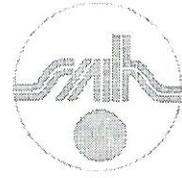


Las proteínas del shock térmico

Graciela E. Laguens
Wanda T. Di Girolamo
Carlos Ponzinibbio

Cátedra de Patología B
Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de La Plata
Calle 60 y 120, 1900 La Plata
TE 0221 4233557
e-mail: carlopon@atlas.med.unlp.edu.ar

Fecha de recepción: 09-03-03
Fecha de aprobación: 25-04-03



ARTICULO DE REVISION

HEMATOLOGIA, Vol. 7 N° 1: 1-6
Enero-Abril, 2003

QUE SON LAS PROTEÍNAS DEL SHOCK TÉRMICO

En los últimos 20 años, se produjo el descubrimiento de una familia de proteínas que intervenían en las estrategias que poseen las células para sobrevivir ante diversas injurias o situaciones de «stress». Estas injurias variaban desde el calor o el frío, desequilibrios osmóticos, tóxicos, metales pesados hasta señales fisiopatológicas de algunas citoquinas y eicosanoides. Estas proteínas celulares, constitutivas o inducibles, han recibido hasta la fecha diversas denominaciones: **Hsp** (por Heat Shock Protein o Proteína del Shock por Calor), **Proteínas del Stress** y **Chaperonas o Chaperoninas Moleculares**¹. Este último nombre, acuñado por Lasky en 1978, se debe a la función particular de estas familias de proteínas de ayudar, guiar o asistir como una «chaperona» al plegamiento de diversas proteínas celulares normales para que adquieran su estructura terciaria. Además, estas proteínas, participan también en la reparación de las proteínas desnaturalizadas o promueven su degradación después de una injuria². Estos mecanismos protegen a la célula de los efectos dañinos y están presente en funciones esenciales tales como el metabolismo, el crecimiento y diferenciación celular, y la muerte celular programada (apoptosis)³. Cabe señalar además, que estas proteínas pueden intervenir en la activación de otros sustratos, tales como enzimas y receptores⁴. La denominación Hsp proviene de un hecho casual observado por un grupo de investigadores que dejaron olvidado un cultivo celular en una estufa con una temperatura alta pero no letal para ellas. Cuando estas células cultivadas se sometieron ulteriormente a una determinada injuria, se vio que, llamativamente,

sobrevivieron. Por el contrario, las células de un cultivo similar que no habían recibido el «shock» calórico no fueron capaces de sobrevivir cuando fueron sometidas a la misma injuria. Estas proteínas se han conservado en toda la evolución de los seres vivos y se expresan en todas las células, variando su localización intracelular: en los procariotas se encuentran en el citosol mientras que en los eucariotas se ubican no sólo en el citosol, sino también en el núcleo y organelas. De acuerdo a su peso molecular se identifican 10 familias de Hsp, dentro de cada una de las cuales se reconocen de uno a cinco proteínas diferentes. Sus funciones se listan en la tabla 1⁵.

A raíz de trabajos experimentales con trasplantes de tejidos y de tumores, se han determinado roles inmunológicos fundamentales en dos grupos de moléculas: las pertenecientes al Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH) y las Hsp. Entre ellas existen amplias diferencias, sin embargo ambas están íntimamente relacionadas con respecto a sus funciones, y pese a sus disimilitudes, las dos convergen para crear el terreno apto para el desarrollo de la inmunidad innata y adaptativa⁶.

Se ha demostrado (7) que la interacción entre ciertas Hsp (Hsp 60, 70, 90, 96) con células presentadoras de antígenos (CPA), a través de los receptores «toll-like» y CD14, produce una serie de procesos que son independientes de la presentación antigénica, propios de la inmunidad innata. En esta situación se puede producir la secreción de citoquinas proinflamatorias y quimioquinas, la inducción de la sintetasa del óxido nítrico, la maduración de células dendríticas (CD) con aumento de expresión de moléculas coestimuladoras, y la traslocación de NFκB en el núcleo de las CPA, que es una de las vías de señales de transducción más conservada en el sistema inmune⁸.

