

**МЕМБРАННАЯ ЭКСПРЕССИЯ HSP70 НА ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТКАХ
ПРИ ОБЪЕМНОМ КУЛЬТИВИРОВАНИИ В 3D-КУЛЬТУРАХ**

Костенко В. В.^{1, 2},
Бойко А. А.¹,
Гречихина М. В.¹,
Овсяникова О. В.^{1, 2},
Сапожников А. М.¹

¹ ФГБУН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, 117997, Москва, Россия.

² ФГБУО ВО Московский Государственный университет им. М.В.Ломоносова, 119991, Москва, Россия.

**EXPRESSION OF MEMBRANE HSP70 ON TUMOR CELLS DURING
CULTIVATION IN 3D CULTURES**

Kostenko V. V.^{a, b},
Boyko A. A.^a,
Grechikhina M. V.^a,
Ovsyanikova O.V.^{a, b},
Sapozhnikov A. M.^a

^a Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Science, 117997, Moscow, Russia.

^b Lomonosov Moscow State University, 119991, Moscow, Russia.

Резюме

Белки теплового шока семейства 70 кДа (HSP70) относятся к внутриклеточным шаперонам, необходимым клетке для поддержания белкового гомеостаза. В цитозоле в нормальных условиях эти белки помогают правильному сворачиванию белков, предотвращая их агрегацию, участвуют в транспорте белков, выживании клеток. Среди белков HSP70 выделяют пул стресс-индуцируемых Hsp70, который заметно увеличивается в ответ на ряд стресс-факторов и способствует восстановлению клеток после стресса. Опухолевые клетки, в отличие от нормальных, характеризуются способностью представлять Hsp70 на поверхности клеточной мембраны. Мембраносвязанные Hsp70 могут выступать как сигналы опасности и способны усиливать или ингибировать иммунные реакции. Трехмерная модель клеточных культур в виде сфероидов в разной степени может имитировать структурную организацию солидных опухолей. В культурах многоклеточных сфероидов (3D) формируется гипоксия внутри сфероидов, градиенты питательных веществ, что может влиять на транслокацию Hsp70 на мембрану клеток. Целью данной работы был сравнительный анализ экспрессии Hsp70 на опухолевых клетках различного происхождения при культивировании в монослойном состоянии (2D) и 3D культурах. Анализ экспрессии провели на линиях рака молочной и поджелудочной желез, карцином толстой кишки и простаты, лимфомах методами проточной цитометрии и конфокальной микроскопии. Культивирование в 3D культурах проводили с использованием антиадгезивной подложки PolyHEMA. Показали, что карциномы различного происхождения не все экспрессируют Hsp70 как в 2D, так и в 3D культурах. Для некоторых опухолевых линий характерна экспрессия Hsp70 только в 3D культурах. Экспрессия Hsp70 была выявлена на клетках рака молочных желез BT20; карциномы толстой кишки SW837; поджелудочной железы PANC1 и простаты PC-3. Анализ Hsp70-положительных карцином различной локализации в 2D и 3D моделях может быть полезен для использования антител против Hsp70 в качестве вектора для доставки противоопухолевых препаратов.

Ключевые слова: Hsp70 – стресс индуцируемый белок теплового шока 70 кДа; рак молочной и поджелудочной желез; карцином толстой кишки и простаты; 2D и 3D культуры; флуоресцентная визуализация; конфокальная микроскопия.

