

Úloha proteinu HSP70 v nádorech a jeho využití jako terapeutický cíl

The Role of HSP70 in Cancer and its Exploitation as a Therapeutic Target

Martinková V., Trčka F., Vojtěšek B., Müller P.

Regionální centrum aplikované molekulární onkologie, Masarykův onkologický ústav, Brno

Souhrn

Východiska: Vysoký proliferační potenciál a genetická nestabilita nádorových buněk je spojena se zvýšenou produkcí mutovaných a konformačně nestabilních proteinů. Nadměrná proteosyntéza spolu se zvýšeným metabolickým obratem vytvářejí stresové podmínky, které musí nádorová buňka trvale kompenzovat. Nádorové buňky se tak stávají závislé na udržování proteinové homeostázy zahrnující kontrolu kvality proteinů, jejich skládání, transport a stabilizaci. Tyto funkce jsou zajišťovány molekulárními chaperony, které jsou u nádorů reprezentovány především stresovými proteiny HSP70 a HSP90. Jejich exprese a aktivita je významně zvýšena ve všech maligních nádorech, kde spolu s dalšími proteiny nazývanými kochaperony vytváří multiproteinové komplexy. Aktivita HSP70 a HSP90 je nezbytná pro udržení maligního fenotypu tím, že se podílí na stabilizaci četných onkoproteinů, podporuje proliferaci a inhibuje apoptózu. V tomto ohledu představují proteiny teplotního šoku důležitý cíl využitelný v protinádorové terapii, neboť jejich inhibice umožňuje souběžnou inaktivaci řady signálních drah důležitých pro přežití nádorové buňky. Ačkoli bylo v uplynulém desetiletí vyvinuto několik specifických inhibitorů HSP90, jejich protinádorová aktivita je značně limitována vzhledem k indukci proteinů HSP70, které umožňují buňkám přežít. Vývoj inhibitorů HSP70 představuje novou výzvu v terapii cílené na inhibici proteostatických mechanismů nádorových buněk. **Cíl:** Cílem tohoto článku je shrnout informace o struktuře HSP70 a jeho roli při udržování proteinové homeostázy v normálních a nádorových buňkách. Článek popisuje mechanismy inhibice HSP70 pomocí nízkomolekulárních sloučenin a jejich potenciální aplikace v cílené protinádorové terapii.

Klíčová slova

HSP70 – stresové proteiny – molekulární chaperony – buněčný stres – nádory – skládání proteinu

Summary

Background: Sustained proliferation and genetic instability of cancer cells are associated with enhanced production of mutated and conformationally unstable proteins. Excessive proteosynthesis along with increased metabolic turnover generates stress conditions that cancer cells must permanently compensate for. Tumor cells thus become dependent on the maintenance of protein homeostasis, which involves protein quality control, folding, transport and stabilization. These tasks are provided by molecular chaperones, predominantly the stress proteins HSP70 and HSP90. Their expression and activity is increased in all malignant tumors, where they associate with their cochaperones to form large multiprotein complexes. HSP70 and HSP90 maintain the malignant phenotype because they facilitate the folding of numerous oncogenic proteins, maintain proliferative potential, and inhibit apoptosis. In this regard, heat-shock proteins represent an important target for cancer therapy because their inactivation results in the simultaneous blockade of multiple signaling pathways. Although several specific HSP90 inhibitors have been developed in the past decade, their antitumor activity as single agents is limited due to the induction of HSP70, which enables cell survival. Inhibitors of HSP70 thus present new possibilities for targeting proteostatic mechanisms in cancer cells. **Aim:** The aim of this article is to summarize information on the structure of HSP70 and its role in maintaining protein homeostasis in normal and cancer cells. The mechanisms of HSP70 inhibition by low-molecular weight compounds and their application in targeted antitumor therapy are also described.

Key words

HSP70 – stress proteins – molecular chaperons – cellular stress – tumours – protein folding

Práce byla podpořena projektem MŠMT – NPU1 – LO1413.

This work was supported by the project MEYS – NPS1 – LO1413.

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

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

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

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



Mgr. Veronika Martinková
Regionální centrum aplikované
molekulární onkologie
Masarykův onkologický ústav
Žlutý kopec 7
656 53 Brno
e-mail: veronika.martinkova@mou.cz

Přijato/Accepted: 16. 08. 2018

doi: 10.14735/amko20182546

Úvod

Genetické změny a vysoký proliferační potenciál vedou u nádorových buněk ke zvýšené proteosyntéze a nadprodukcii konformačně nestabilních proteinů. Pro nádorové buňky je proto nezbytné aktivovat mechanismy udržující proteo-ovou homeostázu. Mezi základní mechanismy kontrolující kvalitu a množství proteinu v buňce patří ubiquitin-proteazomový systém, autofagie a molekulární chaperony. Zatímco první dva jmenované mechanismy slouží k degradaci proteinů, molekulární chaperony umožňují skládání a stabilizaci řady mutovaných proonkogenních proteinů nezbytných pro proliferaci nádorových buněk. V průběhu maligní transformace se tak nádorová buňka stává závislá na zvýšené

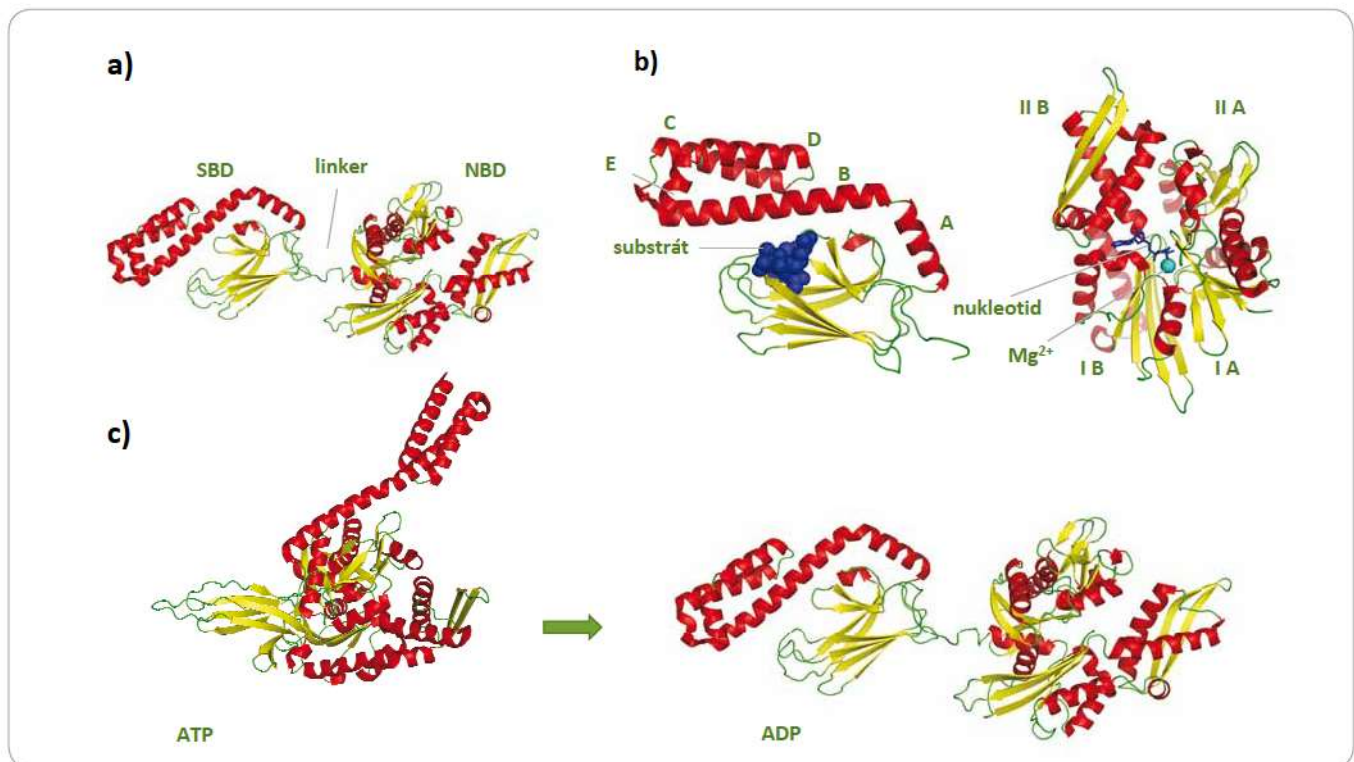
aktivitě molekulárních chaperonů. Mezi nejčastěji zastoupené chaperony patří stresové proteiny teplotního šoku (heat-shock proteins – HSPs) reprezentované několika proteinovými rodinami rozdělenými podle molekulové hmotnosti.

