , TRAP1 и STIP1 в лимфоцитах периферической крови у пациентов с рефрактерной ЛХ. Блокада PD-1 также влияла на локализацию и содержание HSP90 в лимфоцитах костного мозга. Примечательно, что блокада PD-1 приводила к повышению HSP90 на поверхности лимфоцитов. Предыдущие исследования показали, что HSP могут появляться на поверхности иммунных клеток после ER стресса [82,23]. Эти исследования

предполагают, что существует связь между иммунными контрольными точками и HSP90 и, что лимфоциты могут повышать внеклеточный HSP90 в ответ на анти-PD-1 иммунотерапию. Однако, необходимы дальнейшие исследования, чтобы понять влияние иммунотерапии на локализацию и экспрессию HSP90 в лимфоцитах периферической крови и костного мозга пациентов с рецидивной и рефрактерной ЛХ.

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.

Благодарности

Благодарю моих родителей и моих двух старших братьев за поддержку и веру в меня, которые дали мне возможность реализовать данный проект. Я благодарна ТОО «Чокан» (Алматы, Республика Казахстан) за спонсорскую поддержку. Я благодарна гранту РФФИ «Аспиранты» за поддержку моей идеи.

Низкий поклон всем пациентам и донорам, которые участвовали в моем проекте, а также врачам и сотрудникам НМИЦ гематологии.

Благодарю врача-гематолога к.м.н. Яну Мангасарову (НМИЦ гематологии) за помощь с пациентами, реагентами и донорами и за интерес, участие и поддержку моего проекта.

Я благодарю к.м.н. Владимира Воробьева (Городская клиническая больница им. С.П. Боткина) за помощь с реагентами.

Я благодарю профессора д.б.н. академика Сергея Артуровича Недоспасова и его лабораторию, где я прошла стажировку и которая является первой лабораторией в моем PhD, где меня многому научили.

Я благодарна к.б.н. Дмитрию Рязанцеву из Лаборатории молекулярной диагностики ИБХ РАН, с которым я коллаборировала в ходе проекта, который меня научил методам молекулярной биологии и который помогал мне с реагентами и оборудованием.

Я благодарна профессору д.б.н. Нине Иосифовне Дризе (НМИЦ гематологии) за помощь с образцами.

Я благодарна д.б.н. Юрию Петровичу Рубцову из Лаборатории молекулярной вирусологии ИБХ РАН за помощь с реагентами и советы.

Я благодарна к.б.н. Роману Холоденко из Лаборатории молекулярной иммунологии ИБХ РАН за помощь с реагентами.

Я благодарна своим однокурсникам из Университета Вестминстера, Университетского колледжа Лондон и Сити Колледж Манчестера, которые всегда оказывали мне поддержку и помощь.

Выражаю благодарность всем редакторам и ревьюерам/рецензентам, которые своими рекомендациями улучшали мои статьи.

Я благодарна менеджерам компаний Биокоммерц, Пущинские лаборатории, Аламед, Диаэм и всем другим компаниям, с которыми я сотрудничала для покупки реагентов, за их качественную работу и скорость доставки реагентов, и большие скидки при покупке.

Я благодарна кафедре иммунологии за очень интересные именные лекции. Я благодарна всем преподавателям кафедры иммунологии. Отдельная благодарность профессору д.б.н.

член-корреспонденту Дмитрию Владимировичу Купрашу за его замечательные вопросы на экзаменах и аттестациях.

Я благодарна Дмитрию Борисовичу Киселевскому и Нине Владимировне Взоровой за работу с нами, аспирантами.

Я благодарна Наталии Валериановне Лавровой и Зарете Мочкиевне Бакаевой из Отдела аспирантуры за их бескорыстную помощь. Я также благодарна Марии Ратаниной из Научного отдела.

Я благодарна научному руководителю профессору д.б.н. Сапожникову Александру Михайловичу и Лаборатории Клеточных Взаимодействий ИБХ РАН, в которой я проводила экспериментальную часть работы. Я благодарна Александру Михайловичу за то, что он дал возможность реализовать мои идеи, доверял моему видению проекта. Благодарна Александру Михайловичу за его терпение, лояльность и всестороннюю поддержку. Выражаю глубокое уважение и искреннюю признательность моему научному руководителю Александру Михайловичу.

Список цитируемой литературы

1. Rosenzweig R, Nillegoda NB, Mayer MP, Bukau B (2019) The Hsp70 chaperone network. *Nat Rev Mol Cell Biol* 20 (11):665-680. doi:10.1038/s41580-019-0133-3
2. Schopf FH, Biebl MM, Buchner J (2017) The HSP90 chaperone machinery. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 18 (6):345-360. doi:10.1038/nrm.2017.20
3. Kampinga HH, Hageman J, Vos MJ, Kubota H, Tanguay RM, Bruford EA, Cheetham ME, Chen B, Hightower LE (2009) Guidelines for the nomenclature of the human heat shock proteins. *Cell Stress Chaperones* 14 (1):105-111. doi:10.1007/s12192-008-0068-7
4. Albakova Z, Mangasarova Y, Albakov A, Gorenkova L HSP70 and HSP90 in Cancer: Cytosolic, Endoplasmic Reticulum and Mitochondrial Chaperones of Tumorigenesis. *Frontiers in Oncology*:17
5. Albakova Z, Mangasarova Y (2021) The HSP Immune Network in Cancer. *Frontiers in Immunology* 12 (5162). doi:10.3389/fimmu.2021.796493
6. Albakova Z, Armeev GA, Kanevskiy LM, Kovalenko EI, Sapozhnikov AM (2020) HSP70 Multi-Functionality in Cancer. *Cells* 9 (3). doi:10.3390/cells9030587
7. Ciocca DR, Calderwood SK (2005) Heat shock proteins in cancer: diagnostic, prognostic, predictive, and treatment implications. *Cell Stress Chaperones* 10 (2):86-103. doi:10.1379/csc-99r.1
8. Seclì L, Fusella F, Avalle L, Brancaccio M (2021) The dark-side of the outside: how extracellular heat shock proteins promote cancer. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 78 (9):4069-4083. doi:10.1007/s00018-021-03764-3
9. 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* 13. doi:10.3389/fimmu.2022.893137
10. Albakova Z, Norinho DD, Mangasarova Y, Sapozhnikov A (2021) Heat Shock Proteins in Urine as Cancer Biomarkers. *Front Med (Lausanne)* 8 (1748). doi:10.3389/fmed.2021.743476
11. Albakova Z, Mangasarova Y, Sapozhnikov A (2021) Heat Shock Proteins in Lymphoma Immunotherapy. *Frontiers in Immunology* 12 (769). doi:10.3389/fimmu.2021.660085
12. Srivastava P (2002) Interaction of heat shock proteins with peptides and antigen presenting cells: chaperoning of the innate and adaptive immune responses. *Annu Rev Immunol* 20:395-425. doi:10.1146/annurev.immunol.20.100301.064801
13. Wang X-Y, Kazim L, Repasky EA, Subjeck JR (2001) Characterization of Heat Shock Protein 110 and Glucose-Regulated Protein 170 as Cancer Vaccines and the Effect of Fever-Range Hyperthermia on Vaccine Activity. *The Journal of Immunology* 166 (1):490. doi:10.4049/jimmunol.166.1.490
14. Udono H, Srivastava PK (1994) Comparison of tumor-specific immunogenicities of stress-induced proteins gp96, hsp90, and hsp70. *The Journal of Immunology* 152 (11):5398
15. Ullrich SJ, Robinson EA, Law LW, Willingham M, Appella E (1986) A mouse tumor-specific transplantation antigen is a heat shock-related protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83 (10):3121-3125. doi:10.1073/pnas.83.10.3121
16. Graner MW (2016) Chapter Eight - HSP90 and Immune Modulation in Cancer. In: Isaacs J, Whitesell L (eds) *Advances in Cancer Research*, vol 129. Academic Press, pp 191-224. doi:<https://doi.org/10.1016/bs.acr.2015.10.001>
17. Flynn GC, Pohl J, Flocco MT, Rothman JE (1991) Peptide-binding specificity of the molecular chaperone BiP. *Nature* 353 (6346):726-730. doi:10.1038/353726a0
18. Weng D, Calderwood SK, Gong J (2011) Preparation of a heat-shock protein 70-based vaccine from DC-tumor fusion cells. *Methods Mol Biol* 787:255-265. doi:10.1007/978-1-61779-295-3_19

19. Wu BX, Hong F, Zhang Y, Ansa-Addo E, Li Z (2016) Chapter Seven - GRP94/gp96 in Cancer: Biology, Structure, Immunology, and Drug Development. In: Isaacs J, Whitesell L (eds) *Advances in Cancer Research*, vol 129. Academic Press, pp 165-190. doi:<https://doi.org/10.1016/bs.acr.2015.09.001>
20. Li R, Emsley J (2013) The organizing principle of the platelet glycoprotein Ib–IX–V complex. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 11 (4):605-614. doi:<https://doi.org/10.1111/jth.12144>
21. Li Y, Lu J, Cohen D, Prochownik EV (2008) Transformation, genomic instability and senescence mediated by platelet/megakaryocyte glycoprotein Iba. *Oncogene* 27 (11):1599-1609. doi:10.1038/sj.onc.1210794
22. Zhang Y, Wu BX, Metelli A, Thaxton JE, Hong F, Rachidi S, Ansa-Addo E, Sun S, Vasu C, Yang Y, Liu B, Li Z (2015) GP96 is a GARP chaperone and controls regulatory T cell functions. *The Journal of clinical investigation* 125 (2):859-869. doi:10.1172/JCI79014
23. Chaumonnot K, Masson S, Sikner H, Bouchard A, Baverel V, Bellaye P-S, Collin B, Garrido C, Kohli E (2021) The HSP GRP94 interacts with macrophage intracellular complement C3 and impacts M2 profile during ER stress. *Cell Death Dis* 12 (1):114. doi:10.1038/s41419-020-03288-x
24. Kurotaki T, Tamura Y, Ueda G, Oura J, Kutomi G, Hirohashi Y, Sahara H, Torigoe T, Hiratsuka H, Sunakawa H, Hirata K, Sato N (2007) Efficient Cross-Presentation by Heat Shock Protein 90-Peptide Complex-Loaded Dendritic Cells via an Endosomal Pathway. *The Journal of Immunology* 179 (3):1803. doi:10.4049/jimmunol.179.3.1803
25. Furuta K, Eguchi T (2021) Roles of HSP on Antigen Presentation. In: Asea AAA, Kaur P (eds) *Heat Shock Proteins in Human Diseases*. Springer International Publishing, Cham, pp 275-280. doi:10.1007/7515_2020_5
26. Rajagopal D, Bal V, Mayor S, George A, Rath S (2006) A role for the Hsp90 molecular chaperone family in antigen presentation to T lymphocytes via major histocompatibility complex class II molecules. *European Journal of Immunology* 36 (4):828-841. doi:<https://doi.org/10.1002/eji.200535326>
27. Deffit SN, Blum JS (2015) Macronutrient deprivation modulates antigen trafficking and immune recognition through HSC70 accessibility. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 194 (4):1446-1453. doi:10.4049/jimmunol.1402472
28. Martine P, Chevriaux A, Derangère V, Apetoh L, Garrido C, Ghiringhelli F, Rébé C (2019) HSP70 is a negative regulator of NLRP3 inflammasome activation. *Cell Death Dis* 10 (4):256. doi:10.1038/s41419-019-1491-7
29. Arbore G, West EE, Spolski R, Robertson AAB, Klos A, Rheinheimer C, Dutow P, Woodruff TM, Yu ZX, O'Neill LA, Coll RC, Sher A, Leonard WJ, Köhl J, Monk P, Cooper MA, Arno M, Afzali B, Lachmann HJ, Cope AP, Mayer-Barber KD, Kemper C (2016) T helper 1 immunity requires complement-driven NLRP3 inflammasome activity in CD4⁺ T cells. *Science (New York, NY)* 352 (6292):aad1210-aad1210. doi:10.1126/science.aad1210
30. Swanson KV, Deng M, Ting JPY (2019) The NLRP3 inflammasome: molecular activation and regulation to therapeutics. *Nature Reviews Immunology* 19 (8):477-489. doi:10.1038/s41577-019-0165-0
31. Ghiringhelli F, Apetoh L, Tesniere A, Aymeric L, Ma Y, Ortiz C, Vermaelen K, Panaretakis T, Mignot G, Ullrich E, Perfettini J-L, Schlemmer F, Tasdemir E, Uhl M, Génin P, Civas A, Ryffel B, Kanellopoulos J, Tschopp J, André F, Lidereau R, McLaughlin NM, Haynes NM, Smyth MJ, Kroemer G, Zitvogel L (2009) Activation of the NLRP3 inflammasome in dendritic cells induces IL-1 β -dependent adaptive immunity against tumors. *Nature Medicine* 15 (10):1170-1178. doi:10.1038/nm.2028
32. Nizami S, Arunasalam K, Green J, Cook J, Lawrence CB, Zarganes-Tzitzikas T, Davis JB, Di Daniel E, Brough D (2021) Inhibition of the NLRP3 inflammasome by HSP90 inhibitors. *Immunology* 162 (1):84-91. doi:10.1111/imm.13267
33. Shimp SK, Parson CD, Regna NL, Thomas AN, Chafin CB, Reilly CM, Nichole Rylander M (2012) HSP90 inhibition by 17-DMAG reduces inflammation in J774 macrophages through