Abstract

Heat shock proteins of the 70 kDa family (HSP70) are intracellular chaperones necessary for the cell to maintain protein homeostasis. In the cytosol, under normal conditions, these proteins promote the correct folding of proteins, preventing their aggregation, and are involved in protein transport and cell survival. Among the HSP70 proteins, there is a pool of stress-inducible Hsp70, which significantly increases in response to a number of stress factors and facilitates cell recovery after stress. Tumor cells, unlike normal, are characterized by the ability to present Hsp70 on the surface of the cell membrane. Membrane-bound Hsp70 can be considered as a danger signal and enhance or inhibit immune responses. A three-dimensional model of cells in the spheroids in varying degrees simulates the structural organization of solid tumors. In cultures of multicellular spheroids (3D), hypoxia and nutrient gradients are formed within the spheroids, which can affect the translocation of Hsp70 to the cell membrane. The purpose of this work was a comparative analysis of Hsp70 expression on tumor cells of various origins when cultivated in a monolayer state (2D) and 3D cultures. Analysis was carried out on breast and pancreatic tumor cell lines, colon and prostate carcinomas, and lymphomas using flow cytometry and confocal microscopy methods. Cultivation in 3D cultures was performed using the anti-adhesive PolyHEMA substrate. The results showed that not all carcinomas from our panel express Hsp70 in both 2D and 3D cultures. Some tumor lines has membrane Hsp70 only in 3D cultures. Hsp70 expression was detected on BT20 breast cancer cells; colon carcinoma SW837; pancreas PANC1 and prostate PC-3. Analysis of Hsp70-positive carcinomas of various localizations in 2D and 3D models may be useful for the application of antibodies against Hsp70 as a vector for the delivery of anticancer drugs.

Keywords: Hsp70 – stress-inducible heat shock protein 70 kDa; breast and pancreatic cancer; colon and prostate carcinomas; 2D and 3D cultures; fluorescence imaging; confocal microscopy.

1 Введение

Белки теплового шока (HSP) относятся к внутриклеточным шаперонам, необходимым клетке для поддержания белкового гомеостаза: они способствуют поддержанию нормальной конформации белков, предотвращают их агрегацию, они вовлечены в процессы транспорта и утилизации неправильно свернутых белков в нормальных условиях и при стрессе. Одну из групп HSP формирует семейство белков с молекулярной массой 70 кДа. Это семейство включает в себя конститутивно экспрессируемые белки (Hsc70, митохондриальный Hsp70), а также несколько стресс-индуцируемых белков (Hsp70), инициация накопления которых в клетке происходит в условиях гипертермии, окислительного стресса, токсического воздействия и др.[5]. Индуцируемые Hsp70 помимо внутриклеточной локализации экспрессируются на поверхности клеток различных злокачественных опухолей, для нормальных/нетрансформированных клеток поверхностная экспрессия Hsp70 не характерна [7]. Такой локализации способствуют специфическими изменения в липидных компонентах мембран опухолевых клеток, связанных с присутствием глоботриаозилцерамида (Gb3) и фосфатидил серина [4]. Появление мембрано-ассоциированных Hsp70 на поверхности клетки можно рассматривать как сигнал опасности, стимулирующего распознавание опухолевых клеток иммуннокомпетентными клетками [1,2,3,10], с другой стороны показано, что повышенная экспрессия Hsp70 на мембране опухолевых клеток ассоциирована с плохим прогнозом для пациентов [8]. Таким образом, опухоль-ассоциированную мембранную экспрессию Hsp70 можно рассматривать как мишень для доставки терапевтических препаратов к опухолевым клеткам.

В работе использовали линии клеток рака молочных желез BT20, BT474, HCC1395, MDA-MD-231; толстой кишки HCT116, HT29; аденокарцинома прямой кишки SW837; карциномы поджелудочной железы PANC1, AsPC1, COLO357; простаты Du145, PC-3; а также лимфом Raji, Daudi и лейкемии K562 (все линии из коллекции ИБХ РАН). Клетки инкубировали в среде DMEM/F12 с добавлением 10% фетальной телячьей сыворотки (FCS), L-глутамина, антибиотиков (все от ПанЭко, Москва) в инкубаторе с 5% CO₂ при температуре 37 °С. Клетки пассировали путем трипсинизации с использованием раствора трипсин/ЭДТА (ПанЭко, Москва) два раза в неделю.

Для получения 3D культур на дно стерильных 12-луночных планшетов (Costar, США) вносили 700 мкл поли(2-гидроксиэтилметакрилата) (PolyHEMA) (5 мг/мл в 100% этаноле). Планшеты оставляли до полного испарения спирта. После промывки фосфатно-солевым буфером (ФБ) в лунки вносили клетки и оставляли инкубировать 24-36 ч.