HSP70 tvoří rodinu sekvenčně konzervovaných molekulárních chaperonů s molekulovou hmotností 70 kDa [1]. V lidském genomu je tato rodina reprezentována minimálně 13 různými geny kódujícími strukturně a funkčně podobné proteiny, které dohromady tvoří až 2 % buněčného proteomu [2]. Mezi nejdůležitější konstitutivně exprimované izoformy patří HSPA8 v cytosolu a jádře, HSPA5 v endoplazmatickém retikulu a HSPA9 v mitochondriích. Exprese indukovaná stresem je pak charakteris-

tická pro HSPA1A a HSPA1B lokalizované v cytoplasmě i jádře [1]. Za fyziologických podmínek napomáhá HSP70 nově vznikajícím proteinům získat nativní konformaci. Dále je zapojen do vnitrobuněčného transportu proteinů, degradaci poškozených proteinů a asistuje při opětovném skládání chybně složených proteinů. Úloha HSP70 je nezastupitelná při stresových podmínkách (hypoxie, teplotní šok, UV záření apod.), které způsobují poškození konformace proteinů či jejich agregaci. HSP70 následně rozpoznává hydrofobní aminokyseliny poškozeného proteinu, na které se naváže, zabrání jeho agregaci a s využitím energie z hydrolyzy adenosintrifosfátu (adenosine triphosphate – ATP) umožňuje denaturovaným proteinům získávat na-

Tab. 1. Lidské proteiny patřící do rodiny HSP70.

Protein	UniProt ID	Alternativní názvy	Buněčná lokalizace	Počet aminokyselin	Exprese indukovaná stresem	Název genu	Genové ID
HSPA1A	P0DMV8	Hsp70-1, Hsp72, HspA1, Hsp70-1A, Hsp70i	cytosol, jádro, buněčná membrána, exozomy	641	ano	<i>HSPA1A</i>	3303
HSPA1B	P0DMV9	Hsp70-2, Hsp70-1B	cytosol, jádro, exozomy	641	ano	<i>HSPA1B</i>	3304
HSPA1L	P34931	Hsp70-1L, Hsp70-hom, Hsp70-1t, Hum70t	cytosol, jádro	641	ne	<i>HSPA1L</i>	3305
HSPA2	P54652	Heat-shock 70kD protein 2, Hsp70.2	cytosol, jádro, buněčná membrána, exozomy	639	ne	<i>HSPA2</i>	3306
HSPA5	P11021	Hsp70-5, BiP, Grp78, Mif-2	endoplazmatické retikulum, exozomy	654	ne	<i>HSPA5</i>	3309
HSPA6	P17066	Hsp70-6, Hsp70B'	cytosol, exozomy	643	ano	<i>HSPA6</i>	3310
HSPA7	P48741	Hsp70-7, Hsp70B	krevní mikročástice, exozomy	367	ano	<i>HSPA7</i>	3311
HSPA8	P11142	Hsp70-8, Hsc70, Hsc71, Hsp71, Hsp73	cytosol, jádro, buněčná membrána, exozomy	646	ne	<i>HSPA8</i>	3312
HSPA9	P38646	Hsp70-9, Grp75, HspA9B, MOT, MOT2, PBP74, mot-2, mtHsp70, mortalin	mitochondrie, jádro	679	ne	<i>HSPA9</i>	3313
HSPA12A	O43301	Hsp70-12A, FLJ13874, KIAA0417	exozomy	675	ne	<i>HSPA12A</i>	259217
HSPA12B	B7ZLP2	Hsp70-12B, RP23-32L15.1, 2700081N06Rik	endoteliální buňky, krevní plazma	685	ne	<i>HSPA12B</i>	116835
HSPA13	P48723	Hsp70-13, Stch	endoplazmatické retikulum, exozomy, mikrozoomy	471	ne	<i>HSPA13</i>	6782
HSPA14	Q0VDF9	Hsp70-14, Hsp70L1	cytosol, membrána	509	ano	<i>HSPA14</i>	51182



Obr. 1. Struktura HSP70.

Červeně jsou označeny α -helixy, žlutě struktury β -skládaného listu, zeleně nestrukturované oblasti a modře peptidový substrát, nukleotid a hořečnatý kationt. a) Na obrázku je znázorněna celá krystalová struktura HSP70 (PDB: 2KHO). Protein se skládá ze SBD a NBD, které navzájem spojuje linker. b) Detailní pohled na strukturu substrát vazebné domény nalevo (PDB: 1DKZ) a nukleotid vazebné domény napravo (PDB: 4B9Q). c) Schematické zobrazení výrazných strukturních změn v HSP70 po hydrolyze ATP. Nejvýraznější změny můžeme na první pohled pozorovat u SBD (PDB: 4JNE, 2KHO).

SBD – substrát vazebná doména, NBD – nukleotid vazebná doména, ATP – adenosin trifosfát, ADP – adenosin difosfát

tivní konformaci. Díky těmto funkcím je HSP70 zapojen do udržení proteinové homeostázy během fyziologických i stresových podmínek. Tuto rozsáhlou škálu funkcí však HSP70 nezastává samostatně. Proteiny, které se při těchto procesech s molekulárními chaperony asociují a napomáhají jejich funkci, jsou označovány jako kochaperony [3,4].

V tomto článku je skupina proteinů, které patří mezi HSPs 70, označována souhrnně jako HSP70 a pokud bylo v textu potřeba uvést konkrétní izoformu, je označena podle oficiálního názvu genu (tab. 1).

