



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA**

**UNIDAD DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA EN CÁNCER**

**INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGÍA**

***PERFIL DE EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE CHOQUE  
TÉRMICO DE 90KDA, HSP90 $\alpha$  Y HSP90 $\beta$ , EN LÍNEAS CELULARES  
DE CARCINOMA CERVICAL Y SU IMPLICACIÓN EN LA VÍA DE  
SEÑALIZACIÓN DE  $\beta$ -CATENINA***

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO  
ACADÉMICO DE**

**BIÓLOGA**

**P R E S E N T A :**

**SILVIA GABRIELA MORALES GUADARRAMA**

**ASESOR: DR. CARLO CÉSAR CORTÉS GONZÁLEZ**



**LOS REYES IZTACALA, ESTADO DE MÉXICO. 2014.**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



*El desarrollo del presente proyecto fue realizado en la Unidad de Investigación Biomédica en Cáncer del Instituto de Investigaciones Biomédicas-UNAM con sede en el Instituto Nacional de Cancerología (INCA).*

*Los resultados del mismo, fueron presentados en la III Reunión Anual de Investigación del Instituto Nacional de Cancerología, 2012; así como, en el XVIII Congreso de Carteles Dr. Lino Díaz de León organizado por el Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, 2013.*

*“Me di cuenta de que tenía que revolucionar; aprender cosas nuevas para no quedarme atrás. Me di cuenta y me rebelé”.*

*Jaime Sabines*

A mamá, que me espero al volver cada noche, para escuchar con atención mis aventuras, mis logros, mis dudas y mis pesares, gracias por darme alas para volar y fuerza para alcanzar mis metas. El esfuerzo sobrehumano que has hecho hizo posible alcanzar este gran logro. Te amo Mou.

A mis abuelos Rafa y Silvia, por nunca dejar de creer en mí y hacer hasta lo imposible para aligerarme las presiones, por verme y hacerme sentir invencible. A Belén por su gran apoyo, por creer en mi paso; gracias por darme siempre un motivo para sonreír aún frente a las dificultades. Su sacrificio y confianza me llevaron a lugares inimaginables.

A Ted por “quererme mucho, nada más” (con eso tuve de sobra para seguir adelante), finalmente acabé aprendiendo biología, tu apoyo y tu ejemplo ha sido muy importante para la consolidación de mi “cultura general”. A mi Fafa bebé, que apenas viene: que esté lleno de luz tu camino.

A mi hermanito Al, por dejarme café en las noches de estudio y por siempre recordarme lo importante de la vida (“no te rindas por favor”), tú eres una de las más grandes fuerzas que la vida me dio y por ustedes soy todo.

A los que estuvieron antes, en la carrera y en esta vida, les dedico esto porque en otro tiempo fueron mi fuerza; los caminos se bifurcan pero ustedes también creyeron en mí y estuvieron a mi lado en momentos difíciles y críticos de este camino. Gracias a la vida y mucho viento en la cara.

## *Agradecimientos*

---

A la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, por abrigar y nutrir mi formación como estudiante de Bióloga.

A mi tutor, el Doctor Carlo Cortés, por la increíble oportunidad de este gran proyecto, por hacerme parte de su “familia” de laboratorio. Gracias por el apoyo académico incondicional, por su paciencia conmigo, y por la inmensa cantidad de enseñanzas que, como persona, me ha dejado el trabajar juntos.

A la Comisión Coordinadora de Institutos Nacionales de Salud y Hospitales de Alta Especialidad (CCINSHAE) por el apoyo recibido durante la realización del proyecto, a través del Programa de Becas de Inicio a la Investigación (PROBEI).

Gracias, a los que contribuyeron a la estructuración, desarrollo y comprensión de este proyecto: al laboratorio de Oncogenómica y a la Dirección de Investigación Básica en Cáncer del Instituto Nacional de Cáncerología.

A mis revisores, por su tiempo y dedicación para que la edición de esta Tesis fuera de calidad: Dra. Emma Berta Gutierrez-Cirlos, Dra. Yolanda Chirino, Dr. Ricardo Mejía, Dra. Beatriz Vázquez.

## *Agradecimientos a título personal*

---

La fuerza para permanecer en pie estos años de trabajo se la debo, en parte, a los que creyeron que podría sobrevivir a la carrera y después a la Tesis, que me enseñaron a aprender y alimentar mi fuerza de aquellos que no creyeron que llegaría hasta acá.

A mi familia, que nunca ha dejado de creer en mí, de apoyarme para salir adelante y para no darme por vencida nunca. A los Guadarrama Cedillo y a los Morales Jasso; a los Guadarrama Alcántara, los Oropeza Guadarrama, los amo tíos.

Gracias a mi querido Aarón Roqueñí porque alimentó mis sueños y no me permitió tirarlos por la borda, te quiero monstruo. A Karina Jácome por estar al pie del cañón en las buenas y las malas, eres única mijji; a Kari (*Ettel*) Alvarado y Dany (*Mandu*) Zúñiga, por ser como el hogar cuando estoy perdida *in the middle*: las amo mujeres. A mis sistersitas, por crecer a mi lado, Itzel Segoviano y Fanny Núñez, siempre han tenido mi más profunda admiración y respeto, pero sobretodo, mi cariño: las adoro.

A mis queridas babies Ale Ángeles, Kary Díaz, Cheli Ramos, Yadi Rivero, Andy García: las mejores compañeras de locura que pude haber tenido, gracias por los muchos debrayes de media noche; a los demás chicos de la “familia querida”, gracias por hacer de las etapas más duras de la carrera, una situación llevadera.

A mi mejor amigo, y mejor jefe de grupo: Alan Roldán, gracias por regresar mi mente a la Tierra cuando desaparecía de la faz y por siempre entenderme, a todas las amistades que hice durante mi estancia en la FES Iztacala, los quiero amigos, se convirtieron en una fuerza más para que me levantara después de cada caída.

Muchas gracias al maravilloso equipo con el que fui a dar en el INCAn: Nadia Rangel y Marcela De la Fuente, gracias por su apoyo y su compañía en las largas horas de trabajo; gracias a Mary y Osman, mis primeros *sensei* en el arte del Western blot. A Maus Orozco, gracias por el inmenso apoyo este trayecto, por tu cariño, la confianza y tu amistad, hiciste más de lo que imaginas al ayudarme a recuperar la perspectiva. Gracias.

A los profesores que han hecho de paso por la Biología un crecer constante, sobre todo, gracias a los que me dieron mucho más que conocimiento de una materia. A la profesora Saharay Cruz, por los increíbles viajes, la experiencia de un congreso, las terapias existenciales y una bonita amistad.

A la profesora Dolores Hurtado por siempre darme algo en qué pensar después de cada clase, por enseñarme que los aprendizajes más grandes están fuera de la escuela

Al profesor Omar Ángeles, a la profesora Meztli Olvera, por enseñarme el compromiso que uno puede llegar a tener con su trabajo, cuando se hace lo que nos gusta.

Finalmente, gracias a la Maestra Carmen Martínez Parra, por mostrarme la belleza y lo apasionante de una vida en la Biología, tú pasión por lo que haces me trajo hasta acá, gracias infinitas.

*La naturaleza, amigos míos, es el espectáculo más sorprendente que puede mirar el hombre.  
Manuel Rivas, "La lengua de las mariposas"*



<b>Capítulo</b>	<b>Página</b>
PRÓLOGO	1
RESUMEN	2
1. INTRODUCCIÓN	3
1.1. Proteínas de choque térmico	3
1.2. Proteínas de choque térmico de 90 kDa (Hsp90)	4
1.3. Proteínas de choque térmico de 90 kDa, Hsp90 $\alpha$ y Hsp90 $\beta$	7
1.4. La función de Hsp90 y el cáncer	9
1.5. $\beta$ -catenina: molécula estructural y de señalización celular.	11
2. ANTECEDENTES	16
3. JUSTIFICACIÓN	19
4. HIPÓTESIS	19
5. OBJETIVOS	20
5.1. Objetivos Particulares	20
6. MATERIALES Y MÉTODOS	21
6.1. Mantenimiento de cultivos celulares	21
6.2. Extracción de proteínas totales	21
6.3. Extracción de proteínas de compartimentos celulares	22
6.4. Electroforesis y electro-transferencia de las proteínas extraídas en geles de poliacrilamida SDS-PAGE	22
6.5. Inmunodetección por ensayos de Western blot (WB)	23
6.6. Ensayo de co-inmunoprecipitación de Hsp90	24
7. RESULTADOS	25
7.1. Patrón de expresión de Hsp90 $\alpha$ y Hsp90 $\beta$ en líneas celulares de	25

	<b>cáncer cervical.</b>	
<b>7.2.</b>	<b>Perfil de proteínas activadas por fosforilación involucradas en la vía de señalización mediada por <math>\beta</math>-catenina.</b>	<b>28</b>
<b>7.3.</b>	<b>Patrón de localización de las proteínas Hsp90<math>\alpha</math> y Hsp90<math>\beta</math>, en líneas celulares de cáncer cervical.</b>	<b>30</b>
<b>7.4.</b>	<b>Patrón de localización de las proteínas “cliente” de Hsp90 involucradas en la vía de señalización mediada por <math>\beta</math>-catenina, en líneas celulares de cáncer cervical.</b>	<b>32</b>
<b>7.5.</b>	<b>Patrón de interacción de Hsp90 con su oncoproteína “cliente” Akt.</b>	<b>34</b>
<b>8.</b>	<b>DISCUSIÓN</b>	<b>36</b>
<b>9.</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>43</b>
<b>10.</b>	<b>PROSPECTIVAS</b>	<b>44</b>
<b>11.</b>	<b>REFERENCIAS</b>	<b>45</b>

<b>Figura</b>	<b>Página</b>
<b>I.</b> Esquema de los dominios estructurales de la proteína de Hsp90 en <i>H. sapiens</i> .	5
<b>II.</b> Ciclo de maduración/activación de una proteína “cliente” de Hsp90.	6
<b>III.</b> Esquema representativo de los dominios característicos de las Hsp90 y relación con los hallmarks del cáncer, por medio de sus proteínas cliente, (modificado de Shames y Minna, 2008).	8
<b>IV.</b> Vías de señalización mediadas por $\beta$ -catenina en una célula normal y una célula tumoral.	15
<b>1.</b> SDS-PAGE de proteínas totales y de compartimentos teñidos con azul de Coomassie.	25
<b>2.</b> Perfil de expresión de las proteínas de choque térmico, Hsp90 y Hsp70 en líneas de cáncer cervical.	26
<b>3.</b> Perfil de expresión de las proteínas de choque térmico, Hsp90 $\alpha$ y Hsp90 $\beta$ en líneas celulares de cáncer cervical.	27
<b>4.</b> Perfil de expresión y activación de $\beta$ -catenina, en líneas celulares de cérvix.	29
<b>5.</b> Perfil de expresión de las cinasas fosforiladas, “clientes” de Hsp90 en líneas de cáncer cervical	31
<b>6.</b> Patrón de localización de Hsp90 $\alpha$ , Hsp90 $\beta$ , y las proteínas involucradas en la vía $\beta$ -catenina/Akt/Gsk3- $\beta$ , en líneas celulares de cáncer cervical.	33
<b>7.</b> Estandarización y validación de la Co-IP de Hsp90 Total en la línea celular HeLa.	34
<b>8.</b> Perfil de interacción de Hsp90 y sus isoformas, con su oncoproteína “cliente” Akt. Inmunocomplejos, en las líneas celulares HeLa y C33a.	35
<b>9.</b> Activación de $\beta$ -catenina asociada al perfil de expresión de Hsp90 $\alpha$ o Hsp $\beta$	42

<b>Tabla</b>	<b>Página</b>
<b>I.</b> Clasificación de las proteínas de choque térmico (Hsp) y sus principales propiedades conformacionales, funcionales y de localización.	4
<b>II.</b> Niveles de regulación de las isoformas de Hsp90: Hsp90 $\alpha$ y Hsp90 $\beta$ . Principales diferencias de regulación a nivel transcripcional, traduccional, conformacional y funcional, reportadas en la literatura.	9-10
<b>III.</b> Breve descripción de las líneas celulares neoplásicas de cérvix empleadas en el proyecto.	21
<b>IV.</b> Anticuerpos empleados para la obtención de los perfiles de expresión y localización.	23

### AMINOÁCIDOS

**aa.**- Aminoácidos

**Ser.**- Serina (Serine)

**Thr.**- Treonina (Threonine)

**Tyr.**- Tirosina (Tyrosine)

### CÁNCER

**CC.**- Cáncer cervical, cáncer de cérvix

**TEM.**- Transición Epitelio-Mesénquima

### GRUPOS FUNCIONALES Y COMPUESTOS QUÍMICOS

**COOH-t.**- Carboxi-terminal

**NaCl.**- Cloruro de sodio

**NH<sub>2</sub>-t.**- Amino-terminal

**NO<sub>2</sub>.**- Óxido Nítrico (Nitrito)

**NO<sub>3</sub>.**- Nitrato

**OH.**- Radical hidroxilo

**Tris-NaCl.**- Trisaminometano de cloruro de sodio

### MATERIALES/MÉTODOS

**Céls.**- Células

**Co-IP.**- Co-inmunoprecipitación (*Co-Immunoprecipitation*)

**DMEM F12.**- Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12

**DMEM.**- Dulbecco's Modified Eagle Medium

**PrimAb.**- Anticuerpo primario (*Primary Antibody*)

**PVDF.**- Polifluoruro de vinilideno

**SDS-PAGE.**- Electroforésis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (*Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrilamide Gel for Electrophoresis*)

**SecAb.**- Anticuerpo secundario (*Secondary Antibody*)

**SFB.**- Suero Fetal Bovino

**TBS-Tween.-** Buffer Salino de Tris (*Tris-Buffered Saline*)

## **NUCLEÓTIDOS**

**ADP.-** Difosfato de adenosina

**ATP.-** Trifosfato de adenosina

## **PROTEÍNAS**

**Akt-** Proteína cinasa B (*Protein Kinase B*)

**APC.-** Proteína de la Poliposis Adenomatosa del colon (*Adenomatous polyposis coli protein*)

**ATPasa.-** Función de hidrólisis de ATP, en Hsp90.

**Bcl-2.-** Proteína de Linfoma Folicular de Células B (*B-cell lymphoma 2*)

**CHIP.-** Proteína de interacción con el dominio Carboxi-terminal de Hsc70 (del inglés, *Carboxyl terminus of Hsc70-interacting protein*)

**c-jun.-** Proto-oncogene C-jun

**CK1- $\alpha$ .-** Caseína Cinasa Alfa (*Casein Kinase Alpha*)

**Ck2.-** Caseína Cinasa 2 (*Casein Kinase 2*)

**c-myc.-** Proto-oncogene C-myc

**CpG-B.-** Proteína de unión a Islas CpG (*Binding protein CpG*)

**c-Src.-** Proteína Tirosina Cinasa Src (del inglés *Tyrosine-protein kinase Src*)

**cyclin-D.-** Ciclina D

**EGFR.-** Receptor de Factor de Crecimiento Epitelial (*Epithelial Growth Factor Receptor*)

**eNOS.-** Sintasa de Óxido Nítrico Endotelial (*Endothelial Nitric Oxid Synthase*)

**Fzz.-** Receptor acoplado a proteína G, *Frizzled*,

**GCUNC45.-** Proteína de interacción con el Receptor de Progesterona (*Progesterone Receptor-interacting protein GCUNC-45*)

**Grp94.-** Proteína regulada por glucosa de 94 kDa (del inglés, *Glucose-regulated protein*)

**Gsk3- $\beta$ .-** Glucógeno Sintetasa Cinasa 3 $\beta$ , (del inglés (*Glycogen-Synthase-Kinase 3 $\beta$* )).

**HDAC6.-** Desacetilasa de Histonas 6 (*Platelet Derived Growth Factor*)

**HOP.-** Proteína Organizadora de Hsp90 y Hsp70 (del inglés, *Hsp90-Hsp70 Organizing Protein*)

**Hsc70.-** Proteína 8 de Choque Térmico de 70 kDa (del inglés, *Heat Shock Cognate 71 kDa, Heat Shock 70 kDa Protein 8*)

**Hsp.-** Proteína de Choque Térmico (del inglés, *Heat Shock Protein*)

**Hsp100.-** Proteína de Choque térmico de 100 kDa

**Hsp40.-** Proteína de Choque térmico de 40 kDa  
**Hsp60.-** Proteína de Choque térmico de 60 kDa  
**Hsp70.-** Proteína de Choque térmico de 70 kDa  
**Hsp90 $\alpha$ .-** Proteína de Choque térmico de 90 kDa, isoforma alfa  
**Hsp90.-** Proteína de Choque térmico de 90 kDa  
**Hsp90N.-** Proteína de Choque térmico de 90 kDa asociada a membrana.  
**Hsp90 $\beta$ .-** Proteína de Choque térmico de 90 kDa, isoforma beta  
**LEF.-** Potenciador linfocitario de unión al Factor 1 (*Lymphoid enhancer-binding factor-1*)  
**LRP5.-** Receptor 5 de lipoproteínas de baja densidad 5 (*Low density lipoprotein (LDL)-receptor 5*)  
**LRP6.-** Receptor 6 de lipoproteínas de baja densidad 6 (*Low density lipoprotein (LDL)-receptor 6*)  
**MMP2.-** Metaloproteínasa de Matriz Extracelular 2  
**p300.-** Acetiltransferasa de Histonas p300 (*Histone Acetyltransferase p300*)  
**p53.-** Proteína supresora de tumor p53 (*Tumor Protein p53*)  
**pAkt<sup>Ser473</sup>.-** Fosforilación de Akt en el residuo de la Serina 473  
**pAkt<sup>Thr308</sup>.-** Fosforilación de Akt en el residuo de la Treonina 308  
**PDGF.-** Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas (*Platelet Derived Growth Factor*)  
**PDGFR.-** Receptor del Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas (*Platelet Derived Growth Factor Receptor*)  
**pGsk3- $\beta$  (Ser9).-** Fosforilación de Gsk3- $\beta$  en la Serina 9  
**PKA.-** Proteína Cinasa A (*Protein Kinase A*)  
**RTKs.-** Receptores Tirosina Cinasas  
**TCF.-** Factor de transcripción de células T (*T-Cell Factor*)  
**TRAP1.-** Proteína 1 asociada al receptor del factor de necrosis tumoral (del inglés *Tumor necrosis factor receptor-associated protein 1*).  
**Wnt.-** Gen/Proteína Wingless

#### **SECUENCIAS/DOMINIOS**

**ARM.-** Secuencia Armadillo de la proteína  $\beta$ -catenina  
**ARNm.-** Ácido Ribonucleico Mensajero  
**CGPs.-** Células germinales primordiales  
**HSE.-** Elemento de respuesta a choque térmico (*Heat Shock Element*)  
**MEEVD.-** Secuencia de unión a co-chaperonas MEEVD

**PEST.-** Secuencia peptídica rica en residuos de prolina (P), ácido glutámico (E), serina (S) y treonina (T) que marca a las proteínas para su degradación rápida

**TRP.-** Motivo repetido de tetratricopeptidos de unión a chaperonas (*Tetratricopeptide repeat*)

### **UNIDADES DE MEDICIÓN**

**kDa.-** Kilodaltones

**kpb.-** Kilopares de bases

**rpm.-** Revoluciones por minuto

**µg.-** Microgramo

### **VÍAS DE SEÑALIZACIÓN**

**Wnt/PCP.-** Señalización de Wnt de Polaridad Planar Celular (*Planar Cell Polarity Wnt Signaling*)

**Wnt/PKC-dependent.-** Señalización de Wnt dependiente de la Proteína Cinasa C (*Protein Kinase C-dependent Wnt Signaling*)

### **VIRUS**

**VPH.-** Virus del Papiloma Humano

**VPH16.-** Virus del Papiloma Humano, tipo 16

**VPH18.-** Virus del Papiloma Humano, tipo 18



La biología es una de las ciencias más amplias al ser considerada multidisciplinaria. Una de las aplicaciones de mayor impacto antropocéntrico que ha tenido es la investigación biomédica, que surge de manera revolucionaria ante la necesidad de comprender los procesos moleculares, celulares y sistémicos que participan en enfermedades consideradas problemas de salud pública a nivel mundial; uno de los retos más grandes a los que se enfrenta la biomedicina es el cáncer.