- suppression of Akt and nuclear factor- κ B pathways. *Inflammation Research* 61 (5):521-533. doi:10.1007/s00011-012-0442-x
34. Broemer M, Krappmann D, Scheidereit C (2004) Requirement of Hsp90 activity for I κ B kinase (IKK) biosynthesis and for constitutive and inducible IKK and NF- κ B activation. *Oncogene* 23 (31):5378-5386. doi:10.1038/sj.onc.1207705
35. Bae J, Munshi A, Li C, Samur M, Prabhala R, Mitsiades C, Anderson KC, Munshi NC (2013) Heat shock protein 90 is critical for regulation of phenotype and functional activity of human T lymphocytes and NK cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 190 (3):1360-1371. doi:10.4049/jimmunol.1200593
36. Zavareh RB, Spangenberg SH, Woods A, Martínez-Peña F, Lairson LL (2021) HSP90 Inhibition Enhances Cancer Immunotherapy by Modulating the Surface Expression of Multiple Immune Checkpoint Proteins. *Cell Chemical Biology* 28 (2):158-168.e155. doi:10.1016/j.chembiol.2020.10.005
37. Mbofung RM, McKenzie JA, Malu S, Zhang M, Peng W, Liu C, Kuitse I, Tieu T, Williams L, Devi S, Ashkin E, Xu C, Huang L, Zhang M, Talukder AH, Tripathi SC, Khong H, Satani N, Muller FL, Roszik J, Heffernan T, Allison JP, Lizee G, Hanash SM, Proia D, Amaria R, Davis RE, Hwu P (2017) HSP90 inhibition enhances cancer immunotherapy by upregulating interferon response genes. *Nature communications* 8 (1):451-451. doi:10.1038/s41467-017-00449-z
38. Rao A, Taylor JL, Chi-Sabins N, Kawabe M, Gooding WE, Storkus WJ (2012) Combination therapy with HSP90 inhibitor 17-DMAG reconditions the tumor microenvironment to improve recruitment of therapeutic T cells. *Cancer research* 72 (13):3196-3206. doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-0538
39. Morales C, Rachidi S, Hong F, Sun S, Ouyang X, Wallace C, Zhang Y, Garret-Mayer E, Wu J, Liu B, Li Z (2014) Immune Chaperone gp96 Drives the Contributions of Macrophages to Inflammatory Colon Tumorigenesis. *Cancer Research* 74 (2):446. doi:10.1158/0008-5472.CAN-13-1677
40. Cook KL, Soto-Pantoja DR, Clarke PAG, Cruz MI, Zwart A, Wärrri A, Hilakivi-Clarke L, Roberts DD, Clarke R (2016) Endoplasmic Reticulum Stress Protein GRP78 Modulates Lipid Metabolism to Control Drug Sensitivity and Antitumor Immunity in Breast Cancer. *Cancer Research* 76 (19):5657. doi:10.1158/0008-5472.CAN-15-2616
41. Albakova Z, Siam MKS, Sacitharan PK, Ziganshin RH, Ryazantsev DY, Sapozhnikov AM (2021) Extracellular heat shock proteins and cancer: New perspectives. *Translational Oncology* 14 (2):100995. doi:<https://doi.org/10.1016/j.tranon.2020.100995>
42. Suzuki K, Ito Y, Wakai K, Kawado M, Hashimoto S, Seki N, Ando M, Nishino Y, Kondo T, Watanabe Y, Ozasa K, Inoue T, Tamakoshi A (2006) Serum Heat Shock Protein 70 Levels and Lung Cancer Risk: A Case-Control Study Nested in a Large Cohort Study. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 15 (9):1733. doi:10.1158/1055-9965.EPI-06-0005
43. Kocsis J, Madaras B, Tóth ÉK, Füst G, Prohászka Z (2010) Serum level of soluble 70-kD heat shock protein is associated with high mortality in patients with colorectal cancer without distant metastasis. *Cell Stress and Chaperones* 15 (2):143-151. doi:10.1007/s12192-009-0128-7
44. Gehrman M, Cervello M, Montalto G, Cappello F, Gulino A, Knape C, Specht HM, Multhoff G (2014) Heat Shock Protein 70 Serum Levels Differ Significantly in Patients with Chronic Hepatitis, Liver Cirrhosis, and Hepatocellular Carcinoma. *Frontiers in Immunology* 5 (307). doi:10.3389/fimmu.2014.00307
45. Mambula SS, Calderwood SK (2006) Heat Shock Protein 70 Is Secreted from Tumor Cells by a Nonclassical Pathway Involving Lysosomal Endosomes. *The Journal of Immunology* 177 (11):7849-7857. doi:10.4049/jimmunol.177.11.7849
46. Mambula SS, Stevenson MA, Ogawa K, Calderwood SK (2007) Mechanisms for Hsp70 secretion: crossing membranes without a leader. *Methods* 43 (3):168-175. doi:10.1016/j.ymeth.2007.06.009

47. Lancaster GI, Febbraio MA (2005) Exosome-dependent trafficking of HSP70: a novel secretory pathway for cellular stress proteins. *J Biol Chem* 280 (24):23349-23355. doi:10.1074/jbc.M502017200
48. Clayton A, Turkes A, Navabi H, Mason MD, Tabi Z (2005) Induction of heat shock proteins in B-cell exosomes. *J Cell Sci* 118 (Pt 16):3631-3638. doi:10.1242/jcs.02494
49. Multhoff G, Hightower LE (1996) Cell surface expression of heat shock proteins and the immune response. *Cell Stress Chaperones* 1 (3):167-176. doi:10.1379/1466-1268(1996)001<0167:cseohs>2.3.co;2
50. Tang X, Chang C, Guo J, Lincoln V, Liang C, Chen M, Woodley DT, Li W (2019) Tumour-Secreted Hsp90 α on External Surface of Exosomes Mediates Tumour - Stromal Cell Communication via Autocrine and Paracrine Mechanisms. *Scientific reports* 9 (1):15108-15108. doi:10.1038/s41598-019-51704-w
51. Taha EA, Ono K, Eguchi T (2019) Roles of Extracellular HSPs as Biomarkers in Immune Surveillance and Immune Evasion. *Int J Mol Sci* 20 (18):4588
52. Gehrman M, Liebisch G, Schmitz G, Anderson R, Steinem C, De Maio A, Pockley G, Multhoff G (2008) Tumor-specific Hsp70 plasma membrane localization is enabled by the glycosphingolipid Gb3. *PLoS One* 3 (4):e1925. doi:10.1371/journal.pone.0001925
53. Arispe N, Doh M, Simakova O, Kurganov B, De Maio A (2004) Hsc70 and Hsp70 interact with phosphatidylserine on the surface of PC12 cells resulting in a decrease of viability. *Faseb j* 18 (14):1636-1645. doi:10.1096/fj.04-2088com
54. Singh-Jasuja H, Scherer HU, Hilf N, Arnold-Schild D, Rammensee H-G, Toes REM, Schild H (2000) The heat shock protein gp96 induces maturation of dendritic cells and down-regulation of its receptor. *European Journal of Immunology* 30 (8):2211-2215. doi:[https://doi.org/10.1002/1521-4141\(2000\)30:8<2211::AID-IMMU2211>3.0.CO;2-0](https://doi.org/10.1002/1521-4141(2000)30:8<2211::AID-IMMU2211>3.0.CO;2-0)
55. Yang Y, Liu B, Dai J, Srivastava PK, Zammit DJ, Lefrançois L, Li Z (2007) Heat Shock Protein gp96 Is a Master Chaperone for Toll-like Receptors and Is Important in the Innate Function of Macrophages. *Immunity* 26 (2):215-226. doi:<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2006.12.005>
56. Seigne A, Joly A-L, Chaumonnot K, Hazoumé A, Sanka M, Marcion G, Boudesco C, Hammann A, Seigneuric R, Jégo G, Ducoroy P, Delarue P, Senet P, Castilla-Llorente C, Solary E, Durey M-A, Rubio M-T, Hermine O, Kohli E, Garrido C (2017) Serum Gp96 is a chaperone of complement-C3 during graft-versus-host disease. *JCI Insight* 2 (6). doi:10.1172/jci.insight.90531
57. Rondas D, Crèvecoeur I, D'Hertog W, Ferreira GB, Staes A, Garg AD, Eizirik DL, Agostinis P, Gevaert K, Overbergh L, Mathieu C (2014) Citrullinated Glucose-Regulated Protein 78 Is an Autoantigen in Type 1 Diabetes. *Diabetes* 64 (2):573-586. doi:10.2337/db14-0621
58. Vig S, Buitinga M, Rondas D, Crèvecoeur I, van Zandvoort M, Waelkens E, Eizirik DL, Gysemans C, Baatsen P, Mathieu C, Overbergh L (2019) Cytokine-induced translocation of GRP78 to the plasma membrane triggers a pro-apoptotic feedback loop in pancreatic beta cells. *Cell Death Dis* 10 (4):309. doi:10.1038/s41419-019-1518-0
59. Misra UK, Gonzalez-Gronow M, Gawdi G, Pizzo SV (2005) The Role of MTJ-1 in Cell Surface Translocation of GRP78, a Receptor for α 2-Macroglobulin-Dependent Signaling. *The Journal of Immunology* 174 (4):2092-2097. doi:10.4049/jimmunol.174.4.2092
60. Kant Misra U, Gonzalez-Gronow M, Gawdi G, Wang F, Vincent Pizzo S (2004) A novel receptor function for the heat shock protein Grp78: silencing of Grp78 gene expression attenuates α 2M*-induced signalling. *Cellular Signalling* 16 (8):929-938. doi:<https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2004.01.003>
61. Yang M, Zhang F, Qin K, Wu M, Li H, Zhu H, Ning Q, Lei P, Shen G (2016) Glucose-Regulated Protein 78-Induced Myeloid Antigen-Presenting Cells Maintained Tolerogenic Signature upon LPS Stimulation. *Frontiers in immunology* 7:552-552. doi:10.3389/fimmu.2016.00552
62. Chen L, Zheng H, Yu X, Liu L, Li H, Zhu H, Zhang Z, Lei P, Shen G (2020) Tumor-Secreted GRP78 Promotes the Establishment of a Pre-metastatic Niche in the Liver Microenvironment. *Frontiers in Immunology* 11 (2544). doi:10.3389/fimmu.2020.584458

63. Flohé SB, Brüggemann J, Lendemans S, Nikulina M, Meierhoff G, Flohé S, Kolb H (2003) Human Heat Shock Protein 60 Induces Maturation of Dendritic Cells Versus a Th1-Promoting Phenotype. *The Journal of Immunology* 170 (5):2340. doi:10.4049/jimmunol.170.5.2340
64. Vabulas RM, Ahmad-Nejad P, da Costa C, Miethke T, Kirschning CJ, Häcker H, Wagner H (2001) Endocytosed HSP60s Use Toll-like Receptor 2 (TLR2) and TLR4 to Activate the Toll/Interleukin-1 Receptor Signaling Pathway in Innate Immune Cells *. *Journal of Biological Chemistry* 276 (33):31332-31339. doi:10.1074/jbc.M103217200
65. Asea A, Rehli M, Kabingu E, Boch JA, Baré O, Auron PE, Stevenson MA, Calderwood SK (2002) Novel Signal Transduction Pathway Utilized by Extracellular HSP70: ROLE OF Toll-LIKE RECEPTOR (TLR) 2 AND TLR4 *. *Journal of Biological Chemistry* 277 (17):15028-15034. doi:10.1074/jbc.M200497200
66. Gabai VL, Mabuchi K, Mosser DD, Sherman MY (2002) Hsp72 and stress kinase c-jun N-terminal kinase regulate the bid-dependent pathway in tumor necrosis factor-induced apoptosis. *Mol Cell Biol* 22 (10):3415-3424. doi:10.1128/mcb.22.10.3415-3424.2002
67. Li H, Li Y, Liu D, Sun H, Su D, Yang F, Liu J (2013) Extracellular HSP70/HSP70-PCs promote epithelial-mesenchymal transition of hepatocarcinoma cells. *PLoS One* 8 (12):e84759. doi:10.1371/journal.pone.0084759
68. Chen H, Wu Y, Zhang Y, Jin L, Luo L, Xue B, Lu C, Zhang X, Yin Z (2006) Hsp70 inhibits lipopolysaccharide-induced NF- κ B activation by interacting with TRAF6 and inhibiting its ubiquitination. *FEBS Letters* 580 (13):3145-3152. doi:<https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.04.066>
69. Xie Y, Bai O, Zhang H, Yuan J, Zong S, Chibbar R, Slattery K, Qureshi M, Wei Y, Deng Y, Xiang J (2010) Membrane-bound HSP70-engineered myeloma cell-derived exosomes stimulate more efficient CD8(+) CTL- and NK-mediated antitumour immunity than exosomes released from heat-shocked tumour cells expressing cytoplasmic HSP70. *J Cell Mol Med* 14 (11):2655-2666. doi:10.1111/j.1582-4934.2009.00851.x
70. Laudanski K, De A, Miller-Graziano C (2007) Exogenous heat shock protein 27 uniquely blocks differentiation of monocytes to dendritic cells. *European Journal of Immunology* 37 (10):2812-2824. doi:<https://doi.org/10.1002/eji.200636993>
71. Berthenet K, Boudes C, Collura A, Svrcek M, Richaud S, Hammann A, Causse S, Yousfi N, Wanherdrick K, Duplomb L, Duval A, Garrido C, Jegou G (2016) Extracellular HSP110 skews macrophage polarization in colorectal cancer. *Oncoimmunology* 5 (7):e1170264-e1170264. doi:10.1080/2162402X.2016.1170264
72. Marcion G, Hermetet F, Neiers F, Uyanik B, Dondaine L, Dias AMM, Da Costa L, Moreau M, Bellaye P-S, Collin B, Gobbo J, Briand L, Seigneuric R, Kitten O, Cinier M, Garrido C (2021) Nanofitins targeting heat shock protein 110: An innovative immunotherapeutic modality in cancer. *International Journal of Cancer* 148 (12):3019-3031. doi:<https://doi.org/10.1002/ijc.33485>
73. Wang X-Y, Arnouk H, Chen X, Kazim L, Repasky EA, Subject JR (2006) Extracellular Targeting of Endoplasmic Reticulum Chaperone Glucose-Regulated Protein 170 Enhances Tumor Immunity to a Poorly Immunogenic Melanoma. *The Journal of Immunology* 177 (3):1543. doi:10.4049/jimmunol.177.3.1543
74. Wang H, Pezeshki AM, Yu X, Guo C, Subject JR, Wang X-Y (2015) The Endoplasmic Reticulum Chaperone GRP170: From Immunobiology to Cancer Therapeutics. *Frontiers in Oncology* 4 (377). doi:10.3389/fonc.2014.00377
75. Multhoff G, Mizzen L, Winchester CC, Milner CM, Wenk S, Eissner G, Kampinga HH, Laumbacher B, Johnson J (1999) Heat shock protein 70 (Hsp70) stimulates proliferation and cytolytic activity of natural killer cells. *Exp Hematol* 27 (11):1627-1636. doi:10.1016/s0301-472x(99)00104-6
76. Multhoff G, Pfister K, Gehrman M, Hantschel M, Gross C, Hafner M, Hiddemann W (2001) A 14-mer Hsp70 peptide stimulates natural killer (NK) cell activity. *Cell Stress Chaperones* 6 (4):337-344. doi:10.1379/1466-1268(2001)006<0337:AMHPSN>2.0.CO;2