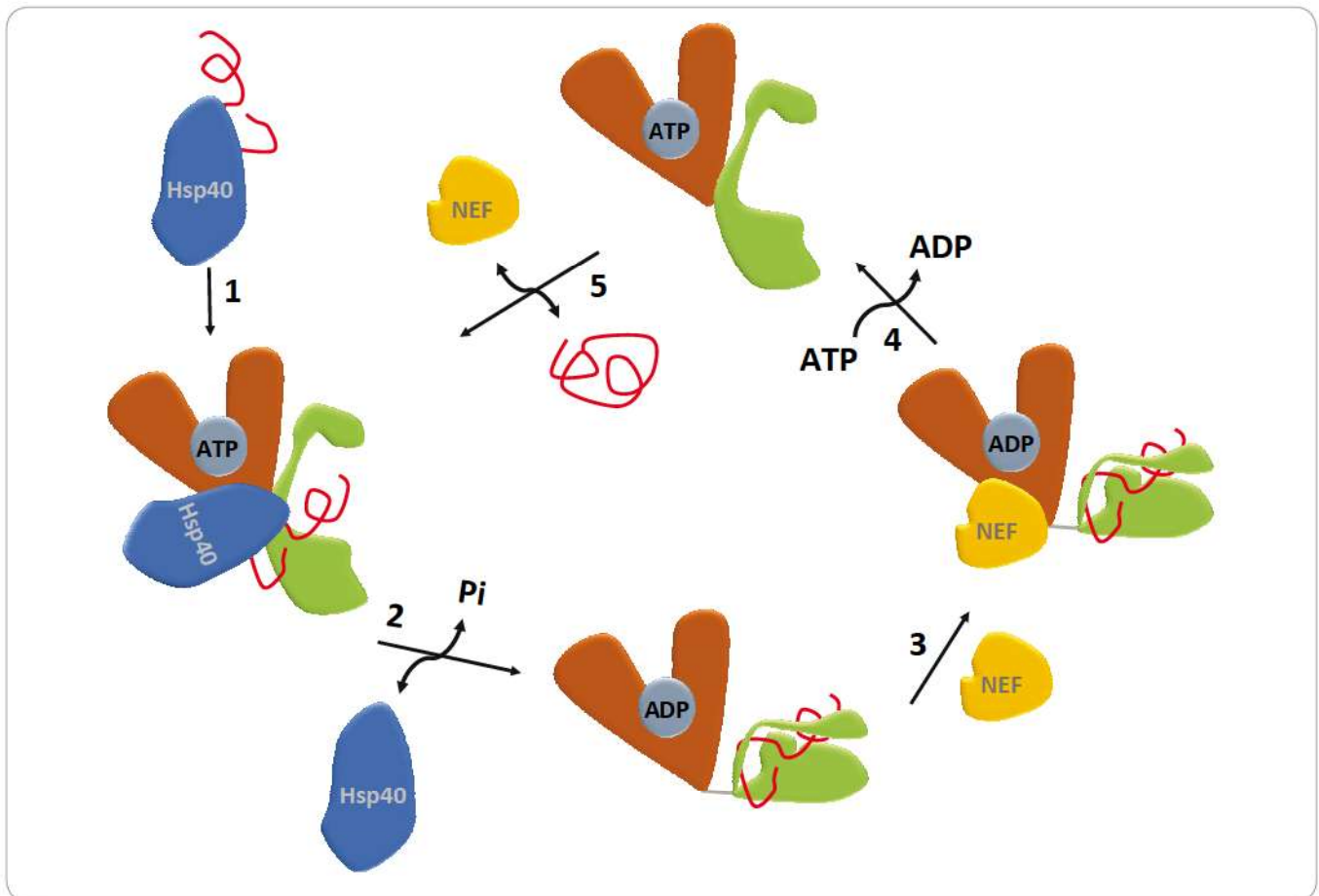
Struktura a ATPázový cyklus HSP70

Protein HSP70 je tvořen N-koncovou nukleotid vazebnou doménou (nucleotide-binding domain – NBD), 44 kDa a C-koncovou substrát vazebnou doménou (substrate-binding domain – SBD),

28 kDa (obr. 1a). NBD je dále členěna na subdomény IA/B a IIA/B, jejichž prostorové uspořádání vytváří kavitu pro vazbu ATP/adenosin difosfát (adenosine diphosphate ADP) v koordinaci s vazbou hořečnatého a draselného kationtu (obr. 1b) [5,6]. SBD se skládá ze dvou subdomén. Vlastní vazebné místo pro substrát je utvářeno v subdoméně se strukturou β -skládaného listu. Subdoména SBD tvořená soustavou α -helixů má pak funkci „víka“, které stabilizuje vazbu substrátu (obr. 1b). NBD a SBD domény jsou spojeny krátkou, vysoce konzervovanou hydrofobní sekvencí – linkerem (obr. 1a), který hraje významnou roli při regulaci alosterických strukturních změn v molekule HSP70 vyvolaných vazbou ATP [7].

V nepřítomnosti ATP se NBD a SBD domény HSP70 chovají jako nezávislé a SBD doména vykazuje vysokou afinitu k substrátu – vzniká tzv. uzavřená konformace

SBD (obr. 1c) [4]. Vazba ATP do NBD vede k částečnému splnutí („docking“) NBD a SBD domén regulovanému linkerovou sekvencí. Tím dochází ke snížení afinity substrátu k SBD, která se tak nachází v tzv. otevřené konformaci. Hydrolyza ATP na ADP uvádí molekulu HSP70 opět do stavu „uzavřené konformace“ SBD. Průchod proteinu HSP70 ATPázovým cyklem je usnadňován jeho interakcí s proteiny HSP40, které se váží na rozhraní NBD-SBD domén HSP70 v ATP-vázaném stavu, a spolu se substrátem, který transportují do SBD, katalyzují hydrolyzu ATP a vznik „uzavřené konformace“ SBD s navázaným substrátem (obr. 2). Spontánní uvolnění ADP z NBD je pomalý proces, který výrazně urychlují proteiny s funkcí NEF (nucleotide-exchange factor). Výměna ADP za ATP vede ke vzniku „otevřené konformace“ SBD a uvolnění substrátu, čímž se HSP70 navrácí na začátek ATPázového cyklu [8,9]. Typickými



Obr. 2. ATPázový cyklus HSP70.

1 – klientský protein je dopraven kochaperonem do SBD HSP70, 2 – vazba HSP40 způsobí rozsáhlé konformační změny, které způsobí hydrolyzu ATP a uzavření klientského proteinu v SBD, 3 – konformačními změnami dojde k odhalení vazebného místa pro NEF, 4 – vazbou NEF je umožněna výměna ADP za ATP, 5 – navázání ATP způsobí konformační změny vedoucí k uvolnění složeného klientského proteinu.

SBD – substrát vazebná doména, ATP – adenosin trifosfát, NEF – nukleotid výměnný faktor, ADP – adenosin difosfát

substráty HSP70 jsou krátké hydrofobní peptidové motivy obklopené pozitivně nabitými aminokyselinami, které jsou po denaturaci proteinů exponovány na jejich povrchu [10].