Для анализа методом проточной цитометрии клетки из 2D культур снимали трипсином, отмывали фосфатно-солевым буфером ФБ, переводили в

ФБ с 1% бычьего альбумина и 0.05% азида натрия (ФБА). Клетки из 3D культур разбивали на мелкие сфероиды интенсивным пипетированием и далее обрабатывали аналогично. Клетки разносили по 96-луночным круглодонным планшетах, добавляли антитела к Hsp70 (клон REA349, Miltenyi Biotec, Германия), меченные FITC или фикоэритрином (PE), инкубировали планшеты при +4 °C 1-2 ч, отмывали в ФБА и анализировали на проточном цитометре FACsCalibur (BD, USA). Результаты обработаны в программе FlowJo v.10 (BD, Колумбус, Огайо, США).

Для получения 2D культур клетки высевали на стерильные покровные стекла, помещенные в 6-луночные планшеты (Costar, Вашингтон, штат Вашингтон, США) и инкубировали в течение ночи. Затем клетки промывали в ФБ и инкубировали с антителом к Hsp70 (клон REA349, HSP70-PE, Miltenyi Biotec), меченным FITC или PE. Для анализа клеток в 3D культурах сфероиды переносили в лунки 96-луночных круглодонных планшетов и окрашивали антителами к Hsp70. Ядра клеток окрашивали Hoechst 33258 (Сигма, США) 10-15 мин. Инкубацию проводили 1-2 ч, отмывали ФБА, фиксировали 2% параформальдегидом и полимеризовали средой Mowiol 4.88 (Calbiochem, Германия). Слайды анализировали с помощью конфокального микроскопа Eclipse TE2000 (Nikon, Япония). Для обработки результатов использовалось программное обеспечение EZ-C1 FreeViewer (корпорация Nikon, Япония).

Графики были созданы с использованием программного обеспечения MS Excel. Данные представлены как среднее значение $\pm$ SEM по крайней мере для трех независимых экспериментов или как один репрезентативный эксперимент из трех. Статистический анализ проводился с использованием t-критерия Стьюдента. Уровни значимости $p < 0.05$ считались статистически достоверными.

Сравнительный анализ экспрессии Hsp70 методом проточной цитометрии на поверхности опухолевых клеточных линий различного происхождения после культивирования в стандартных условиях в монослое (2D культуры) показал, что не все клетки экспрессируют этот белок (Рис 1-2). Клетки линий рака молочной железы BT-20 и HCC1395 характеризовались наличием мембрано-ассоциированных Hsp70, тогда как MDA-MB-231 и BT474 были негативными (Рис 1, а). Среди анализируемых линий, выделенных из опухолей колоректального происхождения HCT116, SW837 и HT29 не было выявлено Hsp70-позитивных (Рис 1, d).

В условиях формирования сфероидов (3D культуры) регистрировалось усиление представленности на поверхности мембраны Hsp70 для линии BT-20 (Рис. 1, а, стрелка); уровень экспрессии Hsp70 на мембранах HCC1395 не менялся, а линии MDA-MB-231 и BT474 оставались негативными в 3D культурах, как в 2D состоянии (Рис.1, а).

89 Среди линий колоректального рака клеток усиление экспрессии Hsp70 в
90 3D культурах наблюдалось на линиях HT29 и SW837 (Рис.1, d). Мембранная
91 экспрессия Hsp70 в клетках HCT116 не появлялась в 3D культурах (Рис. 1. d).

92
93 Анализ поверхностной экспрессии Hsp70 методом конфокальной
94 микроскопии показал, что усиление транслокации Hsp70 на мембрану клеток
95 линии BT-20 наблюдается по поверхности сфероидов (Рис. 1, b), тогда как в
96 центре сфероида красное свечение отсутствовало (Рис. 1, b, стрелка).
97 Экспрессию Hsp70 на клетках MDA-MD-231 не наблюдали в 3D культуре
98 (Рис. 1, c), что согласуется с данными проточной цитометрии.