77. Multhoff G, Botzler C, Jennen L, Schmidt J, Ellwart J, Issels R (1997) Heat shock protein 72 on tumor cells: a recognition structure for natural killer cells. *The Journal of Immunology* 158 (9):4341
78. Shevtsov M, Pitkin E, Ischenko A, Stangl S, Khachatryan W, Galibin O, Edmond S, Lobinger D, Multhoff G (2019) Ex vivo Hsp70-Activated NK Cells in Combination With PD-1 Inhibition Significantly Increase Overall Survival in Preclinical Models of Glioblastoma and Lung Cancer. *Frontiers in immunology* 10:454-454. doi:10.3389/fimmu.2019.00454
79. Gastpar R, Gross C, Rossbacher L, Ellwart J, Riegger J, Multhoff G (2004) The Cell Surface-Localized Heat Shock Protein 70 Epitope TKD Induces Migration and Cytolytic Activity Selectively in Human NK Cells. *The Journal of Immunology* 172 (2):972. doi:10.4049/jimmunol.172.2.972
80. Gastpar R, Gehrman M, Bausero MA, Asea A, Gross C, Schroeder JA, Multhoff G (2005) Heat shock protein 70 surface-positive tumor exosomes stimulate migratory and cytolytic activity of natural killer cells. *Cancer Res* 65 (12):5238-5247. doi:10.1158/0008-5472.Can-04-3804
81. Lv L-H, Wan Y-L, Lin Y, Zhang W, Yang M, Li G-L, Lin H-M, Shang C-Z, Chen Y-J, Min J (2012) Anticancer drugs cause release of exosomes with heat shock proteins from human hepatocellular carcinoma cells that elicit effective natural killer cell antitumor responses in vitro. *The Journal of biological chemistry* 287 (19):15874-15885. doi:10.1074/jbc.M112.340588
82. Raiter A, Lipovetzki J, Lubin I, Yerushalmi R (2020) GRP78 expression in peripheral blood mononuclear cells is a new predictive marker for the benefit of taxanes in breast cancer neoadjuvant treatment. *BMC Cancer* 20 (1):333. doi:10.1186/s12885-020-06835-z
83. Sedlacek AL, Kinner-Bibeau LB, Binder RJ (2016) Phenotypically distinct helper NK cells are required for gp96-mediated anti-tumor immunity. *Scientific Reports* 6 (1):29889. doi:10.1038/srep29889
84. Janetzki S, Palla D, Rosenhauer V, Lochs H, Lewis JJ, Srivastava PK (2000) Immunization of cancer patients with autologous cancer-derived heat shock protein gp96 preparations: A pilot study. *International Journal of Cancer* 88 (2):232-238. doi:[https://doi.org/10.1002/1097-0215\(20001015\)88:2<232::AID-IJC14>3.0.CO;2-8](https://doi.org/10.1002/1097-0215(20001015)88:2<232::AID-IJC14>3.0.CO;2-8)
85. Leo R, Johannes D, Inês CC, Valentina D, Manik C, Stefan K, Frank H, Andreas R, Hermann E, Max ST, Stephanie B (2015) GRP78-directed immunotherapy in relapsed or refractory multiple myeloma - results from a phase 1 trial with the monoclonal immunoglobulin M antibody PAT-SM6. *Haematologica* 100 (3):377-384. doi:10.3324/haematol.2014.117945
86. Dadey DYA, Kapoor V, Hoyer K, Khudanyan A, Collins A, Thotala D, Hallahan DE (2017) Antibody Targeting GRP78 Enhances the Efficacy of Radiation Therapy in Human Glioblastoma and Non-Small Cell Lung Cancer Cell Lines and Tumor Models. *Clinical Cancer Research* 23 (10):2556. doi:10.1158/1078-0432.CCR-16-1935
87. Aghamollaei H, Ghanei M, Rasae MJ, Latifi AM, Bakherad H, Fasihi-Ramandi M, Taheri RA, Gargari SLM (2021) Isolation and characterization of a novel nanobody for detection of GRP78 expressing cancer cells. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 68 (2):239-246. doi:<https://doi.org/10.1002/bab.1916>
88. Al-Hashimi AA, Caldwell J, Gonzalez-Gronow M, Pizzo SV, Aboumrada D, Pozza L, Al-Bayati H, Weitz JI, Stafford A, Chan H, Kapoor A, Jacobsen DW, Dickhout JG, Austin RC (2010) Binding of anti-GRP78 autoantibodies to cell surface GRP78 increases tissue factor procoagulant activity via the release of calcium from endoplasmic reticulum stores. *The Journal of biological chemistry* 285 (37):28912-28923. doi:10.1074/jbc.M110.119107
89. Gonzalez-Gronow M, Cuchacovich M, Llanos C, Urzua C, Gawdi G, Pizzo SV (2006) Prostate Cancer Cell Proliferation & In vitro Is Modulated by Antibodies against Glucose-Regulated Protein 78 Isolated from Patient Serum. *Cancer Research* 66 (23):11424. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-1721
90. Doody ADH, Kovalchin JT, Mihalyo MA, Hagymasi AT, Drake CG, Adler AJ (2004) Glycoprotein 96 can chaperone both MHC class I- and class II-restricted epitopes for in vivo

- presentation, but selectively primes CD8⁺ T cell effector function. *Journal of immunology* (Baltimore, Md : 1950) 172 (10):6087-6092. doi:10.4049/jimmunol.172.10.6087
91. Blachere NE, Li Z, Chandawarkar RY, Suto R, Jaikaria NS, Basu S, Udono H, Srivastava PK (1997) Heat shock protein-peptide complexes, reconstituted in vitro, elicit peptide-specific cytotoxic T lymphocyte response and tumor immunity. *J Exp Med* 186 (8):1315-1322. doi:10.1084/jem.186.8.1315
92. Wang X-Y, Kazim L, Repasky EA, Subjeck JR (2003) Immunization with tumor-derived ER chaperone grp170 elicits tumor-specific CD8⁺ T-cell responses and reduces pulmonary metastatic disease. *International Journal of Cancer* 105 (2):226-231. doi:<https://doi.org/10.1002/ijc.11058>
93. Wang H, Yu X, Guo C, Zuo D, Fisher PB, Subjeck JR, Wang X-Y (2013) Enhanced endoplasmic reticulum entry of tumor antigen is crucial for cross-presentation induced by dendritic cell-targeted vaccination. *Journal of immunology* (Baltimore, Md : 1950) 191 (12):6010-6021. doi:10.4049/jimmunol.1302312
94. Li X, Liu Z, Yan X, Zhang X, Li Y, Zhao B, Wang S, Zhou X, Gao GF, Meng S (2013) Induction of Regulatory T Cells by High-Dose gp96 Suppresses Murine Liver Immune Hyperactivation. *PLOS ONE* 8 (7):e68997. doi:10.1371/journal.pone.0068997
95. Chen Y-Q, Li P-C, Pan N, Gao R, Wen Z-F, Zhang T-Y, Huang F, Wu F-Y, Ou X-L, Zhang J-P, Zhu X-J, Hu H-M, Chen K, Cai Y-L, Wang L-X (2019) Tumor-released autophagosomes induces CD4⁺ T cell-mediated immunosuppression via a TLR2–IL-6 cascade. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer* 7 (1):178. doi:10.1186/s40425-019-0646-5
96. Figueiredo C, Wittmann M, Wang D, Dressel R, Seltsam A, Blasczyk R, Eiz-Vesper B (2009) Heat shock protein 70 (HSP70) induces cytotoxicity of T-helper cells. *Blood* 113 (13):3008-3016. doi:10.1182/blood-2008-06-162727
97. Wachstein J, Tischer S, Figueiredo C, Limbourg A, Falk C, Immenschuh S, Blasczyk R, Eiz-Vesper B (2012) HSP70 Enhances Immunosuppressive Function of CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ T Regulatory Cells and Cytotoxicity in CD4⁺CD25⁻ T Cells. *PLOS ONE* 7 (12):e51747. doi:10.1371/journal.pone.0051747
98. Corrigall VM, Bodman-Smith MD, Brunst M, Cornell H, Panayi GS (2004) Inhibition of antigen-presenting cell function and stimulation of human peripheral blood mononuclear cells to express an antiinflammatory cytokine profile by the stress protein BiP: Relevance to the treatment of inflammatory arthritis. *Arthritis & Rheumatism* 50 (4):1164-1171. doi:<https://doi.org/10.1002/art.20134>
99. Yang H-Z, Cui B, Liu H-Z, Mi S, Yan J, Yan H-M, Hua F, Lin H, Cai W-F, Xie W-J, Lv X-X, Wang X-X, Xin B-M, Zhan Q-M, Hu Z-W (2009) Blocking TLR2 Activity Attenuates Pulmonary Metastases of Tumor. *PLOS ONE* 4 (8):e6520. doi:10.1371/journal.pone.0006520
100. Gomez CR (2019) Hsp60 in Cancer Immunity: Biological Basis, Diagnostic Potential and Therapeutic Opportunities. In: Asea AAA, Kaur P (eds) *Heat Shock Protein 60 in Human Diseases and Disorders*. Springer International Publishing, Cham, pp 117-134. doi:10.1007/978-3-030-23154-5_9
101. Feng H, Zeng Y, Graner MW, Katsanis E (2002) Stressed apoptotic tumor cells stimulate dendritic cells and induce specific cytotoxic T cells. *Blood* 100 (12):4108-4115. doi:10.1182/blood-2002-05-1389
102. Zanin-Zhorov A, Bruck R, Tal G, Oren S, Aeed H, Hershkoviz R, Cohen IR, Lider O (2005) Heat Shock Protein 60 Inhibits Th1-Mediated Hepatitis Model via Innate Regulation of Th1/Th2 Transcription Factors and Cytokines. *The Journal of Immunology* 174 (6):3227. doi:10.4049/jimmunol.174.6.3227
103. Quintana FJ, Cohen IR (2011) The HSP60 immune system network. *Trends in Immunology* 32 (2):89-95. doi:10.1016/j.it.2010.11.001
104. Quintana FJ, Mimran A, Carmi P, Mor F, Cohen IR (2008) HSP60 as a target of anti-ergotypic regulatory T cells. *PloS one* 3 (12):e4026-e4026. doi:10.1371/journal.pone.0004026

105. Osterloh A, Kalinke U, Weiss S, Fleischer B, Breloer M (2007) Synergistic and Differential Modulation of Immune Responses by Hsp60 and Lipopolysaccharide *. *Journal of Biological Chemistry* 282 (7):4669-4680. doi:10.1074/jbc.M608666200
106. Cohen-Sfady M, Nussbaum G, Pevsner-Fischer M, Mor F, Carmi P, Zanin-Zhorov A, Lider O, Cohen IR (2005) Heat Shock Protein 60 Activates B Cells via the TLR4-MyD88 Pathway. *The Journal of Immunology* 175 (6):3594. doi:10.4049/jimmunol.175.6.3594
107. Tang Y, Jiang Q, Ou Y, Zhang F, Qing K, Sun Y, Lu W, Zhu H, Gong F, Lei P, Shen G (2016) BIP induces mice CD19hi regulatory B cells producing IL-10 and highly expressing PD-L1, FasL. *Molecular Immunology* 69:44-51. doi:<https://doi.org/10.1016/j.molimm.2015.10.017>
108. Connors JM, Cozen W, Steidl C, Carbone A, Hoppe RT, Flechtner H-H, Bartlett NL (2020) Hodgkin lymphoma. *Nature Reviews Disease Primers* 6 (1):61. doi:10.1038/s41572-020-0189-6
109. Andrew DZ, Leo IG, Jeremy SA, Ranjana HA, Nancy LB, Paolo FC, Julie EC, Julio CC, Beth C, Luis EF, Martha JG, Thomas MH, Nancy Lee H, Francisco H-I, Mark SK, Christopher RK, Nadia K, Susan K, Ann SL, Amitkumar M, Auayporn N, Rachel R, Nishitha R, Erin R, Kenneth BR, Stephen DS, Erin DS, Lode JS, Julie MV, Mary AD, Hema S (2019) NCCN Guidelines Insights: B-Cell Lymphomas, Version 3.2019. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network J Natl Compr Canc Netw* 17 (6):650-661. doi:10.6004/jnccn.2019.0029
110. Chaudhari K, Rizvi S, Syed B (2019) Non-Hodgkin lymphoma therapy landscape. *Nature Reviews Drug Discovery* 18. doi:10.1038/d41573-019-00051-6
111. National Comprehensive Cancer Network. NCCN Clinical Practice Guidelines. Hodgkin lymphoma. (2019) NCCN. https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/default.aspx#site. Accessed 21 February 2021
112. Eichenauer DA, Engert A, André M, Federico M, Illidge T, Hutchings M, Ladetto M (2014) Hodgkin's lymphoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up †. *Annals of Oncology* 25:iii70-iii75. doi:10.1093/annonc/mdu181
113. Kuruvilla J, Keating A, Crump M (2011) How I treat relapsed and refractory Hodgkin lymphoma. *Blood* 117 (16):4208-4217. doi:10.1182/blood-2010-09-288373
114. Linch DC, Goldstone AH, McMillan A, Chopra R, Vaughan Hudson G, Winfield D, Hancock B, Moir D, Milligan D (1993) Dose intensification with autologous bone-marrow transplantation in relapsed and resistant Hodgkin's disease: results of a BNLI randomised trial. *The Lancet* 341 (8852):1051-1054. doi:10.1016/0140-6736(93)92411-L
115. Schmitz N, Pfistner B, Sextro M, Sieber M, Carella AM, Haenel M, Boissevain F, Zschaber R, Müller P, Kirchner H, Lohri A, Decker S, Koch B, Hasenclever D, Goldstone AH, Diehl V (2002) Aggressive conventional chemotherapy compared with high-dose chemotherapy with autologous haemopoietic stem-cell transplantation for relapsed chemosensitive Hodgkin's disease: a randomised trial. *The Lancet* 359 (9323):2065-2071. doi:10.1016/S0140-6736(02)08938-9
116. Advani RH, Hoppe RT (2013) How I treat nodular lymphocyte predominant Hodgkin lymphoma. *Blood* 122 (26):4182-4188. doi:10.1182/blood-2013-07-453241
117. U.S. Food and Drug Administration. (2018). FDA expands approval of Adcetris for first-line treatment of Stage III or IV classical Hodgkin lymphoma in combination with chemotherapy. <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-expands-approval-adcetris-first-line-treatment-stage-iii-or-iv-classical-hodgkin-lymphoma>. Accessed 21 February 2021
118. U. S. Food and Drug Administration.(2016). Nivolumab (Opdivo) for Hodgkin Lymphoma <https://www.fda.gov/drugs/resources-information-approved-drugs/nivolumab-opdivo-hodgkin-lymphoma>. Accessed 21 Feb 2021
119. U.S. Food and Drug Administration. (2020). FDA extends approval of pembrolizumab for classical Hodgkin lymphoma. <https://www.fda.gov/drugs/drug-approvals-and-databases/fda-extends-approval-pembrolizumab-classical-hodgkin-lymphoma>. Accessed 21 February 2021
120. U.S. Food and Drug Administration.2018.FDA approves first-line treatment for peripheral T-cell lymphoma under new review pilot. <https://www.fda.gov/news-events/press->

[announcements/fda-approves-first-line-treatment-peripheral-t-cell-lymphoma-under-new-review-pilot](#). Accessed 21 February 2021

121. U.S. Food and Drug Administration.(2020).FDA approves ibrutinib plus rituximab for chronic lymphocytic leukemia. <https://www.fda.gov/drugs/drug-approvals-and-databases/fda-approves-ibrutinib-plus-rituximab-chronic-lymphocytic-leukemia>. Accessed 21 February 2021