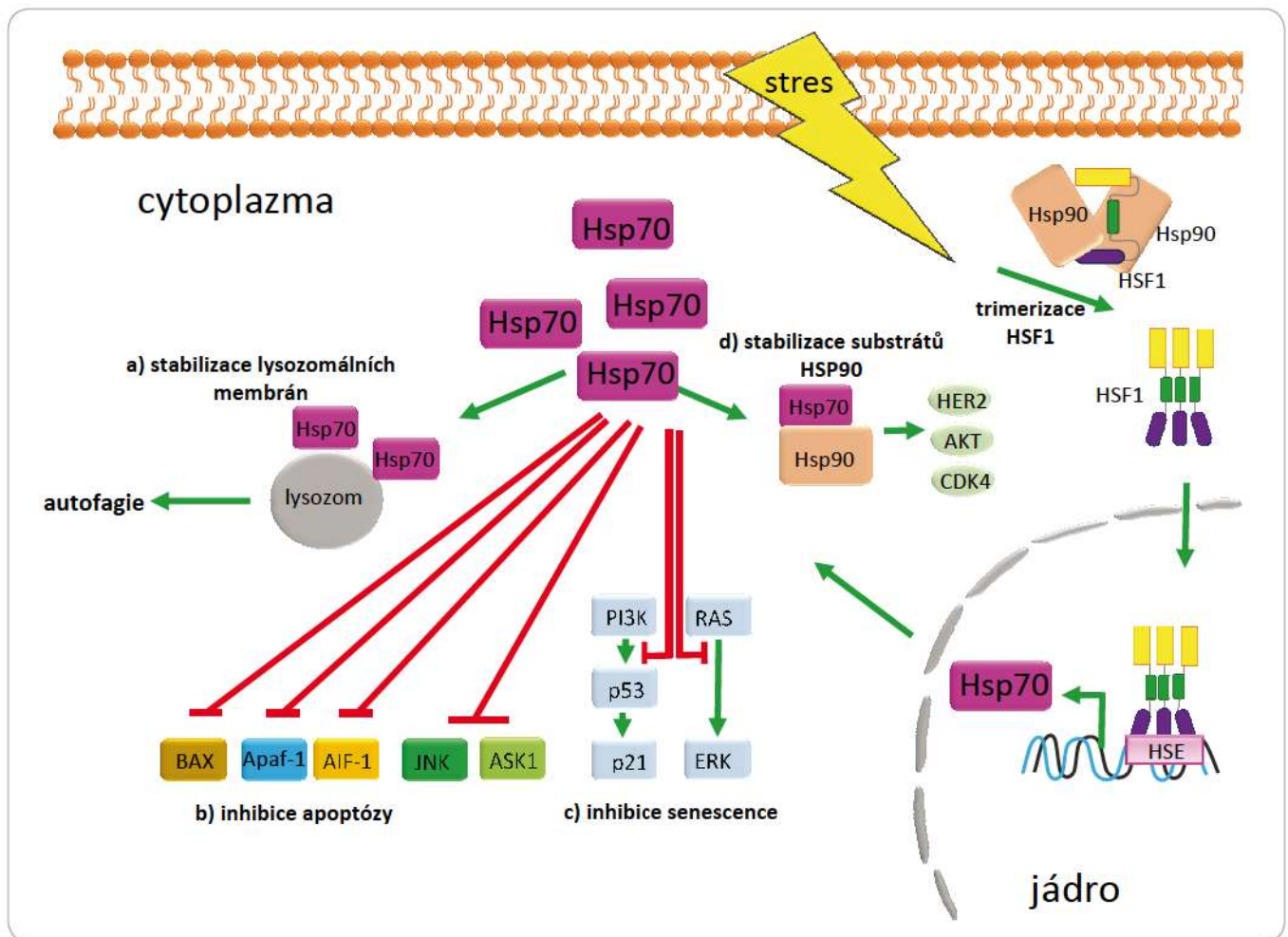
Regulace exprese HSP70

Přestože jsou proteiny HSP70 silně exprimovány ve všech buněčných typech, je jejich exprese významně zvyšována působením buněčného stresu. Zvýšení genové exprese HSP70 a dalších stresových proteinů je centrálním protektivním mechanismem kompenzujícím působení proteotoxického stresu u všech eukaryotických organismů. Klíčovou roli v regulaci genové exprese hraje evolučně konzervovaný transkripční faktor HSF1 (heat-shock factor) [11]. Tento transkripční program je označován jako

odpověď na tepelný šok (heat-shock response – HSR). Aktivita HSF1 vede ke zvýšené expresi některých molekulárních chaperonů, kochaperonů i dalších proteinů, které obsahují ve svých promotorech tzv. elementy tepelného šoku (heat-shock elementy – HSE). Jedná se o krátké sekvencí motivy DNA, na které se váže HSF1 [12]. Aktivita HSF1 je řízena jeho lokalizací a trimerizací. HSF1 je v nestresovaných buňkách přítomen v cytoplasmě jako monomer. Stresové podmínky vyvolávají trimerizaci HSF1 a jeho přesun do jádra, kde spouští expresi daných genů. Aktivita HSF1 je řízena zpětnou vazbou – spuštěním exprese HSE-regulovaných genů nastane rovněž zvýšení hladiny HSP90 a HSP70, jejichž přítomnost negativně ovlivňuje aktivaci HSF1 [13].

Úloha HSP70 v patologii nádorů

HSPA1A a HSPA1B patří mezi indukibilní izoformy HSP70, jejichž exprese je významně zvýšena u všech nádorů [14]. Ze souhrnných údajů o těchto indukibilních izoformách vyplývá, že tyto chaperony mohou hrát kauzální roli při zahájení maligní transformace. Konkrétně bylo zjištěno, že zvýšená exprese HSPA1A podporuje tumorigenicitu u buněk myšího fibrosarkomu a navozuje u nich rezistenci vůči cytotoxickému působení imunitních buněk [15]. Zvýšení exprese indukibilní izoformy HSP70 podporuje tvorbu T buněčného lymfomu u transgenních myší. U imortalizovaných fibroblastů Rat-1 bylo prokázáno, že nadměrná exprese HSPA1A způsobuje ztrátu kontaktní inhibice a vyvolává vznik nádorů při implantaci do myší. Naopak sní-



Obr. 3. Příklady proonkogenního působení HSP70.

Nádorové buňky jsou neustále vystavovány stresu (hypoxie, zánět, změna pH apod.), který aktivuje transkripční faktor HSF1 zodpovědný za zvýšenou expresi HSP70. Zvýšené množství proteinu HSP70 podporuje nádorovou transformaci na několika úrovních. a) Stabilizuje membrány lysozomů, čímž podporuje autofagii. b) Několika způsoby inhibuje vnější i vnitřní dráhu apoptózy. Zabraňuje translokaci BAX do mitochondrií, interakci s APAF1 inhibuje vznik apoptozomu, zabraňuje kondenzaci chromatinu řízenou AIF-1 a inhibuje i děje řízené některými kinázami. c) Blokuje senescenci závislou i nezávislou na proteinu p53. d) Spolu s HSP90 se podílí na maturaci řady onkogenních proteinů vč. HER2, CDK4 a AKT.

ženi exprese tohoto genu vede u těchto buněk ke ztrátě tumorigenních vlastností. Proonkogenní působení inducibilní HSP70 se uplatňuje rovněž v patogenezi nádorů prsu (breast cancer – BC). Bylo ukázáno, že zvýšení exprese HSPA1A je nezbytné pro maligní transformaci vyvolanou onkogenem HER2. Zvýšená exprese HSPA1A je charakteristická pro většinu maligních nádorů, u nichž koreluje s mírou dediferenciace (grade) a horší prognózou [16]. Nádorové buňky potřebují HSPA1A např. k inhibici apoptózy a senescence, ale i k posílení autofagie (obr. 3) [17]. HSPA1A potlačuje apoptózu inhibicí její vnitřní i vnější dráhy. U vnitřní dráhy je HSP70 vázán na BAX

(člen proapoptotické rodiny BCL-2), čímž zabraňuje jeho translokaci do mitochondrií [18]. Dalším mechanismem, kterým HSPA1A zabraňuje spuštění apoptózy, je inhibice proapoptotického proteinu APAF1 (apoptotic protease activating factor 1). HSPA1A se váže na APAF1 a zabraňuje tak jeho oligomerizaci, která je nutná pro tvorbu apoptozomu a aktivaci kaspázy 9 [19]. HSP70 rovněž inhibuje aktivaci vnější apoptotické dráhy vazbou k receptorům smrti. HSPA1A blokuje signalizaci zprostředkovanou apoptózou indukujícím ligandem patřícím do skupiny tumor nekrotizujícího faktoru (tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand – TRAIL) tím, že tvoří kom-

plex s receptory DR4 a DR5 a znemožňuje tak tvorbu DISC (death-inducing signaling complex) u Bcr-Abl pozitivních buněk [20]. Programovanou buněčnou smrt závislou na kaspázách ovlivňuje HSPA1A interakcí s apoptózou indukujícím faktorem (AIF), čímž blokuje kondenzaci chromatinu řízenou AIF [21]. HSPA1A dále inhibuje i kaskádu dějů řízenou mitogenem aktivovanými proteinkinázami (mitogen-activated protein – MAP), vč. např. c-Jun [22]. Kromě inhibičního vlivu HSP70 na apoptózu byl dokumentován i jeho vliv na senescenci nádorových buněk. Bylo prokázáno, že vysoká exprese inducibilních izoform HSP70 je nutná pro zabránění

senescence v nádorových buňkách. Snížení exprese HSPA1A pomocí siRNA vedlo k navození senescence doprovázené aktivací nádorového supresorového proteinu p53 a zvýšenou expresí proteinu p21 [23]. Snížení exprese HSPA1A v nádorových buňkách může rovněž indukovat senescenci nezávislou na p53, a to díky schopnosti HSPA1A ovlivňovat signalizaci zprostředkovanou onkogenními kinázami PI3K, RAS a ERK [24]. Obdobné závěry vyplývají i z prací, které ukázaly, že inducibilní izoformy HSP70 jsou nezbytné pro nádorovou transformaci zprostředkovanou onkoproteinem HER2/neu a snížení jejich exprese vede k navození senescence [25].