99 Аналогичные результаты были получены и на клетках колоректальных
100 карцином. Экспрессия Hsp70 на положительных линиях HT29 и SW837
101 локализовалась по поверхности сфероидов (Рис. 1, e, g) и отсутствовала на
102 сфероидах HCT116 (Рис.1, f).

103
104 Данные анализа экспрессии Hsp70 на линиях рака поджелудочной
105 железы PANC1, AsPC1 и COLO357 приведены только для 3D культур.
106 Показали, что все линии, на которых проводилось тестирование,
107 положительны по мембранной экспрессии Hsp70 (Рис.2, a); на клетках PANC1
108 экспрессия была выше. На клетках карциномы простаты PC-3 экспрессия была
109 очень высокой, а на клетках Du145 экспрессия отсутствовала или была очень
110 низкой (Рис. 2, b-e). Распределение повышенной экспрессии на линии PC-3
111 также наблюдалось в верхних слоях клеток сфероида (Рис. 2, e). Нельзя
112 исключить, что различия в представленности Hsp70 на мембране клеток линий
113 простаты, связаны с потенциалом их метастазирования, поскольку прослежена
114 связь между выживаемостью и путями метастазирования среди пациентов с
115 разным фенотипом мембрано-ассоциированных Hsp70 на опухолях [9].
116 Известно, что клетки PC-3 обладают высоким метастатическим потенциалом
117 по сравнению с клетками DU145, имеющими умеренный метастатический
118 потенциал [6].

119
120 Суспензионные культуры лимфом и лейкемии также культивировали на
121 антиадгезивной подложке. Клетки собирались в сферические культуры, легко
122 разбиваемые пипетированием. На клетках линий Daudi и K562 в 3D культурах
123 экспрессия Hsp70 полностью отсутствовала, а на клетках Raji
124 регистрировалась отдельная популяция, возможно, апоптотических клеток
125 (Рис. 2, c).

126
127 Суммарные данные по экспрессии Hsp70 на опухолевых клетках
128 различного происхождения, культивируемых в 2D и 3D условиях, приведены
129 в Таблице.

130 Таким образом, в модели многоклеточных сфероидов (3D культуры), которая
131 ближе воспроизводит функциональное состояние опухолевых клеток *in vivo*,
132 показали, что в некоторых линиях стимулируется транслокация Hsp70,

133 которая отсутствует в 2D культурах. Маркирование опухолевых клеток Hsp70
134 можно использовать для направленной доставки противоопухолевых
135 препаратов с помощью антител к Hsp70.

136 Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда
137 (проект № 23-15-00472).

ТАБЛИЦЫ

Таблица 1. Экспрессия Hsp70 на клетках эпителиальных карцином и лимфомах при культивировании клеток в 2D и 3D условиях.

Table 1. Expression of Hsp70 on epithelial carcinoma and lymphoma cells under 2D and 3D conditions.

Линии клеток/ Cell lines	2D	3D	Линии клеток/ Cell lines	2D	3D
			Карциномы поджелудочной железы/ Pancreatic carcinomas		
Карциномы молочных желез/ Breast carcinomas			PANC1	+	+
BT20	+	++	AsPC1	-	±
BT474	—	—	COLO357	-	±
HCC1395	+	+	Карциномы простаты/ Prostate carcinomas		
MDA-MD-231	—	—	Du145	—	—
			PC-3	+	++
Карциномы толстой кишки/ Colon carcinomas			Лимфомы, лейкемия/ Lymphomas, leukemia		
HT29	—	+	Raji	—	—
HCT116	—	—	Daudi	—	—
SW837	-	+	K562	—	—

РИСУНКИ

Рисунок 1. Экспрессия Hsp70 на клетках рака молочной железы BT20, BT474, HCC1395, MDA-MD-231 (a) и рака толстой кишки HT29, HCT116, SW837 (d), культивируемых в 2D и 3D культурах, оцененная методами проточной цитометрии. Экспрессия (Z-срезы) Hsp70 (красный) на сфероидах BT20 (b), MDA-MD-231 (c), HT29 (e), HCT116 (f) и SW837 (g). Окраска мембран Cer-BODIPY (зеленый). Шкала 15-20 мкм.