122. Shanafelt TD, Wang XV, Kay NE, Hanson CA, O'Brien S, Barrientos J, Jelinek DF, Braggio E, Leis JF, Zhang CC, Coutre SE, Barr PM, Cashen AF, Mato AR, Singh AK, Mullane MP, Little RF, Erba H, Stone RM, Litzow M, Tallman M (2019) Ibrutinib–Rituximab or Chemoimmunotherapy for Chronic Lymphocytic Leukemia. *New England Journal of Medicine* 381 (5):432-443. doi:10.1056/NEJMoa1817073

123. U.S. Food and Drug Administration.(2019).Project Orbis: FDA approves acalabrutinib for CLL and SLL. <https://www.fda.gov/drugs/resources-information-approved-drugs/project-orbis-fda-approves-acalabrutinib-ctl-and-sll>. Accessed 21 February 2021

124. Sharman JP, Egyed M, Jurczak W, Skarbnik A, Pagel JM, Flinn IW, Kamdar M, Munir T, Walewska R, Corbett G, Fogliatto LM, Herishanu Y, Banerji V, Coutre S, Follows G, Walker P, Karlsson K, Ghia P, Janssens A, Cymbalista F, Woyach JA, Salles G, Wierda WG, Izumi R, Munugalavadla V, Patel P, Wang MH, Wong S, Byrd JC (2020) Acalabrutinib with or without obinutuzumab versus chlorambucil and obinutuzumab for treatment-naïve chronic lymphocytic leukaemia (ELEVATE-TN): a randomised, controlled, phase 3 trial. *The Lancet* 395 (10232):1278-1291. doi:10.1016/S0140-6736(20)30262-2

125. Ghia P, Pluta A, Wach M, Lysak D, Kozak T, Simkovic M, Kaplan P, Kraychok I, Illes A, de la Serna J, Dolan S, Campbell P, Musuraca G, Jacob A, Avery E, Lee JH, Liang W, Patel P, Quah C, Jurczak W (2020) ASCEND: Phase III, Randomized Trial of Acalabrutinib Versus Idelalisib Plus Rituximab or Bendamustine Plus Rituximab in Relapsed or Refractory Chronic Lymphocytic Leukemia. *Journal of Clinical Oncology* 38 (25):2849-2861. doi:10.1200/JCO.19.03355

126. U.S. Food and Drug Administration. (2017).FDA grants accelerated approval to acalabrutinib for mantle cell lymphoma. <https://www.fda.gov/drugs/resources-information-approved-drugs/fda-grants-accelerated-approval-acalabrutinib-mantle-cell-lymphoma>. Accessed 21 February 2021

127. Wang M, Rule S, Zinzani PL, Goy A, Casasnovas O, Smith SD, Damaj G, Doorduijn JK, Lamy T, Morschhauser F, Panizo C, Shah B, Davies A, Eek R, Dupuis J, Jacobsen E, Kater AP, Le Gouill S, Oberic L, Robak T, Jain P, Frigault MM, Izumi R, Nguyen D, Patel P, Yin M, Długosz-Danecka M (2019) Durable response with single-agent acalabrutinib in patients with relapsed or refractory mantle cell lymphoma. *Leukemia* 33 (11):2762-2766. doi:10.1038/s41375-019-0575-9

128. Wang M, Rule S, Zinzani PL, Goy A, Casasnovas O, Smith SD, Damaj G, Doorduijn J, Lamy T, Morschhauser F, Panizo C, Shah B, Davies A, Eek R, Dupuis J, Jacobsen E, Kater AP, Le Gouill S, Oberic L, Robak T, Covey T, Dua R, Hamdy A, Huang X, Izumi R, Patel P, Rothbaum W, Slatter JG, Jurczak W (2018) Acalabrutinib in relapsed or refractory mantle cell lymphoma (ACE-LY-004): a single-arm, multicentre, phase 2 trial. *The Lancet* 391 (10121):659-667. doi:10.1016/S0140-6736(17)33108-2

129. Miller BW, Przepiorka D, de Claro RA, Lee K, Nie L, Simpson N, Gudi R, Saber H, Shord S, Bullock J, Marathe D, Mehrotra N, Hsieh LS, Ghosh D, Brown J, Kane RC, Justice R, Kaminskas E, Farrell AT, Pazdur R (2015) FDA Approval: Idelalisib Monotherapy for the Treatment of Patients with Follicular Lymphoma and Small Lymphocytic Lymphoma. *Clinical Cancer Research* 21 (7):1525. doi:10.1158/1078-0432.CCR-14-2522

130. U.S.Food and Drug Administration. (2017).FDA grants accelerated approval to copanlisib for relapsed follicular lymphoma. <https://www.fda.gov/drugs/resources-information-approved-drugs/fda-grants-accelerated-approval-copanlisib-relapsed-follicular-lymphoma>. Accessed 21 February 2021

131. U.S.Food and Drug Administration.(2018).duvelisib (COPIKTRA, Verastem, Inc.) for adult patients with relapsed or refractory chronic lymphocytic leukemia (CLL) or small lymphocytic lymphoma (SLL). <https://www.fda.gov/drugs/resources-information-approved-drugs/duvelisib->

[copiktra-verastem-inc-adult-patients-relapsed-or-refractory-chronic-lymphocytic-leukemia](#).

Accessed 21 February 2021

132. U.S. Food and Drug Administration.(2018).FDA approves pembrolizumab for treatment of relapsed or refractory PMBCL. <https://www.fda.gov/drugs/resources-information-approved-drugs/fda-approves-pembrolizumab-treatment-relapsed-or-refractory-pmbcl>. Accessed 21 February 2021

133. Zinzani PL, Thieblemont C, Melnichenko V, Bouabdallah K, Walewski J, Majlis A, Fogliatto L, Caballero D, Christian B, Gulbas Z, Özcan M, Salles GA, Shipp MA, Chatterjee A, Orłowski RJ, Balakumaran A, Armand P (2017) Efficacy and Safety of Pembrolizumab in Relapsed/Refractory Primary Mediastinal Large B-Cell Lymphoma (rrPMBCL): Updated Analysis of the Keynote-170 Phase 2 Trial. *Blood* 130 (Supplement 1):2833-2833. doi:10.1182/blood.V130.Suppl_1.2833.2833

134. U.S.Food and Drug Administration.(2018).FDA approves tisagenlecleucel for adults with relapsed or refractory large B-cell lymphoma. <https://www.fda.gov/drugs/resources-information-approved-drugs/fda-approves-tisagenlecleucel-adults-relapsed-or-refractory-large-b-cell-lymphoma>. Accessed 21 February 2021

135. Locke FL, Ghobadi A, Jacobson CA, Miklos DB, Lekakis LJ, Oluwole OO, Lin Y, Braunschweig I, Hill BT, Timmerman JM, Deol A, Reagan PM, Stiff P, Flinn IW, Farooq U, Goy A, McSweeney PA, Munoz J, Siddiqi T, Chavez JC, Herrera AF, Bartlett NL, Wieszorek JS, Navale L, Xue A, Jiang Y, Bot A, Rossi JM, Kim JJ, Go WY, Neelapu SS (2019) Long-term safety and activity of axicabtagene ciloleucel in refractory large B-cell lymphoma (ZUMA-1): a single-arm, multicentre, phase 1-2 trial. *Lancet Oncol* 20 (1):31-42. doi:10.1016/S1470-2045(18)30864-7

136. U.S.Food and Drug Administration. (2017).FDA approves axicabtagene ciloleucel for large B-cell lymphoma. <https://www.fda.gov/drugs/resources-information-approved-drugs/fda-approves-axicabtagene-ciloleucel-large-b-cell-lymphoma>. Accessed 21 February 2021

137. Steidl C (2017) The ecosystem of classical Hodgkin lymphoma. *Blood* 130 (22):2360-2361. doi:10.1182/blood-2017-10-807172

138. Küppers R, Hansmann M-L (2005) The Hodgkin and Reed/Sternberg cell. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 37 (3):511-517. doi:<https://doi.org/10.1016/j.biocel.2003.10.025>

139. Aldinucci D, Celegato M, Casagrande N (2016) Microenvironmental interactions in classical Hodgkin lymphoma and their role in promoting tumor growth, immune escape and drug resistance. *Cancer Letters* 380 (1):243-252. doi:<https://doi.org/10.1016/j.canlet.2015.10.007>

140. Küppers R, Engert A, Hansmann M-L (2012) Hodgkin lymphoma. *The Journal of Clinical Investigation* 122 (10):3439-3447. doi:10.1172/JCI61245

141. Chiu A, Xu W, He B, Dillon SR, Gross JA, Sievers E, Qiao X, Santini P, Hyjek E, Lee J-w, Cesarman E, Chadburn A, Knowles DM, Cerutti A (2007) Hodgkin lymphoma cells express TACI and BCMA receptors and generate survival and proliferation signals in response to BAFF and APRIL. *Blood* 109 (2):729-739. doi:10.1182/blood-2006-04-015958

142. Chiu J, Ernst DM, Keating A (2018) Acquired Natural Killer Cell Dysfunction in the Tumor Microenvironment of Classic Hodgkin Lymphoma. *Frontiers in immunology* 9:267-267. doi:10.3389/fimmu.2018.00267

143. Metkar SS, Naresh KN, Redkar AA, Soman CS, Advani SH, Nadkarni JJ (1999) Expression of Fas and Fas Ligand in Hodgkin's Disease. *Leukemia & Lymphoma* 33 (5-6):521-530. doi:10.3109/10428199909058456

144. Verbeke CS, Wenthe U, Grobholz R, Zentgraf H (2001) Fas Ligand Expression in Hodgkin Lymphoma. *The American Journal of Surgical Pathology* 25 (3)

145. Santón A, García-Cosío M, Cristóbal E, Pascual A, Muriel A, García-Laraña J (2011) Expression of heat shock proteins in classical Hodgkin lymphoma: correlation with apoptotic pathways and prognostic significance. *Histopathology* 58 (7):1072-1080. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.2011.03803.x>

146. Hsu P-L, Hsu S-M (1998) Abundance of Heat Shock Proteins (hsp89, hsp60, and hsp27) in Malignant Cells of Hodgkin's Disease. *Cancer Research* 58 (23):5507
147. Jin H, Yoshino T, Jin Z, Oka T, Kobayashi K, Yamasaki R, Liu Y, Yokota K, Oguma K, Akagi T (2002) Expression of Heat Shock Protein 60 in Normal and Neoplastic Human Lymphoid Tissues. *Journal of Clinical and Experimental Hematopathology* 42:25-32
148. Wang L, Qin W, Huo Y-J, Li X, Shi Q, Rasko JEJ, Janin A, Zhao W-L (2020) Advances in targeted therapy for malignant lymphoma. *Signal Transduction and Targeted Therapy* 5 (1):15. doi:10.1038/s41392-020-0113-2
149. Armengol M, Santos JC, Fernández-Serrano M, Profitós-Pelejà N, Ribeiro ML, Roué G (2021) Immune-Checkpoint Inhibitors in B-Cell Lymphoma. *Cancers (Basel)* 13 (2):214
150. Valbuena JR, Rassidakis GZ, Lin P, Atwell C, Georgakis GV, Younes A, Jones D, Medeiros LJ (2005) Expression of heat-shock protein-90 in non-Hodgkin's lymphomas. *Modern Pathology* 18 (10):1343-1349. doi:10.1038/modpathol.3800459
151. Zappasodi R, Ruggiero G, Guarnotta C, Tortoreto M, Tringali C, Cavanè A, Cabras AD, Castagnoli L, Venerando B, Zaffaroni N, Gianni AM, De Braud F, Tripodo C, Pupa SM, Di Nicola M (2015) HSPH1 inhibition downregulates Bcl-6 and c-Myc and hampers the growth of human aggressive B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Blood* 125 (11):1768-1771. doi:10.1182/blood-2014-07-590034
152. Yasuhiro O, Anas Y, Javier K, Felipe S, Loretta N, Fredrick H, Jorge R, Nathan F, Larry K, Jason W (2015) Experience with HSP90 inhibitor AUY922 in patients with relapsed or refractory non-Hodgkin lymphoma. *Haematologica* 100 (7):e272-e274. doi:10.3324/haematol.2015.126557
153. Walsby EJ, Lazenby M, Pepper CJ, Knapper S, Burnett AK (2013) The HSP90 inhibitor NVP-AUY922-AG inhibits the PI3K and IKK signalling pathways and synergizes with cytarabine in acute myeloid leukaemia cells. *British Journal of Haematology* 161 (1):57-67. doi:<https://doi.org/10.1111/bjh.12215>
154. Best OG, Mulligan SP (2012) Heat shock protein-90 inhibitor, NVP-AUY922, is effective in combination with fludarabine against chronic lymphocytic leukemia cells cultured on CD40L-stromal layer and inhibits their activated/proliferative phenotype. *Leukemia & Lymphoma* 53 (11):2314-2320. doi:10.3109/10428194.2012.698278
155. Kaiser M, Lamottke B, Mieth M, Jensen MR, Quadt C, Garcia-Echeverria C, Atadja P, Heider U, Von Metzler I, Türkmen S, Sezer O (2010) Synergistic action of the novel HSP90 inhibitor NVP-AUY922 with histone deacetylase inhibitors, melphalan, or doxorubicin in multiple myeloma. *European Journal of Haematology* 84 (4):337-344. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1600-0609.2009.01403.x>
156. Rao R, Fiskus W, Yang Y, Lee P, Joshi R, Fernandez P, Mandawat A, Atadja P, Bradner JE, Bhalla K (2008) HDAC6 inhibition enhances 17-AAG-mediated abrogation of hsp90 chaperone function in human leukemia cells. *Blood* 112 (5):1886-1893. doi:10.1182/blood-2008-03-143644
157. Kirkwood JM, Ibrahim JG, Sondak VK, Richards J, Flaherty LE, Ernstoff MS, Smith TJ, Rao U, Steele M, Blum RH (2000) High- and Low-Dose Interferon Alfa-2b in High-Risk Melanoma: First Analysis of Intergroup Trial E1690/S9111/C9190. *Journal of Clinical Oncology* 18 (12):2444-2458. doi:10.1200/jco.2000.18.12.2444
158. Coley WB (1891) II. Contribution to the Knowledge of Sarcoma. *Annals of surgery* 14 (3):199-220. doi:10.1097/00000658-189112000-00015
159. Old Lloyd J (1985) Tumor Necrosis Factor (TNF). *Science* 230 (4726):630-632. doi:10.1126/science.2413547
160. Kraehenbuehl L, Weng C-H, Eghbali S, Wolchok JD, Merghoub T (2022) Enhancing immunotherapy in cancer by targeting emerging immunomodulatory pathways. *Nature Reviews Clinical Oncology* 19 (1):37-50. doi:10.1038/s41571-021-00552-7
161. Rosenberg SA, Yang JC, Topalian SL, Schwartzentruber DJ, Weber JS, Parkinson DR, Seipp CA, Einhorn JH, White DE (1994) Treatment of 283 Consecutive Patients With Metastatic

