



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**Papel de las proteínas de choque térmico, Hsp90 α y Hsp90 β
durante el efecto anti-proliferativo y pro-apoptótico del inhibidor
17-DMAG en líneas celulares de cáncer de próstata**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A

Javier Octavio Mejía Hernández



CIUDAD UNIVERSITARIA CDMX., MARZO 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.



JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE:	Dr. Homero Hernández y Montes
VOCAL:	Dr. José Pedraza Chaverri
SECRETARIO:	Dr. Carlo César Cortés González
1er. SUPLENTE:	Dr. Marco Antonio Carbon Cervantes
2º. SUPLENTE:	Dr. Gerardo David Anaya Eugenio

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Carcinogénesis de la Unidad de Investigación Biomédica en Cáncer (UIBC) del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, con sede en el Instituto Nacional de Cancerología (INCan). La presente tesis estuvo bajo la tutoría del Dr. Carlo César Cortés González. México, CDMX. Periodo enero 2016 - diciembre 2016.

Dr. Carlo César Cortés González
ASESOR DEL TEMA

Javier Octavio Mejía Hernández
SUSTENTANTE



"With every advance in our scientific knowledge new elements come up, often forcing us to recast our entire picture of physical reality. No doubt, theorists would much prefer to perfect and amend their theories rather than be obliged to scrap them continually. But this obligation is the condition and price of all scientific progress."

Louis-Victor de Broglie

"You cannot discover new oceans unless you have the courage to lose sight of the shore."

Andre Gide

"Science is the search for the truth. It is not a game in which one tries to beat his opponent, to do harm to others. We need to have the spirit of science in international affairs."

Linus Pauling



ÍNDICE

Abreviaturas.	7
Índice de figuras.	18
Índice de tablas.	20
Resumen.	21
INTRODUCCIÓN	23
i. Proteínas de choque térmico (Hsp's).	25
ii. Función y estructura de las proteínas de choque térmico.	27
▪ Hsp27.	27
▪ Hsp70.	28
▪ Hsp90.	29
iii. Proteínas “cliente” de Hsp90.	34
iv. Papel de Hsp90 en cáncer.	37
v. Terapia contra el cáncer basada en la inhibición farmacológica de Hsp90.	39
vi. Terapéutica actual contra el cáncer de próstata. Papel de Hsp90.	43
vii. Expresión de las principales isoformas citoplásmicas de Hsp90 en cáncer.	46
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	48
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	50
Hipótesis.	51
Objetivos.	52



MATERIAL Y MÉTODOS	53
i. Reactivos.	54
ii. Estrategia experimental.	55
iii. Cultivo celular.	55
iv. Determinación de la viabilidad celular a través del compuesto bromuro de metiltiazolildifenil-tetrazolio (MTT).	56
v. Inmunodetección por Western blot.	56
vi. Migración celular mediante ensayo de cierre de herida.	57
vii. Determinación del ciclo celular por citometría de flujo (tinción con yoduro de propidio).	58
viii. Determinación de la integridad del ADN a través de la tinción nuclear con el compuesto 4',6-diamidino-2-fenilindol, dihidrocloruro (DAPI).	59
ix. Análisis estadístico.	59
RESULTADOS	60
i. Efecto del inhibidor de Hsp90, 17-DMAG, sobre la viabilidad celular en líneas celulares de cáncer de próstata.	61
ii. Efecto del inhibidor 17-DMAG sobre los niveles relativos de las proteínas Hsp90 α , Hsp90 β , cochaperonas y proteínas “cliente” de Hsp90 en líneas celulares de cáncer de próstata.	65
iii. Efecto del inhibidor de Hsp90, 17-DMAG, sobre la migración celular en líneas celulares de cáncer de próstata.	74
iv. Efecto del inhibidor 17-DMAG sobre el ciclo celular en líneas celulares de cáncer de próstata.	76
v. Efecto del inhibidor de Hsp90, 17-DMAG, sobre la integridad del ADN en líneas celulares de cáncer de	78



próstata.

DISCUSIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS	80
i. Efecto del inhibidor de Hsp90, 17-DMAG, sobre la viabilidad celular en líneas celulares de cáncer de próstata.	81
ii. Efecto del inhibidor 17-DMAG sobre los niveles relativos de las proteínas Hsp90 α , Hsp90 β , cochaperonas y proteínas “cliente” de Hsp90 en líneas celulares de cáncer de próstata.	83
iii. Efecto del inhibidor de Hsp90, 17-DMAG, sobre la migración celular en líneas celulares de cáncer de próstata.	89
iv. Efecto del inhibidor 17-DMAG sobre el ciclo celular en líneas celulares de cáncer de próstata.	90
v. Efecto del inhibidor de Hsp90, 17-DMAG, sobre la integridad del ADN en líneas celulares de cáncer de próstata.	92
CONCLUSIONES	95
PERSPECTIVAS	97
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	99



ABREVIATURAS

4E-BP1	Factor 4e eucariótico de iniciación de la traducción de unión a proteína 1 (por sus siglas en inglés: <i>eukaryotic translation initiation factor 4e binding protein 1</i>).
17-AAG	17-alil-demetoxi-geldanamicina.
17-DMAG	17-(2-dimetil-aminoetil)-amino-17-dimetoxi-geldanamicina.
aa	Aminoácidos.
ADN	Ácido desoxirribonucleico.
ADP	Adenosín difosfato (por sus siglas en inglés: <i>adenosine diphosphate</i>).
Aha1	Proteína activadora de la actividad de ATPasa de Hsp90 1 (por sus siglas en inglés: <i>activator of Hsp90 ATPase 1</i>).
AKT	Proteína cinasa B/Akt, enzimas que constituyen una familia de proteínas serina/treonina cinasas.
Apaf-1	Factor 1 activador de la peptidasa apoptótica (por sus siglas en inglés: <i>apoptotic peptidase activating factor 1</i>).
APS	Antígeno prostático específico.
AR	Receptor de andrógeno (por sus siglas en inglés: <i>androgen receptor</i>).



ARE	Elementos de respuesta a andrógeno (por sus siglas en inglés: <i>androgen response elements</i>).
ATP	Adenosín trifosfato.
Bad	Proteína promotora de muerte asociada a Bcl-2 (por sus siglas en inglés: <i>Bcl-2-associated death promoter</i>).
BAX	Proteína X asociada a Bcl-2 (por sus siglas en inglés: <i>Bcl-2 associated X protein</i>).
Bcl-2	Proteína célula-B CLL/linfoma 2 (por sus siglas en inglés: <i>B-cell CLL/lymphoma 2</i>).
Bcl-XL	Proteína linfoma de células B extra grande (por sus siglas en inglés: <i>B-cell lymphoma-extra large</i>).
Bcr-Abl	Oncoproteína expresada por el gen Bcr-Abl que resulta de una translocación entre los cromosomas 9 y 22. En particular parte del gen <i>BCR</i> (por sus siglas en inglés: <i>Breakpoint Cluster Region</i>) del cromosoma 22 (región q11) se fusiona con parte del gen <i>ABL</i> (por sus siglas en inglés: <i>Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1</i>) del cromosoma 9 (región q34).
C-terminal	Dominio carboxilo terminal.
CaP	Cáncer de próstata.
Cdc2 (CDK1)	Homólogo de la proteína 2 de control de la división celular (por



sus siglas en inglés: *cell division control protein 2 homolog*).