Figure 1. Expression of Hsp70 on breast cancer cells BT20, BT474, HCC1395, MDA-MD-231 (a) and colon cancer HT 29, HCT116, SW837 (d) cultured in 2D and 3D cultures assessed by flow cytometry. Expression of Hsp70 (red) on BT20 (b), MDA-MD-231 (c), HT29 (e), HCT116 (f) and SW837 (g) spheroids. The membranes are stained with Cer-BODIPY (green). The scale bar 15-20 μ m.

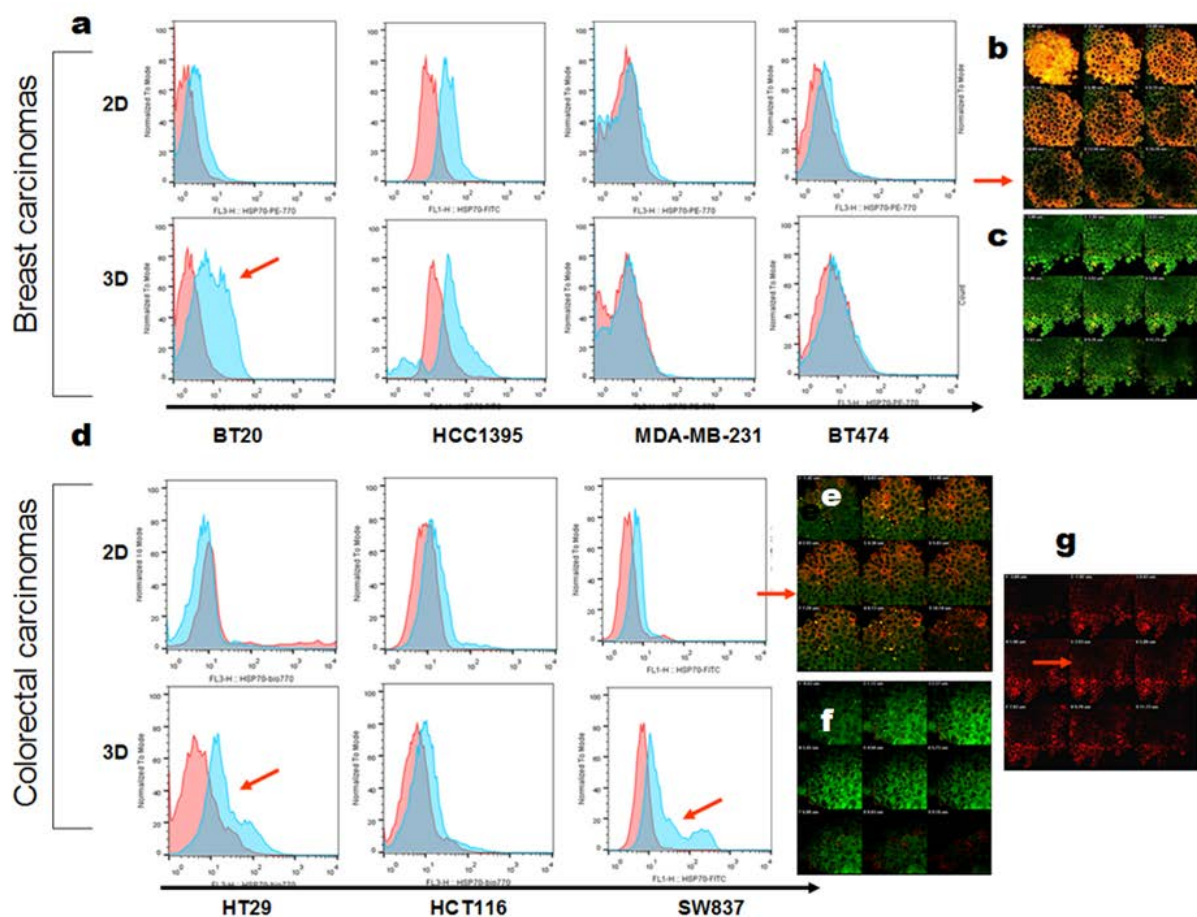