El cáncer es considerado una de las primeras causas de muerte a nivel mundial, y la tercera causa de muerte en México, de acuerdo con estimaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS) y de la Unión Internacional contra el Cáncer. En nuestro país, el cáncer cervical (CC) constituye la primera causa de muerte por tumores malignos en el grupo de mujeres de 25 a 64 años.

La carcinogénesis es el proceso por el cual una célula normal sufre una serie de modificaciones genéticas que conforme se van acumulando, le confieren las características de una célula tumoral. Este fenotipo se caracteriza por la presencia de ciertos patrones moleculares que le permiten a la célula tumoral sobrevivir, por medio de la alteración de varias señales de transducción encargadas de la regulación varios de sus procesos vitales; estos van desde la proliferación celular hasta la supervivencia por evasión de los mecanismos de muerte celular.

Algunas proteínas presentan diferencias a nivel de expresión, dentro del tejido neoplásico, con respecto al tejido no neoplásico o normal; varias de estas moléculas interconectan vías alteradas que regulan procesos indispensables para el mantenimiento de las células tumorales, por ello la identificación, caracterización y validación de estas proteínas, por medio de técnicas de biología molecular, nos ayudará a establecer nuevos blancos terapéuticos y tratamientos de mayor eficiencia y especificidad de acuerdo a cierto tipo de cáncer.

La subfamilia de las chaperonas moleculares, Hsp90 se encuentra altamente expresada en cáncer. Su principal función como chaperonas moleculares consiste en mantener la homeostásis celular mediante el correcto plegamiento, replegamiento, degradación o activación de un grupo de proteínas particular al que se les denomina proteínas “cliente”. Sus dos isoformas más abundantes: Hsp90 $\alpha$  y Hsp90 $\beta$ , pese a pertenecer a la misma subfamilia presentan diferencias funcionales en la célula. Con sus más de 100 proteínas “cliente”, se encuentran altamente ligadas a la regulación de procesos celulares indispensables para el mantenimiento de la célula tumoral. Recientemente se describió que Hsp90 $\alpha$  y Hsp90 $\beta$ , regulan de manera diferencial a la oncoproteína Akt, la cual es un regulador esencial en la activación de  $\beta$ -catenina que participa en la transcripción de genes moduladores de la proliferación celular y la transición epitelio-mesénquima.

En el presente trabajo se describe por primera vez, el papel de Hsp90 $\alpha$  y Hsp90 $\beta$  en la regulación y activación de la vía de señalización mediada por  $\beta$ -catenina, en líneas celulares de cáncer cervical humano. Para ello se identificaron dos patrones diferenciales de expresión de las isoformas Hsp90 $\alpha$  y Hsp90 $\beta$  en un mismo tipo de cáncer, las líneas C33a y SiHa mostraron sobreexpresión de Hsp90 $\beta$ , mientras que las líneas celulares HeLa y CaSki presentaron sobreexpresión de Hsp90 $\alpha$ .

Además se observó la sobreexpresión y alta activación de las oncoproteínas “cliente” de Hsp90: Akt y de  $\beta$ -catenina, indispensables en la carcinogénesis. La localización de  $\beta$ -catenina activada en núcleo, en las cuatro líneas celulares de CC indica la activación de la señalización mediada por esta proteína.

La relación entre la activación de dichas proteínas muestra indicios de que la activación por factores de crecimiento, y la oncoproteína “cliente” de Hsp90, Akt, en las líneas celulares de cérvix, es de gran importancia para la activación de  $\beta$ -catenina.

*Palabras clave: Hsp90, Hsp90 $\alpha$ , Hsp90 $\beta$ ,  $\beta$ -catenina, Akt, cáncer de cérvix.*

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Proteínas de choque térmico

En los organismos eucariota y procariota, existen múltiples condiciones y factores externos que pueden desequilibrar la homeostasis celular como son: la exposición a altas temperaturas, a inhibidores del metabolismo energético, metales pesados, estrés oxidativo, cambios en la osmolaridad y el pH, entre otros. En particular, la exposición a altas temperaturas que pueden llegar a sufrir los organismos vivos tiene como respuesta celular la síntesis de un conjunto de proteínas altamente conservadas entre los distintos organismos, conocidas como proteínas de choque térmico, o Hsp (por sus siglas en inglés, Heat shock proteins). Esta respuesta celular es conocida universalmente como respuesta al estrés celular mediada por Hsp (Lindquist, 1986; Morimoto, 1993; Swindell et al., 2007).

Las proteínas de choque térmico son denominadas chaperonas moleculares, dada su función de manera intra o extra-celular. De manera general, las Hsp participan en la citoprotección contra múltiples condiciones de estrés celular, desempeñando funciones tales como: 1) plegamiento/replegamiento de proteínas; 2) ensamblaje de complejos multi-proteicos; 3) transporte de proteínas en compartimentos celulares; y 4) degradación de proteínas “cliente” vía proteosomal (Soti et al., 2005; Cortés-González et al., 2008; Wandlinger et al., 2008).

A nivel de secuencia nucleotídica y de aminoácidos, las Hsp mantienen una alta homología conformando una familia multigénica que varía entre los 10 y los 150 kDa. Con base a su peso molecular, las Hsp se clasifican en 6 subfamilias: 1) Hsp de 100-110 kDa, 2) Hsp de 90 kDa, 3) Hsp de 70 kDa, 4) Hsp de 60 kDa, 5) Hsp de 40 kDa, y 6) Hsp pequeñas (que van de 8-30 kDa), (Feder y Hofmann, 1999; Sreedhar et al., 2004).

La función como chaperona molecular de las diversas subfamilias de las Hsp es dependiente de cuatro propiedades principalmente: 1) Estructura conformacional, 2)

Patrón de interacción con chaperonas y co-chaperonas, 3) Hidrólisis de nucleótidos, y 4) localización subcelular (*Tabla 1*) (Makhnevych y Houry, 2012; Clare y Saibil, 2013).

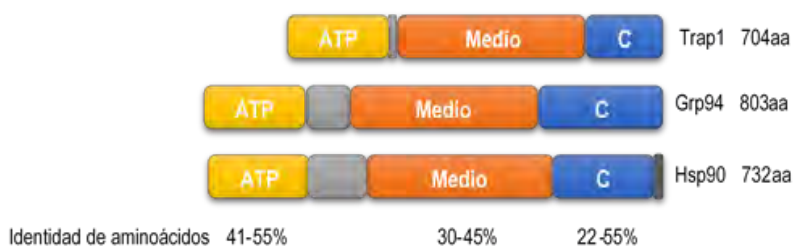
**Tabla I.** Clasificación de las proteínas de choque térmico (Hsp) y sus principales propiedades conformacionales, funcionales y de localización.

Subfamilia de Hsp	Isoformas	Estado Conformacional	Localización Intracelular	Función de chaperona molecular
<b>HSPs pequeñas</b>	Ubiquitina, Hsp10 Hsp20-30kDa	Dímeros, hexámeros, hexadecámeros, Esferas de 24 unidades	Citosol, núcleo, mitocondria	Degradación de proteínas, tolerancia al estrés oxidativo co-factor de Hsp60
<b>Hsp40</b>	Hsp40 Hsp47	Dímeros y complejos proteicos	Citosol, núcleo, retículo endoplásmico	Co-chaperona de Hsp72, plegamiento de proteínas
<b>Hsp60</b>	Hsp60	Tetrámeros y anillos de multímeros	Citosol, mitocondria	Plegamiento de proteínas
<b>Hsp70</b>	Hsp72 Hsc73 mtHsp70	Monómeros y heterodímeros con otras Hsp	Citosol, núcleo, Mitocondria, retículo endoplásmico	Termotolerancia, plegamiento de proteínas, transporte de proteínas a mitocondria
<b>Hsp90</b>	Hsp90 $\alpha$ Hsp90 $\beta$ TRAP-1 Grp94 Hsp90N	Monómeros, dímeros, homodímeros y oligómeros	Citosol, mitocondria, retículo endoplásmico, núcleo	Interacción con receptores de hormonas esteroideas, plegamiento de proteínas
<b>Hsp100</b>	Hsp104-110 ORP150	Dímeros y anillos de multímeros	Citosol, núcleo retículo endoplásmico	Termotolerancia, tolerancia isquémica

### 1.2. Proteínas de choque térmico de 90 kDa (Hsp90)

Dentro de la subfamilia de proteínas de choque térmico de 90 kDa (Hsp90), existen cinco isoformas en las células eucariotas de los organismos más complejos: las isoformas de Hsp90 citoplásmica (Hsp90 $\alpha$  y Hsp90 $\beta$ ), Hsp90 mitocondrial (TRAP1, del inglés: tumor necrosis factor receptor-associated protein 1), Hsp90 asociada a membrana (Hsp90N) y Hsp90 del retículo endoplásmico (Grp94, del inglés: glucose-regulated protein), (Jhonson, 2012).

La estructura de las Hsp90 está conservada en una gran variedad de organismos, los miembros de la subfamilia contienen tres dominios: 1) el dominio amino-terminal (NH<sub>2</sub>-t) en cual se une e hidroliza ATP, necesario para su actividad de chaperona, 2) una región de carga, conformada por una gran cantidad de aminoácidos de carga negativa, que aumenta la afinidad por las proteínas no nativas y la unión del ATP, importante para la regulación de la actividad de Hsp90, 3) un dominio medio que contiene la mayoría de los sitios de unión a proteínas “cliente” y 4) un dominio carboxi-terminal (COOH-t) que permite la dimerización de los monómeros de Hsp90 (*Figura I*) (Park et al., 1998; Sheibel et al., 1999; Meyer et al., 2003; Hainzl et al., 2009; Clare y Saibil, 2013).



**Figura I.** Esquema de los dominios estructurales de la proteína de Hsp90 en *H. sapiens*. Dominio amino-terminal y sitio de unión e hidrólisis de ATP, altamente conservado entre organismos (amarillo); región de carga (gris); dominio medio, responsable de la unión con varias proteínas “cliente” (naranja); dominio carboxi-terminal, necesario para la dimerización de Hsp90 (azul); (Modificado de Jhonson, 2012).

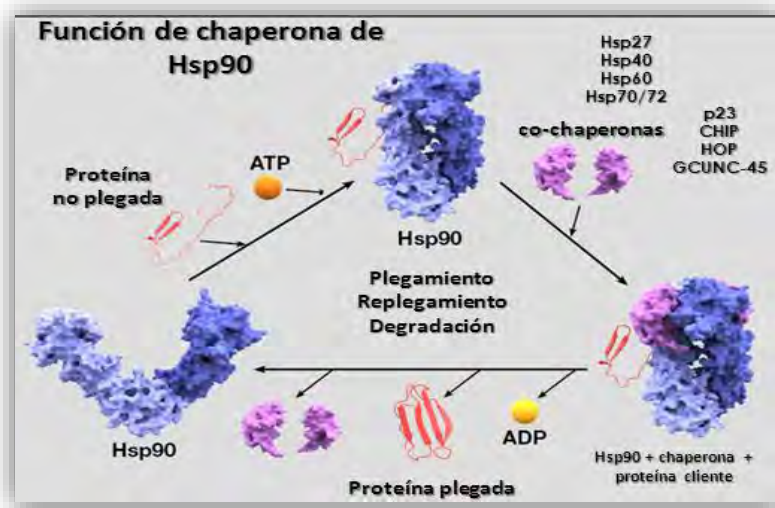
El estado conformacional de las proteínas Hsp90 puede presentarse en estructuras monoméricas, diméricas, oligoméricas, y heterodiméricas, entre los miembros de la misma subfamilia. Las Hsp90 se presentan como dímeros de manera conformacional en condiciones fisiológicas, sin embargo la estabilidad de la unión entre monómeros es dependiente del dominio COOH-t de cada isoforma (Minami et al., 1991; Nemoto y Sato, 1998).

Cuando Hsp90 se encuentra en conformación dimérica, la hidrólisis de ATP de cada monómero es mutuamente dependiente de la del otro monómero, esto aumenta la eficiencia de la hidrólisis por lo que el dímero presenta mayor actividad (ATPasa) y mejor funcionalidad como chaperona (Vaughan et al., 2009).

Sin ATP, el dímero se encontrará en una conformación abierta, cuando el nucleótido se une a esta conformación, induce un ligero cierre sobre el sitio de unión promoviendo la dimerización del N-terminal, lo cual deriva en una conformación compacta y cerrada, en esta conformación un *loop* flexible en el dominio medio de cada subunidad hace contacto con su N-terminal y se inicia la hidrólisis de ATP. Una vez que el ATP es hidrolizado, el dominio N-terminal se disocia y la conformación abierta es recuperada (Young et al., 1998; Shiau et al., 2006; Ali et al, 2006; Dollins et al, 2007).

La forma conformacional de las Hsp también es regulada por la interacción con proteínas co-chaperonas, que son proteínas cruciales para dirigir el curso del ciclo de Hsp90-proteína “cliente”; la unión a co-chaperonas ha sido identificada en procesos como la inhibición o activación de la actividad de ATPasa de la Hsp90, así como en el reclutamiento de proteínas “cliente” en específico (Li et al., 2012; Street et al., 2011; Retzlaff et al., 2009; Prodromou, 2012; Muller et al., 2013).

Los estados conformacionales de Hsp90, así como su papel en el ciclo de maduración de proteínas “cliente”, donde participa con algunas co-chaperonas, se encuentra descrito en la *Figura II*.



**Figura II.** Ciclo de maduración/activación de una proteína “cliente” de Hsp90. La conformación de Hsp90 es de suma importancia en el ciclo de maduración de una proteína “cliente”, los estados conformacionales de Hsp90 son 3: 1) Conformación abierta: unión de la molécula de ATP y de la proteína “cliente”; 2) Conformación cerrada inactiva: unión con chaperonas y co-chaperonas; y 3) Conformación cerrada activa: hidrólisis de ATP y plegamiento de la proteína “cliente”. (Modificado de Wandinger, et al., 2008).

Además de su interacción con co-chaperonas, la actividad de Hsp90 es susceptible de ser regulada por medio de modificaciones postraduccionales, tales como: fosforilación, acetilación y S-nitrosilación, ubiquitinación, oxidación y metilación. La fosforilación de las Hsp90 es el mecanismo de regulación postraducciona l más estudiado, puesto que la activación de la chaperona o su unión a co-chaperonas tiene un gran impacto en la actividad de las proteínas “cliente”. (Kundrat y Regan, 2010; Mollapour y Neckers, 2011; Li et al., 2011).

### **1.3. Proteínas de choque térmico de 90 kDa, Hsp90 $\alpha$ y Hsp90 $\beta$**

Dentro de la subfamilia de las proteínas Hsp90 tan sólo las isoformas Hsp90 $\alpha$  y Hsp90 $\beta$  componen el 80%; en abundancia, Hsp90 $\alpha$  se encuentra en menor proporción, en comparación con Hsp90 $\beta$ ; en mamíferos, estas isoformas mantienen hasta un 85% de identidad a nivel de la proteína (Gupta et al., 1995).

Sin embargo, pese a las similitudes entre estas isoformas, presentan diferencias de gran importancia; se sabe que Hsp90 $\alpha$  se encuentra principalmente como heterodímero con Hsp90 $\beta$ , al contrario de Hsp90 $\beta$  la cual forma principalmente homodímeros (Perdew, 1993). Además de esto, por la cantidad de elementos de respuesta a estrés una de estas isoformas es constitutiva en citoplasma (Hsp90 $\beta$ ), mientras que la otra es inducible ante ciertos estímulos que provocan su sobreexpresión (Hsp90 $\alpha$ ), (Sreedhar et al., 2004).

Se han descrito funciones diferenciales sobre la activación de ciertas proteínas “cliente” así como la sensibilidad que Hsp90 $\alpha$  y Hsp90 $\beta$  presentan a los inhibidores de Hsp90, como el radicicol (Millson et al., 2007), en donde la tasa de cambio de la expresión de estas isoformas, tiene implicaciones valiosas en el equilibrio homeostático de una célula.

En la *Tabla II*, se enumeran los principales niveles de regulación de Hsp90 reportadas para cada isoforma.

**Tabla II.** Niveles de regulación de las isoformas de Hsp90: Hsp90 $\alpha$  y Hsp90 $\beta$ . Principales diferencias de regulación a nivel transcripcional, traduccional, conformacional y funcional, reportadas en la literatura.