Ciertos antígenos derivados de tumores y de células infectadas por virus no tienen de por sí capacidad inmunogénica, y la adquieren en cambio, al unirse a las Hsp. Estas proteínas tienen uno o dos sitios de unión para esos péptidos antigénicos. El complejo así formado interactúa a través de receptores específicos (CD91) presentes en la superficie con las CPA, que lo endocitan, procesan y presentan en el contexto de las moléculas clase I y/o clase II del CMH (9). El complejo Hsp-péptido puede producir una respuesta de linfocitos T CD 8+ a pesar de la administración exógena. Es sabido que los antígenos exógenos son presentados a través del CMH clase II y producen una respuesta de linfocitos T CD 4+, mientras que los antígenos sintetizados en forma endógena son presentados a través de las moléculas clase I del CMH. Sin embargo, se ha demostrado que la inmunización utilizando Hsp unida a péptidos exógenos produce también una respuesta antígeno específica restringida a las moléculas clase I (a este fenómeno particular se le ha llamado *cross-presentation* ó presentación cruzada)¹⁰. Se considera, por lo tanto, que las Hsp actúan como coadyuvantes en la presentación inmune. De esta forma se hace necesario sólo una pequeña cantidad de péptido acompañado para obtener una inmunización efectiva⁶. La secreción de IL12 por la CPA, luego de su interacción con Hsp provoca la expansión de la población de células NK ampliando la respuesta inmune. Estas propiedades permiten el uso de las Hsp para desarrollar una nueva generación de vacunas profilácticas y terapéuticas contra el cáncer y enfermedades infecciosas¹¹.

En el intento de desarrollar una respuesta antitumoral eficaz, actualmente se están realizando distintos experimentos con el objeto de activar a las células dendríticas que son las células presentadoras de antígenos por excelencia. Varios autores¹²⁻¹³, han demostrado que los lisados de células tumorales necróticas causan la maduración de CD evidenciada por la expresión de moléculas co-estimuladoras en su superficie. Las células tumorales que mueren por necrosis liberan Hsp que son captadas por el receptor correspondiente en las CD. Se considera que las células tumorales necróticas son más inmunogénicas que las que mueren por apoptosis. Dado que las Hsp son moléculas eminentemente intracelulares, su detección en el microambiente tumoral es una señal de pérdida de la integridad celular. De esta manera, la Hsp liberada por las células tumorales se une a péptidos derivados del tumor necrótico y es captada a través del receptor CD 91 de las CD, estas células maduran y realizan eficazmente la presentación del péptido antigénico para obtener una respuesta inmune antígeno-específica.

Las familias mejor estudiadas a la fecha son las Hsp que tienen un peso molecular entre 90 y 60 kDa¹⁴.

Hsp 90: Los miembros de esta familia tienen la función de regular diversas proteínas. Por ejemplo, se ha observado que la tirosinquinasa de membrana es sintetizada en forma inactiva y se acompleja transitoriamente con la Hsp 90 constitutiva. El complejo se traslada a la membrana plasmática y la Hsp libera a la enzima en forma activa. Otras tirosinquinases tienen interacciones similares con la Hsp90. Funcionalmente se relacionan con los receptores de las hormonas esteroides regulando su actividad biológica. En este caso, facilitan el traslado del receptor esteroideo al núcleo activando la expresión de los genes correspondientes¹⁵.

Hsp 70: Cuando las células son sometidas a estrés por calor, la Hsp 70 migra rápidamente al núcleo, especialmente al nucléolo, donde cumple la función de proteger a las estructuras ribosomales del mismo que son sensibles a las temperaturas elevadas, y también se une al complejo de replicación de ADN que es una estructura termolábil. Normalmente la Hsp 70 se expresa durante la fase S del ciclo celular. Previene el plegamiento incorrecto de proteínas que se están sintetizando, y facilita el transporte de proteínas dañadas a los lisosomas para su degradación. Como se ha señalado antes, tienen funciones inmunológicas tales como asistir al plegamiento correcto de las moléculas clase I del CMH y también acompañar a los antígenos endógenos para su presentación¹⁶. Un componente de esta familia, la p72/74 denominada proteína que une péptidos (PBP), es una molécula constitutiva de los linfocitos B y de las CPA que está comprometida no sólo en la presentación, sino también en el procesamiento de antígenos. La respuesta inmune depende si la presentación del antígeno se realiza en el contexto de las moléculas clase I o II del CMH a las células inmunocompetentes. La PBP se une a péptidos antigénicos en los endosomas o lisosomas y los protege de la proteólisis para luego transferir el epitope al CMH a fin de que lo exponga en la superficie celular.