Zvýšená exprese HSPA1A koreluje se zvýšenou proliferací nádoru, s klinickým stadiem a špatnou prognózou pacientů s nemalobuněčným karcinomem plic (non-small cell lung cancer – NSCLC) [26], BC, endometria [27], kolorektálním karcinomem [28], hepatocelulárním karcinomem [29] a karcinomem prostaty [30]. U pacientů s akutní myeloidní leukémií s charakteristickou expresí Bcr-Abl je zvýšená exprese HSPA1A spojována s rezistencí k imatinibu [31,32].

Plazmatická membrána nádorových buněk často obsahuje zvýšené množství HSPA1A [33]. Nádory s vysokým obsahem membránového HSPA1A jsou obecně vysoce rezistentní k chemoterapii a to často kvůli inhibici signálních drah JNK, ERK a NF- κ B [34]. U metastáz je hustota membránového HSPA1A vyšší v porovnání s primárním tumorem, což naznačuje schopnost membránového HSPA1A usnadnit proces metastazování. V souladu s těmito poznatky byla vyšší hustota membránového HSPA1A spojena s nepříznivou prognózou a sníženým celkovým přežitím pacientů s rektálním karcinomem a spinocelulárním karcinomem plic [35,36].

Kromě cytoprotektivních účinků se změněná exprese nebo funkce HSPA1A podílí také na vývoji dalších onemocnění, která jsou spojena s defekty v konformaci či skládání proteinů. Mezi tato onemocnění patří např. Parkinsonova a Alzheimerova choroba [4].

Inhibice HSP70

V současnosti jsou neustále vyvíjeny nové strategie pro úspěšnou léčbu ma-

ligních onemocnění. Základním konceptem úspěšné chemoterapie je narušení procesu, který je pro nádorovou buňku klíčový. Podobně jako genotoxické látky využívají u nádorů zvýšený metabolismus nukleových kyselin, můžeme zvýšenou proteosyntézu a přítomnost nestabilních proteinů v nádorových buňkách využít k cílené protinádorové léčbě. Dosaďovaný vývoj protinádorové terapie založený na narušení proteinové homeostázy se soustředil zejména na vývoj nízkomolekulárních látek inhibujících proteazom a stresový protein HSP90. Ačkoli bylo v uplynulém desetiletí vyvinuto několik specifických inhibitorů HSP90, jejich protinádorová aktivita je značně limitována kvůli indukci proteinů HSP70, které zabraňují navození buněčné smrti a umožňují buňkám přežít. Syntéza selektivních inhibitorů HSP70 tak představuje novou výzvu v terapii cílené na inhibici proteostatických mechanismů nádorových buněk [37–39].

Vhodným mechanismem účinku inhibitorů HSP70 je jejich vazba do substrát a nukleotid vazebné domény a také narušení protein-proteinových interakcí mezi HSP70 a jeho kochaperony [40]. Doposud bylo nalezeno několik inhibitorů, u nichž byla potvrzena jejich vazba do struktury HSP70 (tab. 2). Míra aktivity inhibitorů a síla vazby látek k HSP70 byla charakterizována pomocí inhibiční konstanty IC_{50} (koncentrace inhibitoru, při které dojde ke snížení odpovědi na 50 %), střední efektivní koncentrace EC_{50} (koncentrace látky, při které nastane snížení definované odpovědi na polovinu) nebo disociační konstanty K_d (síla vazby mezi inhibitorem a HSP70) (tab. 2).

MKT-077 a jeho deriváty

Jedním z prvních nalezených inhibitorů HSP70 je kladně nabitě rhodacyaninové barvivo MKT-077, které se váže poblíž vazebného místa pro ATP v nukleotid vazebné doméně mitochondriálního HSPA9. Za selektivitu MKT-077 je zodpovědná i jeho kationtová povaha, díky čemuž je akumulován protonovým gradientem v mitochondriích rychle se dělících nádorových buněk [41,54]. Později byla také pomocí spektroskopie nukleární magnetické rezonance potvrzena vazba mezi MKT-077 a HSPA8. Inhibitor je zde

vázán do negativně nabitě kapsy v blízkosti nukleotid vazebného místa. Díky jeho selektivní vazbě pouze do ADP stavu HSPA8 začal být MKT-077 klasifikován jako alosterický inhibitor [54]. Jeho protinádorový efekt byl pozorován např. u inhibice proliferace nádorových buněčných linií prsu, střeva a močového měchýře ($IC_{50} \sim 1-5 \mu\text{m}$) a zároveň nebyla pozorována toxicita u zdravých buněk ledvin [41]. Inhibitor MKT-077 postoupil do fáze I klinických testů, v níž byly pacientům aplikovány každodenně infuze o dávce 30–50 mg/m² po dobu 3 týdnů. U řady pacientů však byla pozorována renální toxicita a zároveň bylo zjištěno, že dochází k rychlé metabolizaci MKT-077, čímž nemohlo být v séru dosaženo požadované terapeutické hladiny [55].

Nestabilita MKT-077 je způsobena především oxidací benzothiazolového a pyridinového kruhu. Lepší stability za současného udržení dobré antiproliferační aktivity bylo dosaženo systematickými substitucemi, přičemž nejlepší výsledky vykazovala látka se zaměněným pyridinovým kruhem za thiazolový heterocyklus se současnými substitucemi malých molekul (na benzothiazolovém a thiazolovém kruhu). Aplikací vzniklé látky JG-98 na buňky prsního adenokarcinomu MDA-MB-231 byly zjištěny $EC_{50} = 0,4 \mu\text{m}$ a $> 7\times$ lepší mikrozomální stabilita – 37 min. Později byl JG-98 identifikován jako alosterický inhibitor interakce HSP70/BAG3 [42,56].

Novolactone

Haasan et al hledali dráhy a konkrétní geny, které ovlivňuje přírodní látka novolactone prostřednictvím screeningu přežívání heterozygotických a homozygotických delečních mutantů kvasinek vystavených této látce. Při bližším zkoumání biochemických vlastností kvasinkového i lidského HSP70 po jejich ovlivnění novolactonem bylo objeveno, že se jedná o alosterický inhibitor, který se kovalentně váže na Glu444 v SBD HSPA1A. Studium chování HSPA1A inhibovaného novolactonem přineslo nové poznatky o alosterické komunikaci NBD a SBD domén [43]. Zmíněný inhibitor je proto užitečným nástrojem pro pochopení fungování chaperonů *in vitro* i *in vivo* a v neposlední řadě také novým potenciálním léčivem.

Tab. 2. Látky modulující aktivitu HSP70.

Látka	Vazebné místo	Známa struktura HSP70 inhibitor	Míra aktivity/vazby [μm]	Reference
rhodocyaniny a analoga				
MKT-077	NBD	Ano ^d (NMR)	1,4 (EC ₅₀)	[41,42]
JG-98	NBD		0,4 (EC ₅₀)	[42]
novolactone	SBD	Ano ^b (RTG)	0,25 (IC ₅₀)	[43]
flavonoidy				
EGCG	NBD		12 (IC ₅₀); 0,7 ^c (K _d)	[44]
myricetin	NBD	Ano ^a (NMR)	14,5 (IC ₅₀)	[45]
látky mimikující ATP				
VER-155008	NBD	Ano ^d (RTG)	0,5 (IC ₅₀); 0,3 ^b (K _d)	[46]
fenylehtylsulfonamidy				
PES	SBD		8,4 (IC ₅₀); 6 ^b (K _d)	[47,48]
PET-16	SBD	Ano ^a (RTG)	1,5 (IC ₅₀); 4 ^b (K _d)	[48]
deriváty kolchicinu				
AEAC	neznámé		100 (IC ₅₀); 0,15 ^b (K _d)	[49]
imidazoly				
apoptozol	NBD		0,21 ^d (K _d); 0,14 ^b (K _d)	[50]
peptidy				
peptidový aptamer A8	SBD			[51]
peptidový aptamer A17	NBD			[51]
polyaminy				
15-deoxyspergualin	SBD		4 ^d (K _d)	[52]
dihydropyrimidiny				
MAL3-101	NBD		8,3 ^d (IC ₅₀)	[53]
vakcíny				
pNGVL4a-Sig/E7(detox)/HSP70 DNA				(NCT00121173)
rekombinantní protein HSP70				(NCT00030303)
HSP70-peptid TKD/IL-2 aktivovaný				(NCT02118415)
protilátka cmHSP70.1	epitop TKD			(NCT02118415)
CN54gp140 glycoprotein-HSP70 konjugovaná vakcína				(NCT01285141)