Nivel	Hsp90 $\alpha$	Hsp90 $\beta$	Referencia
<b>Transcripcional y Traduccional</b>	Tiene 10 exones que codifican un transcrito de 5.3 kb.	Consta de 11 exones y el transcrito es de 6.8kb.	Csermely et. al., 1998
	Codifica a una proteína de 733 aminoácidos (aa) con un peso molecular de 86 kDa.	Codifica a una proteína más pequeña que Hsp90 $\alpha$ , formada por 726 aa y un peso molecular de 84 kDa.	Csermely et. al., 1998
	Su alta tasa de transcripción en condiciones de estrés es altamente regulada por su región promotora.	El primer exón no es traducido, sin embargo, se sugiere ser importante para su regulación transcripcional.	Sreedhar et. al., 2004
	Región promotora del gene contiene 5 elementos de respuesta a estrés térmico (HSE)	Región promotora del gene posee sólo 2 HSE's.	Zhang et. al., 2013
	Niveles de ARNm significativamente menores que los de Hsp90 $\beta$ , en condiciones normales.	Menor nivel de inducción en su transcripción pero mayor cantidad de ARNm en condiciones normales.	Chang et. al., 2006
<b>Conformacional</b>	En la porción terminal, posee un residuo de serina, cuyo grupo OH puede hacer tres enlaces de hidrógeno adicionales que facilitan su dimerización.	En la porción terminal, un residuo de serina es sustituida por alanina, disminuyendo su capacidad de dimerizar.	Zubriené et. al., 2010
	Su abundancia como dímeros de Hsp90 le permite estabilizar a sus proteínas cliente.	Su estructura conformacional es monómero.	Csermely et. al., 1998 Ritcher et. al., 2007
	Actividades como co-chaperona de manera semejante a Hsp90 $\beta$ .	GCUNC45 tiene mayor afinidad por su conformación monomérica.	Chadli et. al., 2008



	Durante la embriogénesis normal y teratogénica en ratón, se encuentra específicamente en líneas de células Germinales primordiales (CGP's).	Se distribuye por todo el embrión de ratón a lo largo de diferentes etapas.	Vanmuyulder et.al., 2002.
	En cáncer de colón metastásico, es necesaria para la actividad de la metaloproteasa-2 (MMP-2) y la invasión de las células cancerosas.	En cáncer de mama se ha visto implicada en la activación de MMP-2 y MMP-9	Eustace et. al., 2004 Stellas et al., 2010
	Su dimerización incrementa los niveles de NO <sub>2</sub> /NO <sub>3</sub> al aumentar la fosforilación del residuo Ser-117 de Akt/PKB y Ser-473 de eNOS	Reduce los niveles de NO <sub>2</sub> /NO <sub>3</sub> y previene la activación de Akt en la Ser-473.	Cortés-González et. al., 2010
<b>Funcional</b>	No se ha visto relación con la activación de Cp-G y Bcl-2	Participa de manera importante en funciones anti-apoptóticas empleando oligodeoxinucleótido CpG-B y Bcl-2	Kuo et al., 2007; Cohen-Saidon et al., 2006
	Activación más eficiente de la cinasa src, en levadura; la inhibición con radicicol parece no afectar los niveles de proteína de esta isoforma	No parece afectar la activación de la cinasa scr, su expresión a nivel de proteína es más sensible a la inhibición con radicicol	Millson et al., 2007

#### 1.4. La función de Hsp90 y el cáncer

Dentro de las células, el equilibrio es un factor vital para su funcionalidad; para mantener la homeostásis de las proteínas (proteostasis) ante la presencia de factores de estrés, las células poseen un mecanismo de respuesta al estrés en el que la estabilidad de las proteínas es mantenida por medio de un “control de calidad” de proteínas, el cual se encuentra principalmente dirigido por las principales chaperonas moleculares, las proteínas de choque térmico (Bakau et al., 2006). El correcto plegamiento y la translocación de las proteínas son las principales funciones de dicho complejo, puesto que estos errores pueden resultar en la pérdida de funciones biológicas y la formación de

agregados proteicos, lo que desencadenaría fenómenos dañinos para el organismo relacionados con el desarrollo de enfermedades de índole neurodegenerativo, inmunológico, entre otros (Luheshi et al., 2008; Tiroli-Cepeda y Ramos, 2011).

Puesto que un gran número de proteínas dependen de Hsp90 para adquirir una conformación activa, la subfamilia de Hsp90 es considerada como eje principal de la proteostasis (Taipale et al., 2010). Sin embargo dentro de la gran lista de proteínas “cliente” se encuentran una cantidad considerable de proteínas mutadas y de otras tantas conocidas como oncoproteínas, por su papel oncogénico en las células; entre estas cabe destacar a p53<sup>mut</sup>, EGFR<sup>mut</sup>, KRAS<sup>mut</sup>, entre otras (Blagosklonny, 2002).

Se ha reportado que en distintos tipos de cáncer, las Hsp se encuentran sobreexpresadas, al igual que muchas de las proteínas que estabilizan, las cuales son responsables de la transformación de las células sanas en células cancerosas, pues regulan los distintos “hallmarks” o marcadores del cáncer. El grupo de proteínas “cliente” más amplio es el de las cinasas, siendo éstas, una clase de enzimas que se encargan de catalizar la transferencia de grupos fosfatos, resultando ser elementos clave en el control de fenómenos fisiológicos estudiados en diversas patologías como el cáncer. Entre estas proteínas oncogénicas, que son “clientes” de Hsp90 está PKB/Akt, Src, Lyn, Lck, Raf-1, EGFR, PDGFR y HIF-1, entre otras, (*Figura III*) (Blagosklonny, 2002; Mahalingam et al., 2009; Hanahan y Weinberg, 2011; Miyata et al., 2013; Piccard, 2013;).

Evidencia experimental, ha comprobado que las células cancerosas requieren de la función de las chaperonas para su supervivencia en un ambiente estresante, causado por los procesos oncogénicos propios de la célula tumoral; por ello la disociación de las interacciones entre Hsp90 y sus proteínas “cliente”, puede resultar en la degradación proteosomal de dichas proteínas y por ende en la muerte de las tumorales (Holzbeierlein et. al., 2010; Cooper et al., 2011; Fukumoto y Kiang, 2011).

Por todo lo anterior, diversos grupos de investigación científica y médica han reconocido a los inhibidores sintéticos de Hsp90, como una herramienta prometedora en la lucha contra el cáncer, tanto como agentes individuales o en combinación con otras terapias

(Heath et al., 2005; Modi et al., 2007; Solit et al., 2008; Mahalingam et al., 2009; Jego et al., 2010; Da Silva y Ramos, 2012; Jhaveri et al., 2012).



**Figura III.** Esquema representativo de los dominios característicos de las Hsp90 y relación con los hallmarks del cáncer, por medio de sus proteínas cliente, (modificado de Shames y Minna, 2008).

### 1.5. $\beta$ -catenina: molécula estructural y de señalización celular.

En todos los tejidos del cuerpo humano, la integridad de las uniones intercelulares es indispensable para brindar una estructura funcional. Dichas uniones se clasifican de acuerdo a la función que desempeñan dentro y fuera de la célula en uniones estrechas, uniones adherentes y desmosomas. Específicamente, las uniones intercelulares adherentes se encuentran conformadas por complejos multi-proteicos determinados por la interacción entre proteínas de membrana, denominadas cadherinas, y proteínas citoplasmáticas, llamadas cateninas.

La proteína citoplasmática  $\beta$ -catenina forma parte de la familia de las cateninas, dentro de las cuales hay tres miembros,  $\alpha$ -catenina,  $\beta$ -catenina y  $\gamma$ -catenina. La proteína  $\beta$ -catenina consiste en una región central compuesta por 12 repetidos Armadillo (ARM), flanqueados por un dominio amino-terminal (NTD) y un dominio carboxi-terminal (CTD),

entre el último repetido ARM y la región flexible del CTD se encuentra una hélice-C conservada (Córdova et al, 2009).

Cuando  $\beta$ -catenina es recién sintetizada, inmediatamente se asocia por interacción directa con E-cadherina formando un complejo que participa en las uniones adherentes, la asociación entre estas proteínas se da mientras siguen en el retículo endoplásmico, justo después de ser sintetizadas; posteriormente ambas se dirigen juntas hacia la membrana celular. La interrupción de esta unión, desde el citoplasma resulta en la degradación de ambas; por una parte  $\beta$ -catenina protege el motivo con secuencia PEST de E-cadherina que es reconocido por una ubiquitin-ligasa que la marca para su degradación (Orsulic et al., 1999), de manera semejante E-cadherina estabiliza a  $\beta$ -catenina al prevenir la unión de APC y Axina a  $\beta$ -catenina (Huber y Weis, 2011).

De manera constitutiva,  $\beta$ -catenina puede hallarse unida a la proteína de membrana E-cadherina. Dentro del complejo de uniones adherentes  $\beta$ -catenina es capaz de unirse a  $\alpha$ -catenina por medio de la porción distal del NTD y el primer repetido ARM adyacente, y modular indirectamente la actina, participando como intermediario en la unión entre las moléculas de adhesión y el citoesqueleto (Valenta et al., 2011; Córdova et al., 2009).

Durante muchos años se pensó que  $\beta$ -catenina participaba únicamente como proteína estructural en las uniones adherentes; sin embargo, hace 3 décadas aproximadamente, se logró establecer una segunda función para  $\beta$ -catenina como proteína importante en la señalización intracelular participando de manera activa en la transcripción de genes involucrados con la proliferación celular (Nusse et al., 2012).

En condiciones normales, la concentración de  $\beta$ -catenina es regulada por el complejo de degradación dirigido por Gsk3- $\beta$ , en el citoplasma, y por las uniones a caderinas y otros tipos de catenina, en la membrana celular (Kimelman y Xu, 2006; Córdova et al., 2009), sin embargo, existen mecanismos de activación de  $\beta$ -catenina que en algunas patologías pueden llegar a encontrarse alterados. En los siguientes párrafos se describen dichas vías alternas de activación (*Figura IV*).

Recientemente, el estudio molecular de enfermedades como el cáncer, ha iniciado la búsqueda de nuevos blancos terapéuticos de mayor eficacia y más específicos para ciertos grupos de pacientes. La vía de Wnt es una vía de señalización involucrada en importantes procesos biológicos, estos van desde la diferenciación hasta la proliferación celular y la organogénesis. La activación de la vía canónica de Wnt se considera como un paso decisivo en la carcinogénesis en diversos tipos de tumores, en donde se le ha relacionado con un aumento de la supervivencia celular y la invasión; uno de los efectores finales de esta cascada de señalización es  $\beta$ -catenina (Pérez-Placencia, et. al., 2008; Saifo et al., 2010).

La señalización mediada por  $\beta$ -catenina no sólo se encuentra regulada por la activación de la vía de Wnt; se han descrito otras vías que río arriba de la inactivación del complejo de degradación, permiten la activación de  $\beta$ -catenina, como la estimulación de receptores tirosina-quinasa (RTKs) y algunos receptores de factores de crecimiento (PDGFR, EGFR, entre otros). Esta señalización, en cáncer, se asocia a la transición epitelio-mesénquima (TEM), un proceso de transdiferenciación importante en la progresión del cáncer (Purcell et al., 2011; Valenta et al., 2012 ; Kannan et al., 2013)

A la fecha,  $\beta$ -catenina representa una plataforma de interacciones con diversas proteínas en la célula, el patrón de localización de  $\beta$ -catenina es determinante para que esta proteína lleve a cabo determinada función ya sea como parte de un complejo estructural en la célula, o bien, como una proteína de señalización involucrada con la transcripción, lo que le confiere una dualidad funcional.

Para que  $\beta$ -catenina pueda desempeñarse como una molécula de señalización en específico, es necesario que ésta se encuentre en el núcleo. Una vez en el núcleo,  $\beta$ -catenina puede asociarse a factores de transcripción de la familia TCF/Lef y dirigir la transcripción de genes blanco, tales como: c-myc, c-jun, Ciclina-D, entre otros. La transcripción de genes mediada por el complejo de  $\beta$ -catenina/TCF/Lef puede ser independiente de la vía de Wnt, estimulada por receptores de tirosina-quinasa (MacDonald et al., 2009).

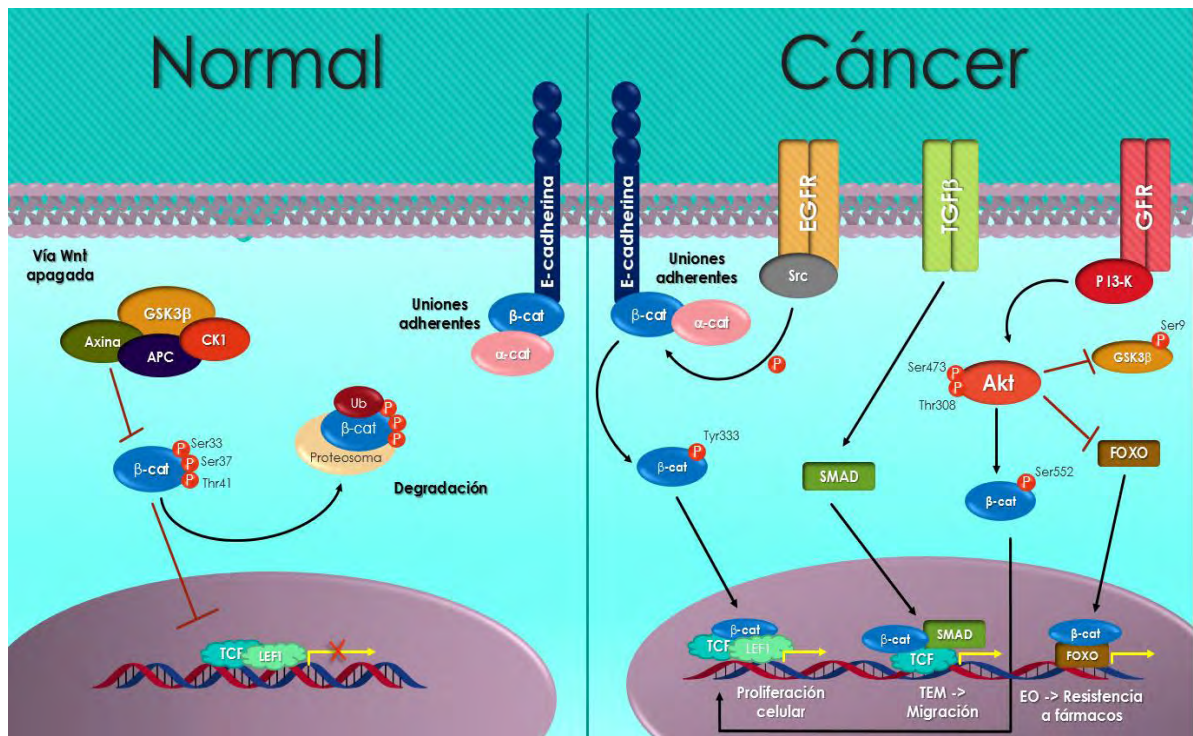
EGFR es un miembro de la familia de receptores tirosina-cinasa que se encuentra sobre-expresado en diversos tipos de cáncer, asociándose a un bajo pronóstico y progresión de la enfermedad. A nivel molecular, EGFR es capaz de impedir la adhesión celular mediada por el complejo de E-cadherina y  $\beta$ -catenina al promover la fosforilación de  $\beta$ -catenina en la Tyr333 por Src, y facilitar así su acumulación en núcleo. Una vez en el núcleo,  $\beta$ -catenina participa en la transcripción de genes que promueven la proliferación y crecimiento celular (Lee et al., 2010; Yang et al., 2011).

Sin embargo, otros factores de transcripción también pueden proveer a  $\beta$ -catenina de una plataforma de unión al ADN, entre estos se encuentra el factor transcripcional FOXO, el cual se encuentra sobre-expresado en condiciones de estrés oxidativo (Essers et al., 2005). FOXO se une directamente a  $\beta$ -catenina para promover la transcripción de los genes blanco de FOXO. Puesto que FOXO compite con TCF por su unión a  $\beta$ -catenina se ha observado que incluso llega a secuestrar a  $\beta$ -catenina del complejo con TCF. Mientras que en una célula no neoplásica la transcripción de genes relacionados con la respuesta al estrés oxidativo, en una célula tumoral los mecanismos de transcripción están sobrerregulados, por lo que se ha propuesto que el exceso de proteínas de reparación de ADN y de daño celular pueden llegar a generar resistencia a fármacos y metástasis en cáncer (Hoogeboom et al., 2008; Tenbaum et al., 2012).

Recientemente, se ha sugerido una posible interacción entre la vía de señalización estimulada por TGF- $\beta$  y la vía de señalización estimulada por Wnt. TGF- $\beta$ -1 en particular, induce la TEM al estimular a Smad3, la cual protege a  $\beta$ -catenina de su degradación y facilitar su traslocación al núcleo, promoviendo así la unión de  $\beta$ -catenina a Smad3, y no a LEF-1, junto con TCF. En esta vía,  $\beta$ -catenina ha sido identificada como co-factor necesario para la TEM dirigida por TGF- $\beta$ -1, importante en la migración e invasión de las células tumorales en cáncer (Zhang et al., 2012; Tian et al., 2012).

Algunos factores de crecimiento (IGF e EGFR) pueden activar la proteína cinasa Akt, la cual bloquea la actividad de FOXO, promoviendo la fosforilación de  $\beta$ -catenina en la Ser552, lo

cual conlleva al bloqueo de la restauración de la transcripción dirigida por TCF/ $\beta$ -catenina (Valenta et al., 2012).



**Figura IV.** Vías de señalización mediadas por  $\beta$ -catenina en una célula normal y una célula tumoral. Dentro de la célula normal, la vía de Wnt se encuentra apagada y la concentración de  $\beta$ -catenina en citoplasma es regulada por el complejo de degradación dirigido por Gsk3- $\beta$ ; estructuralmente se encontrará unida a cadherinas y  $\alpha$ -catenina participando en uniones adherentes. En una célula tumoral, la señalización mediada por  $\beta$ -catenina suele ser independiente de Wnt y regulada por los complejos que forma en núcleo, donde podrá interactuar con TCF/Lef-1, TCF/Smad3, o con FOXO, que compite con TCF, (Hoogeboom et al., 2007; Lee et al., 2010; Yang et al., 2011; Tenbaum et al., 2012; Tian et al., 2013; Valenta et al., 2012 Zhang et al., 2013).

## 2. ANTECEDENTES

La regulación de la estabilidad o activación de  $\beta$ -catenina, depende principalmente de dos clientes de Hsp90: Gsk3- $\beta$ , que interviene en la fosforilación de  $\beta$ -catenina al ser parte del complejo de degradación, y Akt, que regula de manera positiva a  $\beta$ -catenina, ya sea inactivando a Gsk3- $\beta$  o bien, fosforilando directamente  $\beta$ -catenina (Kimelman y Xu, 2006; Valenta et al., 2011). Cooper y su grupo de investigación, han reportado que Hsp90  $\alpha/\beta$  desempeña un papel de chaperona de la función cinasa, a través de Axina-1, lo cual permitiría a GSK3 $\beta$  fosforile a  $\beta$ -catenina y proponen el complejo de Axin1/fosfo- $\beta$ -catenina como nuevo “cliente” de Hsp90  $\alpha/\beta$  (Cooper et al., 2011)

Estudios *in vitro*, han reportado que la vía canónica de Wnt/ $\beta$ -catenina promueve la carcinogénesis (Purcell et al., 2011; Saifo et al., 2010). Dentro de las proteínas involucradas en regular la vía Wnt/ $\beta$ -catenina se han estudiado a las Hsp90 (Kurashina, et. al, 2009). En este estudio, se sugiere una posible modulación de la activación por fosforilación de  $\beta$ -catenina, basado en el papel de Hsp90 como chaperona de la función cinasa, a través de Axina-1; facilitando así, que Gsk-3 $\beta$  fosforile a  $\beta$ -catenina. En este trabajo los autores proponen el complejo de Axin1/fosfo- $\beta$ -catenina/Hsp90 como regulador de la proliferación celular vía GSK-3 $\beta$ / $\beta$ -catenina (Cooper, et. al., 2011).

Las cinasas son probablemente, el grupo más importante de proteínas “cliente” de Hsp90 puesto la importancia que tienen en la señalización celular y la transducción de estas señales, Akt es una importante “cliente” de Hsp90 reguladora de la vía previamente descrita; se ha demostrado previamente que Hsp90 $\alpha$  y Hsp90 $\beta$  regulan de manera diferencial su activación y función; por ello el patrón de expresión de Hsp90 $\alpha$  y Hsp90 $\beta$  podría repercutir sobre la activación de sus proteínas cliente y por ende de la señalización mediada por ellas (Cortés-González et al., 2010). Considerando que la investigación en cáncer sobre la señalización mediada por  $\beta$ -catenina es relativamente reciente, el conocimiento aún es limitado.



Actualmente, comunidades científicas y médicas han reconocido a los inhibidores sintéticos de Hsp90 (proteína de choque térmico de 90kDa) como una herramienta prometedora en la lucha contra el cáncer, tanto como agentes individuales o en combinación con otras terapias (Al-Lazikani B. et al. 2012).