La Hsp 70 actúa como inhibidora de la apoptosis dependiente de estrés. Este proceso es indispensable para la homeostasis de los tejidos y la regulación del sistema inmune. La supresión de la apoptosis está implicada en enfermedades humanas, tales como el cáncer, enfermedades neurodegenerativas y procesos isquémicos. La apoptosis celular puede ser inducida por una gran variedad de señales como la activación del receptor Fas por la unión de su ligando, la privación de factores de crecimiento, estrés oxidativo, daño irreparable del ADN, tratamiento con drogas quimioterapéuticas, radiaciones¹⁷. La

apoptosis iniciada por estrés comienza con la liberación de citocromo-c mitocondrial. El citocromo-c junto con el ATP se une al factor activador de proteasas (Apaf-1) en el citoplasma, provocando la activación en cascada de las procaspasas 9, 3, 6 y 7 resultando en una alteración de los procesos celulares, cambios morfológicos en el núcleo celular y, finalmente a la muerte¹⁸.

Las isquemias y las enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer son el resultado de una apoptosis excesiva, por lo cual la limitación de este proceso podría constituir una instancia de manejo de estas patologías. Proteínas como bcl-2 pueden servir para inhibir la apoptosis interfiriendo la liberación de citocromo-c. Igualmente la Hsp70 protege a las células de estímulos apoptóticos, al suprimir la actividad de una protein-quinasa, la c-jun NH2 quinasa terminal, que es un componente temprano de la vía de señalización de la apoptosis inducida por estrés¹⁹.

Hsp60: además de actuar como una molécula chaperona, es una proteína clave en la respuesta inmune innata actuando como una señal de peligro. En estudios experimentales se ha comprobado que cuando se incuban macrófagos, células endoteliales y células musculares lisas con Hsp 60, se produce la liberación de citoquinas proinflamatorias. Esta respuesta se pone de manifiesto *in vivo* incrementando la expresión de moléculas de adhesión y co-estimuladoras B7-2 y liberación de mediadores tales como Il-6 y TNF alfa.

La Hsp 60 humana induce la expresión de genes que codifican para la Il-12 e Il-15. Estas citoquinas son esenciales para la polarización de linfocitos T CD4+ a Th1²⁰.

Esta molécula tiene la capacidad de unirse a receptores semejantes al CD14 y al Toll-like en la su-

perficie de CPA provocando liberación de citoquinas y reclutamiento de células T. De esta manera la Hsp60 actúa como iniciadora de la respuesta inmune adaptativa, desempeñando el papel de ligando molecular entre la respuesta inmune innata y la adaptativa²¹.

Se ha demostrado que la Hsp 60 cumple un rol importante en la patogenia de diversas enfermedades humanas. Investigaciones recientes han señalado que el evento inicial en la aterosclerosis podría ser una injuria de naturaleza autoinmune en las paredes de los vasos y la Hsp 60 que es expresada en la superficie de las células endoteliales se comportaría como un posible autoantígeno. Cuando la Hsp 60 autóloga es liberada durante la necrosis en enfermedades inflamatorias o es trasladada a la membrana plasmática durante diversas situaciones de estrés, se comporta como un antígeno "peligroso" capaz de montar una respuesta inmune capaz de producir y perpetuar el daño. Este mecanismo de daño podría estar involucrada en numerosos procesos inflamatorios donde se ha demostrado una expresión aumentada de la Hsp 60, tales como la artritis reumatoidea, insulinitis, enfermedad de Crohn y aterosclerosis²².

Por otra parte, se ha observado que las Hsp 60 de origen microbiano se comportan como verdaderos antígenos capaces de estimular el desarrollo de una respuesta inmune protectora contra diversas infecciones²³⁻²⁴. Tabla 1

LAS PROTEÍNAS DEL SHOCK TÉRMICO Y EL SISTEMA HEMOPOYÉTICO

Con referencia particular al sistema hemopoyético se han descrito funciones específicas conocidas para las proteínas del shock térmico.