Cdc25c	Proteína ciclo de división celular 25C (por sus siglas en inglés: <i>cell division cycle 25C</i>).
Cdc37	Proteína homóloga ciclo de división celular 37 (por sus siglas en inglés: <i>cell-division cycle 37 homologue</i>).
CDK4	Proteína cinasa 4 dependiente de ciclina (por sus siglas en inglés: <i>cyclin dependent kinase 4</i>).
CPRC	Cáncer de próstata resistente a la castración.
DAPI	4',6-Diamidino-2-Fenilindol, Dihidrocloreuro.
DHT	Dihidrotestosterona.
DMSO	Dimetil sulfóxido (por sus siglas en inglés: <i>dimethyl sulfoxide</i>).
D.O.	Densidad óptica.
DU145	Línea celular de cáncer de próstata, de <i>Homo sapiens</i> , derivada de sitio metastásico (cerebro), carcinoma.
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico (por sus siglas en inglés: <i>epidermal growth factor receptor</i>).
eNOS	Óxido nítrico sintasa endotelial (por sus siglas en inglés: <i>endothelial nitric oxide synthase</i>).
ERK	Cinasa regulada por señales extracelulares (por sus siglas en



inglés: *extracellular signal-regulated kinase*).

FACS	Selección de células activadas por fluorescencia (por sus siglas en inglés: <i>fluorescence activated cell sorting</i>)
FAK	Cinasa de adhesión focal (por sus siglas en inglés: <i>focal adhesion kinase</i>).
FDG	Fluorodesoxiglucosa.
Fes/Fps	Oncoproteína de sarcoma felino (por sus siglas en inglés: <i>feline sarcoma oncoprotein</i>).
FIH-1	Factor inhibidor de HIF-1 (por sus siglas en inglés: <i>factor inhibiting HIF-1</i>).
FKBP	Proteína de unión a FK506 (por sus siglas en inglés: <i>FK506-binding protein</i>).
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (por sus siglas en inglés: <i>glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>).
GM	Geldanamicina.
Grp94	Proteína regulada por glucosa de 94 KDa (por sus siglas en inglés: <i>glucose-regulated protein</i>).
HER-2	Receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (por sus siglas en inglés: <i>human epidermal growth factor receptor 2</i>).



HIF-1 α	Factor inducible por hipoxia 1 alfa (por sus siglas en inglés: <i>hipoxia inducible factor 1 alpha</i>).
HOP	Proteína organizadora de Hsp70-Hsp90 (por sus siglas en inglés: <i>Hsp70-Hsp90 organizing protein</i>) .
HSE	Elementos transcripcionales de respuesta a estrés térmico (por sus siglas en inglés: <i>heat shock element</i>).
HSF1	Factor de transcripción de choque térmico (por sus siglas en inglés: <i>heat shock transcription factor 1</i>).
HSP	Gen que codifica para las proteínas de choque térmico (por sus siglas en inglés: <i>heat shock protein</i>).
Hsp	Proteína de choque térmico (por sus siglas en inglés: <i>heat shock protein</i>).
Hsp27	Proteína de choque térmico de 27 kDa.
Hsp40	Proteína de choque térmico de 40 kDa.
Hsp60	Proteína de choque térmico de 60 kDa.
Hsp70	Proteínas de choque térmico de 72 kDa.
Hsp90	Proteínas de choque térmico de 90 kDa.
Hsp90 α	Proteínas de choque térmico de 90 kDa, isoforma alfa.
Hsp90 β	Proteínas de choque térmico de 90 kDa, isoforma beta.



<i>HSP90AA1</i>	Gen que codifica para la isoforma alfa de Hsp90 (Hsp90 α).
<i>HSP90AB1</i>	Gen que codifica para la isoforma beta de Hsp90 (Hsp90 β).
Hsp90N	Proteínas de choque térmico de 90 kDa asociada a membrana.
Hsp90T	Proteínas de choque térmico de 90 kDa total.
Hsp100	Proteínas de choque térmico de 100 kDa total.
I κ B α	Inhibidor NF κ B alfa (por sus siglas en inglés: <i>NFκB Inhibitor alpha</i>).
iHsp90	Inhibidores de Hsp90.
ILK1	Cinasa unida a integrina 1 (por sus siglas en inglés: <i>integrin-linked kinase 1</i>).
IRS	Substrato de receptor de insulina (por sus siglas en inglés: <i>insulin receptor substrate</i>).
kDa	Kilodaltones.
LRR	Repetición rica en leucina (por sus siglas en inglés: <i>leucine-rich repeat</i>).
Mdm2	Proteína ratón doble minuto 2 (por sus siglas en inglés: <i>mouse double minute 2</i>). También conocida como oncoproteína ubiquitina ligasa E3.



MDR	Proteína de resistencia a múltiples fármacos (por sus siglas en inglés: <i>multidrug resistance protein</i>).
MEEVD	Pentapéptido localizado en el dominio C-terminal, responsable de la interacción de Hsp90 con co-chaperonas que poseen el dominio TPR.
MEK	Cinasa MAPK/ERK (por sus siglas en inglés: <i>MAPK/ERK kinase</i>).
MMP2	Metaloproteinasa de matriz 2 (por sus siglas en inglés: <i>matrix metalloproteinase 2</i>).
MPT	Poros de transición de permeabilidad mitocondrial (por sus siglas en inglés: <i>mitochondrial permeability transition pore</i>).
mTOR	Proteína blanco de Rapamicina en Mamíferos (por sus siglas en inglés: <i>mammalian target of rapamycin</i>).
MTT	Metiltiazolildifenil-tetrazolio.
MutL	Proteína mutadora L (por sus siglas en inglés: <i>mutator L</i>).
NF- κ B	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (por sus siglas en inglés: <i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>).
NQO1	NAD(P)H quinona deshidrogenasa 1 (por sus siglas en inglés: <i>NAD(P)H quinone dehydrogenase 1</i>).



N-terminal	Dominio amino terminal.
p23 (PTGES3)	Prostaglandina E sintasa 3 (por sus siglas en inglés: <i>Prostaglandin E synthase 3</i>).
p53	Proteína de 53 kDa (por sus siglas en inglés: <i>protein 53 kDa</i>).
PARP	Poli ADP ribosa polimerasa (por sus siglas en inglés: <i>poly ADP ribose polymerase</i>).
PAS	Los dominios Per-ARNT-Sim (PAS) se encuentran ampliamente distribuidos y sirven de sensores e intergradores de señales en las proteínas de transductoras.
PBS	Buffer salino de fosfatos (por sus siglas en inglés: <i>phosphate buffered saline</i>).
PC-3	Línea celular de cáncer de próstata, de <i>Homo sapiens</i> , derivada de sitio metastásico (hueso), grado IV adenocarcinoma.
PDK1	Cinasa dependiente de fosfoinositol 1 (por sus siglas en inglés: <i>phosphoinositide dependent kinase 1</i>).
P-gp	P-glicoproteína.
pH	Potencial de hidrógeno.
PI3K	Fosfatidilinositol 3 cinasa (por sus siglas en inglés: <i>phosphoinositide 3-kinase</i>).



PIP ₂	Fosfatidil-inositol (4,5)-bifosfato (por sus siglas en inglés: <i>phosphatidyl-inositol (4,5)-biphosphate</i>).
PIP ₃	Fosfatidil-inositol (3,4,5)-trifosfato (por sus siglas en inglés: <i>phosphatidyl-inositol (3,4,5)-triphosphate</i>).
p-mTOR	Proteína mTOR fosforilada (por sus siglas en inglés: <i>phosphorylated mTOR</i>).
PrEC	Línea celular epitelial de próstata normal de <i>Homo sapiens</i> .
PTEN	Supresor de tumor fosfatidil-inositol-3,4,5-trifosfato-3-fosfatasa. Fosfatasa y homólogo de tensina (por sus siglas en inglés: <i>phosphatase and tensin homolog</i>).
Pts	Pacientes.
PVDF	Difluoro polivinilideno (por sus siglas en inglés: <i>polyvinylidene difluoride</i>).
pVHL	Proteína von Hippel Lindau supresora de tumor (por sus siglas en inglés: <i>von Hippel Lindau tumour suppressor protein</i>).
RAF	Proteína fibrosarcoma acelerado rápidamente (por sus siglas en inglés: <i>rapidly accelerated fibrosarcoma</i>).
RAS	Proteína de sarcoma de rata (por sus siglas en inglés: <i>rat sarcoma</i>).
RB	Proteína retinoblastoma (por sus siglas en inglés: <i>retinoblastoma</i>).