- Melanoma or Renal Cell Cancer Using High-Dose Bolus Interleukin 2. *JAMA* 271 (12):907-913. doi:10.1001/jama.1994.03510360033032
162. Zhang Y, Zhang Z (2020) The history and advances in cancer immunotherapy: understanding the characteristics of tumor-infiltrating immune cells and their therapeutic implications. *Cellular & Molecular Immunology* 17 (8):807-821. doi:10.1038/s41423-020-0488-6
163. Srivastava PK, DeLeo AB, Old LJ (1986) Tumor rejection antigens of chemically induced sarcomas of inbred mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83 (10):3407-3411. doi:10.1073/pnas.83.10.3407
164. Maki RG, Old LJ, Srivastava PK (1990) Human homologue of murine tumor rejection antigen gp96: 5'-regulatory and coding regions and relationship to stress-induced proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87 (15):5658-5662. doi:10.1073/pnas.87.15.5658
165. Maki RG, Eddy RL, Byers M, Shows TB, Srivastava PK (1993) Mapping of the genes for human endoplasmic reticular heat shock protein gp96/grp94. *Somatic Cell and Molecular Genetics* 19 (1):73-81. doi:10.1007/BF01233956
166. Udono H, Srivastava PK (1993) Heat shock protein 70-associated peptides elicit specific cancer immunity. *The Journal of experimental medicine* 178 (4):1391-1396. doi:10.1084/jem.178.4.1391
167. Calderwood SK, Gong J, Murshid A (2016) Extracellular HSPs: The Complicated Roles of Extracellular HSPs in Immunity. *Frontiers in immunology* 7:159-159. doi:10.3389/fimmu.2016.00159
168. Yamazaki K, Nguyen T, Podack ER (1999) Cutting Edge: Tumor Secreted Heat Shock-Fusion Protein Elicits CD8 Cells for Rejection. *The Journal of Immunology* 163 (10):5178
169. Strbo N, Garcia-Soto A, Schreiber TH, Podack ER (2013) Secreted heat shock protein gp96-Ig: next-generation vaccines for cancer and infectious diseases. *Immunologic Research* 57 (1):311-325. doi:10.1007/s12026-013-8468-x
170. Morgensztern D, Harb W, Schalper K, Price M, Early B, Schreiber T (2017) MA09.06 Viagenpumatulcel-L Bolsters Response to Nivolumab Therapy in Advanced Lung Adenocarcinoma: Preliminary Data from the DURGA Trial. *Journal of Thoracic Oncology* 12 (1):S394-S395. doi:10.1016/j.jtho.2016.11.447
171. Cohen RB, Peoples GE, Kawashima T, Arana B, Cui X, Bazhenova L, Sanborn RE, Harb WA, Pennell NA, Morgensztern D (2021) Interim results of viagenpumatulcel-L (HS-110) plus nivolumab in previously treated patients (pts) with advanced non-small cell lung cancer (NSCLC) in two treatment settings. *Journal of Clinical Oncology* 39 (15_suppl):9100-9100. doi:10.1200/JCO.2021.39.15_suppl.9100
172. Crane CA, Han SJ, Ahn B, Oehlke J, Kivett V, Fedoroff A, Butowski N, Chang SM, Clarke J, Berger MS, McDermott MW, Prados MD, Parsa AT (2013) Individual Patient-Specific Immunity against High-Grade Glioma after Vaccination with Autologous Tumor Derived Peptides Bound to the 96 KD Chaperone Protein. *Clinical Cancer Research* 19 (1):205. doi:10.1158/1078-0432.CCR-11-3358
173. Li C, Du Y, Zhang Y, Ji N (2020) Immunotherapy with heat shock protein 96 to treat gliomas. *Chinese Neurosurgical Journal* 6 (1):31. doi:10.1186/s41016-020-00211-3
174. Bloch O, Lim M, Sughrue ME, Komotar RJ, Abrahams JM, O'Rourke DM, D'Ambrosio A, Bruce JN, Parsa AT (2017) Autologous Heat Shock Protein Peptide Vaccination for Newly Diagnosed Glioblastoma: Impact of Peripheral PD-L1 Expression on Response to Therapy. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 23 (14):3575-3584. doi:10.1158/1078-0432.CCR-16-1369
175. Shinagawa N, Yamazaki K, Tamura Y, Imai A, Kikuchi E, Yokouchi H, Hommura F, Oizumi S, Nishimura M (2008) Immunotherapy with dendritic cells pulsed with tumor-derived gp96 against murine lung cancer is effective through immune response of CD8 + cytotoxic T lymphocytes and

- natural killer cells. *Cancer Immunology, Immunotherapy* 57 (2):165-174. doi:10.1007/s00262-007-0359-3
176. Zeng Y, Feng H, Graner MW, Katsanis E (2003) Tumor-derived, chaperone-rich cell lysate activates dendritic cells and elicits potent antitumor immunity. *Blood* 101 (11):4485-4491. doi:10.1182/blood-2002-10-3108
177. Graner MW, Lillehei KO, Katsanis E (2015) Endoplasmic Reticulum Chaperones and Their Roles in the Immunogenicity of Cancer Vaccines. *Frontiers in Oncology* 4. doi:10.3389/fonc.2014.00379
178. Cantrell J, Larmonier C, Janikashvili N, Bustamante S, Fraszczak J, Herrell A, Lundeen T, J LaCasse C, Situ E, Larmonier N, Katsanis E (2010) Signaling pathways induced by a tumor-derived vaccine in antigen presenting cells. *Immunobiology* 215 (7):535-544. doi:10.1016/j.imbio.2009.09.006
179. Zeng Y, Chen X, Larmonier N, Larmonier C, Li G, Sepassi M, Marron M, Andreansky S, Katsanis E (2006) Natural killer cells play a key role in the antitumor immunity generated by chaperone-rich cell lysate vaccination. *International Journal of Cancer* 119 (11):2624-2631. doi:<https://doi.org/10.1002/ijc.22150>
180. Guo Q-Y, Yuan M, Peng J, Cui X-M, Song G, Sui X, Lu S-B (2011) Antitumor activity of mixed heat shock protein/peptide vaccine and cyclophosphamide plus interleukin-12 in mice sarcoma. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 30 (1):24. doi:10.1186/1756-9966-30-24
181. Li H, Sui X, Wang Z, Fu H, Wang Z, Yuan M, Liu S, Wang G, Guo Q (2021) A new antisarcoma strategy: multisubtype heat shock protein/peptide immunotherapy combined with PD-L1 immunological checkpoint inhibitors. *Clin Transl Oncol* 23 (8):1688-1704. doi:10.1007/s12094-021-02570-4
182. Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF, Weber RW, Sosman JA, Haanen JB, Gonzalez R, Robert C, Schadendorf D, Hassel JC, Akerley W, van den Eertwegh AJM, Lutzky J, Lorigan P, Vaubel JM, Linette GP, Hogg D, Ottensmeier CH, Lebbé C, Peschel C, Quirt I, Clark JI, Wolchok JD, Weber JS, Tian J, Yellin MJ, Nichol GM, Hoos A, Urba WJ (2010) Improved Survival with Ipilimumab in Patients with Metastatic Melanoma. *New England Journal of Medicine* 363 (8):711-723. doi:10.1056/NEJMoa1003466
183. Robert C (2020) A decade of immune-checkpoint inhibitors in cancer therapy. *Nature Communications* 11 (1):3801. doi:10.1038/s41467-020-17670-y
184. Marzec M, Zhang Q, Goradia A, Raghunath PN, Liu X, Paessler M, Wang HY, Wysocka M, Cheng M, Ruggeri BA, Wasik MA (2008) Oncogenic kinase NPM/ALK induces through STAT3 expression of immunosuppressive protein CD274 (PD-L1, B7-H1). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (52):20852-20857. doi:10.1073/pnas.0810958105
185. D'Arrigo P, Russo M, Rea A, Tufano M, Guadagno E, Del Basso De Caro ML, Pacelli R, Hausch F, Staibano S, Iardi G, Parisi S, Romano MF, Romano S (2017) A regulatory role for the co-chaperone FKBP51s in PD-L1 expression in glioma. *Oncotarget* 8 (40):68291-68304. doi:10.18632/oncotarget.19309
186. Song K-H, Oh SJ, Kim S, Cho H, Lee H-J, Song JS, Chung J-Y, Cho E, Lee J, Jeon S, Yee C, Lee K-M, Hewitt SM, Kim J-H, Woo SR, Kim TW (2020) HSP90A inhibition promotes anti-tumor immunity by reversing multi-modal resistance and stem-like property of immune-refractory tumors. *Nature Communications* 11 (1):562. doi:10.1038/s41467-019-14259-y
187. Proia DA, Kaufmann GF (2015) Targeting Heat-Shock Protein 90 (HSP90) as a Complementary Strategy to Immune Checkpoint Blockade for Cancer Therapy. *Cancer Immunology Research* 3 (6):583-589. doi:10.1158/2326-6066.Cir-15-0057
188. Mbofung RM, McKenzie JA, Malu S, Zhang M, Peng W, Liu C, Kuitse I, Tieu T, Williams L, Devi S, Ashkin E, Xu C, Huang L, Zhang M, Talukder AH, Tripathi SC, Khong H, Satani N, Muller FL, Roszik J, Heffernan T, Allison JP, Lizee G, Hanash SM, Proia D, Amaria R, Davis RE,

- Hwu P (2017) HSP90 inhibition enhances cancer immunotherapy by upregulating interferon response genes. *Nature Communications* 8 (1):451. doi:10.1038/s41467-017-00449-z
189. Chou C-W, Yang R-Y, Chan L-C, Li C-F, Sun L, Lee H-H, Lee P-C, Sher Y-P, Ying H, Hung M-C (2020) The stabilization of PD-L1 by the endoplasmic reticulum stress protein GRP78 in triple-negative breast cancer. *Am J Cancer Res* 10 (8):2621-2634
190. Majeti R, Chao MP, Alizadeh AA, Pang WW, Jaiswal S, Gibbs KD, Jr., van Rooijen N, Weissman IL (2009) CD47 is an adverse prognostic factor and therapeutic antibody target on human acute myeloid leukemia stem cells. *Cell* 138 (2):286-299. doi:10.1016/j.cell.2009.05.045
191. Chao MP, Alizadeh AA, Tang C, Myklebust JH, Varghese B, Gill S, Jan M, Cha AC, Chan CK, Tan BT, Park CY, Zhao F, Kohrt HE, Malumbres R, Briones J, Gascoyne RD, Lossos IS, Levy R, Weissman IL, Majeti R (2010) Anti-CD47 antibody synergizes with rituximab to promote phagocytosis and eradicate non-Hodgkin lymphoma. *Cell* 142 (5):699-713. doi:10.1016/j.cell.2010.07.044
192. McCracken MN, Cha AC, Weissman IL (2015) Molecular Pathways: Activating T Cells after Cancer Cell Phagocytosis from Blockade of CD47 "Don't Eat Me" Signals. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 21 (16):3597-3601. doi:10.1158/1078-0432.CCR-14-2520
193. Advani R, Flinn I, Popplewell L, Forero A, Bartlett NL, Ghosh N, Kline J, Roschewski M, LaCasce A, Collins GP, Tran T, Lynn J, Chen JY, Volkmer J-P, Agoram B, Huang J, Majeti R, Weissman IL, Takimoto CH, Chao MP, Smith SM (2018) CD47 Blockade by Hu5F9-G4 and Rituximab in Non-Hodgkin's Lymphoma. *New England Journal of Medicine* 379 (18):1711-1721. doi:10.1056/NEJMoa1807315
194. Cook KL, Soto-Pantoja DR (2017) "UPRegulation" of CD47 by the endoplasmic reticulum stress pathway controls anti-tumor immune responses. *Biomarker Research* 5 (1):26. doi:10.1186/s40364-017-0105-8
195. Cook KL, Soto-Pantoja DR, Clarke PAG, Cruz MI, Zwart A, Wärrri A, Hilakivi-Clarke L, Roberts DD, Clarke R (2016) Endoplasmic Reticulum Stress Protein GRP78 Modulates Lipid Metabolism to Control Drug Sensitivity and Antitumor Immunity in Breast Cancer. *Cancer research* 76 (19):5657-5670. doi:10.1158/0008-5472.CAN-15-2616
196. Casey SC, Tong L, Li Y, Do R, Walz S, Fitzgerald KN, Gouw AM, Baylot V, Gütgemann I, Eilers M, Felsher DW (2016) MYC regulates the antitumor immune response through CD47 and PD-L1. *Science (New York, NY)* 352 (6282):227-231. doi:10.1126/science.aac9935
197. Lee J, Zhang LL, Wu W, Guo H, Li Y, Sukhanova M, Venkataraman G, Huang S, Zhang H, Alikhan M, Lu P, Guo A, Galanina N, Andrade J, Wang ML, Wang YL (2018) Activation of MYC, a bona fide client of HSP90, contributes to intrinsic ibrutinib resistance in mantle cell lymphoma. *Blood Adv* 2 (16):2039-2051. doi:10.1182/bloodadvances.2018016048
198. Waldman AD, Fritz JM, Lenardo MJ (2020) A guide to cancer immunotherapy: from T cell basic science to clinical practice. *Nature Reviews Immunology* 20 (11):651-668. doi:10.1038/s41577-020-0306-5
199. Southam CM, Brunschwig A, Levin AG, Dizon QS (1966) Effect of leukocytes on transplantability of human cancer. *Cancer* 19 (11):1743-1753. doi:10.1002/1097-0142(196611)19:11<1743::aid-cnrcr2820191143>3.0.co;2-u
200. Franks SE, Wolfson B, Hodge JW (2020) Natural Born Killers: NK Cells in Cancer Therapy. *Cancers (Basel)* 12 (8). doi:10.3390/cancers12082131
201. Stangl S, Gross C, Pockley AG, Asea AA, Multhoff G (2008) Influence of Hsp70 and HLA-E on the killing of leukemic blasts by cytokine/Hsp70 peptide-activated human natural killer (NK) cells. *Cell Stress Chaperones* 13 (2):221-230. doi:10.1007/s12192-007-0008-y
202. Hromadnikova I, Li S, Kotlabova K, Dickinson AM (2016) Influence of In Vitro IL-2 or IL-15 Alone or in Combination with Hsp 70 Derived 14-Mer Peptide (TKD) on the Expression of NK Cell Activatory and Inhibitory Receptors on Peripheral Blood T Cells, B Cells and NKT Cells. *PLoS one* 11 (3):e0151535-e0151535. doi:10.1371/journal.pone.0151535