TABLA 1

Familia	Funciones
Hsp 10(GroES)	Síntesis de citoquinas en monocitos
Hsp 20	Inmunosupresora temprana en el embarazo
Hsp 22 (αβ cristalina)	Vasorelajación
Hsp 27	Estabilización del citoesqueleto
Hsp 40	Dinámica de la actina. Receptores estrogénicos.
Hsp 60(GroEL)	Anti-apoptótica.
Hsp 70	Acitividad de chaperona. Control de la síntesis del colágeno.
Hsp 90	Chaperona. Induce la expresión de Moléculas de Adhesión en el endotelio vascular.
Hsp 100	Anti-apoptótica (induce expresión de bcl-2).
Hsp 110	Involucrada en el transporte de proteínas.
	Regula la respuesta al calor.
	Interviene en las señales de las vías de transducción, a través de quinasas y Rc.esteroides. Actividad de chaperona .
	Actividad de chaperona.
	Alta homología con la flia. Hsp 70. No se conocen bien aún sus funciones.

Fisiológicamente, cabría asignar a las Hsps una función de señal de alerta dentro del complejo de activación de la inmunidad innata (24) tal cual se ha señalado mas arriba. Las Hsps son sensibles al daño celular infligido por diversas injurias, actuando como portadoras de péptidos celulares derivados de células tumorales o de células infectadas por virus trasladándolos a moléculas clase I del sistema Mayor de Histocompatibilidad presente en las células presentadoras de antígenos profesionales²⁵. Recientemente se ha descrito para la Hsp Gp 96 una función de este tipo, pero que a diferencia de la descripción original, utiliza a los leucocitos polimorfonucleares como fase inicial del proceso de activación. Esta Hsp, naturalmente almacenada en el retículo endoplasmático (RE), es liberada por la acción de diversas injurias celulares al espacio extracelular desde donde sería captada por los PMNs. Para ello utilizaría los mismos receptores que el PMN emplea para el reconocimiento de los lipopolisacáridos bacterianos (LPS). La unión del ligando al receptor desencadenaría el proceso de activación celular conocido como endocitosis mediada por receptor tanto en PMNs como en monocitos. En el mismo trabajo se describe el aumento de síntesis de la quimiocina IL-8, conocida por su capacidad para reclutar mas PMNs, fenómeno coincidente con la observación de acumulación de PMNs en los sitios de necrosis celular²⁶.

Como contrapartida de esta actividad estimulante pro-inflamatoria, se ha observado la capacidad de absorción por parte de las plaquetas de la Hsp 90. Estas partículas subcelulares, además de intervenir en la formación del tapón hemostático, desempeñan un papel importante en el proceso de cicatrización por medio de la liberación de un conjunto de mediadores químicos. Se ha logrado la evidencia experimental que las plaquetas expresan receptores para la Hsp Gp96, unión que se ve notablemente aumentada por el agregado de trombina. De esta forma, se postula que la retención en las plaquetas de la Hsp Gp96 disminuiría la disponibilidad de la misma para intervenir en la estimulación del proceso inflamatorio, limitando así la progresión del mismo²⁷.

Desde el punto de vista terapéutico en hematología el conocimiento de las Hsp pueden ser explotado, básicamente, por dos vías: A) utilizando la capacidad inmunogénica de las Hsp en procedimientos inmunoterapéuticos, y B) por el hecho que varias proteínas celulares con potencial oncogénico dependen de las Hsp para mantener su estabilidad.

A) La propiedad de transporte de péptidos exógenos de las Hsps a moléculas del HLA se aprovecha para despertar reacciones inmunes de especial potencia con aplicación inmunoterapéutica.

Numerosas formas de inmunoterapia activa utilizan esta propiedad^{28,29,30}. Algunos ensayos se han realizado con la intención de erradicar células leucémicas residuales post-trasplante³¹. En un trabajo experimental Sato K et al³², pusieron en evidencia que ratones inmunizados durante el período de reconstitución inmunológica post-trasplante con Hsp 70 y Hsp Gp 96 de la línea celular leucémica murina A 20, mostraron una sobrevida superior a los controles no inmunizados. Esta respuesta se vio mediada por la acción conjunta de células CD 4 + y células CD 8 + citotóxicas, y demostraría la capacidad de eliminar células leucémicas residuales en los animales.