R.E.	Retículo endoplásmico.
RhoA	Proteína homóloga de Ras miembro de la familia A (por sus siglas en inglés: <i>Ras homolog family member A</i>).
RP	Respuesta parcial.
RTKs	Receptores de tirosina cinasa (por sus siglas en inglés: <i>receptors tyrosine kinases</i>).
S6K	Cinasa S6 (por sus siglas en inglés: <i>S6 kinase</i>).
SBD	Dominio de unión a sustrato (por sus siglas en inglés: <i>substrate-binding domain</i>).
SFB	Suero fetal bovino.
SGT1	Supresor del alelo G2 de <i>skp1</i> (por sus siglas en inglés: <i>suppressor of G2 allele of skp1</i>).
STAT3	Transductor de señales y activador de la transcripción 3 (por sus siglas en inglés: <i>signal transducer and activator of transcription 3</i>).
TBS-T	Buffer salino de tris con tween (por sus siglas en inglés: <i>tris-buffered saline with tween</i>).
TERT	Telomerasa transcriptasa inversa (por sus siglas en inglés: <i>telomerase reverse transcriptase</i>).



TEP	Tomografía de emisión de positrones.
TOM70	Translocasa de la membrana mitocondrial externa 70 (por sus siglas en inglés: <i>translocase of outer mitochondrial membrane 70</i>).
TPR	Repetidos de tetratricopeptido, secuencia de 34aa repetidos en tándem (por sus siglas en inglés: <i>tetratricopeptide repeat</i>).
TRAP1	Proteína asociada al receptor del factor de necrosis tumoral 1 (por sus siglas en inglés: <i>tumor necrosis factor receptor-associated protein 1</i>).
UNC45	Unc-45 miosina chaperona A (por sus siglas en inglés: <i>Unc-45 myosin chaperone A</i>).
WB	Western blot.



Figuras

Figura	No. Página
1. Participación de Hsp90 en la regulación de la proteostasis.	30
2. Estructura y conformación de Hsp90.	31
3. Ciclo chaperónico de Hsp90.	33
4. Hsp90 regula diversos procesos celulares a través de su interacción con diferentes proteínas cliente.	36
5. Hsp90 y los <i>Hallmarks</i> del cáncer.	38
6. Dependencia de las células malignas a Hsp90.	39
7. Primeros inhibidores derivados de la geldanamicina.	41
8. Principales vías de señalización desreguladas en cáncer de próstata.	43
9. Estrategia experimental.	55



10. Efecto del inhibidor de Hsp90, 17-DMAG, sobre la viabilidad celular en líneas celulares de próstata.	63
11. Diferencias estadísticamente significativas en la viabilidad celular de las líneas celulares de próstata a una concentración de 500 η M.	64
12. Efecto de la inhibición de Hsp90 sobre el perfil de expresión de Hsp90T, Hsp90 α y Hsp90 β .	66
13 Efecto de la inhibición de Hsp90 sobre el perfil de expresión de las co-chaperonas Hsp70 y Hsp27.	68
14. Efecto de la inhibición de Hsp90 sobre el perfil de expresión de HIF-1 α y los niveles relativos de p-mTOR (pS ²⁴⁴⁸).	70
15. Efecto de la inhibición de Hsp90 sobre el perfil de expresión de la proteína anti-apoptótica Bcl-2 y la proteína pro-apoptótica BAX.	72
16. Efecto de la inhibición de Hsp90 sobre el perfil de expresión de Caspasa 3 y PARP.	74
17. Efecto del inhibidor de Hsp90, 17-DMAG, sobre la migración de las líneas celulares de CaP.	75
18. Efecto del inhibidor 17-DMAG sobre el ciclo celular de las líneas celulares de CaP.	77
19. Efecto del inhibidor de Hsp90, 17-DMAG, sobre la integridad del ADN de las líneas celulares de CaP.	79



Tablas

Tabla	No. Página
1. Clasificación y propiedades de las proteínas de choque térmico.	26
2. Ensayos clínicos de inhibidores de Hsp90.	42
3. Resumen de los mecanismos de resistencia a los inhibidores de Hsp90.	45
4. Características genotípicas y fenotípicas de las líneas celulares de próstata empleadas.	56



RESUMEN

Introducción: El cáncer de próstata (CaP) es una enfermedad con evolución heterogénea, ocupando en México el primer lugar en incidencia y mortalidad en la población masculina, y situándose en el quinto lugar como causa de muerte por cáncer a nivel mundial.

En la terapéutica actual contra el CaP existen estudios fase clínica I y II empleando inhibidores de la proteína de choque térmico de 90 kDa (iHsp90), los cuales han exhibido resultados prometedores, solos y/o en combinación con otras terapias. No obstante, algunas células malignas han mostrado resistencia al efecto anti-proliferativo y pro-apoptótico de los iHsp90 a través de mecanismos poco caracterizados. Recientemente se ha sugerido que algunos iHsp90 pueden ser selectivos de isoforma y, por lo tanto, afectar de diferente manera la expresión y actividad de cada una de las isoformas de Hsp90 y como consecuencia la de sus proteínas cliente.

En el CaP la expresión de las diferentes isoformas de Hsp90 no se ha determinado, ni su implicación funcional. Por esta razón en el presente trabajo se evaluó el efecto de la inhibición de Hsp90 sobre los perfiles de expresión de las principales isoformas citoplasmicas de Hsp90 (Hsp90 α y Hsp90 β) en líneas celulares de CaP.

Objetivo: Determinar si la expresión de las isoformas, Hsp90 α y Hsp90 β , participan en la resistencia intrínseca o adquirida al inhibidor de Hsp90, 17-DMAG, en líneas celulares de CaP.

Metodología: Las líneas celulares de CaP fueron tratadas con el iHsp90, 17-DMAG. Se evaluó el efecto de la inhibición de Hsp90 utilizando ensayos de proliferación y migración. La expresión de las isoformas, Hsp90 α y Hsp90 β , y la de algunas proteínas “cliente” fue determinada por Western blot. Además, se estudiaron los cambios en el ciclo celular de las líneas celulares por citometría de flujo. Finalmente, se evaluó el efecto del 17-DMAG sobre la integridad del ADN de las células empleando la tinción nuclear con DAPI.



Resultados: El inhibidor de Hsp90, 17-DMAG, provocó cambios en los perfiles de expresión de Hsp90 α y Hsp90 β en las líneas celulares de CaP. Dichos cambios fueron asociados con diferencias en la migración celular, en la integridad del ADN, con cambios en el ciclo celular de las líneas celulares de CaP, y con cambios en los perfiles de expresión de proteínas “cliente” de Hsp90.

Conclusiones: En conjunto, nuestro estudio identificó que el 17-DMAG posee una alta actividad contra la línea celular PC-3 y una baja citotoxicidad contra la línea celular DU145. La línea celular PC-3, que mostró ser sensible al inhibidor 17-DMAG, fue incapaz de reestablecer sus niveles de Hsp90 α . Por otro lado la resistencia adquirida por la línea celular DU145 al 17-DMAG, fue asociada al restablecimiento de los niveles de Hsp90 α y al arresto en la fase G₁ del ciclo celular.



INTRODUCCIÓN



El desarrollo normal de las células y el mantenimiento de la homeostasis celular requieren una estricta regulación de los procesos de proliferación, diferenciación y muerte celular ^(1,2). Dichos procesos son regulados por diversas vías de transducción de señales, encargadas de transmitir la información del medio extracelular a moléculas efectoras intracelulares ⁽²⁾. La desregulación de cualquiera de estos procesos puede tener consecuencias graves, dando como resultado enfermedades tales como la autoinmunidad, las infecciones virales, los trastornos alérgicos, los trastornos neurodegenerativos y el cáncer ^(1,2).

La perturbación de la homeostasis conduce a un estado de estrés celular. El estrés es capaz de generar daño a nivel molecular y celular ⁽³⁾. La respuesta de las células a los estímulos estresores depende de la intensidad y duración de éstos, sin embargo, de manera general el estrés induce una respuesta adaptativa que normalmente compensa la noxa ⁽³⁾.