Como se mencionó anteriormente, Hsp90 $\alpha$  y Hsp90 $\beta$ , son proteínas que se encuentran sobre-expresadas en varios tipos de cáncer y que a pesar de mantener una actividad intrínseca como chaperonas moleculares idéntica, su capacidad de interactuar y de activar distintas proteínas oncogénicas puede ser diferente (Piccard, 2013).

El cáncer es un conjunto de enfermedades en el que las células se dividen sin control, superando barreras y mecanismos biológicos antes de convertirse en células cancerosas, (NCI, 2013). Los procesos que conllevan en sí a la carcinogénesis se desencadenan, principalmente, a partir de la desregulación de diversas vías de señalización de las cuales depende el correcto funcionamiento de la célula; la carcinogénesis implica la adquisición de diferentes propiedades oncogénicas, conocidos como “hallmarks” del cáncer, que incluyen el crecimiento continuo de las células tumorales (crecimiento autónomo), la habilidad para evadir la muerte celular programada (apoptosis), y la posibilidad de superar vías de inhibición de crecimiento, lo que a su vez les permite generar vasos sanguíneos propios (angiogénesis), invadir tejidos adyacentes (invasión) y su diseminación a otros órganos (metástasis), entre otros, (Hanahan y Weinberg, 2000; Hanahan y Weinberg, 2011). La gran mayoría de las proteínas centrales que interconectan dichos procesos, son “clientes” de Hsp90, su activación y funcionalidad depende en gran medida de ésta chaperona.

El cáncer cervical (CC) es de los procesos tumorales mejor estudiados y conocidos por su fácil identificación; sin embargo, en la mayoría de los países en desarrollo, en donde se dan el 83% de los casos, permanece como una de las principales causas de muerte por cáncer, manteniéndose como el segundo tipo de cáncer más común entre las mujeres a nivel mundial (Walboomers, et al., 1999; Parkin y Bray, 2006).

El CC tiene como principal factor etiológico la infección por virus de papiloma humano (VPH) por transmisión sexual, (Gustafsson et al., 1997). Uno de los posibles mecanismos por los que el VPH ejerce sus efectos oncogénicos proviene de hallazgos donde demuestran una interacción directa entre los productos de los genes E6 y E7 y proteínas celulares codificadas por genes supresores de tumor. Así, la proteína E7 del VPH-16 se une a la proteína de retinoblastoma Rb, y la proteína E6 del VPH-16 o 18 interactúa con el producto del gene p53, generando la expresión anormal de dicha proteína. Si bien este fenómeno debido a la degradación del gen normal ocasionada por la interacción con E6, también puede ser dado por la mutación del gen, ambas vías conducen a una desregulación de los procesos de regulación de procesos biológicos cruciales y posteriormente desencadenan la transformación tumoral de las células (Thomas M, et al., 1999). La expresión anormal de p53 se ha encontrado en muchos carcinomas humanos, en particular de mama y de colon, predominantemente como niveles elevados de la proteína a consecuencia de la presencia de una mutación puntual (Cagatay y Ozturk, 2002).

Los estudios clínicos o epidemiológicos que han incorporado las técnicas de biología molecular, han detectado la presencia de VPH de alto riesgo en casi el 100% de los CC, cuando la muestra es adecuada y la tecnología de detección viral es de alta sensibilidad, llegando a descartarse la existencia de CC no asociado al VPH (Franceschi, et al., 2009).

### 3. JUSTIFICACIÓN

Durante el proceso de carcinogénesis, Hsp90 ha sido implicada en el mantenimiento proteostático de una amplia variedad de oncoproteínas. Dentro de este contexto, la asociación entre Hsp90 con Akt, GSK3 $\beta$  y  $\beta$ -catenina ha sido descrita recientemente en líneas celulares de cáncer de mama y de leucemia, resultando tener un efecto anti-proliferativo cuando la actividad de Hsp90 es inhibida (Kurashina et al. 2009; Cooper et al. 2011).

En el modelo de cáncer cervical, la transcripción mediada por  $\beta$ -catenina estimulada por Wnt, ha sido previamente propuesta como un paso de gran importancia en la carcinogénesis cervical (Pérez-Plasencia et al., 2008); sin embargo, el panorama con respecto a la activación de  $\beta$ -catenina, por señales independientes de Wnt y la participación de Hsp90 en la activación de  $\beta$ -catenina y sus reguladores Akt y GSK3 $\beta$ , no han sido previamente estudiadas en este tipo de cáncer en particular.

Recientemente, nuestro grupo de investigación describió un papel diferencial entre Hsp90 $\alpha$  y Hsp90 $\beta$  en la actividad de la proteína cinasa Akt, un regulador central de la activación de  $\beta$ -catenina. Por lo anterior, en este estudio proponemos que las diferencias entre el perfil de expresión de Hsp90 $\alpha$  y Hsp90 $\beta$  tendrán una relación con la activación de sus oncoproteínas “cliente”, en el modelo celular de cáncer cervical.

### 4. HIPÓTESIS

Considerando que las vías de señalización mediadas por  $\beta$ -catenina en cáncer son reguladas diferencialmente por dos proteínas “cliente” de Hsp90 (Akt y GSK3- $\beta$ ), proponemos que el perfil de expresión, localización e interacción entre Hsp90 $\alpha$  y Hsp90 $\beta$  con sus proteínas “cliente”, determinará el estado de activación y localización de  $\beta$ -catenina.

## 5. OBJETIVOS

Identificar un patrón de expresión, de localización y de interacción entre Hsp90 $\alpha$  y Hsp90 $\beta$  con las proteínas Akt, Gsk3 $\beta$  y  $\beta$ -catenina, las líneas celulares de CC: HeLa, CaSki, C33a y SiHa.

### 5.1. Objetivos Particulares

- Obtener el perfil de expresión de las proteínas Hsp90 total, Hsp90 $\alpha$ , Hsp90 $\beta$ , y  $\beta$ -catenina, en las líneas celulares de carcinoma cervical.
- Identificar el patrón de localización celular de las proteínas, Hsp90 total, Hsp90 $\alpha$ , Hsp90 $\beta$ , Akt, Gsk3 $\beta$  y  $\beta$ -catenina.
- Determinar el efecto del patrón de expresión, localización e interacción diferencial entre Hsp90 $\alpha$  y Hsp90 $\beta$ , sobre la activación de  $\beta$ -catenina mediada por Akt y GSK3 $\beta$ .

## 6. MATERIAL Y MÉTODOS

### 6.1. Mantenimiento de cultivo celular

Se emplearon cuatro líneas celulares neoplásicas de cérvix (detalles en Tabla IV), y la línea celular de queratinocitos humanos inmortalizados, HaCaT. Ésta última se empleó como control negativo de células no neoplásicas. Los cultivos celulares fueron mantenidos en incubación a 37°C con un ambiente de CO<sub>2</sub> al 5%; en medio DMEM o DMEM-F12, suplementados con suero fetal bovino al 10% y solución de antibiótico/antimicótico 1X (Millipore).

**Tabla III.** Breve descripción de las líneas celulares neoplásicas de cérvix empleadas en el proyecto.

Línea Celular de CC Humano	VPH como agente etiológico del CC	Proteína p53 asociada al desarrollo del CC
HaCaT (no CC)	-	-
SiHa	VPH16	p53 wt
CaSKi	VPH16	p53 wt
HeLa	VPH18	p53 wt
C33a	-	p53 mut

### 6.2. Extracción de proteínas totales

La extracción se realizó a partir de cajas de 10mm<sup>2</sup> con una confluencia del 80 al 90%, empleando el buffer de lisis celular NP40, (NaCl-150 mM), NP-40 (1%) y Tris-Cl (50 mM, pH 8).

Para despegar y lisar las células, las cajas de cultivo fueron raspadas con ayuda de un *scraper*, empleando el buffer de lisis NP40 adicionado con inhibidor de proteasas y fosfatasa al 1x. Todo el proceso fue llevado a cabo en frío, sobre hielo; posteriormente

se recuperó el sobrenadante y fue centrifugado a 10,000 rpm a 4°C por 10 minutos, el sobrenadante restante fue almacenado como “Extracto de proteína totales” a -20°C.

Se obtuvieron al menos 3 extractos de proteína total, por línea celular; partiendo de distintos pases; la concentración de los extractos fue determinada mediante el método de Lowry, empleando el kit de cuantificación Lowry Protein Assay (BioRad).

La eficiencia de la extracción e integridad de las proteínas extraídas se corroboró mediante el corrimiento en geles desnaturalizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE), teñidos posteriormente con Azul de Coomassie (Coomassie R-250, Sigma).

### **6.3. Extracción de proteínas de compartimentos celulares**

En cada línea celular, se realizó extracción de las proteínas de los distintos compartimentos celulares: membrana, citoplasma y núcleo, empleando los kits de la compañía Millipore (Compartimental protein extraction kit y Nuclear extraction kit), siguiendo las indicaciones de la hoja técnica del proveedor. La concentración de los extractos se determinó por el método de Lowry (Lowry Protein Assay, BioRad), mientras la integridad de las proteínas extraídas se corroboró mediante el corrimiento de los extractos en geles desnaturalizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE), teñidos más tarde con Azul de Coomassie.

### **6.4. Electroforesis y electro-transferencia de las proteínas extraídas en geles SDS-PAGE**

Los geles desnaturalizantes de poliacrilamida para los extractos totales, fueron cargados con 20µg de proteína, mientras que los de los extractos de proteínas de compartimentos fueron cargados con 10µg de cada uno de los extractos. Las muestras se trataron con buffer de carga adicionado con β-mercaptoetanol al 5% y choque térmico a 90°C.

La separación electroforética de las proteínas se llevó a cabo en geles de acrilamida al 8% para los perfiles de expresión total y los perfiles de localización, y al 10% para el perfil de interacción (inmunocomplejos). Los geles empleados para WB, fueron transferidos en cámara semi-seca (BioRad), a membranas de PVDF (Immobilon-P, Millipore) previamente

permeabilizadas en metanol. Para corroborar la eficiencia de las electrotransferencias; previo al bloqueo, las membranas se tiñeron con Rojo de Ponceau (Ponceau S P-3504, Sigma).

### 6.5. Inmunodetección por ensayos de Western blot (WB)

Una vez transferido el gel de acrilamida a membranas de PVDF, se bloqueó la membrana en leche baja en grasa al 5%, durante hora y media a 37°C o toda la noche, dependiendo de la proteína a medir.

En cada experimento de WB, las membranas fueron incubadas con su anticuerpo primario durante una hora y media a 37°C o toda la noche, dependiendo de la proteína o el anticuerpo a analizar, los anticuerpos empleados se encuentran en la *Tabla IV*. Al término de cada incubación se realizaron una serie de al menos 5 lavados, de 10 minutos cada uno, con TBS-Tween al 1%.

**Tabla IV.** Anticuerpos empleados para la obtención de los perfiles de expresión y localización.

	Anticuerpo primario	Anticuerpo secundario acoplado a HRP
1	Anti- $\beta$ -actina	
2	Anti-EGFR	
3	Anti-Hsp90 total	Anti-Mouse
4	Anti-pAkt(Ser473)	
5	Anti- $\beta$ -catenina Activada (no p- $\beta$ -catenina <sup>Ser33/37</sup> )	
6	Anti-HIF1- $\alpha$	
7	Anti- $\beta$ -catenina total	
8	Anti-Akt/PKB	Anti-Rabbit
9	Anti-pAkt(Thr308)	
10	Anti-Hsp70	
11	Anti-pGsk3- $\beta$	
12	Anti-Hsp90 $\alpha$	Anti-Goat
13	Anti-Hsp90 $\beta$	

Posteriormente, las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario específico (anti-goat #V805A de PROMEGA, anti-rabbit #AP132P, o anti-mouse #AP124P de Millipore) durante una hora a temperatura ambiente. Después de una serie de al menos

ocho lavados, las membranas fueron reveladas por quimioluminiscencia (kit Chemiluminiscent HRP Substrate, Invitrogen). Finalmente, las membranas fueron reveladas en placas radiográficas (Kodak).

Para digitalizar las placas radiográficas de los western blots obtenidos, se empleó el programa LabScan™ 6.0 (Swiss Institute of Bioinformatics, GE Healthcare). Esto se llevó a cabo en el digitalizador ImageScanner III (GE Healthcare).

En los experimentos realizados al menos por duplicado, se analizó si existían diferencias significativas empleando un análisis de t-Student, en el programa SigmaPlot 10.0

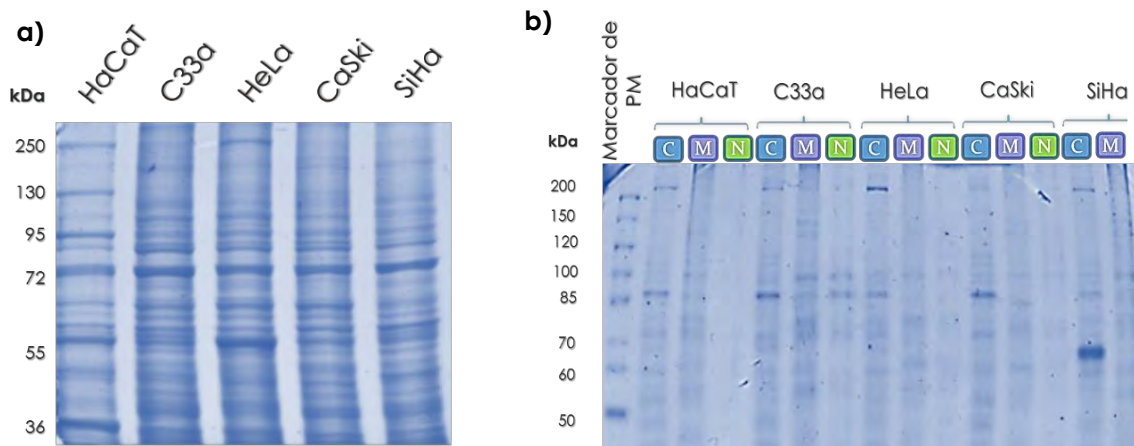
#### **6.6. Co-Immunoprecipitación de Hsp90**

Se realizaron ensayos de co-inmuprecipitación empleando perlas magnéticas (The Dynabeads® Protein G Immunoprecipitation Kit, #10007D de Novex®) acopladas a anticuerpo de Hsp90 total. Posteriormente se incubaron por 24 hs, 500 µg de proteína total, de cada línea celular. Una vez concluida la incubación, se rescató el antígeno no unido para su posterior análisis por electroforesis desnaturizante, y se llevó a cabo una elución desnaturizante de los inmunocomplejos obtenidos. Cada muestra fue tratada con un buffer Después de 2 horas de incuba Finalmente, los inmunocomplejos fueron analizados por ensayos de Western blot y por SDS-PAGE teñido con Azul brillante de Coomassie.



## 7. RESULTADOS

Con la finalidad de conocer el significado funcional de las proteínas Hsp's de 90kDa, Hsp90 $\alpha$  y Hsp90 $\beta$ , en la vía de señalización mediada por  $\beta$ -catenina, se realizaron ensayos de inmunodetección por WB de las proteínas en este estudio, empleando cuatro líneas celulares de cáncer cervical, HeLa, CaSki, SiHa, C33a, incluyéndose la línea celular HaCaT como control de células no neoplásicas. Los extractos empleados para realizar los ensayos de WB y co-IP, fueron separados por electroforesis en geles SDS-PAGE y teñidos con azul brillante de Coomassie (*figura 1*).

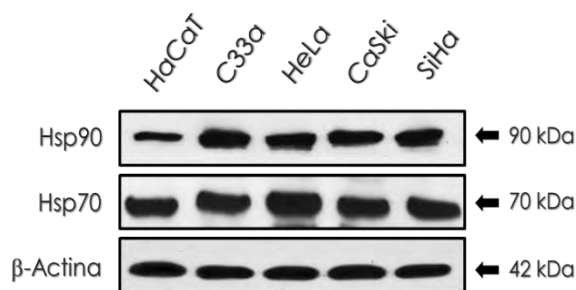


**Figura 1. SDS-PAGE de proteínas totales y de compartimentos teñidos con azul de Coomassie.** Figura 1a. Gel de SDS-PAGE al 8% teñido con azul de Coomassie, el gel fue cargado con 20  $\mu$ g de extracto total de proteínas de las cinco líneas celulares de cervix, se observan bandas muy bien definidas de 30 a 250 kDa muestra la integridad de los extractos. Figura 1b. Gel SDS-PAGE al 8% teñido con azul de Coomassie con 5  $\mu$ g de proteína de cada compartimento para validar la integridad de los mismos. En el costado izquierdo de ambos geles se observan los pesos moleculares (PM) que permite identificar cada marcador.

### 7.1. Patrón de expresión de Hsp90 $\alpha$ y Hsp90 $\beta$ en líneas celulares de cáncer cervical.

Con el fin de identificar el patrón de expresión diferencial de las isoformas de Hsp90, se evaluó por medio de WB la expresión de las proteínas de choque térmico: Hsp90 total, Hsp90 $\alpha$ , Hsp90 $\beta$  y Hsp70.

Se obtuvo por medio de WB el perfil de expresión de las proteínas de choque térmico Hsp90 total y Hsp70, *figura 2*. Es notable una sobreexpresión de Hsp90 total en las líneas celulares de cáncer con respecto a células no neoplásicas. En cuanto a la proteína Hsp70 no se presentan diferencias significativas en su expresión.



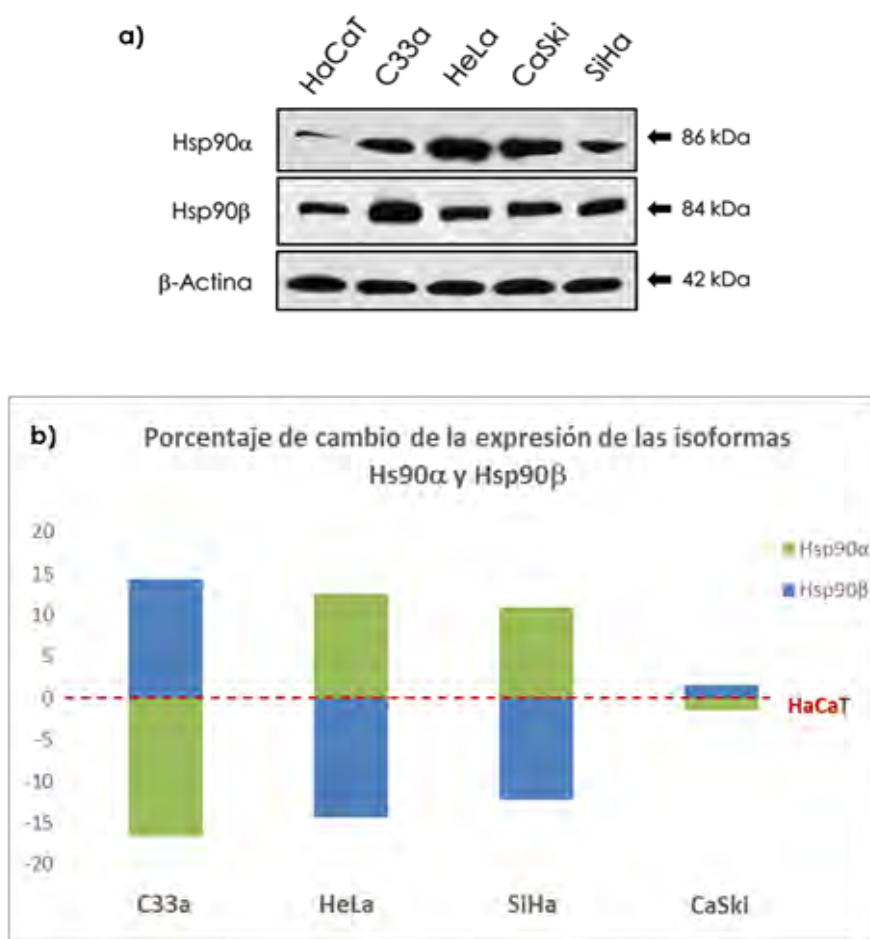
**Figura 2. Perfil de expresión de las proteínas de choque térmico, Hsp90 y Hsp70 en líneas de cáncer cervical.** Detección de las proteínas chaperonas Hsp90 y Hsp7, a partir de extractos totales de cinco líneas celulares de cérvix, por WB, (ensayo único).