NMR – spektroskopie nukleární magnetické rezonance, EGCG – epigalokatechin galát, ATP – adenosintrifosfát, SBD – substrát vazebná doména, NBD – nukleotid vazebná doména, TKD – peptid o aminokyselinové sekvenci: TKDNNLLGRFELSG

^adnaK, ^bHSPA1, ^cHSPA5, ^dHSPA8

Inhibitory s flavonoidní strukturou

Epigalokatechin galát (epigallocatechin gallate – EGCG) je přírodní polyfenolický flavonoid ze zeleného čaje, u něhož byla pomocí afinitní chromatografie zjištěna interakce s NBD endoplazmatic-

kého HSPA5 (K_d = 0,7 μm) [44]. Dalším inhibitorem s flavonoidní strukturou je myricetin, který taktéž inhibuje ATPázovou aktivitu HSP70. Detailnější mechanismus jeho účinku byl popsán u bakteriálního HSP70 – DnaK. Myricetin inhibuje interakci DnaK s kochaperonem

DnaJ (HSP40), čímž blokuje ATPázový cyklus DnaK [45].

Látky mimikující ATP

Williamson et al v roce 2009 s využitím krystalové struktury komplexu ATP a HSPA8/BAG1 navrhli a připravili sérii

8- a 8,5'-substituovaných derivátů adenozinu. Následnými systematickými modifikacemi těchto inhibitorů v poloze C8 a 5' bylo dosaženo hodnoty $IC_{50} = 0,5 \mu\text{m}$ u látky, která dostala název VER-155008. Krystalová struktura komplexu VER-155008-HSPA8 odhalila stabilizaci inhibitoru v NBD HSPA8 prostřednictvím několika π - π interakcí mezi Arg272, aromatickými kruhy obou substituentů a Tyr15 [46]. Doposud byla u této látky prokázána inhibice proliferace nádorových linií prsu a střeva s GI_{50} v rozmezí 5,3–14,4 μm . U linie BT474 (BC) VER-155008 indukuje kaspázami-3/7 závislou apoptózu, kdežto u linie HCT116 (karcinom střeva) způsobuje apoptózu nezávislou na systému kaspáz-3/7 [57].

2-phenylethynesulfonamid

Nízkomolekulární látka 2-phenylethynesulfonamid (PES) (známá též pod názvem pfithtrin- μ) zabraňovala akumulaci p53 v mitochondriích, nebyly však známy jeho přímé intracelulární cíle. Prostřednictvím biotinylovaného PES a afinitní precipitace byl jako intracelulární cíl tohoto inhibitoru nalezen HSPA1A. Vazebné místo pro PES bylo pomocí delecí mutagenese identifikováno v substrát vazebné doméně HSP70 [47]. PES vykazuje cytotoxicitu vůči širokému spektru solidních nádorů bez ohledu na jejich status p53 a zvýšenou expresi antiapoptotického Bcl-xL. PES způsobuje poškození procesu degradace makromolekul pomocí autofagie a lyzozomů, což vede k nahromadění nesprávně složených a agregovaných proteinů, vč. substrátů HSP90 a následně k buněčné smrti [58].

AEAC

AEAC je syntetický derivát kolchicinu inhibující HSPA1A. Bližší charakterizace mechanismu účinku prokázala inhibici vazby substrátu a poškození HSP70-řízeného refoldingu. Prozatím existují na základě *in silico* predikcí tři potenciální místa vazby inhibitoru AEAC – jedno v NBD a dvě v SBD. Ačkoliv byla naměřena nanomolární afinita mezi AEAC a HSPA1A *in vitro* a *in silico*, nebyl pozorován výrazný vliv podání AEAC na viabilitu nádorových buněk krysího glioblastomu (C6) a melanomu (B16). Současné podání AEAC a doxorubicinu však sig-

nifkantně zesílilo protinádorový efekt doxorubicinu [49].

Apoptozol

Apoptozol byl nalezen při screeningu knihovny imidazolových látek s apoptotickým účinkem. Při bližším zkoumání bylo zjištěno, že se specificky váže do NBD HSPA1A a HSPA8 [50,59]. Mechanismus účinku tohoto inhibitoru spočívá v přerušení interakce mezi HSP70 a jeho substrátem APAF1. Tato událost vede k aktivaci buněčné smrti závislé na kaspázách. Využití apoptozolu k potenciální protinádorové terapii podporuje studie na myších xenograftech, u nichž bylo pozorováno zmenšení nádoru bez vlivu na viabilitu myši [59].

Využití HSP70 v imunoterapii

Kromě nízkomolekulárních látek inhibujících HSP70 jsou v posledních letech také intenzivně studovány imunogenní vlastnosti chaperonů. V personalizované medicíně hledají své uplatnění komplexy HSP70-substrátový peptid izolované z nádorů konkrétního pacienta i lidský rekombinantní protein HSPA1A [60–62]. Ke zdolání nádorů pomocí imunitní odpovědi však existuje mnohem víc způsobů: a) imunizace komplexem HSP70-HPV16 oE7 antigenem vede k aktivaci imunitní odpovědi řízené CD8+ buňkami; b) exozomy z nádorových buněk nadměrně produkující HSP70 aktivují zránění dendritických buněk a odpověď řízenou buňkami CD4+ a CD8+ a c) komplexy HSP70 s tumor asociovanými antigeny izolované z fúzních dendritických a nádorových buněk způsobují odpověď řízenou T lymfocyty doprovázenou indukci efektorových i paměťových T buněk [60,63,64].

V současnosti probíhá několik klinických testů sledujících imunogenní vlastnosti HSP70. V prvním klinickém testu byla hledána míra odpovědi imunitního systému pacientů s chronickou myeloidní leukémií (CML) v chronické fázi na vakcínu vyrobenou z jejich vlastního nádoru. Vakcína byla připravena z přečištěného HSPA1A a na základě výsledků byla reinfúze autologních NK (natural killer) buněk aktivovaných HSPA1A shledána za bezpečnou [65]. Díky úspěšným testům z fáze I, probíhá v kombinaci

s chemoradioterapií fáze II u pacientů s NSCLC (NCT02118415). Odlišná vakcína pNGVL4a-Sig/E7(detox)/HSP70 DNA byla testována u pacientek s cervikální intraepiteliální neoplazií [66]. Ve fázi I klinického testování je také sledován rekombinantní protein HSP70 při léčbě CML v chronické fázi (NCT00030303).

Závěr

Zvýšení genetické nestability a proliferační aktivity nádorových buněk klade velké nároky na buněčný proteostatický aparát, jehož centrální složkou jsou molekulární chaperony HSP90 a HSP70. Úspěšné zavedení inhibice HSP90 do nádorové terapie je komplikováno komplexností buněčného chaperonového systému, který na inhibici HSP90 reaguje zvýšením exprese chaperonů rodiny HSP70. Objevení či design selektivního inhibitoru HSP70 s vysokou afinitou a jeho kombinované použití s inhibitory HSP90 představuje nadějnou strategii při léčbě nádorových onemocnění. Klíčové je zejména zacílení na stresem-indukovanou izoformu HSPA1A, jejíž zvýšená exprese je charakteristická pro nádorové buňky.