La respuesta celular al estrés es un mecanismo altamente conservado en casi todos los organismos y se basa en la interrupción de toda síntesis proteica y la rápida inducción de chaperonas moleculares, comúnmente denominadas como proteínas de choque térmico (Hsp's) ^(2,3). Estas proteínas, principalmente aquellas pertenecientes a la familia de Hsp70, la familia Hsp90 y Hsp27, son esenciales en el plegamiento de proteínas, la translocación de proteínas a través de compartimentos celulares, en el montaje y el mantenimiento de complejos multiprotéicos en su estado activo, evitando la agregación proteica y favoreciendo la degradación proteasomal de las proteínas mal plegadas y de vida media corta ^(1,2,3). De esta manera, las Hsp's son capaces de restablecer la proteostasis celular, a través de sus funciones citoprotectoras ^(1,2,3).

Las Hsp's inducidas por estrés, le confieren a las células un estado de citoprotección ^(1,2,4). Esta respuesta adaptativa, también conocida como termotolerancia inducida, permite que las células respondan rápidamente a desafíos continuos, repetidos y letales que de otra manera conducirían a las células a apoptosis, necrosis y/o cualquier otro tipo de muerte celular ⁽⁴⁾. La respuesta celular al estrés dependerá entonces de los niveles preexistentes de las proteínas de choque térmico ^(1,4).



Muchos tipos de tumores poseen de manera constitutiva niveles elevados de diferentes Hsp's que protegen a las células malignas de condiciones o agentes citotóxicos ^(1,2,3). La expresión anormal y el incremento en la actividad de las Hsp's han sido implicados en la quimio-resistencia y en la carcinogénesis en diferentes tipos de cáncer ^(5,6,7).

i. Proteínas de choque térmico (Hsp's)

Las proteínas tienen diversas funciones intracelulares que incluyen la señalización, el transporte, la catálisis, la protección de las células y la regulación de muchos procesos intercelulares ⁽⁸⁾. Después de la síntesis ribosomal, las proteínas deben plegarse y adoptar una estructura tridimensional adecuada para ser funcionales ⁽⁹⁾.

Las células se encuentran expuestas a condiciones continuas de estrés tales como el calor, el estrés oxidativo, la inflamación, metales pesados u otros compuestos tóxicos, que pueden causar la desnaturalización de las proteínas y la agregación inespecífica de éstas, dando como resultado una pérdida de la proteostasis ⁽¹⁰⁾. Las proteínas son las biomoléculas más sensibles a las condiciones de estrés celular ⁽¹¹⁾. El equilibrio entre la síntesis, el plegamiento y la degradación de las proteínas controla la correcta función del proteoma y hay dos formas por las cuales la célula es capaz de mantener éste equilibrio: (i) a través de la maquinaria de degradación proteica, y (ii) a través de las Hsp's, que impiden la agregación y garantizan el adecuado plegamiento de las proteínas ^(12,13).

Las Hsp's ganaron su nombre tras los experimentos de Ritossa en 1962, en los que expusieron glándulas salivales de *Drosophila* a calor, a dinitrofenol o salicilato ⁽¹⁴⁾. Ritossa observó un nuevo patrón de "puffing" cromosómico después de haber expuesto las glándulas a los estresores ⁽¹⁴⁾. Años más tarde, Tissieres demostró que después de exponer las glándulas salivales de *Drosophila* a un choque térmico, se inducía la síntesis de un número pequeño de polipéptidos y se inhibía la síntesis de muchos otros ⁽¹⁵⁾.



Las Hsp's comprenden una gran superfamilia de proteínas altamente conservadas en todos los organismos ^(1,2,10). Éstas proteínas también se conocen como "chaperonas moleculares", debido a su capacidad para estabilizar polipéptidos y proteínas denominadas como proteínas "cliente" ^(1,2). Las Hsp's existen en altas concentraciones en la célula y juegan un papel crucial en el mantenimiento de la proteostasis durante estrés ^(10,11). Las Hsp's no sólo son inducidas por estrés, sino que algunas Hsp's se expresan constitutivamente, desempeñando funciones celulares en condiciones normales ⁽²⁾.

Las proteínas de choque térmico pertenecen a una familia multigénica con pesos moleculares que varían entre los 10 y los 150 kDa ⁽²¹⁾ (ver Tabla 1).

Tabla 1. Clasificación y propiedades de las proteínas de choque térmico ⁽²¹⁾

Subfamilia Hsp	Isoformas	Localización Intracelular	Función Intracelular
Hsp100	Hsp104-110 ORP150	Citosol, núcleo, retículo endoplásmico	Termotolerancia, tolerancia isquemia
Hsp90	Hsp90 α Hsp90 β TRAP-1 Grp94 Hsp90N	Citosol, mitocondria, retículo endoplásmico, núcleo	Interacción con receptores de hormonas esteroideas
Hsp70	Hsp72 Hsc73 mtHsp70	Citosol, núcleo, mitocondria, retículo endoplásmico	Termotolerancia, plegamiento de proteínas, transporte de proteínas a mitocondria
Hsp60	Hsp60	Citosol, mitocondria	Plegamiento de proteínas
Hsp40	Hsp40 Hsp47	Citosol, núcleo, retículo endoplásmico	Co-chaperona de Hsp72, plegamiento de proteínas
Hsp's pequeñas	Ubiquitina Hsp10 Hsp20-30	Citosol, núcleo, mitocondria	Degradación de proteínas, tolerancia al estrés oxidativo, cofactor de Hsp60



Hay cuatro familias ATP-dependientes clasificadas de acuerdo a su peso molecular como Hsp100, Hsp90, Hsp70 y Hsp60 ^(10,16). Existen además, 2 familias de chaperonas moleculares independientes de ATP: Hsp40 y Hsp's pequeñas ⁽¹⁶⁾.

Los miembros de la familia Hsp60 funcionan como chaperoninas que evitan la agregación y asisten el plegado correcto de las proteínas (principalmente proteínas mitocondriales) ⁽¹⁷⁾. Hsp70 y Hsp90 se unen a polipéptidos no-plegados en el citoplasma e inducen su correcto plegamiento ⁽¹⁸⁾. Hsp27 asiste el plegamiento de sus proteínas "cliente" de manera ATP-independiente ⁽¹⁹⁾. El trabajo coordinado de todas las chaperonas es importante para el plegamiento eficiente de todas sus proteínas "cliente" y para mantener el equilibrio de la homeostasis celular ⁽²⁰⁾. En la Tabla 1 se resume la clasificación y las principales propiedades de las proteínas de choque térmico ⁽²¹⁾.

ii. Función y estructura de las proteínas de choque térmico

Aunque no todas las funciones de las Hsp's se han esclarecido, la mayoría de las Hsp's actúan como chaperones moleculares asistiendo el plegamiento adecuado de las proteínas y reparando el daño de éstas ⁽²²⁾.

Las proteínas de choque térmico se clasifican en dos grupos: las Hsp's ATP-dependientes y las Hsp's ATP-independientes ^(11,23). Las Hsp's de alto peso molecular son chaperonas dependientes de ATP, mientras que las co-chaperonas, que pertenecen a ésta misma clasificación, se encargan de estabilizar el estado de unión a ATP o ADP de las chaperonas ⁽¹⁰⁾. A diferencia de las Hsp's de alto peso molecular, las Hsp's pequeñas son ATP-independientes ⁽¹⁰⁾. El miembro mejor estudiado de esta familia es Hsp27 ⁽²³⁾.

- Hsp27

Hsp27 es una proteína ubicua que se induce en respuesta a diversas condiciones de estrés. Su función principal es evitar la acumulación de proteínas y



evitar la agregación inespecífica de éstas ⁽²³⁾.