A fin de identificar el patrón de expresión de las isoformas de Hsp90, se analizó la expresión de Hsp90 $\alpha$  y Hsp90 $\beta$  por WB a partir de extractos totales provenientes de líneas de cérvix; en la *figura 3a* se observa el WB de Hsp90 $\alpha$  y Hsp90 $\beta$ , en la cual destaca una notable sobreexpresión de Hsp90 $\alpha$  en las líneas de cáncer, particularmente en la línea celular HeLa con respecto al control HaCaT, ( $p < 0.01$ ); Hsp90 $\beta$  se observa en mayor proporción en las células control, y en la línea C33a, principalmente. El perfil de expresión de Hsp90 $\alpha$  y Hsp90 $\beta$  fue realizado por triplicado.

Para obtener el porcentaje de cambio entre las isoformas (*figura 3b*) se calculó la diferencia entre el porcentaje de sobreexpresión de Hsp90 $\alpha$  sobre la sobreexpresión de Hsp90 $\beta$ , y el porcentaje de sobreexpresión de Hsp90 $\beta$  sobre la sobreexpresión de Hsp90 $\alpha$  en las líneas celulares de CC (con respecto a la expresión en la línea celular HaCaT). Para

poder normalizar todas las líneas de CC con respecto a la línea celular no neoplásica, se emplearon los valores de únicamente un experimento.

A partir de la *figura 3* se identificaron dos patrones diferenciales de expresión entre Hsp90 $\alpha$  y Hsp90 $\beta$  en las líneas celulares de cáncer de cérvix, con respecto al control HaCaT; las líneas celulares HeLa y CaSki sobreexpresan principalmente Hsp90 $\alpha$ , con el 12% y el 10% de sobreexpresión de Hsp90 $\alpha$ >Hsp90 $\beta$ , respectivamente. Por otra parte, las líneas celulares C33a y SiHa sobreexpresan Hsp90 $\beta$  en un 14% y 1% de sobreexpresión Hsp90 $\beta$ >Hsp90 $\alpha$ , respectivamente.



**Figura 3. Perfil de expresión de las proteínas de choque térmico, Hsp90 $\alpha$  y Hsp90 $\beta$  en líneas celulares de cáncer cervical.** Figura 3a. Análisis de expresión por WB de las proteínas Hsp90 $\alpha$  y Hsp90 $\beta$  a partir de extractos totales de cinco líneas celulares de cérvix. Figura 3b. Porcentaje de cambio de la expresión de Hsp90 $\alpha$  y Hsp90 $\beta$ , con respecto a la línea control HaCaT, en líneas de cáncer cervical; el valor del porcentaje sobre o debajo de la línea punteada indica el porcentaje de sobreexpresión de Hsp90 $\alpha$  con respecto a Hsp90 $\beta$ , o bien, de Hsp90 $\beta$  con respecto a Hsp90 $\alpha$ .

Esta es la primera evidencia de patrones diferenciales en la expresión de Hsp90 $\alpha$  y Hsp90 $\beta$  en líneas celulares de un mismo tipo de cáncer; las células de líneas celulares CC, ambas isoformas se sobreexpresan, sin embargo, muestran patrones diferenciales entre las isoformas Hsp90 $\alpha$  y Hsp90 $\beta$ .

## **7.2. Perfil de activación de las proteínas involucradas en la vía de señalización mediada por $\beta$ -catenina.**

Una vez identificada la presencia de dos patrones de expresión diferenciales entre ambas isoformas de Hsp90, dos líneas celulares de CC con sobreexpresión de Hsp90 $\alpha$  y las otras dos con sobreexpresión de Hsp90 $\beta$  con respecto a la línea celular no neoplásica, se procedió a identificar el estado de activación de las proteínas “cliente” de Hsp90.

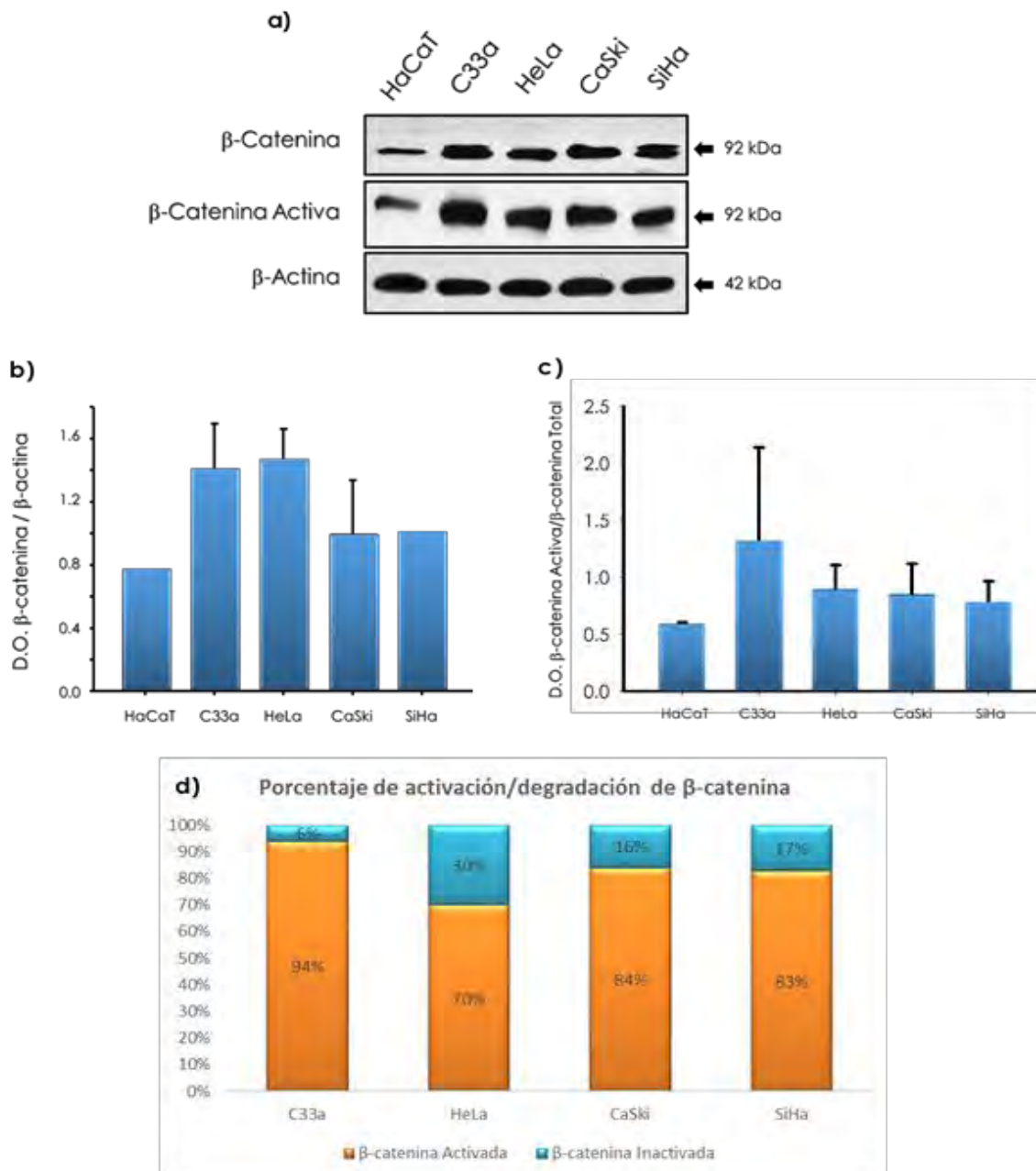
Primeramente, mediante ensayos de WB, se evaluó el estado de activación de la proteína  $\beta$ -catenina, analizando la expresión de la proteína no fosforilada en los sitios que la marcan para su degradación (Ser33/37 y Tyr41), así como su expresión total en líneas celulares de cérvix (*figura 4a*).

Para determinar los niveles de expresión de  $\beta$ -catenina total, en la *figura 4b* se muestra la densitometría de la expresión de  $\beta$ -catenina total normalizada con respecto a  $\beta$ -actina; hay una notable sobreexpresión de esta proteína en particular, en las líneas celulares de CC, C33a y HeLa, con respecto al control y a las otras dos líneas celulares de CC.

Para analizar el estado de activación de  $\beta$ -catenina, en la *figuras 4c* se observa la densitometría de la proteína  $\beta$ -catenina activada/ $\beta$ -catenina total, en esta se muestra una mayor activación de la proteína en las líneas HaCat, C33a y SiHa. En la *figura 4d* se muestra el porcentaje de proteína que se encuentra activada, mientras que el porcentaje restante implica la porción de  $\beta$ -catenina que se estaría degradando; cabe destacar a HeLa como la línea con mayor porcentaje de  $\beta$ -catenina no activada de todo el panel. Todos los experimentos de esta figura, fueron realizados por duplicado.

Si bien el estado de activación de  $\beta$ -catenina es importante, la regulación de su estabilidad y la señalización que puede llevar a cabo depende principalmente de dos cinasas

importantes en este estudio: Akt y Gsk3- $\beta$  puesto que ambas son proteínas “cliente” de Hsp9090.



**Figura 4. Perfil de expresión y activación de  $\beta$ -catenina, en líneas celulares de cérvix.** Figura 4a. Análisis de expresión por WB, de las proteínas  $\beta$ -catenina total y  $\beta$ -catenina activada, a partir de extractos totales de cinco líneas celulares de cérvix. Figura 4b. Densitometría de la expresión de  $\beta$ -catenina total normalizada con  $\beta$ -actina. Figura 4c. Densitometría de la forma activa de  $\beta$ -catenina/ $\beta$ -catenina total. Figura 4d. Porcentaje de cambio en la expresión de  $\beta$ -catenina activada/ $\beta$ -catenina total; la gráfica muestra el porcentaje de activación o degradación de  $\beta$ -catenina en experimentos realizados por duplicado.

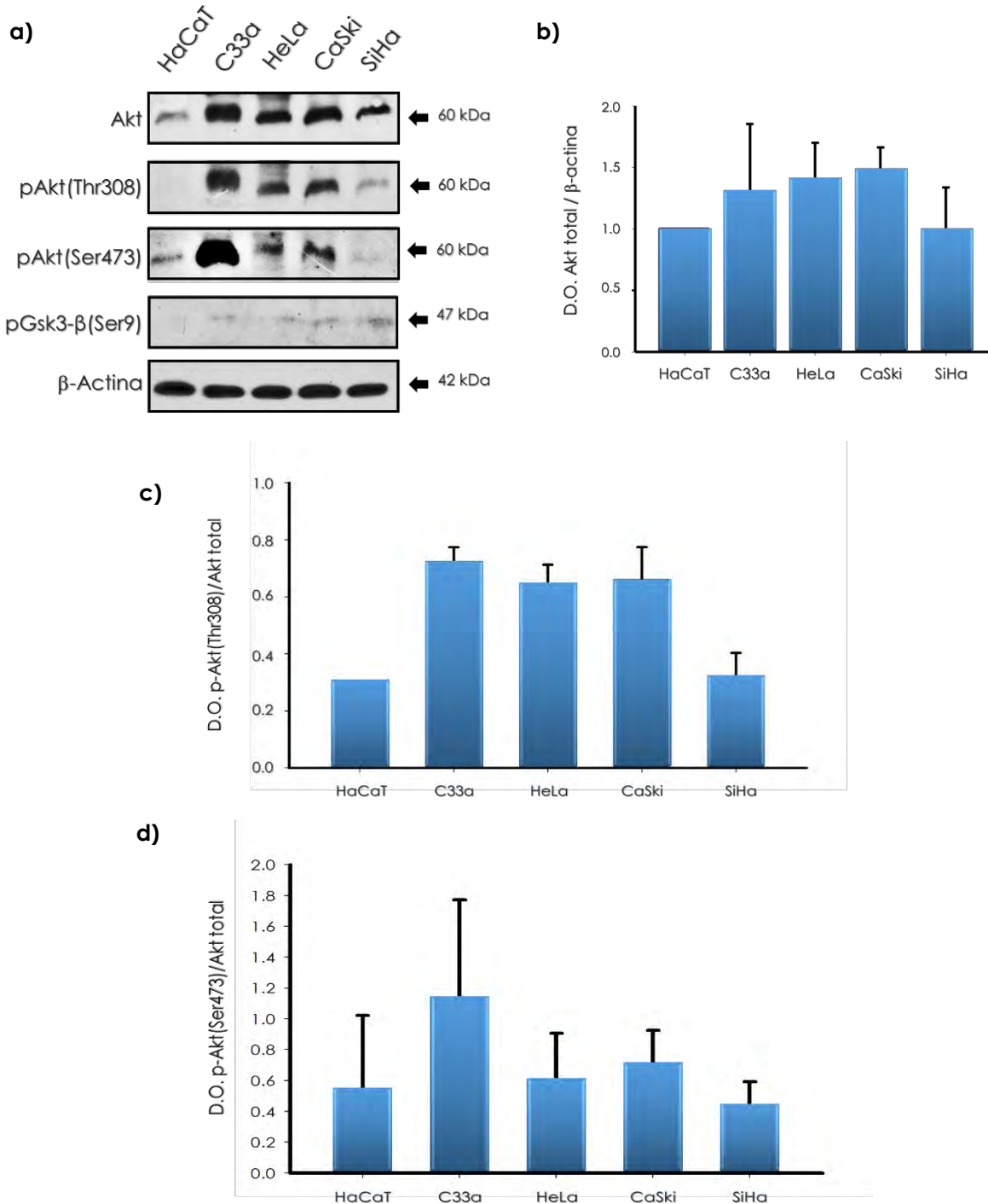
En la *figura 5a*, se evaluó el estado de activación de estas proteínas por medio de la inmunodetección por WB de las proteínas fosforiladas en sitios específicos: fosforilaciones activantes en la proteína Akt (residuos p-Akt<sup>Ser473</sup> y p-Akt<sup>Thr308</sup>), e inactivantes en la proteína Gsk3-β (residuo de p-Gsk3-β<sup>Ser9</sup>).

En la densitometría de la expresión de Akt total, normalizada con respecto a β-actina; como era de esperarse, hubo una sobreexpresión de Akt en las líneas celulares de CC con respecto a células no neoplásicas (*figura 5b*, siendo la línea celular SiHa la que presento los niveles más bajos de Akt total o activada y la línea celular C33a la que mayores niveles de expresión y activación presentó (*figura 5c, 5d*).

Buscando identificar un patrón diferencial de activación de Akt por alguna de las fosforilaciones evaluadas en este estudio, observamos que en células no neoplásicas, la activación que predomina es la de p-Akt<sup>Ser473</sup>, mientras que en cáncer pareciera ser mayor la activación en el residuo de p-Akt<sup>Thr308</sup>, a excepción de la línea celular de CC, C33a, la cual presentó mayor cantidad de pAkt<sup>Ser473</sup>>pAkt<sup>Thr308</sup>, (*figura 5c, 5d*).

### **7.3. Patrón de localización de las proteínas Hsp90α y Hsp90β.**

Las isoformas Hsp90α y Hsp90β han sido descritas principalmente como citoplásmicas, sin embargo se sabe que una de sus funciones es transportar proteínas cliente a ciertos compartimentos, por lo que pueden llegar a presentar una localización celular diferente al citoplasma, por lo que a partir del enriquecimiento de compartimentos celulares de citoplasma, membrana y núcleo, determinamos el patrón de localización de las isoformas; si bien corroboramos la localización citoplásmica de éstas, identificamos una localización nuclear de ambas isoformas en la línea celular HeLa, principalmente de la isoforma Hsp90α (*figura 6a*).



**Figura 5. Perfil de expresión de las cinasas fosforiladas, “clientes” de Hsp90 en líneas de cáncer cervical.** Figura 5a. Análisis de expresión por WB de las proteínas Akt total, pAkt<sup>Thr308</sup>, pAkt<sup>Ser473</sup>, p-Gsk3-β<sup>Ser9</sup>, a partir de extractos totales de cinco líneas celulares de cérvix. Figura 5b, densitometría de la expresión de Akt total normalizada con β-actina, experimento realizado por triplicado. Figura 5c, densitometría de p-Akt<sup>Thr308</sup>/Akt total; figura 5d, densitometría de p-Akt<sup>Ser473</sup>/Akt total.