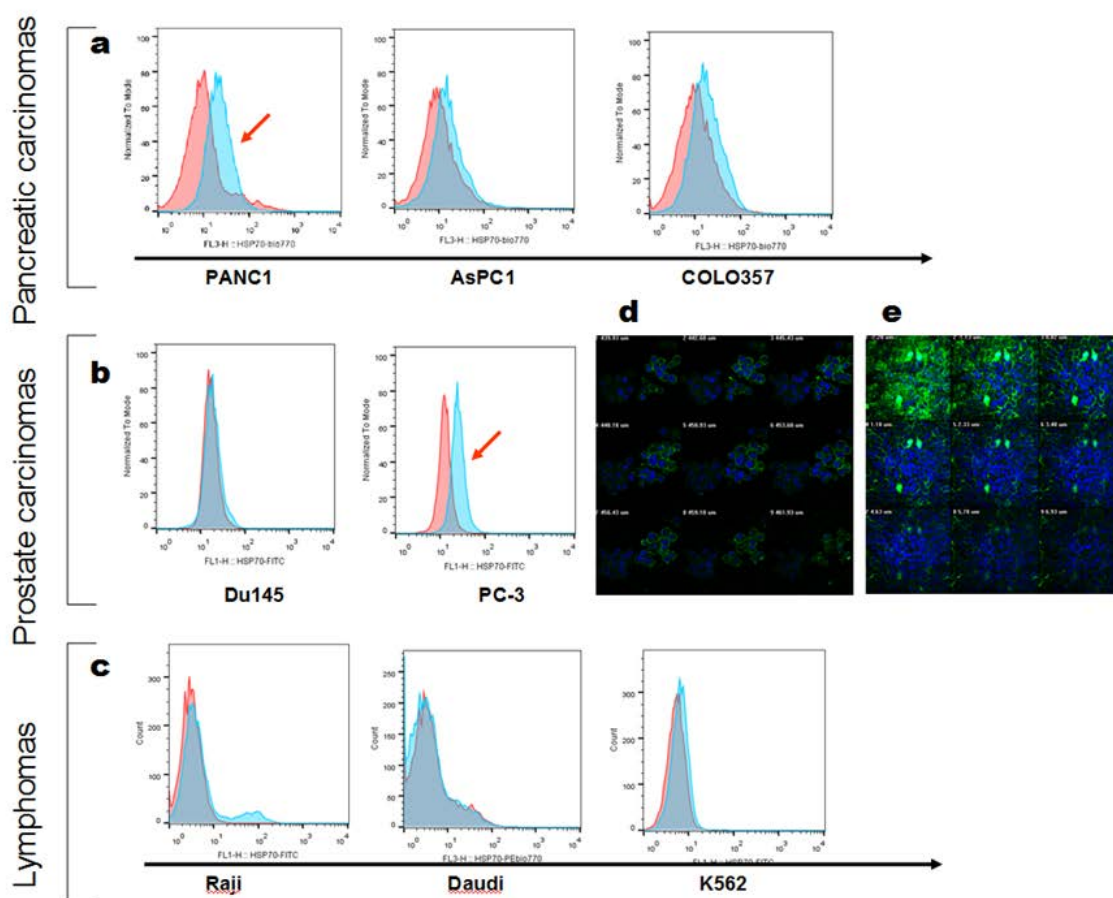


Рисунок 2. Экспрессия Hsp70 на клетках рака поджелудочной железы PANC1, AsPC1, COLO357 (a), карциномы простаты Du145, PC-3 (b), лимфом Raji, Daudi и лейкемии K562 (c), культивируемых в 3D культурах в проточной цитометрии. Конфокальная микроскопия экспрессии Hsp70 (зеленый) на сфероидах Du145 (d) и PC-3 (e). Ядра окрашены Hoechst 33258 (синий). Шкала 15-20 мкм.