La Hsp27 difiere de otras Hsp's porque Hsp27 (i) es independiente de ATP, (ii) tienen una masa molecular pequeña (27 kDa), (iii) puede formar oligómeros grandes, y (iv) porque posee un dominio α -cristalino (dominio conservado en todas en las Hsp's pequeñas) ^(24,25). Hsp27 tiene la capacidad de formar oligómeros grandes de hasta 800 kDa ⁽²⁶⁾. La oligomerización de Hsp27 es un proceso dinámico que depende de la fisiología de las células, el estado de fosforilación de la proteína y la exposición al estrés ⁽²⁶⁾. La fosforilación de Hsp27 conduce a la desagregación de los multimeros de Hsp27 afectando la localización celular de ésta chaperona y sus proteínas "cliente" ⁽²³⁾.

Asimismo la Hsp27 fosforilada puede favorecer la degradación de proteínas citosólicas y nucleares ⁽²³⁾. Lanneau D., *et al*, demostraron que la actividad catalítica de la subunidad 26S del proteasoma se ve incrementa por la expresión de Hsp27, induciendo así la degradación de las proteínas ubiquitinadas bajo condiciones de estrés. Además Hsp27 podría actuar como un factor E4, capaz de cooperar con la ubiquitina ligasa E3 ^(23,27). Por otro lado, Hsp27 podría afectar de manera indirecta la apoptosis a través de la degradación de la proteína I κ B α y como consecuencia estimular a la proteína reguladora de muerte NF- κ B ⁽²³⁾.

- Hsp70

La proteína de choque térmico de 70 kDa tiene un papel activo en el ensamblaje de proteínas recién sintetizadas, la translocación de proteínas secretoras y membranales, el repliegue de proteínas mal plegadas y/o agregadas y el control de algunas funciones de proteínas reguladoras ^(28,29,30). Hsp70 es crucial para la proteostasis tanto en condiciones normales, como en condiciones de estrés ⁽³¹⁾.

La isoforma constitutiva de Hsp70 (Hsc70) mantiene funciones celulares fisiológicas, mientras que la isoforma inducible por estrés (Hsp72) previene principalmente el daño a las proteínas y la agregación de éstas en condiciones de estrés ⁽¹⁸⁾. Hsp70 tiene un dominio de ATPasa N-terminal y un dominio de unión a sustrato C-terminal (SBD), que puede ser un dominio β -sandwich o un subdominio



α -helicoidal ⁽¹⁸⁾. El dominio ATPasa es responsable de su actividad de chaperona ⁽¹⁰⁾.

Es importante mencionar que Hsp40 mantiene la especificidad de Hsp70 por el sustrato. Hsp40 reconoce las cadenas alifáticas y aromáticas de las proteínas y las marca como sustrato para Hsp70 ^(18,32).

- Hsp90

La familia de Hsp90 es expresada y altamente conservada en muchos organismos (procariotas y eucariotas) ⁽³³⁾. Las Hsp90 son ubicuas y se han encontrado en el retículo endoplásmico, en el citoplasma, núcleo, mitocondria y en el cloroplasto desempeñando funciones necesarias para la viabilidad de las células eucariotas ^(10,34). Hsp90 se expresa en condiciones normales, sin embargo bajo condiciones de estrés, su expresión se incrementa hasta 10 veces ⁽³⁵⁾.

Hsp90 desempeña funciones esenciales para mantener la homeostasis celular, tales como el plegado *de novo* de proteínas durante el proceso de síntesis ribosomal, la translocación de proteínas a través de membranas y el control de la calidad de las proteínas en el retículo endoplasmático ^(36,37). En contraste con otras Hsp's, Hsp90 es responsable de mantener a sus proteínas "cliente" en un estado plegado funcional ⁽³⁶⁾. Además, Hsp90 participa en funciones celulares de orden superior como la regulación post-traducciona de algunas moléculas de señalización, el montaje/desmontaje de complejos transcripcionales y el procesamiento de antígenos ^(38,39,40,41). Las funciones más importantes de la Hsp90 se resumen esquemáticamente en la Figura 1 ⁽³⁶⁾.

Hsp90 posee tres dominios, que son: el dominio C-terminal, con sitios de unión para co-chaperones y con un motivo de dimerización; El dominio N-terminal, con sitios de unión a ATP y co-chaperonas; Y el dominio medio, que proporciona sitios de unión para proteínas "cliente" y otras co-chaperonas (Figura 2) ^(42,43,44,45).

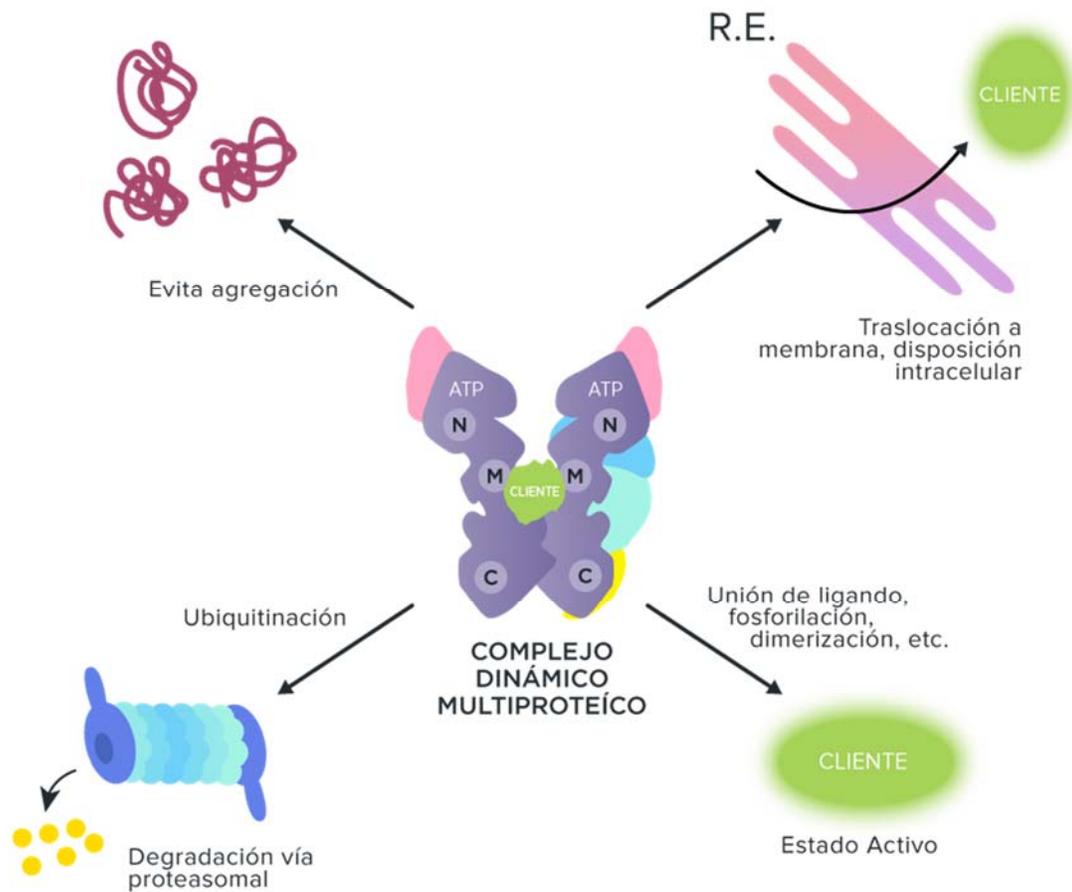


Figura 1. Participación de Hsp90 en la regulación de la proteostasis. Las proteínas “cliente” recién sintetizadas y conformacionalmente lábiles, se asocian a complejos multiproteícos constituidos por Hsp90, algunas co-chaperonas y proteínas accesorias (formas de diferentes colores). Los componentes particulares de cada complejo multiproteíco varían según la proteína cliente. La asociación dinámica de las proteínas “cliente” con los complejos chaperónicos previene la agregación de éstas y ayudan en su tráfico intracelular, especialmente en la translocación a través de estructuras membranales. La asociación entre las proteínas “cliente” involucradas en las vías de señalización y la maquinaria chaperónica de Hsp90 es de particular importancia, ya que Hsp90 mantiene a éstas proteínas en un estado meta-estable, permitiéndoles ser activadas por estímulos específicos tales como unión a ligando, fosforilación o su ensamblaje en otros complejos de señalización. En ausencia de los estímulos apropiados, los complejos chaperónicos pueden favorecer la degradación de sus proteínas “cliente” a través de la vía ubiquitina-proteasoma. Figura modificada de Whitesell *et al.* (2005) ⁽³⁶⁾.