#### **7.4. Patrón de localización celular de las proteínas involucradas en la vía de señalización mediada por $\beta$ -catenina.**

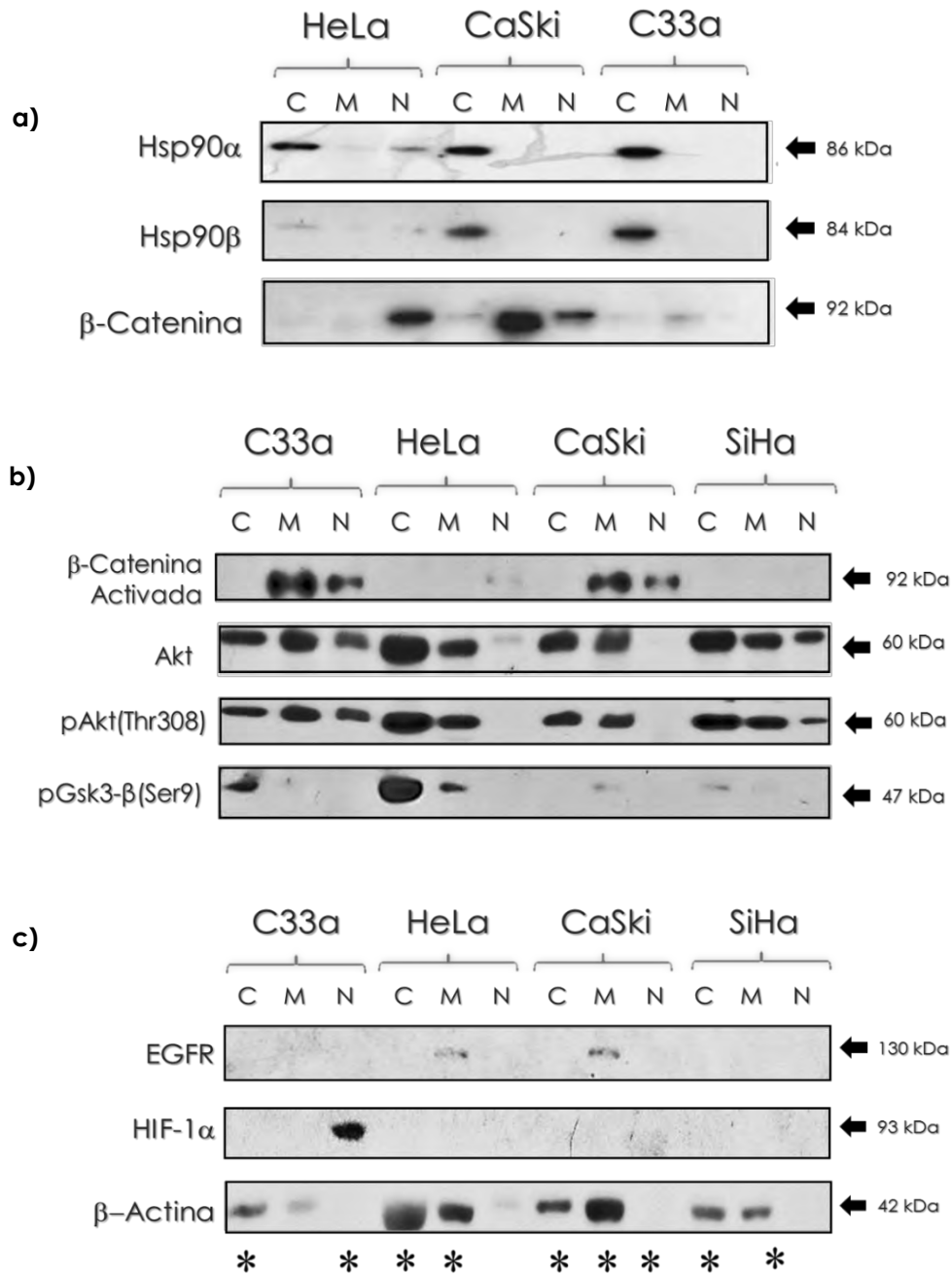
Para conocer si había una relación entre el perfil de expresión y el patrón de localización de las isoformas con el perfil de expresión y localización de sus proteínas cliente involucradas en la vía, se procedió a determinar el patrón de localización de éstas. A partir de extractos enriquecidos de citoplasma, membrana y núcleo de las cuatro líneas de cáncer de cérvix, se determinó la localización de Akt,  $\beta$ -catenina (sus formas activas) y Gsk3- $\beta$ .

Los patrones que encontramos son muy diferentes e interesantes, la localización de  $\beta$ -catenina en particular, es muy importante puesto que muestra un indicio de la clase de proceso que está señalizando o en el que se encuentra involucrada; una de las líneas celulares de gran interés fue HeLa, en este modelo en particular encontramos toda la  $\beta$ -catenina en núcleo, esto se correlaciona con la localización de pGsk3- $\beta$ (Ser9) inactivada en citoplasma y membrana, Akt presenta un patrón de localización exclusivo de citoplasma y membrana (*figura 6a, 6b*).

La línea celular CaSki comparte el mismo patrón de localización de Akt que HeLa, sin embargo, encontramos  $\beta$ -catenina total y activada con una localización en núcleo, pero principalmente en membranal, al igual que la línea celular C33a, en esta línea celular resulta interesante la localización nuclear de Akt tanto total como activada, con presencia de Gsk3- $\beta$ . La única línea celular cuyos niveles de  $\beta$ -catenina activada no fueron detectables para determinar su localización, fue SiHa, la cual comparte el mismo patrón de localización de Akt que C33a (*figura 6b*).

Todos los extractos empleados en los ensayos anteriormente descritos, para determinar la localización de las proteínas de interés para este estudio, fueron validados con marcadores de cada uno de los compartimentos. Las líneas quedaron validadas por la presencia de al menos dos marcadores y la ausencia de estos en compartimentos a los que serían ajenos (*figura 6c*).

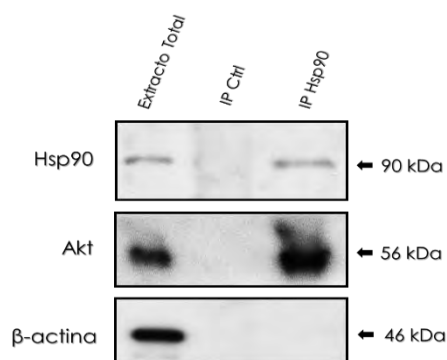




**Figura 6. Patrón de localización de Hsp90α, Hsp90β, y las proteínas involucradas en la vía β-catenina/Akt/Gsk3-β, en líneas celulares de cáncer cervical.** Figura 6a. Patrón de localización de las proteínas Hsp90α, Hsp90β y β-catenina total en tres líneas celulares de cáncer de cérvix, en tres compartimentos celulares (C, fracción de proteínas citoplásmicas; M, porción de proteínas de membrana; N, porción de proteínas de núcleo). Figura 6b, patrón de localización de las proteínas involucradas en la vía y sus formas activas (β-catenina activada, Akt total, pAkt<sup>Thr308</sup> y pGsk3-β<sup>Ser9</sup>). Figura 6c, validación de la pureza del enriquecimiento de los 3 compartimentos celulares, marcados con \* (EGFR, marcador de membrana; HIF-1α, marcador de núcleo; β-actina como marcador de citoplasma).

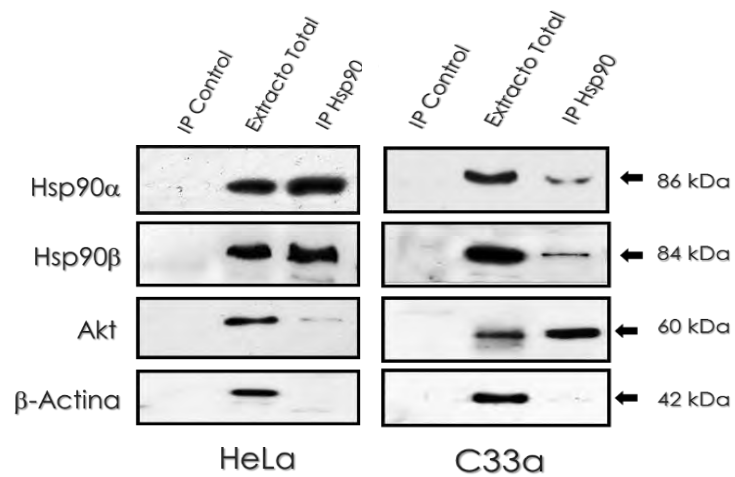
### 7.5. Patrón de interacción de Hsp90 con su oncoproteína “cliente” Akt

Para comprobar la interacción de Hsp90 con sus proteínas cliente se realizaron ensayos de co-inmunoprecipitación (Co-IP) de Hsp90 total. Primeramente se validó la eficiencia en la obtención de los inmunocomplejos, en la línea celular HeLa; en la *figura 6a* se muestra la integridad de los inmunocomplejos de Hsp90, así como la validación del control en un gel SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie; en la *figura 6b* se muestra la validación por WB de la misma Co-IP y el patrón de interacción de Hsp90 con Akt.



**Figura 7. Estandarización y validación de la Co-IP de Hsp90 Total en la línea celular HeLa.** Detección por Western blot de Hsp90 total como validación del inmunoprecipitado,  $\beta$ -actina como control de limpieza, y Akt co-inmunoprecipitado con Hsp90 total. Carril 1, lisado celular; carril 2 DyanaBeads + buffer de anticuerpo + lisado celular; y carril 3, DyanaBeads + anticuerpo anti-Hsp90 total + lisado celular.

Una vez validada la eficiencia de los ensayos de Co-IP, se realizaron dos ensayos más para identificar los patrones de interacción de Hsp90 con sus proteínas “cliente”, en las líneas celulares HeLa y C33a; en la *figura 7* se muestran el WB de Hsp90 $\alpha$  y Hsp90 $\beta$ , así como Akt co-inmunoprecipitado con Hsp90. En estudios posteriores se planea realizar la Co-IP de cada isoforma por separado para conocer el patrón de interacción de cada isoforma con las proteínas involucradas.



**Figura 8. Perfil de interacción de Hsp90 y sus isoformas, con su oncoproteína “cliente” Akt. Inmunocomplejos, en las líneas celulares HeLa y C33a.** Ensayo de Co-IP de Hsp90 total, detección por WB de Hsp90α y Hsp90β, y de Akt. Carril 1, DyanaBeads + buffer de anticuerpo + lisado celular; carril 2 lisado celular; y carril 3, DyanaBeads + anticuerpo anti-Hsp90 total + lisado celular.

## 8. DISCUSIÓN

Las células tumorales se encuentran expuestas de manera endógena y exógena a una amplia variedad de condiciones de estrés. Entre las proteínas alteradas en respuesta al estrés por el proceso de carcinogénesis se encuentran las Hsp. En este aspecto, la familia de las Hsp90 se ha descrito ser en gran parte responsables de mantener vías de señalización indispensables para la supervivencia de la célula tumoral.

En cáncer de mama, pulmón, próstata, endometrio y ovario se ha reportado la sobreexpresión de Hsp90 asociada con a un mal pronóstico de la enfermedad, a la resistencia a fármacos, y al estado de activación de vías dependientes de receptores hormonales, entre otros, (Yano et al., 1999; Pick et al., 2007; Centenera et al., 2012; Senju et al., 2006; Sain et al., 1996; Nanbu et al., 1996). En el presente estudio observamos que en líneas celulares de cáncer cervical hay una notable sobreexpresión de Hsp90 total, en comparación con células de cérvix no neoplásicas (*figura 2*); sin embargo, pese a la heterogeneidad de las características de las líneas celulares de CC, no se observaron diferencias en cuanto a la expresión de Hsp90 total ni de la chaperona Hsp70, que previamente se ha propuesto en este modelo como biomarcador de proliferación, malignidad y tamaño del tumor (Ralhan y Kaur, 1995; Abd el All et al.; 1998; Park et al., 2010).

Si bien, en algunos tipos de cáncer el aumento en la expresión de Hsp90 basta para emplearla como biomarcador o bien como blanco terapéutico, en CC aún no existe evidencia experimental y/o clínica que pueda explicar un perfil de expresión de Hsp90 y sus isoformas. Basados en el primer resultado de nuestro estudio, en donde observamos un aumento de Hsp90 en cáncer entre las distintas líneas celulares de CC, nos interesó conocer si existía una expresión diferencial entre la expresión de Hsp90 $\alpha$  y Hsp90 $\beta$ .

En estudios previos se ha destacado la importancia de estas proteínas por separado, puesto que el cambio del ratio de expresión entre una isoforma u otra se traduce en la activación específica de algunas vías de señalización e incluso en un importante factor que afecta la sensibilidad a los inhibidores de Hsp0 (Sreedhar et al., 2004; Millson et al., 2007;

Taherian et al., 2012). De manera interesante y novedosa, identificamos dos patrones de expresión de las Hsp90 $\alpha$  y Hsp90 $\beta$ , en líneas celulares de cáncer cervical. De las dos isoformas citosólicas, Hsp90 $\alpha$  es inducible, por lo que no es raro encontrar la sobreexpresión y en una célula tumoral no resulta extraño encontrar su sobreexpresión, en una de las líneas celulares del estudio, HeLa, encontramos diferencias significativas en la sobreexpresión de Hsp90 $\alpha$  con respecto al control, HaCaT. Resulta de suma importancia en lo que esta sobreexpresión pudiera derivar funcionalmente en la célula tumoral, puesto que las funciones específicas de Hsp90 $\alpha$  han sido asociadas a la promoción del crecimiento, la regulación del ciclo celular y la citoprotección (Sreedhar et al., 2004) además de haberse visto involucrada en estudios previos con la migración e invasión celular mediada por MMPs en otros tipos de cáncer (Eustace et al., 2004; Li et al., 2007; Cheng, 2008). Cabe destacar que la línea celular CaSki, presentó un comportamiento similar en cuanto al porcentaje de cambio entre Hsp90 $\alpha$ /Hsp90 $\beta$  (*figura 3*).

Aunque Hsp90 $\beta$  de manera constitutiva es mayor en proporción a Hsp90 $\alpha$ , en condiciones normales como se observa en el control de HaCaT, una de las líneas celulares de CC presentó un patrón notablemente distinto al de HeLa, la línea celular C33a si bien sobreexpresa tanto Hsp90 $\alpha$  como Hsp90 $\beta$ , posee una mayor proporción de Hsp90 $\beta$  en comparación con Hsp90 $\alpha$ ; la línea celular SiHa, aunque con menor cantidad de proteína, también presenta dicho patrón de sobreexpresión. Anteriormente, en cáncer gástrico, se había observado el aumento de la expresión de esta isoforma en el tejido de tumoral (Liu et al., 1999), dentro de las funciones particulares de esta isoforma está la transformación celular y la transducción de señales, en modelos de cáncer se ha asociado al mantenimiento de la función antiapoptótica de Bcl-2 y de Cpg-B así como a una mayor sensibilidad a inhibidores de Hsp90 como el radicicol, y los derivados naturales y sintéticos de la geldanamicina, que se unen de manera reversible al sitio de unión de ATP inhibiendo la función de chaperona de Hsp90 (Cohen-Saidon et al., 2006; Kuo et al., 2007; Millson et al., 2007).

Así, en este estudio demostramos de manera preliminar la primera evidencia sobre la existencia de patrones diferenciales de expresión entre Hsp90 $\alpha$  y Hsp90 $\beta$ , en líneas

celulares de un mismo tipo de cáncer. Entre los complejos que forma Hsp90 con sus proteínas “cliente”, se ha visto que Hsp90 tiene predilección por las proteínas si éstas presentan alguna mutación, como es el caso de p53<sup>mut</sup> (Peng et al., 1993). La importancia de emplear diversas líneas celulares de CC para este proyecto, fue principalmente por las diferencias etiológicas que hay entre ellas, mismas que están dadas de cierta manera, por las características moleculares de las células, tales como la presencia de VPH (en las líneas celulares HeLa, CaSki y SiHa) o la presencia de una mutación inactivante en el gene p53 (en la línea celular C33a).

Partiendo de la evidencia de dos patrones de expresión diferenciales entre Hsp90 $\alpha$  y Hsp90 $\beta$ , y de las diferencias intrínsecas de las líneas celulares, el impacto que esto puede tener en la respuesta a los tratamientos con inhibidores de Hsp90 pueden verse altamente influenciados por el patrón de expresión observado en cada línea celular; en experimentos previos realizados por nuestro grupo de investigación se ha visto que la inhibición de Hsp90 genera una inversión del patrón de expresión de las isoformas, lo cual repercute en el mantenimiento de la señalización que mantiene a las células tumorales (Datos no publicados, 2012).

Puesto que se ha visto que el cambio del ratio de expresión de las isoformas afecta de manera considerable la activación de sus proteínas cliente, esperábamos ver diferencias en el estado de activación de las proteínas “cliente” de Hsp90: Akt, Gsk3- $\beta$  y  $\beta$ -catenina.

Anteriormente, la sobreexpresión y localización en membrana o en núcleo de  $\beta$ -catenina, han sido propuestas como posibles biomarcadores de agresividad; en este estudio se identificaron altos niveles de  $\beta$ -catenina activada y localización de la misma en el núcleo de al menos 3 de las 4 líneas celulares de CC, de inicio este patrón de localización es evidencia de que en al menos las líneas celulares C33a, HeLa y CaSki, la transcripción mediada por  $\beta$ -catenina está activa. La localización en núcleo de esta proteína ha sido previamente reportada para otros tipos de cáncer como próstata, gástrico, oral y cáncer de vejiga, en donde se ha relacionado con tumores de grados clínicos avanzados y de mayor agresividad (Jaggi et al., 2005; Chaw et al., 2012; Clairotte et al., 2006; Whitaker et al.,

2008), por ello sería de esperarse que estas células presenten mayor capacidad proliferativa, de migración o de resistencia a fármacos.

Dentro de este grupo de líneas celulares, el patrón de expresión de las isoformas es diverso; primero tenemos el modelo que sobre-expresa Hsp90 $\beta$ , C33a, el cual presentó los niveles más altos de proteína  $\beta$ -catenina activada, y la localización de ésta en membrana y núcleo. La línea celular C33a se caracteriza por ser negativa para VPH pero con p53<sup>mut</sup> en el codón 573 (mutación inactivante), una de las principales mutaciones o inactivaciones encontradas en cáncer de cérvix, mama, pulmón y hepatoblastoma, en estos tipos de cáncer suele expresarse de manera aberrante  $\beta$ -catenina acumulada en núcleo; Cagatay y Ozturk en 2002 comprobaron experimentalmente que la presencia de mutaciones en p53 son mutuamente exclusivas en un 92% de líneas celulares de carcinoma hepatocelular, las cuales presentan la acumulación de  $\beta$ -catenina en núcleo. La pérdida de la función de p53 es una causa que posiblemente podría explicar la acumulación aberrante de  $\beta$ -catenina en estas células y posiblemente en tumores con esta característica.

El segundo modelo está representado por HeLa y CaSki que sobreexpresan la isoforma Hsp90 $\alpha$ , en estas líneas celulares sin embargo, la expresión y localización de  $\beta$ -catenina fue distinto. Estudios en células de cáncer de mama han propuesto a la proteína p- $\beta$ -catenina<sup>Ser33/37</sup> como un nuevo “cliente” de Hsp90, en donde la chaperona podría estar implicada en la degradación de  $\beta$ -catenina (Cooper et al., 2011), en nuestros resultados la línea celular HeLa fue la que presentó mayor porcentaje de proteína inactiva (marcada para su degradación), esto podría implicar la participación de Hsp90 $\alpha$ , en esta línea celular, en el mecanismo de degradación de  $\beta$ -catenina, al ser “clientes” tanto p- $\beta$ -catenina<sup>Ser33/37</sup> como la cinasa encargada de fosforilarla, Gsk3- $\beta$ .

No obstante, resulta interesante que en las células de CC con VPH 18 se observe la localización exclusiva en el núcleo de  $\beta$ -catenina activada. La carcinogénesis cervical dirigida por las oncoproteínas E6 y E7 de VPH de alto riesgo juegan un papel importante en la estimulación la transducción de señales iniciadas por EGFR, así como la activación de

Src, ambos efectos se han estudiado en las líneas celulares SiHa y HeLa (Hu et al., 1997; Szalmás et al., 2013). La acumulación en núcleo de  $\beta$ -catenina podría estar dada por la estimulación de la señalización dirigida por EGFR, ya que ésta activa río abajo a la cinasa Src, la cual puede activar directamente a  $\beta$ -catenina al disociar su unión con E-cadherina (Lee et al., 2010; Yang et al., 2011).

Por otra parte, la línea celular CaSki también presentó sobreexpresión de Hsp90 $\alpha$ >Hsp90 $\beta$ ; sin embargo, a diferencia de HeLa, la localización de  $\beta$ -catenina fue semejante a la encontrada en la línea celular C33a (membrana y núcleo), la activación de esta proteína fue menor en un 10% con respecto al control y en comparación con C33a.