En otra observación concordante, Yi Zeng et al³³ señalan la actividad antitumoral de lisados ricos en células y chaperonas como estimulantes de células dendríticas. La vacunación con este producto de ratones portadores del tumor murino 12B1 *bcr-abl* +, resultó en una curación del 75 % de los animales.

B) Un buen ejemplo de la segunda situación en patología hematológica puede verse en ensayos recientes de aplicación de drogas con capacidad inhibitoria de la Hsp 90. La mas empleada de ellas es la Geldanamicina. Esta es una ansamicina-benzoquinona que inhibe específicamente la Hsp 90 por unión competitiva en el amino terminal del bolsillo para ATP de la Hsp 90^{34,35}.

WG An y colaboradores describieron en el año 2000 que la Geldanamicina altera la asociación de la proteína de fusión p210 *bcr-abl* con la Hsp 90³⁶.

En la Leucemia Mieloide crónica (LMC) se presenta en forma característica la traslocación BCR-ABL que codifica para la proteína p210 *bcr-abl* con capacidad oncogénica a través de una actividad de tirosinquinasa específica³⁷. La disponibilidad actual de un inhibidor sintético de esta proteína - imatinib mesilato- representa un avance significativo en el tratamiento de LMC³⁸. Sin embargo, se está actualmente viendo que el tratamiento con imatinib en pacientes en fase blástica es de corto alcance por la aparición de resistencia al inhibidor. Esta resistencia estaría dada, al menos en algunos casos, por mutaciones de la traslocación BCR-ABL³⁹. Un camino nuevo para enfrentar esta pérdida de sensibilidad al tratamiento es utilizar la dependencia que la p210 *bcr-abl* tiene de la Hsp 90 para mantener su estabilidad. Experimentalmente se ha puesto en evidencia que degradando específicamente la Hsp 90 con Geldanamicina inhibe el producto BCR-ABL⁴⁰.

Otro ejemplo de aplicación reciente del inhibidor de la Hsp 90 Geldanamicina lo presentan Mitsiades et al⁴¹ al comunicar el efecto protector de esta droga en mieloma murino. Los animales tratados con Geldanamicina mostraron una sobrevida superior a los no tratados. Empleando la línea celular de

mieloma in vitro, los autores pusieron en evidencia que la droga actúa por inhibición de la expresión y la señalización interna del sistema Pi3-RAS-MAPK. Esta información debería conjugarse con el hallazgo obtenido utilizando la técnica de microchips para identificar genes, que señala al gen de la Hsp 70 como uno de los integrantes del compendio de genes mas frecuentemente expresados en el mieloma⁴².

Se señala un efecto parecido de control sobre leucemias FLT3, MLL+. utilizando tanto herbamicina como Geldanamycin, en este trabajo, los autores consiguieron una reducción del crecimiento celular leucémico, mediada por la desestabilización de quinasas tales como FLT3 y MAPK⁴³.

Ciertamente, es posible observar cada día la aparición en la bibliografía nuevos ensayos vinculados a propiedades y usos de estas familias de proteínas, - como por ejemplo- aquella cita en la que se evidencia que la Hsp 90 se torna esencial para el desarrollo del Plasmodium Falciparum en eritrocitos humanos, abriendo así un camino para nuevas intervenciones terapéuticas⁴⁴. De esta tal modo, debería pensarse a esta breve revisión como la introducción a un tema actualmente abierto y en pleno desarrollo.