El dominio N-terminal (~ 25 kDa) está compuesto por dos capas de estructuras α/β en sandwich que da lugar a la formación de un pocket ^(46,47). Este pocket sirve como sitio de unión para nucleótidos de adenina ⁽⁴⁸⁾.

Mutaciones en diferentes cepas de levadura confirmaron que la función de Hsp90

es completamente dependiente de hidrólisis de ATP ^(49,50). El patrón de plegado del dominio N-terminal y la actividad ATPasa de Hsp90, se asemejan con la proteína MutL (Mutator L) y con las topoisomerasas de tipo II ^(48,51).

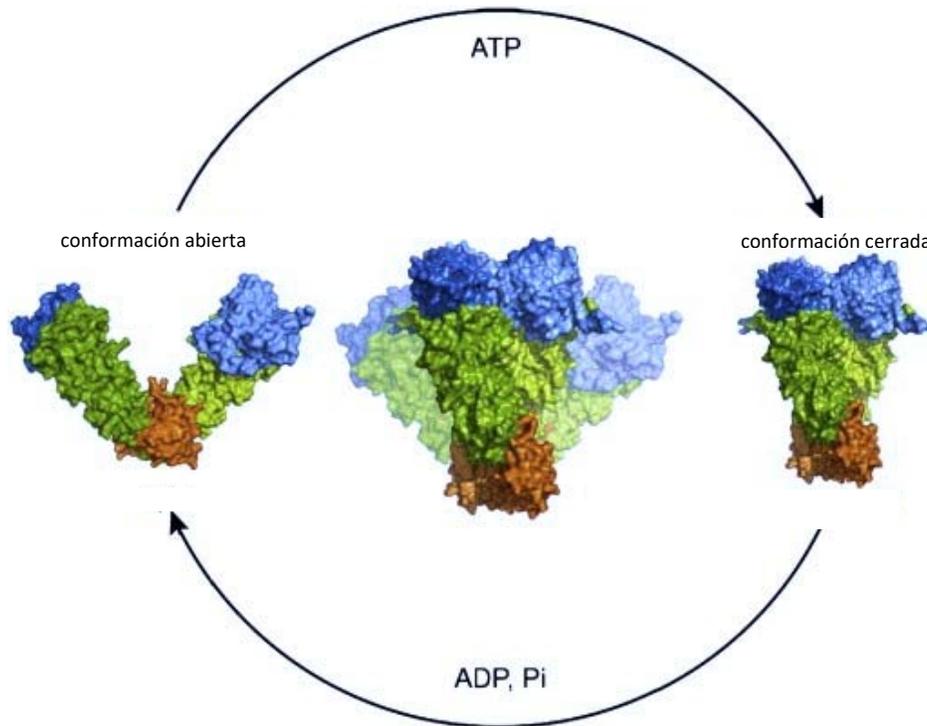


Figura 2. Estructura y conformación de Hsp90. Hsp90 forma homodímeros flexibles. Cada dímero posee un dominio N-terminal con un sitio de unión a ATP (dominio N-terminal representado en color azul), seguido de un dominio medio (dominio M representado en color verde) con sitios de unión para las proteínas “cliente” y co-chaperonas y un dominio C-terminal de dimerización (dominio C-terminal representado en color naranja) con su motivo MEEVD de anclaje a proteínas con dominio TPR. Todas las formas de Hsp90, existen naturalmente como homodímeros, sólo así Hsp90 es capaz de hidrolizar ATP. En la figura se muestra a Hsp90 en la conformación abierta (izquierda) y Hsp90 unida a nucleótidos en la conformación cerrada (derecha). La conformación de Hsp90 depende de las cochaperonas unidas a los diferentes dominios y de la unión de ATP. Figura modificada de Didenko *et al.* (2012) ⁽⁷³⁾.

El dominio medio de Hsp90 (~35 kDa) es el sitio de unión para las proteínas “cliente” y está implicado en el reconocimiento específico de éstas y de algunas co-chaperonas reguladoras que coordinan la activación apropiada del sustrato ^(52,53).



El dominio C-terminal (~10 kDa) es responsable de la dimerización de Hsp90. La dimerización es necesaria para una actividad de ATPasa eficiente ^(54,55,56). Los últimos cinco aminoácidos del dominio C-terminal de Hsp90 forman el motivo MEEVD, que sirve como sitio de unión para una gran variedad de co-chaperonas que posean un dominio TPR de unión a péptidos ^(57,58).

Todas las isoformas de Hsp90, existen naturalmente como homodímeros, sólo así Hsp90 es capaz de hidrolizar ATP con el fin de regular eficazmente la maduración de sus proteínas “cliente” a través de un ciclo dinámico dependiente de ATP ⁽⁵⁹⁾. Éste ciclo chaperónico es controlado y orquestado por una amplia gama de co-chaperonas ^(60,61). Hsp90 interactúa con sus proteínas “cliente” de una manera cíclica e iterativa que fue descrita en detalle por primera vez por Smith *et al* ⁽⁶²⁾. Hsp90 no modifica covalentemente los sustratos sobre los que actúa para prevenir/resolver la agregación o alterar su conformación ⁽³⁶⁾.

Una versión simplificada del ciclo que describe los requisitos mínimos para la maduración de una proteína “cliente” de Hsp90, se muestra en la Figura 3 ⁽⁵⁹⁾.

Las cinco isoformas de Hsp90 (Tabla 1) que han sido identificadas, difieren en su localización celular ^(59,63,65,65). Las dos principales isoformas citoplasmáticas de Hsp90 son: Hsp90 α (denominada como isoforma inducible) y Hsp90 β (denominada como la isoforma constitutiva), ambas poseen aproximadamente un 86% homología ⁽⁶⁶⁾. Estas dos isoformas comprenden el 80% de la subfamilia de proteínas de choque térmico de 90 kDa y son las encargadas de modular la mayoría de los procesos intracelulares dependientes de las chaperonas de 90 kDa ^(21,67,68).

El gen *HSP90AA1* para Hsp90 α consta de 10 exones que codifican para un transcrito de 5.3 Kb lo que da lugar a una proteína de 733aa con un peso molecular de 86 kDa. A pesar de que el gen *HSP90AB1* de Hsp90 β consta de 11 exones y el transcrito de 6.8 Kb, la proteína resultante es más pequeña, con 726 aa y con un peso molecular de 84 kDa ^(21,34).