En este estudio, encontramos la localización de la cinasa Gsk3- $\beta$  en la membrana celular de las células CaSki; como ya se ha mencionado esta proteína es conocida por regular de manera negativa la señalización mediada por  $\beta$ -catenina, sin embargo en 2005, Zeng y colaboradores demostraron que la Gsk3- $\beta$  asociada a la membrana, al contrario de la forma citoplásmica, estimula la vía de Wnt por medio de la fosforilación y activación del receptor de membrana LRP6 (Zeng et al., 2005). Esto podría correlacionar con la presencia de la forma activa de  $\beta$ -catenina en núcleo que implicaría la activación de la transcripción mediada por  $\beta$ -catenina, dirigida a los genes blancos de Wnt.

La localización de la proteína  $\beta$ -catenina activada no solamente se limitó al núcleo, al menos en las células C33a y CaSki se encontró localización en la membrana celular; el papel de  $\beta$ -catenina en la membrana está involucrado con las asociaciones que forma con las cadherinas (E-cadherina principalmente), su disminución en la expresión en la membrana se ha descrito como un marcador biológico de mejor pronóstico en pacientes de cáncer de vejiga (Clairotte et al., 2006).

Se ha comprobado experimentalmente que la asociación a E-cadherina y evidente localización en la membrana celular, previene la activación de la transcripción mediada por  $\beta$ -catenina (Orsulic et al., 1999). Sin embargo también puede estar involucrada en la transición epitelio-mesénquima; en base a los resultados observados en este proyecto, en



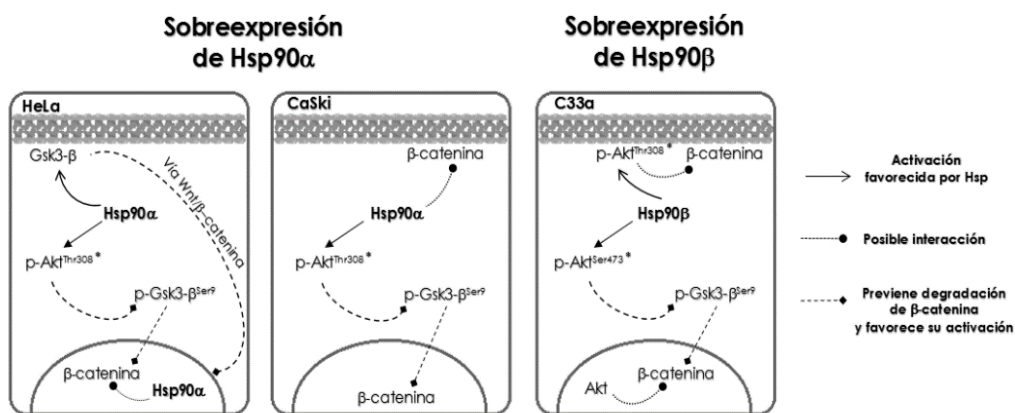
las líneas celulares C33 y CaSki, sería necesario determinar la expresión de E-cadherina o de alguna otra cadherina que pudiese estar asociada a  $\beta$ -catenina.

Recientemente, en nuestro grupo de investigación se describió que la sobreexpresión de Hsp90 $\alpha$  está relacionada con la activación de Akt por medio de p-Akt<sup>Ser473</sup>, en células embrionarias de riñón (Cortés-González et al., 2010), sin embargo en este proyecto observamos que en el modelo de cáncer cervical sucede lo contrario; en las líneas celulares de CC donde predominó la sobreexpresión de Hsp90 $\alpha$  se observó una mayor activación de la pAkt<sup>Thr308</sup>, mientras que en la línea celular que observamos una sobreexpresión de Hsp90 $\beta$  la principal fosforilación que se observa es en p-Akt<sup>Ser473</sup>.

En los resultados que mostramos en este proyecto, encontramos una asociación entre la sobreexpresión, la activación y la localización de Akt y  $\beta$ -catenina, en las líneas celulares de cáncer de cérvix. Se conocen dos mecanismos por los cuales Akt puede promover la estabilización de  $\beta$ -catenina, el primero y más común es que mediante la p-Gsk3 $\beta$ <sup>Ser9</sup> inhiba la degradación de  $\beta$ -catenina por medio del complejo de degradación, esto facilita la acumulación de  $\beta$ -catenina en el citoplasma y su posterior traslocación a núcleo; el segundo es que en citoplasma Akt puede fosforilar directamente a  $\beta$ -catenina<sup>Ser552</sup> causando la disociación de las uniones célula-célula e incrementando la transcripción mediada por  $\beta$ -catenina (Fang, 2007). Sin embargo se ha visto recientemente que la sobreactivación de Akt en el citoplasma puede ser promovida a su vez por  $\beta$ -catenina, este mecanismo de feedback podría explicar la asociación encontrada entre niveles altos de  $\beta$ -catenina y de  $\beta$ -catenina activada, así como de Akt, principalmente en las líneas C33a, HeLa y CaSki; esto sería traducido en una alta proliferación así como la evasión de la apoptosis, (Dihlmann et al., 2005).

Este proyecto representa una puerta de la investigación que puede dar mucho de sí dada la novedad del tema central de investigación, sin embargo, por la misma razón es poco comparable con lo que sucede en otros modelos de cáncer, ya que se ha visto que los perfiles de expresión son particulares del tejido de origen del cáncer, la dependencia de receptores hormonales o la presencia de mutaciones puntuales. El panorama de Hsp90 $\alpha$

y Hsp90β en CC y su implicación en la señalización mediada por β-catenina requiere de estudios más exhaustivos, para ello es necesario continuar con posteriores experimentos para corroborar lo encontrado en este estudio y avanzar con la inhibición de la función de Hsp90 en los modelos donde observamos patrones diferenciales de la expresión de Hsp90α y Hsp90β, determinar su efecto en fenómenos celulares que posiblemente podrían estar regulando por medio de la señalización mediada por sus proteínas “cliente”: Akt/Gsk3-β/β-catenina y determinar si existe una correlación de lo observado en las líneas celulares de CC con muestras de pacientes de CC.



**Figura 9. Activación de β-catenina asociada al perfil de expresión de Hsp90α o Hsp90β.** De dos patrones diferenciales de expresión, entre Hsp90α y Hsp90β, se encontraron tres modelos diferentes de activación de β-catenina. En la línea celular HeLa, donde se encontró sobreexpresión de Hsp90α, es posible que la vía de Wnt esté favoreciendo la activación de β-catenina, además de una posible interacción con Hsp90α en el núcleo. En la línea celular CaSki, que también sobreexpresó Hsp90α, la activación de β-catenina parece ser independiente de Akt; la activación de Akt en el residuo de la Thr308 fue asociada a la sobreexpresión de Hsp90α, al igual que en HeLa. Aunque las líneas celulares CaSki y C33a comparten el patrón de localización de β-catenina, el patrón de localización y activación de Akt sugiere que en la línea celular donde predomina la sobreexpresión de Hsp90β, la activación de β-catenina es dependiente de Akt (C33a); la activación de Akt en el residuo fosforilable de la Ser473 se asoció a la sobreexpresión de la isoforma Hsp90β. (\*) Residuo fosforilable de mayor importancia para la activación de Akt.

## 9. CONCLUSIONES

- Se determinó la presencia de sobreexpresión de Hsp90 total en las líneas celulares de CC (HeLa, CaSki, C33a y SiHa), con respecto a la línea celular no neoplásica; sin diferencias significativas entre las líneas celulares de CC.
- Se encontró un patrón diferencial en la expresión de Hsp90 $\alpha$  y Hsp90 $\beta$  en líneas celulares de un mismo tipo de cáncer, dos líneas celulares de CC: HeLa y CaSki presentaron una sobreexpresión de Hsp90 $\alpha$ >Hsp90 $\beta$ , mientras que las otras dos líneas celulares de CC: C33a y SiHa presentaron una sobreexpresión de Hsp90 $\beta$ >Hsp90 $\alpha$ .
- Se encontró la sobreexpresión de Akt y de  $\beta$ -catenina, así como una alta activación de ambas proteínas, en cáncer (líneas celulares de CC), siendo la línea celular C33a la que presentó los niveles más altos de proteína y proteína activada –tanto de Akt como de  $\beta$ -catenina– y las líneas celulares HeLa y SiHa las que presentaron los niveles más bajos de  $\beta$ -catenina activada y Akt total y activada –respectivamente.
- A diferencia de lo previamente reportado por nuestro grupo de investigación, en células no neoplásicas, sobre la expresión de Hsp90 $\alpha$  y la activación de Akt en la Ser473, encontramos que en cáncer pareciera ser más importante la p-Akt<sup>Thr308</sup>.
- Se identificó la localización de  $\beta$ -catenina en tres de las cuatro líneas celulares de CC (C33a, HeLa, CaSki), la presencia de la forma activa de la proteína indica que la señalización mediada por  $\beta$ -catenina se encuentra activa.
- La localización de  $\beta$ -catenina en núcleo, en la línea celular HeLa, se asoció a la localización en núcleo de Hsp90 $\alpha$ .
- Las líneas celulares C33a y CaSki presentaron localización de  $\beta$ -catenina en membrana, que se traduce en menor proliferación mediada por  $\beta$ -catenina.
- Se identificaron, de manera preliminar, dos patrones de localización de  $\beta$ -catenina asociada al patrón de localización de Akt: mientras que en C33a dicho patrón de localización se asoció al patrón de Akt en membrana y núcleo, en CaSki parece ser independiente.

## 10. PROSPECTIVAS

Para continuar con el proyecto y describir el efecto de la expresión diferencial de Hsp90 $\alpha$  y Hsp90 $\beta$  sobre la activación de sus proteínas “cliente”, Akt, Gsk3- $\beta$ , así como la señalización mediada por  $\beta$ -catenina, es necesario confirmar qué complejos forma  $\beta$ -catenina en el núcleo y de qué manera la transcripción mediada por  $\beta$ -catenina es afectada por Hsp90. Para ello se evaluarán los blancos de la transcripción mediada por  $\beta$ -catenina cuando forma los diferentes complejos que puede hacer en el núcleo.

Posteriormente, para ver el efecto funcional de Hsp90 $\alpha$  y Hsp90 $\beta$ , sobre las células de CC, se realizarán ensayos de proliferación y migración celular, donde se inhibirá la función de Hsp90 con un derivado de la geldanamicina, 17-DMAG.

Esperamos que en un futuro, se pueda corroborar lo observado en muestras de pacientes de CC y de ser posible determinar si es viable el tratamiento con los inhibidores de Hsp90.

## 11. REFERENCIAS

[Abd el All et al., 1998]

Abd el All H, Rey A, Duvillard P. 1998. Expression of heat shock protein 70 and c-myc in cervical carcinoma. *Anticancer Research*, 18:1533-1536.

[Ali et al., 2006]

Ali MM, Roe SM, Vaughan CK, Meyer P, Panaretou B, Piper PW, Prodromou C, Pearl LH. 2006. Crystal structure of an Hsp90-nucleotide-p23/Sba1 closed chaperone complex. *Nature*, 440(7087):1013-1017.

[Al-Lazikani et al., 2012]

Al-Lazikani B, Banerji U, Workman P. 2012. Combinatorial drug therapy for cancer in the post-genomic era. *Nature Biotechnology*. 30(7):679-692.

[Bakau, 2003]

Bakau B. 2003. Molecular chaperones and folding catalyst: Regulation, celular functions and mechanism. CRC Press. 680p.

[Cagatay T, Ozturk M. 2002]

Cagatay T, Ozturk M. 2002. p53 mutation as a source of aberrant  $\beta$ -catenina accumulation in cancer cells. *Oncogene*, 21:7971-7980.

[Centenera et al., 2012]

Centenera MM, Gillis JL, Hanson AR, Jindal S, TTaylor RA, Risbridger GP, Sutherland PD, Scher HI, Raj GV, Knudsen KE. 2012. Evidence for efficacy of new Hsp90 inhibitors revealed by Ex vivo culture of human prostate tumors. *Cancer Clinical Research*, 18(13):3562-5370.

[Chadli et al., 2008]

Chadli A, Graham JD, Abel MG, Jackson TA, Gordon DF, Wood WM, Felts SJ, Horwitz KB, Toft D. 2008. GCUNC-45 is a novel regulator for the Progesterone Receptor/Hsp90 chaperoning pathway. *Molecular and Cellular Biology*, 26(5):1722-1730.

[Chang et al., 2006]

Chang YS, Lo CW, Sun FC, Chang MDT, Lai YK. 2006. Differential expression of Hsp90 isoforms in geldanamycin-treated 9L cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 344: 37-44.

[Chaw et al., 2012]

Chaw SY, Abdul MA, Dalley AJ, Chan A, Stein S, Farah CS. 2012. Epithelial to mesenchymal transition (EMT) biomarkers –E-cadherin,  $\beta$ -catenin, APC and vimentin– in oral squamous cell carcinogenesis and transformation. *Oral Oncology*, 48(10):997-1006.

[Cheng et al., 2008]

Cheng CF, Fan J, Fedesco M, Guan S, Li Y, Bandyopadhyay B, Bright AM, Yerushalmi D, Liang M, Chen M, Han YP, Woodley DT, Li W. 2008. Transforming growth factor  $\alpha$  (TGF $\alpha$ )-stimulated secretion of Hsp90 $\alpha$ : Using the receptor LRP1-CD91 to promote human skin cell migration against a TGF $\beta$ -rich environment during wound healing. *Molecular Cell Biology*, 28(10):3344-3358.

[Clairotte et al., 2006]

Clairotte A, Lascombe I, Fauconnet S, Mauny F, Félix S, Algors MP, Bittard H, Kantelip B. 2006. Expression of E-cadherin and  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -catenins in patients with bladder cancer. *American Journal of Clinical Pathology*, 125:119-126.

[Clare y Saibil, 2013]

Clare DK, Saibil HR. 2013. ATP-driven molecular chaperone machines. *Biopolymers*, 99(11):846-859.

[Cohen-Saidon et al., 2006]

Cohen-Saidon C, Carmi I, Keren A, Razin E. 2006. Antiapoptotic function of Bcl-2 in mast cells is dependent on its association with heat shock protein 90 $\beta$ . *Blood*, 107:1413-1420.

[Cooper et al., 2011]

Cooper LC, Prinsloo E, Edkins AL, Blatch GL. 2011. Hsp90 $\alpha/\beta$  associates with the GSK3 $\beta$ /axin1/phospho- $\beta$ -catenin complex in the human MCF-7 epithelial breast cancer model. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 413(4):550-554.

[Córdova et al., 2009]

Córdova AT, Navarro MMC, Rosado GA. 2009. Catenina beta: características estructurales y funcionales. *Contactos*, 75:15-20.

[Cortés-González et al., 2008]

Cortés-González CC, Ramírez-González V, Ariza AC, Bobadilla NA. 2008. Functional significance of heat shock protein 90. *Revista de Investigación Clínica*, 60(4):311-320.

[Cortés-González et al., 2010]

Cortés-González CC, Barrera-Chimal J, Ibarra-Sánchez M, Gilbert M, Gamba G, Zentella A, Flores ME, Bobadilla NA. 2010. Opposite effect of Hsp90 $\alpha$  and Hsp90 $\beta$  on eNOS ability to produce nitric oxide or superoxide anion in human embryonic kidney cells. *Cell Physiology Biochem*, 26(4-5):657-668.

[Csermely et al., 1998]

Csermely P, Schnaider T, Sóti C, Prohászka Z, Nardai G. 1998. The 90-kDa molecular chaperone family: Structure, function and clinical applications. A comprehensive review. *Pharmacology and Therapeutics*, 79(2):129-168.

[Da Silva y Ramos, 2012]

Da Silva VCH, Ramos CHI. 2012. The network interaction of the human cytosolic 90 kDa heat shock protein Hsp90: A target for cancer therapeutics. *Journal of Proteomics*, 75:2790-2802.

[Dollins et al., 2007]

Dollins DE, Warren JJ, Immormino RM, Gewirth DT. 2007. Structure of Grp94-nucleotide complexes reveal mechanistic differences between Hsp90 chaperones.

[Dihlman et al., 2005]

Dihlman S, Kloor M, Fallsehr C, von Knebel DM. 2005. Regulation of Akt1 expression by  $\beta$ -catenin/Tcf/Lef signaling in colorectal cancer cells. *Carcinogenesis*, 26(9):1503-1512.

[Essers et al., 2005]

Essers MA, De Vries-Smith LM, Barker N, Polderman PE, Burgering B, Korswagen HC. 2005. Functional interaction between beta-catenin and FOXO in oxidative stress signaling. *Science*, 308(5725):1181-1184.

[Eustace et al. 2004]

Eustace BK, Sakurai T, Stewart JK, Yimlamai D, Unger C, Zehetmeier C, Lain B, Torella C, Henning SW, Beste G, Scroggins BT, Neckers L, IlagLL, Jay DG. 2004. Functional proteomic screens reveal an essential extracellular role for Hs90 alpha in cancer cell invasiveness. *Nature Cell Biology*, 6(6):507-514.

[Franceschi et al., 2009]

Franceschi S, Plummer M, Clifford G, de Sanjose S, Bosch X, Herrero R, Muñoz N, Vaccarella S. 2009. Differences in the risk of cervical cancer and human papillomavirus infection by education level. *British Journal of Cancer*, 101(5):865-870.

[Fang et al., 2007]

Fang D, Hawke D, Zheng Y, Xia Y, Meisenhelder J, Nika H, Mills GB, Kobayashi R, Hunter T, Lu Z. 2007. Phosphorylation of  $\beta$ -catenin by Akt promotes  $\beta$ -catenin transcriptional activity. *Journal of Biological Chemistry*, 282:11221-11229.

[Feder y Hofmann, 1999]

Feder ME, Hofmann GE. 1999. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: Evolutionary and ecological physiology. *Annual Reviews of Physiology*, 61:243-282.

[Fukumoto y Kiang, 2011]

Fukumoto R, Kuang JG. 2011. Geldanamycin analog 17-DMAG limits apoptosis in human peripheral blood cells by inhibition of p53 activation and its interaction with heat-shock protein 90 kDa after exposure to ionizing radiation. *Radiation Research*, 176(3):333-345.

[Gupta, 1995]

Gupta RS. 1995. Phylogenetic analysis of the 90-kDa heat shock family of protein sequences and an examination of the relationship among animals, plants and fungi species. *Molecular Biology and Evolution*, 12:1063-73.

[Gustafsson et al., 1997]

Gustafsson L, Pontén J, Zach M, Adami HO. 1997. International incidence rates of invasive cervical cancer after introduction of cytological screening. *Cancer Causes Control*, 8(5):755-765.



[Hainzl et al., 2009]

Hainzl O, Lapina MC, Buchner J, Ritcher K. 2009. The charged linker region is an important regulator of Hsp90 function. *Journal of Biological Chemistry*, 284(34):22559-22567.

[Hanahan y Weinberg, 2000]

Hanahan D, Weinberg RA. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell*, 100(1):57-70.

[Hanahan y Weinberg, 2011]

Hanahan D, Weinberg RA. 2011. The hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5):646-674.

[Heath et al., 2005]

Heath E, Gaskins M, Pitot HC, Pili R, Tan W, Maschke R, Liu G, Hillman D, Sarkar F, Sheng S, Erlichman C, Ivy P. 2005. A phase II trial of 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin in patients with hormone-refractory metastatic prostate cancer. *Cinical Protate Cancer*, 4(2):138-141.