Figure 2. Expression of Hsp70 on pancreatic cancer cells PANC 1, AsPC1, COLO357 (a), prostate carcinoma Du145, PC-3 (b), Raji, Daudi, K562 lymphomas (c) cultured in 3D conditions by flow cytometry method. Confocal microscopy of Hsp70 expression (green) on Du145 (d) and PC-3 (e) spheroids. The nuclei are stained with Hoechst 33258 (blue). The scale bar 15-20 μ m.



ТИТУЛЬНЫЙ ЛИСТ_МЕТАДАННЫЕ

Блок 1. Информация об авторе ответственном за переписку

Бойко Анна Александровна – к.б.н., н.с., Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук
адрес: 117997, Российская Федерация, Москва, ГСП-7, улица Миклухо-Маклая, дом 16/10;

телефон: 8(916)303-73-02;

e-mail: boyko_anna@mail.ru

Boyko Anna A. – PhD, research scientist, Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences;

address: 117997, Russian Federation, Moscow, GSP-7, Ulitsa Miklukho-Maklaya, 16/10;

telephone: 8(916)303-73-02;

e-mail: boyko_anna@mail.ru

Блок 2. Информация об авторах

Костенко Валентина Витальевна – студент бакалавриата ФГБУО ВО “Московский Государственный университет им. М.В.Ломоносова”, Россия, 119991Москва, Ленинские горы, 1, инженер-исследователь отдела иммунологии Институт биоорганической химии РАН, 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10;

e-mail: 89168752290@mail.ru

Kostenko Valentina V. – undergraduate student of the Lomonosov Moscow State University, Russia, 119991Moscow, Leninskie Gory, 1, Research Engineer of the Department of Immunology, Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences, 16/10 Miklukho-Maklaya str., 117997, Moscow;

e-mail: 89168752290@mail.ru

Гречихина Мария Владимировна – м.н.с., Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук 117997, Российская Федерация, Москва, ГСП-7, улица Миклухо-Маклая, дом 16/10;

e-mail: marygrec@mail.ru

Grechikhina Maria V. – Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Science, 16/10 Miklukho-Maklaya str., 117997, Moscow;

e-mail: marygrec@mail.ru

Овсяникова Ольга Викторовна – аспирант ФГБУО ВО “Московский Государственный университет им. М.В.Ломоносова”, Россия, 119991Москва, Ленинские горы, 1, инженер-исследователь отдела иммунологии Институт биоорганической химии РАН, 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10;

e-mail: olgaovsyanicova@yandex.ru

Ovsyanikova O. V. – PhD student of the Lomonosov Moscow State University, Russia, 119991 Moscow, Leninskie Gory, 1, Research Engineer of the Department of Immunology, Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences, 16/10 Miklukho-Maklaya str., 117997, Moscow;

e-mail: olgaovsyanyickova@yandex.ru

Сапожников Александр Михайлович – д.б.н., профессор, г.н.с. Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, 117997, Российская Федерация, Москва, ГСП-7, улица Миклухо-Маклая, дом 16/10;

e-mail: amsap@mail.ru

Sapozhnikov Aleksandr M. – Professor, Doctor of Science, Principal research fellow, Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Science, 16/10 Miklukho-Maklaya str., 117997;

e-mail: amsap@mail.ru

Блок 3. Метаданные статьи

МЕМБРАННАЯ ЭКСПРЕССИЯ HSP70 НА ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТКАХ ПРИ ОБЪЕМНОМ КУЛЬТИВИРОВАНИИ В 3D-КУЛЬТУРАХ

EXPRESSION OF MEMBRANE HSP70 ON TUMOR CELLS DURING CULTIVATION IN 3D CULTURES

Сокращенное название статьи для верхнего колонтитула:

ЭКСПРЕССИЯ HSP70 В 3D КУЛЬТУРАХ

EXPRESSION OF HSP70 IN 3D CULTURES

Ключевые слова: Hsp70 – стресс индуцируемый белок теплового шока 70 кДа; рак молочной и поджелудочной желез; карцином толстой кишки и простаты; 2D и 3D культуры; флуоресцентная визуализация; конфокальная микроскопия.