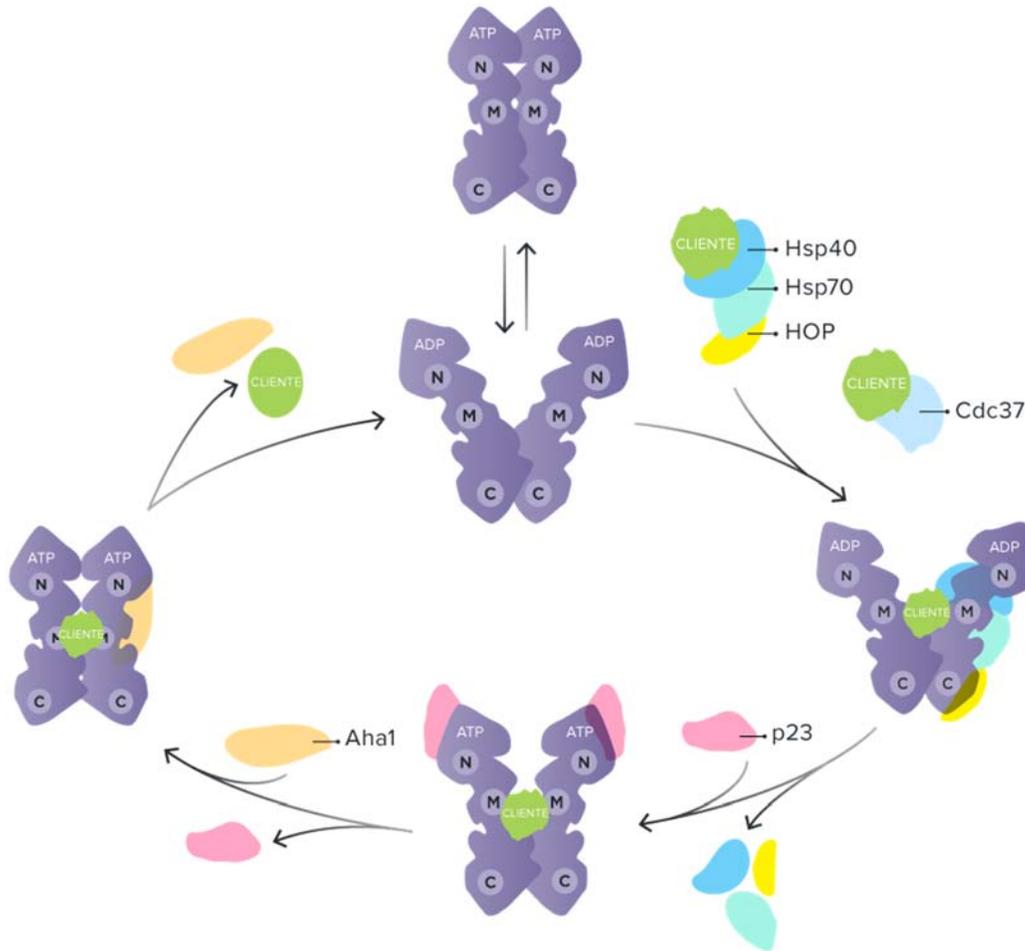


Figura 3. Ciclo chaperónico de Hsp90. A medida que se sintetizan nuevas proteínas cliente, se unen rápidamente a Hsp40, ésta unión es independientemente de ATP y de otras proteínas. La Hsp40 entonces se asocia con Hsp70, esta unión estimula la actividad de ATPasa de Hsp70, facilitando que Hsp70 se una a la proteína cliente, formando así el complejo chaperónico Hsp70-Hsp40. Determinadas proteínas clientes, tales como los factores de transcripción, se unen a la conformación abierta de Hsp90 a través del dominio TPR de la co-chaperona HOP asociada al complejo chaperónico Hsp70-Hsp40. HOP se une al motivo MEEVD, permitiendo la unión reversible entre Hsp70 y Hsp90, esto facilita la transferencia de las proteínas clientes a Hsp90. Los homodímeros de Hsp90 adoptan una conformación cerrada como consecuencia de los cambios conformacionales generados por la unión de la proteína “cliente” al dominio medio de las Hsp90. p23 se une entonces y estimula la disociación del complejo HOP-Hsp70-Hsp40. p23 se une preferente a la conformación cerrada de Hsp90 que se encuentre unida a ATP. Las cinasas son transferidas a Hsp90 mediante un proceso alternativo que implica la participación de la proteína Cdc37. Cdc37 permite la interacción entre el lid del pocket de ATP en el dominio N-terminal de Hsp90 y las asas altamente conservadas y ricas en glicina de los lóbulos N-terminales de las proteínas cinasas. Las diferentes interacciones entre las co-chaperones y Hsp90 inducen cambios conformacionales en las proteínas “cliente” que permiten su maduración y activación. El ciclo termina cuando Hsp90 se une a la proteína Aha 1. Aha1 estimula la hidrólisis del ATP por Hsp90, dando lugar a la liberación de proteína “cliente” madura y activa. Figura modificada de Butler *et al.* (2015) ⁽⁵⁹⁾.



Aunque estas isoformas muestran papeles superpuestos, su expresión varía entre tejidos ^(69,70). Además se ha observado que la región promotora juega un papel importante en las diferencias de expresión de cada una de las isoformas, sugiriendo que cada isoforma es regulada de diferente manera ⁽²¹⁾.

Hay evidencia que sugiere que bajo condiciones de estrés, Hsp90 α y Hsp90 β desempeñan diferentes funciones intracelulares ^(59,63). En particular, el gen de Hsp90 α (*HSP90AA1*) posee 5 elementos de respuesta a estrés térmico (HSE) en la región promotora, lo que le permite ser inducida rápidamente como respuesta al estrés, desempeñando un papel de citoprotección celular, mientras que el gen de Hsp90 β (*HSP90AB1*) solo posee dos HSE y se ha vinculado a una respuesta al estrés más lenta que implica adaptación celular ^(21,63,71,72).

iii. Proteínas “cliente” de Hsp90

Con el fin de comprender la diversidad de las funciones de Hsp90, es crucial identificar las proteínas “cliente” de la chaperona que juegan papeles esenciales en los procesos biológicos ⁽⁷⁴⁾. Las proteínas clientes de Hsp90 son generalmente proteínas intrínsecamente inestables ⁽⁷⁵⁾.

Una proteína es “cliente” de Hsp90 si (i) interactúa físicamente con Hsp90 y si (ii) la inhibición de la función de Hsp90 resulta en una menor actividad de la proteína ⁽⁷⁶⁾.

Muy poco se sabe sobre como Hsp90 reconoce a sus proteínas cliente. Las proteínas “cliente” de Hsp90 son muy diversas en estructura y función, lo que sugiere que Hsp90 es capaz de interactuar con ellas a través de un proceso general de reconocimiento, probablemente modulado por sus co-chaperonas ⁽⁷⁴⁾.

Los primeros experimentos identificaron dos clases principales de proteínas “cliente” de Hsp90: proteínas cinasas y receptores nucleares de esteroides ⁽⁷⁶⁾. Hsp90 se descubrió durante la purificación por afinidad de la proteína tirosina cinasa v-Src ^(76,77). Una proteína de 90 kDa (en ese entonces denominada pp90) co-precipitó con la proteína v-Src de células de pollo transformadas con el virus



del sarcoma de Rous ⁽⁷⁷⁾. También se co-purificaron otras tirosina cinasas del tipo Src codificadas viralmente tales como Fes/Fps y Yes ⁽⁷⁸⁾. Al mismo tiempo, se detectó Hsp90 en varios complejos proteicos de receptores hormonales nucleares ^(79,80,81).

Aunque las proteínas “cliente” de Hsp90 mejor estudiadas son receptores de hormonas esteroideas y cinasas, se han descubierto muchas otras proteínas “cliente” como la eNOS, la telomerasa transcripasa reversa (TERT), factores de transcripción y proteínas remodeladoras de la cromatina (tales como los factores de transcripción de la familia PAS, p53, STAT3 y trithorax) ^(76,82,83,84,85,86,87). El gran número de proteínas “cliente” de Hsp90 convierte a esta chaperona en un regulador maestro de diversas actividades celulares esenciales. (Figura 4).

Se sabe que muchas de las proteínas “cliente” de Hsp90 contribuyen a la adquisición de un fenotipo maligno. Las razones de este hecho subyacen sobre que muchas de las proteínas “cliente” de Hsp90 son cruciales en el control del crecimiento, la supervivencia y el desarrollo celular ^(36,88). La sobreexpresión de Hsp90 hallada en los diferentes tipos de cáncer, refleja una respuesta citoprotectora al estrés generado por un microambiente hostil (hipóxico, ácido y desprovisto de nutrientes) característico de los tumores ⁽⁷⁶⁾. En general, la evidencia indica que el aumento en la expresión de Hsp90 contribuye a la oncogénesis en varios niveles ⁽⁷⁶⁾.