BIBLIOGRAFÍA

1. Beissinger M, Buchner J. How chaperones fold proteins. *Biol Chem* 1998; 379:245-259
2. Whitley D, Goldberg S, Jordan W. Heat shock proteins: A review of the molecular chaperones. *J Vasc Surg* 1999; 29:748-751
3. Nishioka K, Groreishi M, Yokozeki H. Heat shock proteins and skin diseases. *Current Opinion in Infectious Diseases*. 1999; 12:171-176
4. Yenari M, Giffard R, Sapolsky R, Steinberg G. The neuroprotective potential of heat shock protein 70. *Mol Med Today*. 1999; 5:525-531
5. Coronato S, Di Girolamo W, Salas M, Spinelli O, Laguens G. Biología de las proteínas del shock térmico. *Medicina (Buenos Aires)* 1999; 59:477-486
6. Srivastava P. Interaction of heat shock proteins with peptides and antigen presenting cells: chaperoning of the innate and adaptive immune responses. *Annu Rev Immunol*. 2002; 20:395-420
7. Solvaig H, Breloer M, von Bonin A. Eucaryotic heat shock proteins as molecular links in innate and adaptive immune responses: Hsp60 mediated activation of cytotoxic T cells. *Int Immunol* 2001; 13(9):1121-1127
8. Morimoto R. Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators. *Genes. Dev*. 1998; 12(24):3788-3796
9. Wells A, Malkovsky M. Heat shock proteins, tumor immunogenicity and antigen presentation: an integrated view. *Immunology today*, 2000; 21, N°3:129-132
10. Carbone F, Kurts C, Bennet S, Miller J, Heath W. Cross-presentation: a general mechanism for CTL immunity and tolerance. *Immunology today*, 1998; 19 N°8:368-373
11. Basu S, Srivastava P. Heat shock proteins: the fountainhead of innate and adaptive immune responses *Cell Stress & Chaperones*, 2000; 5:443-451
12. Kotera Y, Shimizu K, Mulé J. Comparative analysis of necrotic and apoptotic tumor cells as a source of antigen(s) in dendritic cell-based immunization. *Can Res*, 2001; 61:8105-8109
13. Moroi Y, Mayhew M, Trcka J et al. Induction of cellular immunity by immunization with novel hybrid peptides complexed to heat shock protein 70. *Proc.Natl.Acad.Sci USA*, 2000; 97:3485-3490
14. Sigal L. Molecular biology and immunology for clinicians 18: heat shock proteins/chaperonins. *J of clinical rheumatology*, 2002; 8(3):174-180
15. Csermely P, Schnaider T, Soti C, Prohászka Z, Nardai G. The 90-kDa molecular chaperone family: structure, function and clinical applications. A comprehensive review. *Pharmacol Ther* 1998; 79(2):129-168
16. Panjwani N, Akbari O, Garcia S, Brazil M, Stockinger B. The HSC73 molecular chaperone: involvement in MHC class II antigen presentation. *The J of Immunol*, 1999; 163:1936-1942
17. Li C, Lee J, Ko Y, Kim J and Seo J. Heat shock protein 70 inhibits apoptosis downstream of cytochrome c release and upstream of caspase-3 activation. *J.Biol.Chem*, 2000; 275:25665-25671
18. Mosser D, Caron A, Bourget L, Meriin A, Sherman M, Morimoto R, Massie B. The chaperone function of hsp70 is required for protection against stress-induced apoptosis. *Mol and Cell Biol* 2000; 20N°19:7146-7159
19. Jaattela M. Escaping cell death: survival proteins in cancer. *Exp Cell Res*. 1999; 248:30-43
20. Chen W, Sildath U, Bellmann K, Burkart V, Kolb H. Human 60kDa heat shock protein a danger signal to the innate immune system. *J. Immunol*, 1999;162:3212-3219
21. Ohashi K, Burkart V, Flohé S, Kolb H. Cutting edge: heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the toll-like receptor-4 complex. *J. Immunol* 2000; 164(2):558-561
22. Hochleitner BW, Hochleitner E, Obrist P et al. Fluid shear stress induces heat shock protein 60 expression in endothelial cells in vitro an in vivo. *Arteriosclerosis, thrombosis and vascular biology*, 2000; 20:617-621
23. Multhoff G, Botzler C, Issels R. The role of heat shock proteins in the stimulation of an immune response. *Biol Chem*,1998; 379(3):295-300
24. Wallin R, Lundqvist A, Moré S, von Bonin A, Kiessling R, Ljunggren H. Heat shock proteins as activators of the innate immune system. *Trends in Immunology* 2002; 23 N°3:130-135
25. Srivastava PK, Udon H, Blachere N, Li Z. Heat shock proteins transfer peptide during antigen processing and CTL priming. *Immunogenetics*, 1994;39:93-98.
26. Radsak M, Hilf N, Sing-Jasuja H, et al. The heat shock protein Gp96 bind to human neutrophils and monocytes and stimulate effector functions. *Blood*, 2003; 101: 2810-2815.
27. Hilf N et al. Human platelets express Heat shock proteins receptors and regulates dendritic cell maturation *Blood*, 2002; 99: 3676-3680.
28. Chen C.H Wang T, Hung C. et al Enhancement of DNA vaccine potency by linkage of antigen gene to Hsp 70. *Cancer Res*, 2000; 60:1035-1042.
29. Feng H, Yi Zeng, Whitsell L., Katsaniš E. Stressed apoptotic tumor cells express and elicit tumor specific immunity. *Blood*,2001; 97: 3505-3512.
30. F-Srivastava PK, Udon H. Heat shock protein-peptide complexes in cancer immunotherapy. *Curr Opin Immunol*, 1994; 6:728-732.
31. Glass B, Uharek L, Zeis M, et al. Allogeneic peripheral blood progenitor cell transplantation in a murine model: evidence for an improved graft-versus-leukemia effect. *Blood*, 1997; 90:1694-