Keywords: Hsp70 – stress-inducible heat shock protein 70 kDa; breast and pancreatic cancer; colon and prostate carcinomas; 2D and 3D cultures; fluorescence imaging; confocal microscopy.

Объединенный иммунологический форум 2024.

Количество страниц текста – 4,

Количество таблиц – 1,

Количество рисунков – 2.

29.03.2024

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Порядко вый номер ссылки	Авторы, название публикации и источника, где она опубликована, выходные данные	ФИО, название публикации и источника на английском	Полный интернет-адрес (URL) цитируемой статьи или ее doi.
1	Albakova Z., Armeev G. A., Kanevskiy L.M., Kovalenko E.I., Sapozhnikov A.M. HSP70 Multifunctionality in Cancer . <i>Cells</i> .2020, V. 2; 9(3), pp. 587		doi: 10.3390/cells9030587
2	Alekseeva L.G., Ovsyanikova O.V., Schulga A.A., Grechikhina M.V., Shustova O.A., Kovalenko E.I., Svirshchevskaya E.V., Deyev S.M., Sapozhnikov A.M. Targeted Delivery of HSP70 to Tumor Cells via Supramolecular Complex Based on HER2-Specific DARPIn9_29 and the Barnase:Barstar Pair . <i>Cells</i> . 2024. V.13, pp. 317.		https://doi.org/10.3390/cells13040317
3	Gastpar R., Gehrman M., Bausero M.A., Asea A., Gross C., Schroeder J.A., et al. Heat Shock Protein 70 Surface-Positive Tumor Exosomes Stimulate Migratory and Cytolytic Activity of Natural Killer Cells . <i>Cancer Res</i> . 2005.V. 65(2), pp. 5238–47.		doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-3804

4	Gehrmann M., Liebisch G., Schmitz G., Anderson R., Steinem C., De Maio A., Pockley G., Multhoff G. Tumor-specific Hsp70 plasma membrane localization is enabled by the glycosphingolipid Gb3. <i>PLoS One</i> . 2008. V.2, 3(4), pp. e1925.		doi: 10.1371/journal.pone.0001925
5	Mayer M.P., Bukau B. Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. <i>Cell Mol Life Sci</i> . 2005. 62(6), pp. 670-684.		doi: 10.1007/s00018-004-4464-6.
6	Molter C.W., Muszynski E.F., Tao Y., Trivedi T., Clouvel A., Ehrlicher A.J. Prostate cancer cells of increasing metastatic potential exhibit diverse contractile forces, cell stiffness, and motility in a microenvironment stiffness-dependent manner. <i>Front Cell Dev Biol</i> . 2022.V.10, pp. 932510.		doi: 10.3389/fcell.2022.932510
7	Multhoff G., Botzler C., Wiesnet M., Müller E., Meier T., Wilmanns W. 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. <i>Int J Cancer</i> . 1995, 61(2), pp. 272–9.		doi: 10.1002/ijc.2910610222
8	Murphy M.E. The HSP70 family and cancer. <i>Carcinogenesis</i> . 2013, 34(6), pp: 1181-1188.		doi: 10.1093/carcin/bgt111.

9	Pfister K., Radons J., Busch R., Tidball J.G., Pfeifer M., et al. Patient survival by Hsp70 membrane phenotype: association with different routes of metastasis. <i>Cancer</i> . 2007, V.110, pp. 926–935		doi: 10.1002/cncr.22864.
10	Shevtsov M.A., Komarova E.Y., Meshalkina D.A., et al. Exogenously delivered heat shock protein 70 displaces its endogenous analogue and sensitizes cancer cells to lymphocytes-mediated cytotoxicity. <i>Oncotarget</i> . 2014, V.5, pp. 3101–3114		doi: 10.18632/oncotarget.1820.