Literatura

1. Daugaard M, Rohde M and Jäättelä M. The heat shock protein 70 family: Highly homologous proteins with overlapping and distinct functions. *FEBS Lett* 2007; 581(19): 3702–3710. doi: 10.1016/j.febslet.2007.05.039.
2. Zyllicz M and Wawrzynow A. Insights into the function of Hsp70 chaperones. *IUBMB Life* 2001; 51(5): 283–287. doi: 10.1080/152165401317190770.
3. Durech M, Vojtěšek B and Müller P. The many roles of molecular chaperones and co-chaperones in tumor biology. *Klin Onkol* 2012; 25 (Suppl 2): 45–49.
4. Mayer MP and Bukau B. Hsp70 chaperones: Cellular functions and molecular mechanism. *Cell Mol Life Sci* 2005; 62(6): 670–684. doi: 10.1007/s00018-004-4464-6.
5. Flaherty KM, DeLuca-Flaherty C, McKay DB. 3-dimensional structure of the ATPase fragment of a 70K heat-shock cognate protein. *Nature* 1990; 346(6285): 623–628. doi: 10.1038/346623a0.
6. Kityk R, Kopp J, Sinning I et al. Structure and dynamics of the ATP-bound open conformation of Hsp70 chaperones. *Mol Cell* 2012; 48(6): 863–874. doi: 10.1016/j.molcel.2012.09.023.
7. Aprile FA, Dhulesia A, Stengel F et al. Hsp70 oligomerization is mediated by an interaction between the interdomain linker and the substrate-binding domain. *PLoS One* 2013; 8(6): e67961. doi: 10.1371/journal.pone.0067961.
8. Mayer MP. Hsp70 chaperone dynamics and molecular mechanism. *Trends Biochem Sci* 2013; 38(10): 507–514. doi: 10.1016/j.tibs.2013.08.001.
9. Kampinga HH and Craig EA. The HSP70 chaperone machinery: J proteins as drivers of functional specificity. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2010; 11(8): 579–592. doi: 10.1038/nrm2941.
10. Rüdiger S, Germeroth L, Schneider-Mergener J et al. Substrate specificity of the DnaK chaperone determined