203. Gehrman M, Marienhagen J, Eichholtz-Wirth H, Fritz E, Ellwart J, Jäättelä M, Zilch T, Multhoff G (2005) Dual function of membrane-bound heat shock protein 70 (Hsp70), Bag-4, and Hsp40: protection against radiation-induced effects and target structure for natural killer cells. *Cell Death & Differentiation* 12 (1):38-51. doi:10.1038/sj.cdd.4401510
204. Multhoff G, Botzler C, Wiesnet M, Muller E, Meier T, Wilmanns W, Issels RD (1995) A stress-inducible 72-kDa heat-shock protein (HSP72) is expressed on the surface of human tumor cells, but not on normal cells. *Int J Cancer* 61 (2):272-279. doi:10.1002/ijc.2910610222
205. Botzler C, Schmidt J, Luz A, Jennen L, Issels R, Multhoff G (1998) Differential Hsp70 plasma-membrane expression on primary human tumors and metastases in mice with severe combined immunodeficiency. *International Journal of Cancer* 77 (6):942-948. doi:[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0215\(19980911\)77:6<942::AID-IJC25>3.0.CO;2-1](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0215(19980911)77:6<942::AID-IJC25>3.0.CO;2-1)
206. Multhoff G, Seier S, Stangl S, Sievert W, Shevtsov M, Werner C, Pockley AG, Blankenstein C, Hildebrandt M, Offner R, Ahrens N, Kokowski K, Hautmann M, Rödel C, Fietkau R, Lubgan D, Huber R, Hautmann H, Duell T, Molls M, Specht H, Haller B, Devecka M, Sauter A, Combs SE (2020) Targeted Natural Killer Cell–Based Adoptive Immunotherapy for the Treatment of Patients with NSCLC after Radiochemotherapy: A Randomized Phase II Clinical Trial. *Clinical Cancer Research* 26 (20):5368. doi:10.1158/1078-0432.CCR-20-1141
207. Sterner RC, Sterner RM (2021) CAR-T cell therapy: current limitations and potential strategies. *Blood Cancer Journal* 11 (4):69. doi:10.1038/s41408-021-00459-7
208. Smith J VJ, Juillerat A, Duchateau P, Sasu B J, Rajpal A (2016) Anti-hsp70 specific chimeric antigen receptors (CARs) for cancer immunotherapy (US Patent No.US20180000914A1). US Patent,
209. Zhang P, Leu JIJ, Murphy ME, George DL, Marmorstein R (2014) Crystal Structure of the Stress-Inducible Human Heat Shock Protein 70 Substrate-Binding Domain in Complex with Peptide Substrate. *PLOS ONE* 9 (7):e103518. doi:10.1371/journal.pone.0103518
210. Lim S, Cho HY, Kim DG, Roh Y, Son SY, Mushtaq AU, Kim M, Bhattarai D, Sivaraman A, Lee Y, Lee J, Yang WS, Kim HK, Kim MH, Lee K, Jeon YH, Kim S (2019) Targeting the interaction of AIMP2-DX2 with HSP70 suppresses cancer development. *Nat Chem Biol*. doi:10.1038/s41589-019-0415-2
211. Shida M, Arakawa A, Ishii R, Kishishita S, Takagi T, Kukimoto-Niino M, Sugano S, Tanaka A, Shirouzu M, Yokoyama S (2010) Direct inter-subdomain interactions switch between the closed and open forms of the Hsp70 nucleotide-binding domain in the nucleotide-free state. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 66 (Pt 3):223-232. doi:10.1107/s0907444909053979
212. Umehara K, Hoshikawa M, Tochio N, Tate S-i (2018) Substrate Binding Switches the Conformation at the Lynchpin Site in the Substrate-Binding Domain of Human Hsp70 to Enable Allosteric Interdomain Communication. *Molecules* 23 (3). doi:10.3390/molecules23030528
213. Cheeseman MD, Westwood IM, Barbeau O, Rowlands M, Dobson S, Jones AM, Jeganathan F, Burke R, Kadi N, Workman P, Collins I, van Montfort RL, Jones K (2016) Exploiting Protein Conformational Change to Optimize Adenosine-Derived Inhibitors of HSP70. *J Med Chem* 59 (10):4625-4636. doi:10.1021/acs.jmedchem.5b02001
214. Arakawa A, Handa N, Ohsawa N, Shida M, Kigawa T, Hayashi F, Shirouzu M, Yokoyama S (2010) The C-terminal BAG domain of BAG5 induces conformational changes of the Hsp70 nucleotide-binding domain for ADP-ATP exchange. *Structure* 18 (3):309-319. doi:10.1016/j.str.2010.01.004
215. Gao X-C, Zhou C-J, Zhou Z-R, Wu M, Cao C-Y, Hu H-Y (2012) The C-terminal Helices of Heat Shock Protein 70 Are Essential for J-domain Binding and ATPase Activation. *Journal of Biological Chemistry* 287 (8):6044-6052
216. Arakawa A, Handa N, Shirouzu M, Yokoyama S (2011) Biochemical and structural studies on the high affinity of Hsp70 for ADP. *Protein Sci* 20 (8):1367-1379. doi:10.1002/pro.663
217. Hassan AQ, Kirby CA, Zhou W, Schuhmann T, Kityk R, Kipp DR, Baird J, Chen J, Chen Y, Chung F, Hoepfner D, Movva NR, Pagliarini R, Petersen F, Quinn C, Quinn D, Riedl R, Schmitt

- EK, Schitter A, Stams T, Studer C, Fortin PD, Mayer MP, Sadlish H (2015) The novolactone natural product disrupts the allosteric regulation of Hsp70. *Chem Biol* 22 (1):87-97. doi:10.1016/j.chembiol.2014.11.007
218. Jones AM, Westwood IM, Osborne JD, Matthews TP, Cheeseman MD, Rowlands MG, Jeganathan F, Burke R, Lee D, Kadi N, Liu M, Richards M, McAndrew C, Yahya N, Dobson SE, Jones K, Workman P, Collins I, van Montfort RL (2016) A fragment-based approach applied to a highly flexible target: Insights and challenges towards the inhibition of HSP70 isoforms. *Sci Rep* 6:34701. doi:10.1038/srep34701
219. Osipiuk J, Walsh MA, Freeman BC, Morimoto RI, Joachimiak A (1999) Structure of a new crystal form of human Hsp70 ATPase domain. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 55 (Pt 5):1105-1107
220. Ravalin M, Theofilas P, Basu K, Opoku-Nsiah KA, Assimon VA, Medina-Cleghorn D, Chen YF, Bohn MF, Arkin M, Grinberg LT, Craik CS, Gestwicki JE (2019) Specificity for latent C termini links the E3 ubiquitin ligase CHIP to caspases. *Nat Chem Biol* 15 (8):786-794. doi:10.1038/s41589-019-0322-6
221. Sriram M, Osipiuk J, Freeman B, Morimoto R, Joachimiak A (1997) Human Hsp70 molecular chaperone binds two calcium ions within the ATPase domain. *Structure* 5 (3):403-414
222. An HJ, Kim YJ, Song DH, Park BS, Kim HM, Lee JD, Paik SG, Lee JO, Lee H (2011) Crystallographic and mutational analysis of the CD40-CD154 complex and its implications for receptor activation. *J Biol Chem* 286 (13):11226-11235. doi:10.1074/jbc.M110.208215
223. Argiriadi MA, Benatuil L, Dubrovskaya I, Egan DA, Gao L, Greischar A, Hardman J, Harlan J, Iyer RB, Judge RA, Lake M, Perron DC, Sadhukhan R, Sielaff B, Sousa S, Wang R, McRae BL (2019) CD40/anti-CD40 antibody complexes which illustrate agonist and antagonist structural switches. *BMC Mol Cell Biol* 20 (1):29. doi:10.1186/s12860-019-0213-4
224. Basu S, Yang J, Xu B, Magiera-Mularz K, Skalniak L, Musielak B, Kholodovych V, Holak TA, Hu L (2019) Design, Synthesis, Evaluation, and Structural Studies of C2-Symmetric Small Molecule Inhibitors of Programmed Cell Death-1/Programmed Death-Ligand 1 Protein-Protein Interaction. *J Med Chem*. doi:10.1021/acs.jmedchem.9b00795
225. Cheng TC, Hong C, Akey IV, Yuan S, Akey CW (2016) A near atomic structure of the active human apoptosome. *Elife* 5. doi:10.7554/eLife.17755
226. Deng L, Langley RJ, Brown PH, Xu G, Teng L, Wang Q, Gonzales MI, Callender GG, Nishimura MI, Topalian SL, Mariuzza RA (2007) Structural basis for the recognition of mutant self by a tumor-specific, MHC class II-restricted T cell receptor. *Nat Immunol* 8 (4):398-408. doi:10.1038/ni1447
227. Dong, Zheng L, Lin J, Zhang B, Zhu Y, Li N, Xie S, Wang Y, Gao N, Huang Z (2019) Structural basis of assembly of the human T cell receptor-CD3 complex. *Nature* 573 (7775):546-552. doi:10.1038/s41586-019-1537-0
228. Evans EJ, Esnouf RM, Manso-Sancho R, Gilbert RJ, James JR, Yu C, Fennelly JA, Vowles C, Hanke T, Walse B, Hunig T, Sorensen P, Stuart DI, Davis SJ (2005) Crystal structure of a soluble CD28-Fab complex. *Nat Immunol* 6 (3):271-279. doi:10.1038/ni1170
229. Forneris F, Wu J, Xue X, Ricklin D, Lin Z, Sfyroera G, Tzekou A, Volokhina E, Granneman JC, Hauhart R, Bertram P, Liszewski MK, Atkinson JP, Lambris JD, Gros P (2016) Regulators of complement activity mediate inhibitory mechanisms through a common C3b-binding mode. *Embo j* 35 (10):1133-1149. doi:10.15252/embj.201593673
230. Ikemizu S, Gilbert RJ, Fennelly JA, Collins AV, Harlos K, Jones EY, Stuart DI, Davis SJ (2000) Structure and dimerization of a soluble form of B7-1. *Immunity* 12 (1):51-60
231. Leahy DJ, Axel R, Hendrickson WA (1992) Crystal structure of a soluble form of the human T cell coreceptor CD8 at 2.6 Å resolution. *Cell* 68 (6):1145-1162
232. Lopez-Lucendo MF, Solis D, Andre S, Hirabayashi J, Kasai K, Kaltner H, Gabius HJ, Romero A (2004) Growth-regulatory human galectin-1: crystallographic characterisation of the structural

- changes induced by single-site mutations and their impact on the thermodynamics of ligand binding. *J Mol Biol* 343 (4):957-970. doi:10.1016/j.jmb.2004.08.078
233. Madden DR, Garboczi DN, Wiley DC (1993) The antigenic identity of peptide-MHC complexes: a comparison of the conformations of five viral peptides presented by HLA-A2. *Cell* 75 (4):693-708
234. McFarland BJ, Kortemme T, Yu SF, Baker D, Strong RK (2003) Symmetry recognizing asymmetry: analysis of the interactions between the C-type lectin-like immunoreceptor NKG2D and MHC class I-like ligands. *Structure* 11 (4):411-422
235. Park BS, Song DH, Kim HM, Choi BS, Lee H, Lee JO (2009) The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex. *Nature* 458 (7242):1191-1195. doi:10.1038/nature07830
236. Porter J, Payne A, de Candole B, Ford D, Hutchinson B, Trevitt G, Turner J, Edwards C, Watkins C, Whitcombe I, Davis J, Stubberfield C (2009) Tetrahydroisoquinoline amide substituted phenyl pyrazoles as selective Bcl-2 inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* 19 (1):230-233. doi:10.1016/j.bmcl.2008.10.113
237. Santiago C, Celma ML, Stehle T, Casanovas JM (2010) Structure of the measles virus hemagglutinin bound to the CD46 receptor. *Nat Struct Mol Biol* 17 (1):124-129. doi:10.1038/nsmb.1726
238. Schulze MS, Anders AK, Sethi DK, Call MJ (2013) Disruption of hydrogen bonds between major histocompatibility complex class II and the peptide N-terminus is not sufficient to form a human leukocyte antigen-DM receptive state of major histocompatibility complex class II. *PLoS One* 8 (7):e69228. doi:10.1371/journal.pone.0069228
239. Sharif H, Wang L, Wang WL, Magupalli VG, Andreeva L, Qiao Q, Hauenstein AV, Wu Z, Nunez G, Mao Y, Wu H (2019) Structural mechanism for NEK7-licensed activation of NLRP3 inflammasome. *Nature* 570 (7761):338-343. doi:10.1038/s41586-019-1295-z
240. Solis D, Mate MJ, Lohr M, Ribeiro JP, Lopez-Merino L, Andre S, Buzamet E, Canada FJ, Kaltner H, Lensch M, Ruiz FM, Haroske G, Wollina U, Kloor M, Kopitz J, Saiz JL, Menendez M, Jimenez-Barbero J, Romero A, Gabius HJ (2010) N-domain of human adhesion/growth-regulatory galectin-9: preference for distinct conformers and non-sialylated N-glycans and detection of ligand-induced structural changes in crystal and solution. *Int J Biochem Cell Biol* 42 (6):1019-1029. doi:10.1016/j.biocel.2010.03.007
241. Su L, Wang Y, Wang J, Mifune Y, Morin MD, Jones BT, Moresco EMY, Boger DL, Beutler B, Zhang H (2019) Structural Basis of TLR2/TLR1 Activation by the Synthetic Agonist Diprovoicim. *J Med Chem* 62 (6):2938-2949. doi:10.1021/acs.jmedchem.8b01583
242. Sullivan LC, Clements CS, Beddoe T, Johnson D, Hoare HL, Lin J, Huyton T, Hopkins EJ, Reid HH, Wilce MC, Kabat J, Borrego F, Coligan JE, Rossjohn J, Brooks AG (2007) The heterodimeric assembly of the CD94-NKG2 receptor family and implications for human leukocyte antigen-E recognition. *Immunity* 27 (6):900-911. doi:10.1016/j.immuni.2007.10.013
243. Wu H, Myszka DG, Tendian SW, Brouillette CG, Sweet RW, Chaiken IM, Hendrickson WA (1996) Kinetic and structural analysis of mutant CD4 receptors that are defective in HIV gp120 binding. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93 (26):15030-15035
244. Yoshida H, Teraoka M, Nishi N, Nakakita S, Nakamura T, Hirashima M, Kamitori S (2010) X-ray structures of human galectin-9 C-terminal domain in complexes with a biantennary oligosaccharide and sialyllactose. *J Biol Chem* 285 (47):36969-36976. doi:10.1074/jbc.M110.163402
245. Zhang X, Schwartz JC, Almo SC, Nathenson SG (2003) Crystal structure of the receptor-binding domain of human B7-2: insights into organization and signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 (5):2586-2591. doi:10.1073/pnas.252771499
246. Fedorov AA Crystal structure of T cell costimulatory ligand B7-1 (CD80). <http://www.rcsb.org/structure/4RWH>,
247. Le Nours JR, J. (2019) Recognition of MHC-like molecule. doi:10.2210/pdb6MWR/pdb