- an improved graft-versus-leukemia effect. *Blood*, 1997; 90:1694-1700.
32. Sato K., Torimoto S., Tamura Y. et al. Immunotherapy using heat shock protein preparations of leukemia cells after syngeneic bone marrow transplantation in mice. *Blood*, 2001; 98:1852-1857.
 33. Yi Zeng, Feng H. , Graner M. , Katsanis E. Tumor-derived, chaperone-rich cell lysates activate dendritic cells and elicit potent anti-tumor immunity . *Blood First Edition Paper*, prepublished online February 6, 2003; DOI 10.1182/blood-2002-10-3108
 34. Prodromou C, Roe SM, O'Brien R, Ladbury JE, Piper PW, Pearl LH. Identification and structural characterization of the ATP/ADP-binding site in the Hsp90 molecular chaperone. *Cell*, 1997;90:65-75.
 35. Grenert JP, Sullivan WP, Fadden P, et al. The amino-terminal domain of heat shock protein 90 (hsp90) that binds geldanamycin is an ATP/ADP switch domain that regulates hsp90 conformation. *J Biol Chem*, 1997;272:23843-23850.
 36. An WG, Schulte TW, Neckers LM. The heat shock protein 90 antagonist geldanamycin alters chaperone association with p210bcr-abl and v-src proteins before their degradation by the proteasome. *Cell Growth Differ*, 2000;11:355-360.
 37. Faderl S, Talpaz M, Estrov Z, O'Brien S, Kurzrock R, Kantarjian HM. The biology of chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*, 1999; 341:164-172.
 38. Druker BJ, Talpaz M, Resta DJ, et al. Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*, 2001; 344:1031-1037.
 39. Gorre ME, Mohammed M, Ellwood K, et al. Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutation or amplification. *Science*, 2001; 293:876-880.
 40. Gorre M, Elwwod-Yen K., Chiosis G., Rosen N., Sawyers C. BCR-ABL point mutants isolated from patients with imatinib mesylate-resistant chronic myeloid leukemia remain sensitive to inhibitors of the BCR-ABL chaperone heat shock protein 90. *Blood*, 2002 ; 100: 3041-3044.
 41. Mitsiades S, Mitsiades n., poulaki V. Et al. Hsp 90 inhibitors prolong survival in SCID/NOD mice model of diffuse multiple myeloma: therapeutic implications. *Blood*, 2002; 100:11 p 106^a, abstract 392.
 42. Claudio J., Masih-Khan E., Tang H , et al A molecular compendium of genes expressed in multiple myeloma. *Blood*, 2002; 100: 2175-2186.
 43. Qing Yao, Nishiuci R., Li Q., Hudson W Kersey J. FLT3 expressing MLL fusion gene leukemias are selectively sensitive to inhibitors of the molecular chaperone Hsp 90 through destabilization of signal transduction associated kinases. *Blood*, 2002; 100 p 558 a, abstract 2192.
 44. Banumathy G, Singh V, Pavithra SR, Tatu U. Heat shock protein 90 function is essential for plasmodium falciparum growth in human erythrocytes. *J Biol Chem*. 2003 Feb 12 (on line)