- by screening cellulose-bound peptide libraries. *EMBO J* 1997; 16(7): 1501–1507. doi: 10.1093/emboj/16.7.1501.
11. Powers MV, Workman P. Inhibitors of the heat shock response: biology and pharmacology. *FEBS Lett* 2007; 581(19): 3758–3769. doi: 10.1016/j.febslet.2007.05.040.
 12. Shi YH, Mosser DD, Morimoto RI et al. Molecular chaperones as HSF1-specific transcriptional repressors. *Gene Dev* 1998; 12(5): 654–666.
 13. Zheng X, Krakowiak J, Patel N et al. Dynamic control of Hsf1 during heat shock by a chaperone switch and phosphorylation. *Elife* 2016; 5: e18638. doi: 10.7554/eLife.18638.
 14. Ferrarini M, Heltai S, Zocchi MR et al. Unusual expression and localization of heat-shock proteins in human tumor-cells. *Int J Cancer* 1992; 51(4): 613–619.
 15. Jaattela M. Over-expression of Hsp70 confers tumorigenicity to mouse fibrosarcoma cells. *Int J Cancer* 1995; 60(5): 689–693.
 16. Sherman MY and Gabai VL. Hsp70 in cancer: back to the future. *Oncogene* 2015; 34(32): 4153–4161. doi: 10.1038/onc.2014.349.
 17. Murphy ME. The HSP70 family and cancer. *Carcinogenesis* 2013; 34(6): 1181–1188. doi: 10.1093/carcin/bgt111.
 18. Stankiewicz AR, Lachapelle G, Foo CP et al. Hsp70 inhibits heat-induced apoptosis upstream of mitochondria by preventing Bax translocation. *J Biol Chem* 2005; 280(46): 38729–38739. doi: 10.1074/jbc.M509497200.
 19. Saleh A, Srinivasula SM, Balkir L et al. Negative regulation of the Apaf-1 apoptosome by Hsp70. *Nat Cell Biol* 2000; 2(8): 476–483. doi: 10.1038/35019510.
 20. Guo F, Sigua C, Bali P et al. Mechanistic role of heat shock protein 70 in Bcr-Abl-mediated resistance to apoptosis in human acute leukemia cells. *Blood* 2005; 105(3): 1246–1255. doi: 10.1182/blood-2004-05-2041.
 21. Ravagnan L, Gurbuxani S, Susin SA et al. Heat-shock protein 70 antagonizes apoptosis-inducing factor. *Nat Cell Biol* 2001; 3(9): 839–843. doi: 10.1038/ncb0901-839.
 22. Gabai VL, Meriin AB, Mosser DD et al. Hsp70 prevents activation of stress kinases – A novel pathway of cellular thermotolerance. *J Biol Chem* 1997; 272(29): 18033–18037.
 23. Yaglom JA, Gabai VL and Sherman MY. High levels of heat shock protein Hsp72 in cancer cells suppress default senescence pathways. *Cancer Res* 2007; 67(5): 2373–2381. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-3796.
 24. Gabai VL, Yaglom JA, Waldman T et al. Heat shock protein Hsp72 controls oncogene-induced senescence pathways in cancer cells. *Mol Cell Biol* 2009; 29(2): 559–569. doi: 10.1128/MCB.01041-08.
 25. Meng L, Hunt C, Yaglom JA et al. Heat shock protein Hsp72 plays an essential role in Her2-induced mammary tumorigenesis. *Oncogene* 2011; 30(25): 2836–2845. doi: 10.1038/onc.2011.5.
 26. Malusecka E, Zborek A, Krzyzowska-Gruca S et al. Expression of heat shock proteins HSP70 and HSP27 in primary non-small cell lung carcinomas. An immunohistochemical study. *Anticancer Res* 2001; 21(2A): 1015–1021.
 27. Ciocca DR, Calderwood SK. Heat shock proteins in cancer: diagnostic, prognostic, predictive, and treatment implications. *Cell Stress Chaperon* 2005; 10(2): 86–103.
 28. Hwang TS, Han HS, Choi HK et al. Differential, stage-dependent expression of Hsp70, Hsp110 and Bcl-2 in colorectal cancer. *J Gastroen Hepatol* 2003; 18(6): 690–700.
 29. Chuma M, Sakamoto M, Yamazaki K et al. Expression profiling in multistage hepatocarcinogenesis: Identification of HSP70 as a molecular marker of early hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2003; 37(1): 198–207. doi: 10.1053/jhep.2003.50022.
 30. Kurahashi T, Miyake H, Hara I et al. Expression of major heat shock proteins in prostate cancer: Correlation with clinicopathological outcomes in patients undergoing radical prostatectomy. *J Urology* 2007; 177(2): 757–761. doi: 10.1016/j.juro.2006.09.073.
 31. Thomas X, Campos L, Mounier C et al. Expression of heat-shock proteins is associated with major adverse prognostic factors in acute myeloid leukemia. *Leukemia Res* 2005; 29(9): 1049–1058. doi: 10.1016/j.leukres.2005.02.010.
 32. Ray S, Lu Y, Kaufmann SH et al. Genomic mechanisms of p210(BCR-ABL) signaling - Induction of heat shock protein 70 through the GATA response element confers resistance to paclitaxel-induced apoptosis. *J Biol Chem* 2004; 279(34): 35604–35615. doi: 10.1074/jbc.M401851200.
 33. Multhoff G, Botzler C, Wiesnet M et al. 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* 1995; 61(2): 272–279.
 34. Pocaly M, Lagarde V, Etienne G et al. Overexpression of the heat-shock protein 70 is associated to imatinib resistance in chronic myeloid leukemia. *Leukemia* 2007; 21(1): 93–101. doi: 10.1038/sj.leu.2404463.
 35. Juhasz K, Lipp AM, Nimmervoll B et al. The complex function of Hsp70 in metastatic cancer. *Cancers* 2014; 6(1): 42–66. doi: 10.3390/cancers6010042.
 36. Pfister K, Radons J, Busch R et al. Patient survival by Hsp70 membrane phenotype – association with different routes of metastasis. *Cancer* 2007; 110(4): 926–935. doi: 10.1002/cncr.22864.
 37. Guo F, Rocha K, Bali P et al. Abrogation of heat shock protein 70 induction as a strategy, to increase antileukemia activity of heat shock protein 90 inhibitor 17-allylamino-demethoxy geldanamycin. *Cancer Res* 2005; 65(22): 10536–10544. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-1799.
 38. Grossin L, Etienne S, Gaborit N et al. Induction of heat shock protein 70 (Hsp70) by proteasome inhibitor MG 132 protects articular chondrocytes from cellular death in vitro and in vivo. *Biorheology* 2004; 41(3–4): 521–534.
 39. Sadekova S, Lehnert S, Chow TY. Induction of PBP74/mortalin/Grp75, a member of the hsp70 family, by low doses of ionizing radiation: a possible role in induced radioresistance. *Int J Radiat Biol* 1997; 72(6): 653–660.
 40. Massey AJ. ATPases as drug targets: Insights from heat shock proteins 70 and 90. *J Med Chem* 2010; 53(20): 7280–7286. doi: 10.1021/jm100342z.
 41. Koya K, Li Y, Wang H et al. MKT-077, a novel rhodocyanine dye in clinical trials, exhibits anticarcinoma activity in preclinical studies based on selective mitochondrial accumulation. *Cancer Res* 1996; 56(3): 538–543.
 42. Li XK, Srinivasan SR, Connarn J et al. Analogues of the allosteric heat shock protein 70 (Hsp70) inhibitor, MKT-077, as anti-cancer agents. *ACS Med Chem Lett* 2013; 4(11): 1042–1047. doi: 10.1021/ml400204n.
 43. Hassan AQ, Kirby CA, Zhou W et al. The Novolactone natural product disrupts the allosteric regulation of Hsp70. *Chem Biol* 2015; 22(1): 87–97. doi: 10.1016/j.chembiol.2014.11.007.
 44. Ermakova SP, Kang BS, Choi BY et al. (-)-epigallocatechin gallate overcomes resistance to etoposide-induced cell death by targeting the molecular chaperone glucose-regulated protein 78. *Cancer Res* 2006; 66(18): 9260–9269. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-1586.
 45. Chang L, Miyata Y, Ung PM et al. Chemical screens against a reconstituted multiprotein complex: Myricetin blocks DnaJ regulation of DnaK through an allosteric mechanism. *Chem Biol* 2011; 18(2): 210–221. doi: 10.1016/j.chembiol.2010.12.010.
 46. Williamson DS, Borgognoni J, Clay A et al. Novel adenosine-derived inhibitors of 70 kDa Heat Shock Protein, discovered through structure-based design. *J Med Chem* 2009; 52(6): 1510–1513. doi: 10.1021/jm801627a.
 47. Leu JI, Pimkina J, Frank A et al. A small molecule inhibitor of inducible heat shock protein 70. *Mol Cell* 2009; 36(1): 15–27. doi: 10.1016/j.molcel.2009.09.023.
 48. Leu JI, Zhang P, Murphy ME et al. Structural basis for the inhibition of HSP70 and DnaK chaperones by small-molecule targeting of a C-terminal allosteric pocket. *ACS Chem Biol* 2014; 9(11): 2508–2516. doi: 10.1021/cb500236y.
 49. Lazarev VF, Sverchinsky DV, Mikhaylova ER et al. Sensitizing tumor cells to conventional drugs: HSP70 chaperone inhibitors, their selection and application in cancer models. *Cell Death Dis* 2018; 9(2): 41–52. doi: 10.1038/s41419-017-0160-y.
 50. Williams DR, Ko SK, Park S et al. An apoptosis-inducing small molecule that binds to heat shock protein 70. *Angew Chem Int Edit* 2008; 47(39): 7466–7469. doi: 10.1002/anie.200802801.
 51. Rerole AL, Gobbo J, De Thonel A et al. Peptides and aptamers targeting HSP70: A novel approach for anticancer chemotherapy. *Cancer Res* 2011; 71(2): 484–495. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-1443.
 52. Nadler SG, Tepper MA, Schacter B et al. Interaction of the immunosuppressant deoxyxpergualin with member of the Hsp70 family of heat-shock proteins. *Science* 1992; 258(5081): 484–486.
 53. Fewell SW, Day BW and Brodsky JL. Identification of an inhibitor of Hsp70-mediated protein translocation and ATP hydrolysis. *J Biol Chem* 2001; 276(2): 910–914. doi: 10.1074/jbc.M008535200.
 54. Rousaki A, Miyata Y, Jinwal UK et al. Allosteric drugs: the interaction of antitumor compound MKT-077 with human Hsp70 chaperones. *J Mol Biol* 2011; 411(3): 614–632. doi: 10.1016/j.jmb.2011.06.003.
 55. Propper DJ, Braybrooke JP, Taylor DJ et al. Phase I trial of the selective mitochondrial toxin HCT116 colon carcinoma cells. *Cancer Chemoth Pharm* 2010; 66(3): 535–545. doi: 10.1007/s00280-009-1194-3.
 56. Li XK, Colvin T, Rauch JN et al. Validation of the Hsp70-Bag3 protein-protein interaction as a potential therapeutic target in cancer. *Mol Cancer Ther* 2015; 14(3): 642–648. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-14-0650.
 57. Massey AJ, Williamson DS, Browne H et al. A novel, small molecule inhibitor of Hsc70/Hsp70 potentiates Hsp90 inhibitor induced apoptosis in HCT116 colon carcinoma cells. *Cancer Chemoth Pharm* 2010; 66(3): 535–545. doi: 10.1007/s00280-009-1194-3.
 58. Leu JI, Pimkina J, Pandey P et al. HSP70 Inhibition by the small-molecule 2-phenylethanesulfonamide impairs protein clearance pathways in tumor cells. *Mol Cancer Res* 2011; 9(7): 936–947. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-11-0019.
 59. Ko SK, Kim J, Na DC et al. A small molecule inhibitor of ATPase activity of HSP70 induces apoptosis and has antitumor activities. *Chem Biol* 2015; 22(3): 391–403. doi: 10.1016/j.chembiol.2015.02.004.
 60. Enomoto Y, Bharti A, Khaleque AA et al. Enhanced immunogenicity of heat shock protein 70 peptide complexes from dendritic cell-tumor fusion cells. *J Immunol* 2006; 177(9): 5946–5955.
 61. Guzhova IV and Margulis BA. HSP70-based anti-cancer immunotherapy. *Hum Vacc Immunother* 2016; 12(10): 2529–2535.
 62. McNulty S, Colaco CA, Blandford LE et al. Heat-shock proteins as dendritic cell-targeting vaccines - getting warmer. *Immunology* 2013; 139(4): 407–415. doi: 10.1111/imm.12104.
 63. Zong JB, Wang C, Liu B et al. Human hsp70 and HPV16 oE7 fusion protein vaccine induces an effective antitumor efficacy. *Oncol Rep* 2013; 30(1): 407–412. doi: 10.3892/or.2013.2445.
 64. Xie YF, Bai O, Zhang H et al. Membrane-bound HSP70-engineered myeloma cell-derived exosomes stimulate more efficient CD8(+) CTL- and NK-mediated antitumor immunity than exosomes released from heat-shocked tumour cells expressing cytoplasmic HSP70. *J Cell Mol Med* 2010; 14(11): 2655–2666. doi: 10.1111/j.1582-4934.2009.00851.x.
 65. Krause SW, Gastpar R, Andreesen R et al. Treatment of colon and lung cancer patients with ex vivo heat shock protein 70-peptide-activated, autologous natural killer cells: a clinical phase I trial. *Clin Cancer Res* 2004; 10(11): 3699–3707. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-03-0683.
 66. Trimble CL, Peng S, Kos F et al. A phase I trial of a human papillomavirus DNA vaccine for HPV16+ cervical intraepithelial neoplasia 2/3. *Clin Cancer Res* 2009; 15(1): 361–367. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-08-1725.