248. Pierce BG, Hourai Y, Weng Z (2011) Accelerating protein docking in ZDOCK using an advanced 3D convolution library. *PLoS One* 6 (9):e24657. doi:10.1371/journal.pone.0024657
249. Pierce B, Weng Z (2007) ZRANK: reranking protein docking predictions with an optimized energy function. *Proteins* 67 (4):1078-1086. doi:10.1002/prot.21373
250. Zhang C, Leng W, Sun C, Lu T, Chen Z, Men X, Wang Y, Wang G, Zhen B, Qin J (2018) Urine Proteome Profiling Predicts Lung Cancer from Control Cases and Other Tumors. *EBioMedicine* 30:120-128. doi:10.1016/j.ebiom.2018.03.009
251. Dolgun A, Demirhan H (2017) Performance of nonparametric multiple comparison tests under heteroscedasticity, dependency, and skewed error distribution. *Communications in Statistics - Simulation and Computation* 46 (7):5166-5183. doi:10.1080/03610918.2016.1146761
252. Blakesley RE, Mazumdar S, Dew MA, Houck PR, Tang G, Reynolds Iii CF, Butters MA (2009) Comparisons of methods for multiple hypothesis testing in neuropsychological research. doi:10.1037/a0012850, American Psychological Association, US
253. van Dongen JJM, Langerak AW, Brüggemann M, Evans PAS, Hummel M, Lavender FL, Delabesse E, Davi F, Schuurin E, García-Sanz R, van Krieken JHJM, Droese J, González D, Bastard C, White HE, Spaargaren M, González M, Parreira A, Smith JL, Morgan GJ, Kneba M, Macintyre EA (2003) Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: Report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia* 17 (12):2257-2317. doi:10.1038/sj.leu.2403202
254. Al-Hubeshy ZB, Coleman A, Nelson M, Goodier MR (2011) A rapid method for assessment of natural killer cell function after multiple receptor crosslinking. *Journal of Immunological Methods* 366 (1):52-59. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jim.2011.01.007>
255. Rigo MM, Borges TJ, Lang BJ, Murshid A, N, Wolfgeher D, Calderwood SK, Truman AW, Bonorino C (2020) Host expression system modulates recombinant Hsp70 activity through post-translational modifications. *The FEBS Journal* 287 (22):4902-4916. doi:<https://doi.org/10.1111/febs.15279>
256. Kampinga HH, Craig EA (2010) The HSP70 chaperone machinery: J proteins as drivers of functional specificity. *Nature reviews Molecular cell biology* 11 (8):579-592. doi:10.1038/nrm2941
257. Shi Y, Liu X, Lou J, Han X, Zhang L, Wang Q, Li B, Dong M, Zhang Y (2014) Plasma Levels of Heat Shock Protein 90 Alpha Associated with Lung Cancer Development and Treatment Responses. *Clinical Cancer Research* 20 (23):6016. doi:10.1158/1078-0432.CCR-14-0174
258. Fu Y, Xu X, Huang D, Cui D, Liu L, Liu J, He Z, Liu J, Zheng S, Luo Y (2017) Plasma Heat Shock Protein 90alpha as a Biomarker for the Diagnosis of Liver Cancer: An Official, Large-scale, and Multicenter Clinical Trial. *EBioMedicine* 24:56-63. doi:10.1016/j.ebiom.2017.09.007
259. Tas F, Bilgin E, Erturk K, Duranyildiz D (2017) Clinical Significance of Circulating Serum Cellular Heat Shock Protein 90 (HSP90) Level in Patients with Cutaneous Malignant Melanoma. *Asian Pac J Cancer Prev* 18 (3):599-601. doi:10.22034/APJCP.2017.18.3.599
260. Sun Y, Zang Z, Xu X, Zhang Z, Zhong L, Zan W, Zhao Y, Sun L (2010) Differential proteomics identification of HSP90 as potential serum biomarker in hepatocellular carcinoma by two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry. *Int J Mol Sci* 11 (4):1423-1433. doi:10.3390/ijms11041423
261. Fredly H, Reikvam H, Gjertsen BT, Bruserud Ø (2012) Disease-stabilizing treatment with all-trans retinoic acid and valproic acid in acute myeloid leukemia: Serum hsp70 and hsp90 levels and serum cytokine profiles are determined by the disease, patient age, and anti-leukemic treatment. *American Journal of Hematology* 87 (4):368-376. doi:10.1002/ajh.23116
262. Seiwert TY, Tretiakova M, Ma PC, Khaleque MA, Husain AN, Ladanyi A, Chen LB, Bharti A, Salgia R (2005) Heat shock protein (HSP) overexpression in lung cancer and potential as a therapeutic target. *Cancer Research* 65 (9 Supplement):559
263. Gráf L, Barabás L, Madaras B, Garam N, Maláti É, Horváth L, Prohászka Z, Horváth Z, Kocsis J (2018) High serum Hsp70 level predicts poor survival in colorectal cancer: Results

- obtained in an independent validation cohort. *Cancer Biomarkers* 23:539-547. doi:10.3233/CBM-181683
264. Gunaldi M, Afsar CU, Okuturlar Y, Gedikbasi A, Kocoglu H, Kural A, Akarsu C, Gunduz U, Tiken EE (2015) Elevated Serum Levels of Heat Shock Protein 70 Are Associated with Breast Cancer. *The Tohoku Journal of Experimental Medicine* 236 (2):97-102. doi:10.1620/tjem.236.97
265. Ostheimer C, Gunther S, Bache M, Vordermark D, Multhoff G (2017) Dynamics of Heat Shock Protein 70 Serum Levels As a Predictor of Clinical Response in Non-Small-Cell Lung Cancer and Correlation with the Hypoxia-Related Marker Osteopontin. *Front Immunol* 8:1305. doi:10.3389/fimmu.2017.01305
266. Chanteloup G, Cordonnier M, Isambert N, Bertaut A, Hervieu A, Hennequin A, Luu M, Zanetta S, Coudert B, Bengrine L, Desmoulins I, Favier L, Lagrange A, Pages P-B, Gutierrez I, Lherminier J, Avoscan L, Jankowski C, Rébé C, Chevriaux A, Padeano M-M, Coutant C, Ladoire S, Causeret S, Arnould L, Charon-Barra C, Cottet V, Blanc J, Binquet C, Bardou M, Garrido C, Gobbo J (2020) Monitoring HSP70 exosomes in cancer patients' follow up: a clinical prospective pilot study. *J Extracell Vesicles* 9 (1):1766192-1766192. doi:10.1080/20013078.2020.1766192
267. Pfister K, Radons J, Busch R, Tidball JG, Pfeifer M, Freitag L, Feldmann HJ, Milani V, Issels R, Multhoff G (2007) Patient survival by Hsp70 membrane phenotype: association with different routes of metastasis. *Cancer* 110 (4):926-935. doi:10.1002/cncr.22864
268. Farkas B, Hantschel M, Magyarlaki M, Becker B, Scherer K, Landthaler M, Pfister K, Gehrman M, Gross C, Mackensen A, Multhoff G (2003) Heat shock protein 70 membrane expression and melanoma-associated marker phenotype in primary and metastatic melanoma. *Melanoma Research* 13 (2)
269. Steiner K, Graf M, Hecht K, Reif S, Rossbacher L, Pfister K, Kolb HJ, Schmetzer HM, Multhoff G (2006) High HSP70-membrane expression on leukemic cells from patients with acute myeloid leukemia is associated with a worse prognosis. *Leukemia* 20 (11):2076-2079. doi:10.1038/sj.leu.2404391
270. Gehrman M, Specht HM, Bayer C, Brandstetter M, Chizzali B, Duma M, Breuninger S, Hube K, Lehnerer S, van Phi V, Sage E, Schmid TE, Sedelmayr M, Schilling D, Sievert W, Stangl S, Multhoff G (2014) Hsp70--a biomarker for tumor detection and monitoring of outcome of radiation therapy in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Radiation oncology (London, England)* 9:131-131. doi:10.1186/1748-717X-9-131
271. Gobbo J, Marcion G, Cordonnier M, Dias AMM, Pernet N, Hammann A, Richaud S, Mjahed H, Isambert N, Clause V, Rébé C, Bertaut A, Goussot V, Lirussi F, Ghiringhelli F, de Thonel A, Fumoleau P, Seigneuric R, Garrido C (2016) Restoring Anticancer Immune Response by Targeting Tumor-Derived Exosomes With a HSP70 Peptide Aptamer. *J Natl Cancer Inst* 108 (3). doi:10.1093/jnci/djv330
272. Korneeva I, Bongiovanni AM, Girotra M, Caputo TA, Witkin SS (2000) Serum antibodies to the 27-kd heat shock protein in women with gynecologic cancers. *American Journal of Obstetrics & Gynecology* 183 (1):18-21. doi:10.1067/mob.2000.105431
273. Olejek A, Damasiewicz-Bodzek A, Bodzek P, Wielkoszyński T, Zamłyński J, Stołtny P, Skutil M (2009) Concentrations of Antibodies Against Heat Shock Protein 27 in the Sera of Women With Ovarian Carcinoma. *International journal of gynecological cancer : official journal of the International Gynecological Cancer Society* 19:1516-1520. doi:10.1111/IGC.0b013e3181bf425b
274. Banerjee S, Lin C-FL, Skinner KA, Schiffhauer LM, Peacock J, Hicks DG, Redmond EM, Morrow D, Huston A, Shayne M, Langstein HN, Miller-Graziano CL, Strickland J, Donoghue L, De AK (2011) Heat Shock Protein 27 Differentiates Tolerogenic Macrophages That May Support Human Breast Cancer Progression. *Cancer Research* 71 (2):318. doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-1778
275. Zhao M, Ding JX, Zeng K, Zhao J, Shen F, Yin YX, Chen Q (2014) Heat shock protein 27: a potential biomarker of peritoneal metastasis in epithelial ovarian cancer? *Tumor Biology* 35 (2):1051-1056. doi:10.1007/s13277-013-1139-7

276. Wyciszkievicz A, Kalinowska-Łyszczarz A, Nowakowski B, Kaźmierczak K, Osztynowicz K, Michalak S (2019) Expression of small heat shock proteins in exosomes from patients with gynecologic cancers. *Scientific Reports* 9 (1):9817. doi:10.1038/s41598-019-46221-9
277. Hamelin C, Cornut E, Poirier F, Pons S, Beaulieu C, Charrier J-P, Häidous H, Cotte E, Lambert C, Piard F, Ataman-Önal Y, Choquet-Kastylevsky G (2011) Identification and verification of heat shock protein 60 as a potential serum marker for colorectal cancer. *The FEBS journal* 278 (24):4845-4859. doi:10.1111/j.1742-4658.2011.08385.x
278. Campanella C, Rappa F, Sciumè C, Marino Gammazza A, Barone R, Bucchieri F, David S, Curcurù G, Caruso Bavisotto C, Pitruzzella A, Geraci G, Modica G, Farina F, Zummo G, Fais S, Conway de Macario E, Macario AJL, Cappello F (2015) Heat shock protein 60 levels in tissue and circulating exosomes in human large bowel cancer before and after ablative surgery. *Cancer* 121 (18):3230-3239. doi:10.1002/cncr.29499
279. Ferris DK, Harel-Bellan A, Morimoto RI, Welch WJ, Farrar WL (1988) Mitogen and lymphokine stimulation of heat shock proteins in T lymphocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 85 (11):3850-3854. doi:doi:10.1073/pnas.85.11.3850
280. Youn J-I, Park S-M, Park S, Kim G, Lee H-J, Son J, Hong MH, Ghaderpour A, Baik B, Islam J, Choi J-W, Lee E-Y, Kim H-R, Seo S-U, Paik S, Yoon HI, Jung I, Xin C-F, Jin H-T, Cho BC, Seong S-Y, Ha S-J, Kim HR (2020) Peripheral natural killer cells and myeloid-derived suppressor cells correlate with anti-PD-1 responses in non-small cell lung cancer. *Scientific Reports* 10 (1):9050. doi:10.1038/s41598-020-65666-x
281. Calderwood SK, Gong J (2016) Heat Shock Proteins Promote Cancer: It's a Protection Racket. *Trends in biochemical sciences* 41 (4):311-323. doi:10.1016/j.tibs.2016.01.003
282. Kluger HM, Chelouche Lev D, Kluger Y, McCarthy MM, Kiriakova G, Camp RL, Rimm DL, Price JE (2005) Using a Xenograft Model of Human Breast Cancer Metastasis to Find Genes Associated with Clinically Aggressive Disease. *Cancer Research* 65 (13):5578. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-0108
283. Balogi Z, Multhoff G, Jensen TK, Lloyd-Evans E, Yamashima T, Jäättelä M, Harwood JL, Vígh L (2019) Hsp70 interactions with membrane lipids regulate cellular functions in health and disease. *Progress in Lipid Research* 74:18-30. doi:<https://doi.org/10.1016/j.plipres.2019.01.004>
284. Juhasz K, Lipp A-M, Nimmervoll B, Sonnleitner A, Hesse J, Haselgruebler T, Balogi Z (2013) The complex function of hsp70 in metastatic cancer. *Cancers (Basel)* 6 (1):42-66. doi:10.3390/cancers6010042
285. Klimczak M, Biecek P, Zylicz A, Zylicz M (2019) Heat shock proteins create a signature to predict the clinical outcome in breast cancer. *Scientific Reports* 9 (1):7507. doi:10.1038/s41598-019-43556-1
286. Wang L, Fu Y, Yu B, Jiang X, Liu H, Liu J, Zha B, Chu Y (2021) HSP70, a Novel Regulatory Molecule in B Cell-Mediated Suppression of Autoimmune Diseases. *Journal of Molecular Biology* 433 (1):166634. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2020.08.019>
287. Trojandt S, Reske-Kunz AB, Bros M (2014) Geldanamycin-mediated inhibition of heat shock protein 90 partially activates dendritic cells, but interferes with their full maturation, accompanied by impaired upregulation of RelB. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 33 (1):16. doi:10.1186/1756-9966-33-16
288. Huyan T, Li Q, Dong D-D, Yang H, Zhang J, Huang Q-S, Yin D-C, Shang P (2016) Heat shock protein 90 inhibitors induce functional inhibition of human natural killer cells in a dose-dependent manner. *Immunopharmacology and Immunotoxicology* 38 (2):77-86. doi:10.3109/08923973.2015.1119159
289. Mah AY, Cooper MA (2016) Metabolic Regulation of Natural Killer Cell IFN- γ Production. *Crit Rev Immunol* 36 (2):131-147. doi:10.1615/CritRevImmunol.2016017387
290. Wang Z, Guan D, Wang S, Chai LYA, Xu S, Lam K-P (2020) Glycolysis and Oxidative Phosphorylation Play Critical Roles in Natural Killer Cell Receptor-Mediated Natural Killer Cell Functions. *Frontiers in Immunology* 11. doi:10.3389/fimmu.2020.00202