[Holzbeierlein et al., 2010]

Holzbeierlein JM, Windsperger A, Vielhauer G. 2010 Hsp90: a drug target? *Current Oncology Reports*, 12(2):95-101.

[Hoogeboom et al., 2008]

Hoogeboom D, Essers MAG, Polderman PE, Voets E, Smits LMM, Burgering MT. 2008. Interaction of FOXO with  $\beta$ -catenin inhibits  $\beta$ -catenin/T Cell factor activity. *Journal of Biological Chemistry*, 283:9224-9230.

[Hu et al., 1997]

Hu G, Liu W, Mendelsohn J, Ellis LM, Radinsky R, Andreeff M, Deisseroth AB. 1997. Human papillomavirus E6/E7 proteins in cervical carcinoma cells. *Journal of the National Cancer Institute*, 89(17):1271-1276.

[Huber y Weis, 2011]

Huber AH, Weis WI. 2001. Th estructure of the beta-catenin/E-cadherin complex and the molecular basis of diverse ligand recognition by beta-catenin. *Cell*, 105(3):391-402.

[Jaggi et al., 2005]

Jaggi M, Johansson SL, Baker JJ, Smith LM, Galich A, Balaji KC. 2005. Aberrant expression of E-cadherin and  $\beta$ -catenin in human prostate cancer. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*, 23(6):402-406.

[Jego et al., 2010]

Jego G, Hazoumé A, Seigneuric R, Garrido C. 2010. Targeting heat shock proteins in cancer. *Cancer Letters*, 332 (2): 275-285.

[Jhaveri et al., 2012]

Jhaveri K, Taldone T, Modi S, Chiosis G. 2012. Advances in the clinical development of heat shock protein 90 (Hsp90) inhibitors in cancers. *Biochemical and Biophysical Acta*, 1823(3):742-755.

[Jhonson, 2012]

Jhonson JL. 2012. Evolution and function of diverse Hsp90 homologs and cochaperone proteins. *Biochemica et Biophysica Acta*, 1823:607-613.

[Kannan et al., 2013]

Kannan A, Krishnan A, Mohammed A, Subramaniam S, Halagowder D, Sivasithamparam ND. 2013. Caveolin-1 promotes gastric cancer progression by up-regulating epithelial to mesenchymal transition by crosstalk of signalling mechanisms under hypoxic condition. *European Journal of Cancer*, 50(1):204-215.

[Kimelman y Xu, 2006]

Kimelman D, Xu W. 2006. Beta-catenin destruction complex: in sights and questions from a structural perspective. *Oncogene*. 25:7582-7491.

[Kuo et al., 2007]

Kuo CC, Liang CM, Lai CY, Liang SM. 2007. Involvement of heat shock protein (Hsp) 90 beta but not Hsp90 alpha in antiapoptotic effect of CpG-B oligodeoxynucleotide. *Journal of Immunology*, 178(10):6100-6108.

[Kundrat y Regan, 2010]

Kundrat L, Regan L. 2010. Identification of residues on Hsp70 and Hsp90 ubiquitinated by cochaperone CHIP. *Journal of Molecular Biology*, 395:587-594.

[Kurashina et al., 2009]

Kurashina R, Ohyashiki JH, Kobayashi C, Hamamura R, Zhang Y, Hirano T, Ohyashiki K. 2009. Anti-proliferative activity of heat shock protein (Hsp) 90 inhibitors via beta-catenin/TCF7L2 pathway in adult T cell leukemia cells. *Cancer Letters*, 284(1):62-70.

[Lee et al., 2010]

Lee CH, Hung HH, Hung PH, Shieh YS. 2010. Epidermal growth factor receptor regulates  $\beta$ -catenin location, stability, and transcriptional activity in oral cancer. *Molecular Cancer*, 9:64.

[Li et al., 2011]

Li J, Ritcher K, Buchner J. 2011. Mixed Hsp90-cochaperone complexes are important for the progression of the reaction cycle. *Nature Structural & Molecular Biology*, 18(1):61-66.

[Lindquist, 1986]

Lindquist S. 1986. The Heat-Shock Response. *Annual Reviews Biochemistry*, 55:1151-1191.

[Liu et al., 1999]

Liu XL, Xiao B, Yu ZC, Guo JC, Zhao QC, Xu L, Shi YQ, Fan DM. 1999. Down-regulation of Hsp90 could change cell cycle distributio and increase drug sensitivity of tumor cells. *World Journal of Gastroenterology*, 5(3): 199-208.

[Luheshi et al., 2008]

Luheshi LM, Crowther DC, Dobson CM. 2008. Protein misfolding and disease: from the test tube to the organism. *Current Opinion in Chemical Biology*, 12(1):25-31.

[MacDonald et al., 2009]

MacDonald BT, Tamai K, He X. 2009. Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and disases. *Developmental Cell*, 17(1):9-26.

[Mahalingam et al., 2009]

Mahalingam, D, Swords R, Carew JS, Nawrocki ST, Bahalla K, Giles FJ. 2009. Targeting Hsp90 for cancer therapy. *British Journal of Cancer*, 100:1523-1529.

[Makhnevych y Houry, 2012]

Makhnevych T, Houry WA. 2012. The role of Hsp90 in protein complex assembly. *Biochemica et Biophysica Acta*, 1823(3):674-682.

[Meyer et al., 2003]

Meyer P, Prodromou C, Hu B, Vaughan C, Roe SM, Panaretou B, Piper PW, Pearl LH. 2003. Structural and functional analysis of the middle segment of Hsp90. Implications for ATP hydrolysis and client protein and cochaperone interactions. *Molecular Cell*, 11(3):647-658.

[Millson et al., 2007]

Millson SH, Truman AW, Rácz A, Hu B, Panaretou B, Nuttal J, Mollapour M, Söti C, Piper PW. 2007. Expressed as the sole Hsp90 of yeast, the alpha and beta isoforms of human Hsp90 differ with regard to their capacities for activation of certain client proteins, whereas only Hsp90beta generates sensitivity to the Hsp90 inhibitor radicicol. *FEBS Journal*, 274(17):4453-4463.

[Minami et al., 1991]

Minami Y, Kawasaki H, Miyata Y, Suzuki K, Yahara I. 1991. Analysis of native forms and isoforms compositions of the mouse 90-kDa Heat Shock Protein, Hsp90. *Journal of Biological Chemistry*, 266(16):10099-10103.

[Miyata et al., 2013]

Miyata Y, Nakamoto H, Neckers L. 2013. The therapeutic target Hsp90 and cancer hallmarks. *Current Pharmaceutical Design*, 19(3):347-365.

[Modi et al., 2007]

Modi S, Stopeck AT, Gordon MS, Mendelson D, Solit DB, Bagatell R, Ma W, Wheler J, Rosen N, Norton L, Cropp GF, Johnson RG, Hannah AL, Hudis AC. 2007. Combination of Trastuzumab and Tanespimycin (17-AAG, KOS-953) is safe and active in Trastuzumab-Refractory HER-2 overexpressing breast cancer: A phase I Dose-Escalation study. *Journal of Clinical Oncology*, 25(34):5410-5417.

[Mollapour y Neckers, 2011]

Mollapour M, Neckers L. 2011. Post-translational modifications of Hsp90 and their contributions to chaperone regulation. *Biochemica et Biophysica Acta*, 1823:648-655.

[Morimoto, 1993]

Morimoto RI. 1993. Cell in Stress: Transcriptional activation of Heat Shock Genes. *Science*, 259(5100):1409-1410.

[Muller et al., 2013]

Muller P, Ruckova E, Halada P, Coates PJ, Hrstka R, Lane DP, Vojtesk B. 2013. C-terminal phosphorylation of Hsp70 and Hsp90 regulates alternate binding to co-chaperones CHIP and HOP to determine cellular protein folding/degradation balances. *Oncogene*, 32:3101-3110.

[Nanbu et al., 1996]

Nanbu K, Konishi I, Komatsu T, Mandai M, Yamamoto S, Kuroda H, Koshiyama M, Mori T. 1996. Expression of Hsp70 and Hsp90 in endometrial carcinomas: Correlation with clinicopathology, sex steroid receptor status, and p53 protein expression. *Cancer*, 77(2):330-338.

[NCI, 2013]

NCI. 2013. What is cancer? Defining cancer. <http://www.cancer.gov/cancertopics/cancerlibrary/what-is-cancer>

[Nemoto y Sato, 1998]

Nemoto T, Sato N. 1998. Oligomeric forms of the 90-kDa heat shock protein. *Biochemical Journal*, 330:989-995.

[Nusse et al., 2012]

Nusse R, Clevers H, Shen K, Niehrs C, Basler K, Polakis P. 2012. Three decades of Wnt signaling. *The EMBO Journal*, Focus Issue 2012.

[Orsulic et al., 1999]

Orsulic S, Huber O, Aberle H, Arnold S, Kemler R. 1999. E-cadherin binding prevents beta-catenin nuclear localization and b-catenin LEF1-mediated transactivation. *Journal of Cell Science*, 112:1237-1245.

[Park et al., 1998]

Park M, Kang CY, Krishna P. 1998. *Brassica napus* Hsp90 can autophosphorylate and phosphorylate other protein substrates. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 185:33-38.

[Park et al., 2010]

Park CS, Joo IS, Song SY, Kim DS, Bae DS, Lee JH. 2010. An immunohistochemical analysis of heat shock protein 70, p53, and estrogen receptor status in carcinoma of the uterine cervix. *Gynecologic Oncology*, 74:53.

[Parkin y Bray, 2006]

Parkin DM, Bray F. 2006. Chapter 2: The burden of HPV-related cancers. *Vaccine*, 24(3):11-25.

[Peng et al., 2001]

Peng Y, Chen L, Li C, Lu W, Chen J. 2001. Inhibition of MDM2 by Hsp90 contributes to mutant p53 stabilization *Journal of Biological Chemistry*, 276(44):40583-40590.

[Perez-Placencia et al., 2008]

Perez-Placencia C, Duenas-González A, Alatorre-Tavera B. 2008. Second hit in cervical carcinogenesis process: involvement of wnt/beta catenin pathway. *International Archives of Medicine*, 1:1-10.

[Perdew et al., 1993]

Perdew GH, Hord N, Hollenback CE, Welsh MJ. 1993. Localization and characterization of the 86- and 84-kDa Heat Shock Proteins in Hepa 1c1c7 Cells. *Experimental Cell Research*, 209:350-356.

[Piccard, 2013]

Piccard D. Diciembre 2013. Hsp90 facts & literatura: Cytosolic heat-shock protein. <http://www.picard.ch/downloads/Hsp90facts.pdf>

[Pick et al., 2007]

Pick E, Kluger Y, Giltneane JM, Moeder C, Camp RL, Rimm DL, Kluger HM. 2007. High Hsp90 expression is associated with decreased survival in breast cancer. *Journal of Cancer Research*, 67(7):2932-2937.

[Prodromou, 2012]

Prodromou C. 2012. The 'active life' of Hsp90 complexes. *Biochemica et Biophysica Acta*, 1823(3):614-623.

[Purcell et al., 2011]

Purcell R, Childs M, Maibach R, Miles C, Turner C, Zimmermann A, Sullivan M. 2011. HGF/c-Met related activation of  $\beta$ -catenin in hepatoblastoma. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 30:96.

[Ralhan y Kaur, 1995]

Ralhan R, Kaur J. 1995. Differential expression of Mr 70,000 heat shock protein in normal, premalignant, and malignant human uterine cervix. *Clinical Cancer Research*, 1:1217-1222.

[Retzlaff et al., 2009]

Retzlaff M, Stahl M, Eberl HC, Lagleder S, Beck J, Kessler H, Buchner J. 2009. Hsp90 is regulated by a switch point in the C-terminal domain. *EMBO Reports*, 10(10):1147-1153.

[Ritcher et al., 2007]

Ritcher K, Hendershot LM, Freeman BC. 2007. The cellular world according to Hsp90. *Nature Structural & Molecular Biology*, 14:90-94.

[Saifo et al., 2010]

Saifo MS, Rempinski DR, Rustum YM, Azrak RG. 2010. Targeting the oncogenic protein beta-catenin to enhance chemotherapy outcome against solid human cancers. *Molecular Cancer*, 9:310.

[Sain et al., 1996]

Sain N, Krishnan B, Ormerod MG, De Rienzo A, Liu WM, Kaye SB, Workman O, Jackman AL. 2006. Potentiation of paclitaxel activity by the Hsp90 inhibitor 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin in human ovarian carcinoma cell lines with high levels of activated Akt. *Molecular Cancer Therapy*, 5(5):1197-1208.

[Senju et al., 2006]

Senju M, Sueoka N, Sato A, Iwanaga K, Sakao Y, Tomimitsu S, Tominaga M, Irie K, Hayashi S, Sueoka E. 2006. Hsp90 inhibitors cause G2/M arrest associated with the reduction of Cdc25C and Cdc2 in lung cancer cells. *Journal of Cancer Research*, 132:150-158.

[Shiau et al., 2006]

Shiau AK, Harris SF, Southworth DR, Agard DA. 2006. Structural analysis of *E. coli* Hsp90 reveals dramatic nucleotide-dependent conformational rearrangements. *Cell*, 127(2):329-340.

[Solit et al., 2008]

Solit DB, Osman I, Polsky D, Panageas KS, Daud A, Goydos JS, Teircher J, Wolchok JD, Germino J, Krown SE, Coit D, Rosen N, Chapman PB. 2008. Phase II trial of 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin in patients with metastatic melanoma. *Clinical Cancer Research*, 14(24):8302–8307.

[Soti et al., 2005]

Soti C, Nagy E, Giricz Z, Vigh L, Csermery P, Ferdinandy P. 2005. Heat shock proteins as emerging therapeutic targets. *British Journal of Pharmacology*, 146: 769-780.

[Sreedhar et al., 2004]

Sreedhar AS, Kalmar E, Csermely P, Shen YF. 2004. Hsp90 isoforms: functions, expression and clinical importance. *FEBS Letters*, 562(1-3): 11-15.

[Stellas et al., 2010]

Stellas D, El Hamidich A, Patsavoudi E. 2010. Monoclonal antibody 4C5 prevents activation of MMP2 and MMP9 by disrupting their interaction with extracellular Hsp90 and inhibits formation of metastatic breast cancer cell deposits. *BMC Cell Biology*, 11:51.

[Street et al., 2011]

Street TO, Lavery LA, Agard DA. 2011. Substrate binding drives large-scale conformational changes in the Hsp90 molecular chaperone. *Molecular Cell*, 42(1):96-105.

[Swindell et al., 2007]

Swindell WR, Huebner M, Weber AP. 2007. Transcriptional profiling of *Arabidopsis* heat shock proteins and transcription factors reveals extensive overlap between heat and non-heat stress response pathways. *Biomed Central Genomics*, 8:125.

[Szalmás et al., 2013]

Szalmás A, Gyöngyösi E, Ferenczi A, László B, Karosi T, Csomor P, Gergely L, Veress G, Kónya J. 2013. Activation of Src, Fyn and Yes non-receptor tyrosine kinases in keratinocytes expressing human papillomavirus (HPV) type 16 E7 oncoprotein. *Virology Journal*, 10:79



[Taherian et al., 2008]

Taherian AA, Krone P, Ovsenek N. 2008. Different interactions of Hsp90 $\alpha$  and Hsp90 $\beta$  with different substrates. *Biochemical Cell Biology*, 86:37-45.

[Thomas M, et al., 1999]

Thomas M, Pim D, Banks L., 1999. The role of the E6-p53 interaction in the molecular pathogenesis of HPV. *Oncogene*, Dec 13;18(53):7690-700.

[Tian et al., 2013]

Tian X, Zhang J, Tan TK, Lyons JG, Niu B, Lee SR, Tsatralis T, Zhao Y, Wang Y, Cao Q, Wang Y, Lee VW, Kahn M, Zheng G, Harris DC. 2013. Association of  $\beta$ -catenin with P-Smad3 but not LEF-1 dissociates in vitro profibrotic from anti-inflammatory effects of TGF- $\beta$ 1. *Journal of Cell Science*, 126(1):67-76.

[Tiroli-Cepeda y Ramos, 2011]

Tiroli-Cepeda AO y Ramos CH. 2011. An overview of the role of molecular chaperones in protein homeostasis. *Protein Peptide Letters*, 18(2):101-109.

[Valenta et al., 2011]

Valenta T, Gay M, Steiner S, Draganova K, Zemke M, Hoffmans R, Cinelli P, Aguet M, Sommer L, Basler K. 2011. Probing transcription-specific outputs of  $\beta$ -catenin in vivo. *Genes & Development*, 25(4):2631-2643.

[Valenta et al., 2012]

Valenta T, Hausmann G, Basler K. 2012. The many faces and functions of  $\beta$ -catenin. *EMBO Journal*, 31(12):2714-2736.

[Vanmuyulder et al., 2012]

Vanmuyulder N, Werry-Huet A, Rooze M, Louryan S. 2002. Heat shock protein HSP86 expression during mouse embryo development, especially in the germ line. *Anatomy and Embryology*, 205(4):301-306.

[Vaughan et al., 2009]

Vaughan CK, Piper PW, Pearl LH, Prodromou C. 2009. A common conformationally coupled ATPase mechanism for yeast and human cytoplasmic Hsp90s. *FEBS Journal*, 276:199-209.

[Walboomers et al., 1999]

Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, FX B, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJ, Peto J, Meijer CJ, Muñoz N. 1999. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *Journal of Parthology*, 189(1):12-19.

[Wandlinger et al., 2008]

Wandlinger K, Ritcher K, Buchner J. 2008. The Hsp90 chaperone machinery. *Journal of Biological Chemistry*, 283: 18473-18477.

[Yang et al., 2011]

Yang W, Xia Y, Ji H, Zheng Y, Liang J, Huang W, Gao X, Aldape K, Lu Z. 2011. Nuclear PKM2 regulates  $\beta$ -catenin transactivation upon EGFR activation. *Nature*, 480:118-122.

[Yano et al., 1999]

Yano M, Naito Z, Tanaka S, Asano G. 1996. Expression and roles of Heat shock proteins in human breast cancer. *Journal of Cancer Research*, 87:908-915.

[Young et al., 1998]

Young JC, Obermann WMJ, Hartl FU. 1998. Specific binding of tetratricopeptide repeat proteins to the C-terminal 12 kDa domain of Hsp90. *Journal of Biological Chemistry*, 273:18007-18010.

[Zhang et al., 2013]

Zhang J, Li J, Liu B, Zhang L, Chen J, Lu M. 2013. Genome-wide analysis of the populus Hsp90 gene family reveals differential expression patterns, localization and heat stress responses. *Biomedical Central Genomics*, 14:532.

[Zeng et al., 2005]

Zheng X, Tamai K, Doble B, Li S, Huang H, Habas R, Okamura H, Woodgett J, He X. 2005. A dual-kinase mechanism for Wnt coreceptor phosphorylation and activation. *Nature*, 438(7069):873-877.

[Zubriené et al., 2010]

Zubriené A, Malgorzata G, Matuliené J, Chaleckis R, Michailoviené V, Voroncova A, Venclovas C, Zylicz A, Zylicz M, Matulis D. 2010. Thermodynamics of radicicol binding to human Hsp90 alpha and beta isoforms. *Biophysical Chemistry*, 152: 153-163.