291. Sciacovelli M, Guzzo G, Morello V, Frezza C, Zheng L, Nannini N, Calabrese F, Laudiero G, Esposito F, Landriscina M, Defilippi P, Bernardi P, Rasola A (2013) The mitochondrial chaperone TRAP1 promotes neoplastic growth by inhibiting succinate dehydrogenase. *Cell Metab* 17 (6):988-999. doi:10.1016/j.cmet.2013.04.019
292. Yoshida S, Tsutsumi S, Muhlebach G, Sourbier C, Lee M-J, Lee S, Vartholomaiou E, Tatokoro M, Beebe K, Miyajima N, Mohny RP, Chen Y, Hasumi H, Xu W, Fukushima H, Nakamura K, Koga F, Kihara K, Trepel J, Picard D, Neckers L (2013) Molecular chaperone TRAP1 regulates a metabolic switch between mitochondrial respiration and aerobic glycolysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (17):E1604-E1612. doi:10.1073/pnas.1220659110

Приложение 1

Таблица S1. Молекулы, используемые для молекулярного докинга

Домены		PDB ID	Цепи, выбранные для докинга
SBD в комплексе		4PO2 [209]	A
		6JPV [210]	A
SBD в свободной форме		5XI9 [212]	A
NBD в комплексе		2E8A [211]	A
		3ATU [216]	A
		5AQZ [213]	A
NBD в свободной форме		2E88 [211]	A
Рецепторы иммунной системы	TLR	TLR1: 6NIH [241]	A
		TLR2: 6NIG [241]	A
		TLR4: 3FXI [235]	A
	NK-клеточные рецепторы	NKG2A: 3BDW [242]	A
		NKG2D: 1MPU [234]	A
	TCR	TCR $\alpha\beta$: 6JXR [227]	D E F G M N
		TCR $\gamma\delta$: 6MWR [247]	C D
	Nod-подобные рецепторы	NLRP3: 6NPY [239]	A
	Рецепторы комплемента	CD46: 3INB[237]	C
		CD46: 5FO8[229]	C
Иммунные ко-рецепторы		CD80: 1DR9[230]	A
		CD80: 4RWH [246]	

	CD86:1NCN [245]	A
	CD40: 3QD6 [222]	S
	CD40: 6PE9 [223]	G
	CD28: 1YJD [228]	C
	PD-L1: 6RPG [224]	A
	CD4: 1CDJ [243]	A
	CD8: 1CD8 [231]	A
Антиген-презентирующие молекулы	MHC I: 1HHJ [233]	A
	MHC II: 4I5B [238]	A B
	MHC II: 2IAN [226]	A B
Галектины	Galectin-1: 1GZW[232]	A
	Galectin-9: 3LSD [240]	A
	Galectin-9:3NV1 [244]	A
Молекулы апоптоза клеток	Bcl-2: 2W3L [236]	A
	Apoptosome: 5JUY[225]	B I

Приложение 2

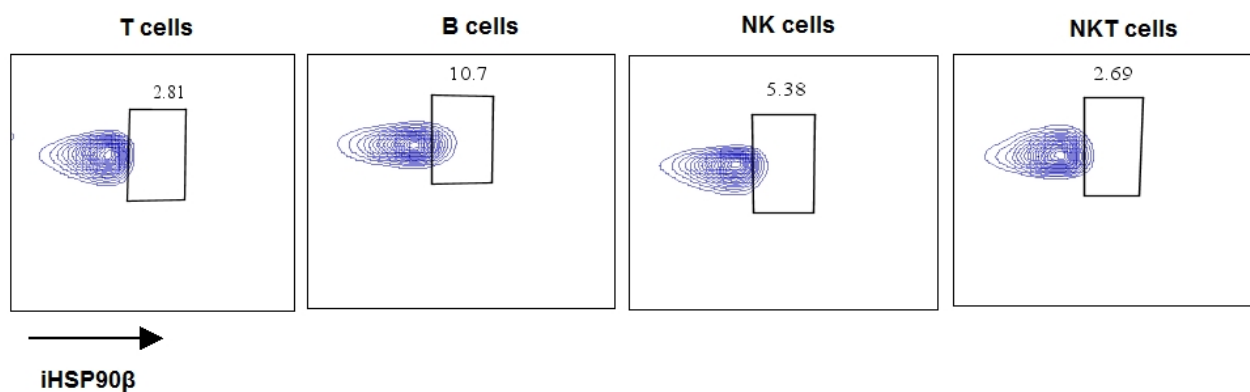


Рис S1. Репрезентативные графики экспрессии iHSP90β в лимфоцитах периферической крови пациента с ЛХ. Экспрессия iHSP90β в Т-клетках (CD3⁺CD56⁻), В-клетках (CD19⁺CD3⁻), NK-клетках (CD3⁻CD56⁺) и NKT-клетках (CD3⁺CD56⁺).

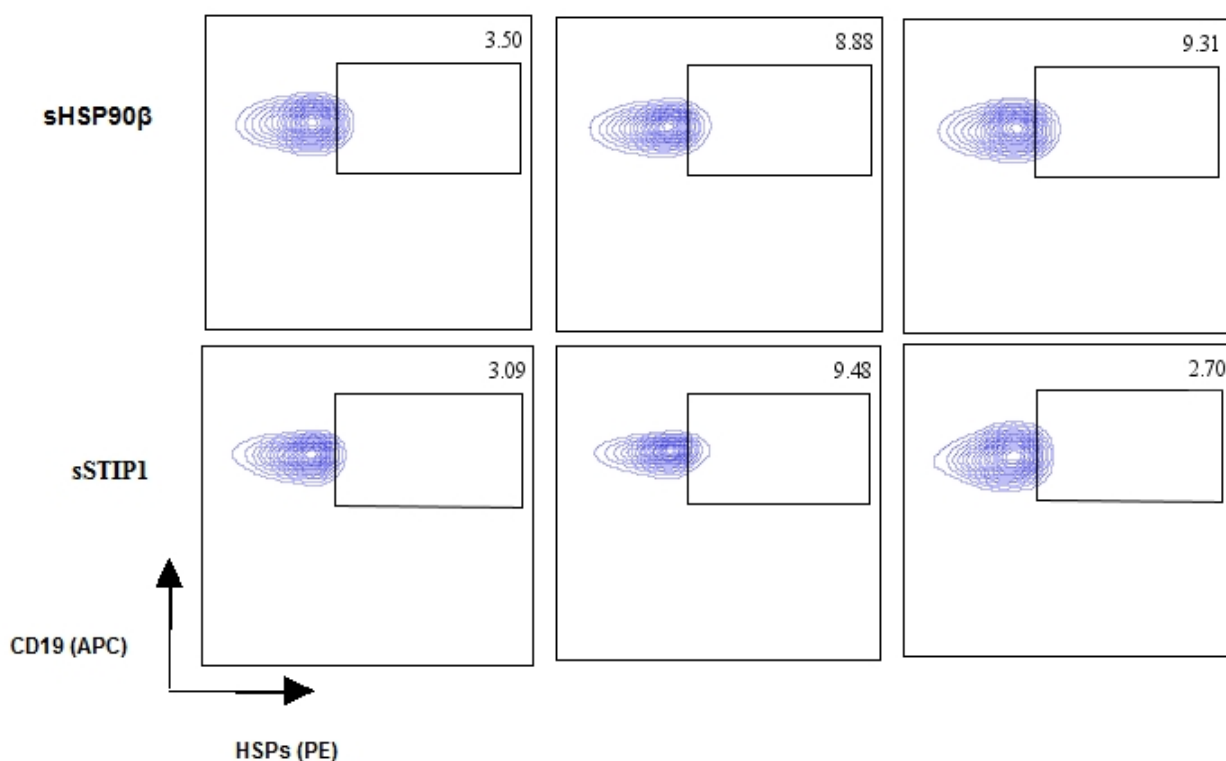


Рис S2. Репрезентативные графики экспрессии sHSP90β и sSTIP1 на В-клетках периферической крови здоровых доноров и пациентов с ЛХ и лимфоцитах костного мозга пациентов с ЛХ. РВ, периферическая кровь; ВМ, костный мозг.

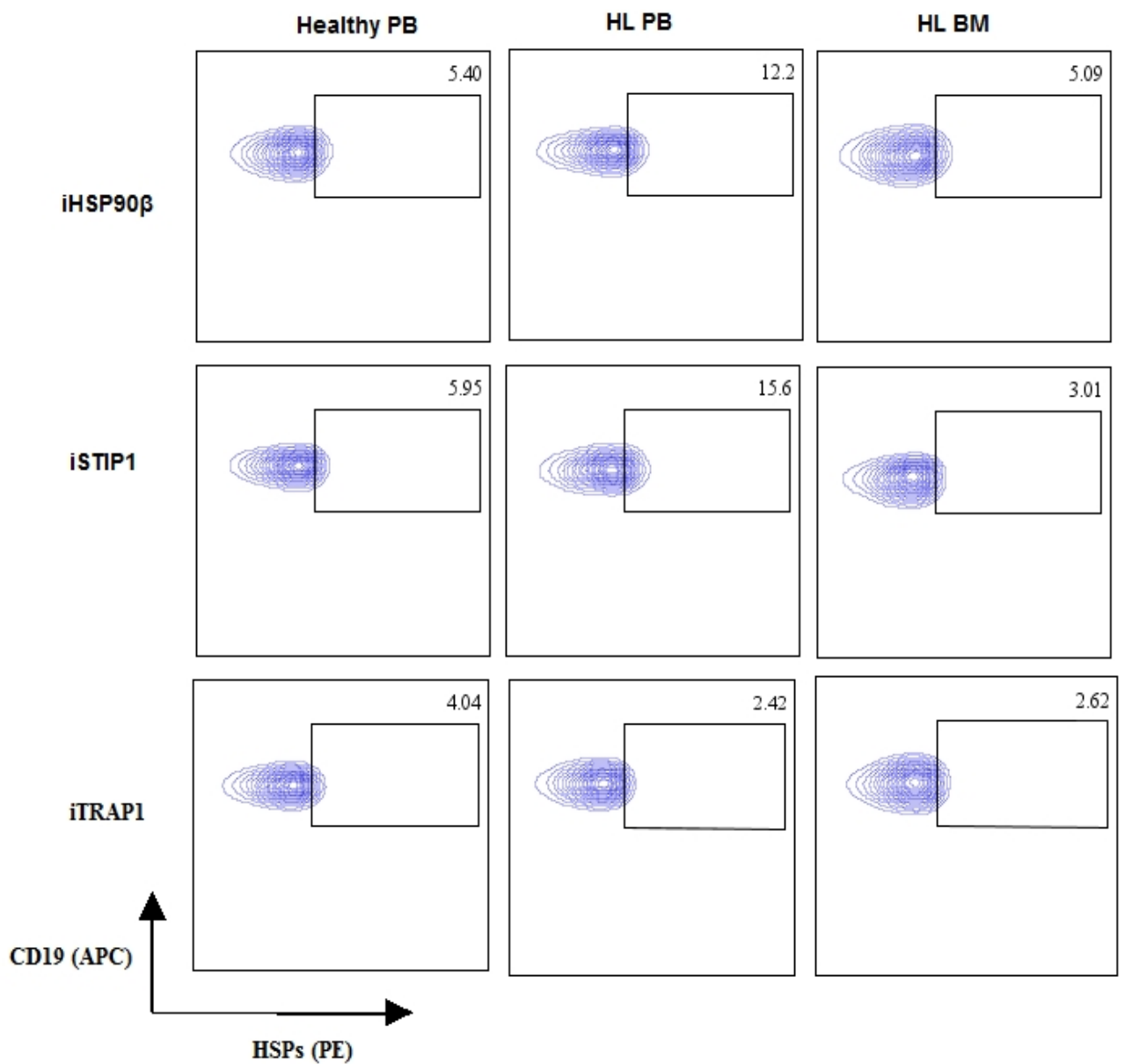


Рис S3 Репрезентативные графики экспрессии iHSP90β, iTRAP1 и iSTIP1 в В-клетках периферической крови здоровых доноров и пациентов с ЛХ и лимфоцитах костного мозга пациентов с ЛХ. PB, периферическая кровь; BM, костный мозг.

Приложение 3

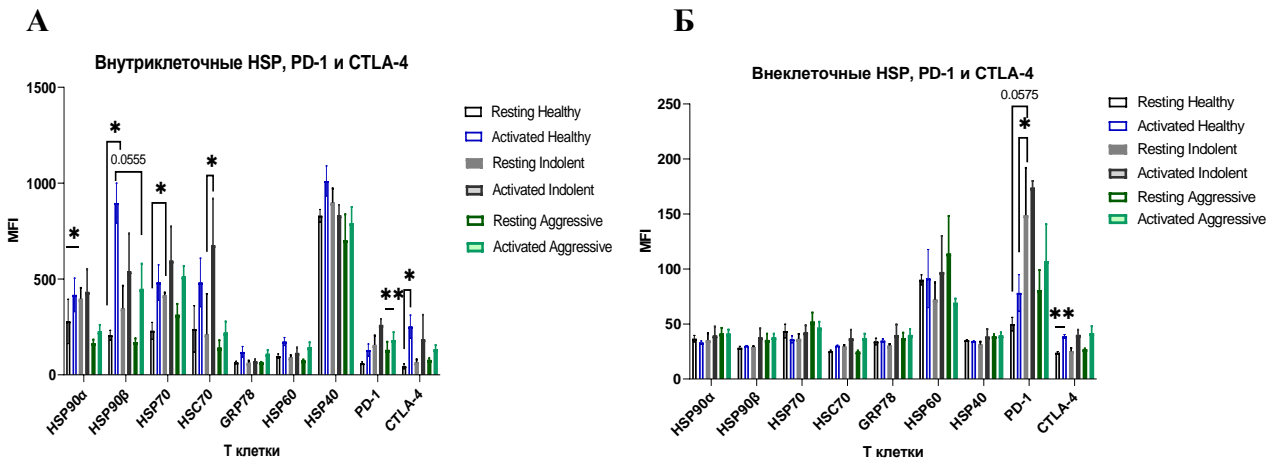


Рис S4 Внутриклеточное (А) и внеклеточное (Б) экспрессия HSP, PD-1, CTLA-4 в неактивированных и активированных Т клетках у здоровых доноров и пациентов с лимфомой. F. Данные показывают среднее значение \pm SEM. нс, недостоверно, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.