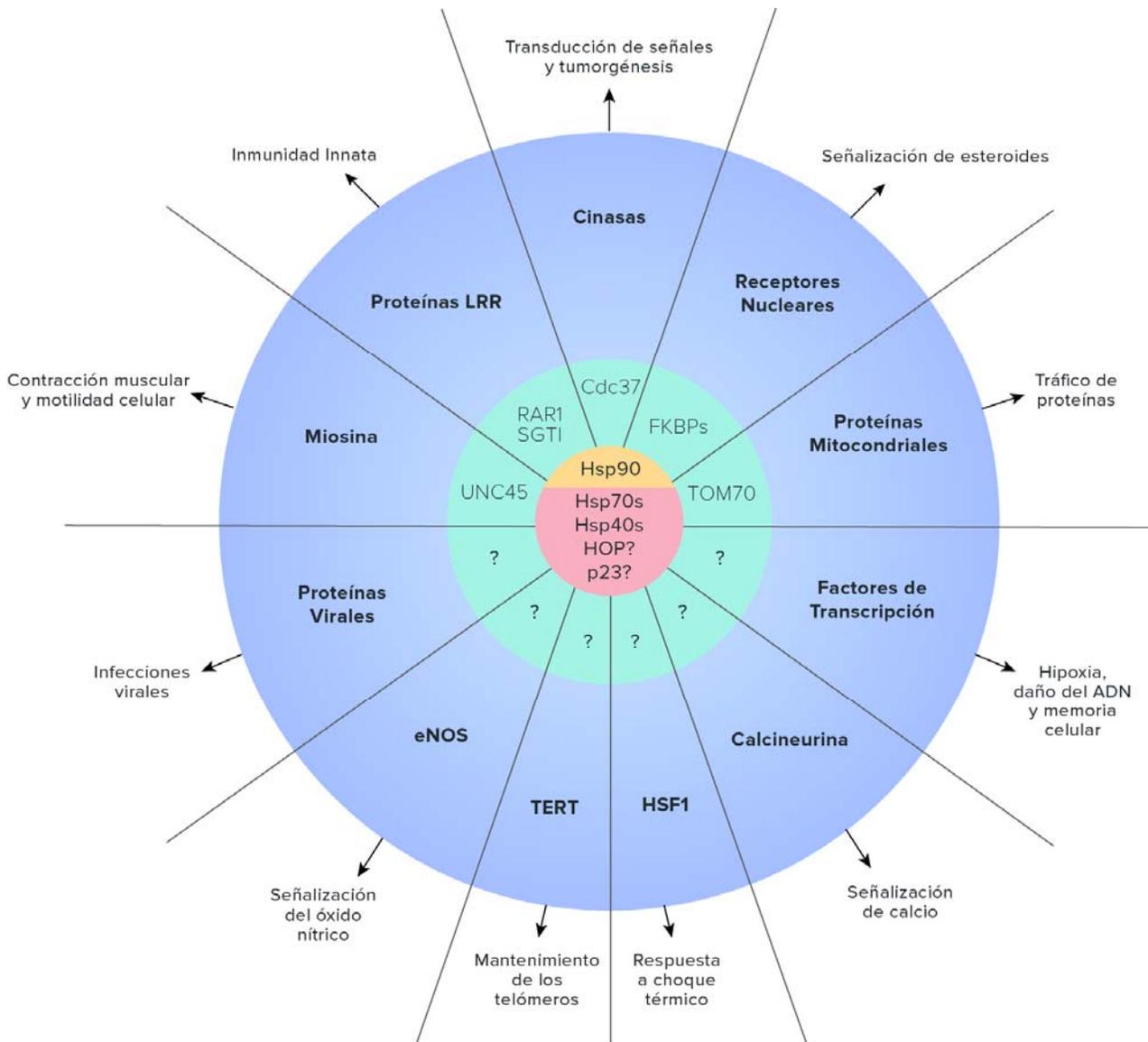


Figura 4. Hsp90 regula diversos procesos celulares a través de su interacción con diferentes proteínas “cliente”. Las proteínas “cliente” de Hsp90 son principalmente transductores de señales tales como cinasas y factores de transcripción, sin embargo Hsp90 es capaz de estabilizar una gama más amplia de proteínas con funciones intracelulares extremadamente diversas. Hsp90 regula diferentes funciones celulares ejerciendo efectos marcados en la biología celular normal, patologías y procesos evolutivos. Hsp90 se asocia con diferentes co-chaperonas centrales (p23, HOP, Hsp70; en rosa). Las cochaperonas adaptadoras (Cdc37, RAR1, SGT1, UNC45, FKBP, TOM70; en verde) se asocian a un número limitado de proteínas o dominios (proteínas en azul). Para la mayoría de las proteínas “cliente” de Hsp90, se desconoce con qué co-chaperonas se asocian (proteínas indicadas por signos de interrogación). Los ejemplos anteriores proporcionan sólo un vistazo de la clientela extraordinariamente diversa de Hsp90. Cdc37; proteína homóloga ciclo de división celular 37; eNOS, sintasa de óxido nítrico endotelial; FKBP, proteína de unión a FK506; HSF1, Factor de transcripción de choque térmico; LRR, repetición rica en leucina; TERT, telomerasa transcripasa reversa; TOM70, translocasa de membrana externa de 70 kDa. Figura modificada de Taipale *et al.* (2010) ⁽⁷⁶⁾.



iv. Papel de Hsp90 en cáncer

La característica principal de las células malignas es su capacidad para proliferar sin control ^(89,90). Las células normales poseen una maquinaria molecular capaz de regular con precisión la proliferación, el crecimiento, la diferenciación y la muerte celular ⁽⁸⁹⁾. Las células malignas, por el contrario, tienen defectos en muchas vías reguladoras de señalización que gobiernan la proliferación celular normal y la homeostasis ⁽⁸⁹⁾.

La interrupción o desregulación de una sola vía maestra de señalización en las células es insuficiente para que una célula adquiriera un fenotipo maligno por el contrario múltiples alteraciones en la fisiología celular conducen a la adquisición de diferentes capacidades biológicas que favorecen la transformación celular (*hallmarks* del cáncer) ^(89,90).

Los *hallmarks* del cáncer comprenden diez capacidades biológicas adquiridas durante el desarrollo de tumores: mantenimiento de señalizaciones de proliferación, evasión de los supresores del crecimiento, resistencia a la muerte celular, inmortalidad replicativa, inducción de angiogénesis, invasión, metástasis, desregulación del metabolismo celular, evasión del sistema inmune, inestabilidad genómica e inflamación ⁽⁹⁰⁾. Debido a que los *hallmarks* del cáncer son compartidos por la mayoría de los tumores, Hanahan y Weinberg propusieron que estas capacidades biológicas apoyan colectivamente el crecimiento maligno ⁽⁹⁰⁾.

Hsp90 está involucrada ampliamente en diversos procesos de señalización aberrante, desempeñando un papel importante en el establecimiento de los *hallmarks* del cáncer ^(35,36,89,90). Esto se debe a que las proteínas “cliente” de Hsp90 juegan un papel clave en las principales vías de señalización que conducen a la tumorigénesis ^(1,3,21,34,35,36,48).

La exacerbada proliferación y la inestabilidad genómica en las células malignas dan lugar a una gran cantidad de proteínas mutadas ^(34,35,36,89,90). Estas mutaciones son generalmente ventajosas para el crecimiento del tumor. Hsp90 se une a las proteínas mutadas estabilizándolas y evitando su degradación

permitiendo que las proteínas mutadas funcionen normalmente ^(89,90).

Un número sorprendentemente grande de proteínas “cliente” de Hsp90 juegan un papel crucial en el establecimiento de los *hallmarks* del cáncer (Figura 5) ⁽⁸⁹⁾. Algunas de las oncoproteínas que son proteínas “cliente” de Hsp90 son: HER-2, Akt, Raf-1, CDK4, HIF-1 α , Bcr-Abl, p53, entre otras ^(1,3,21,34,35,36,48,89,90).

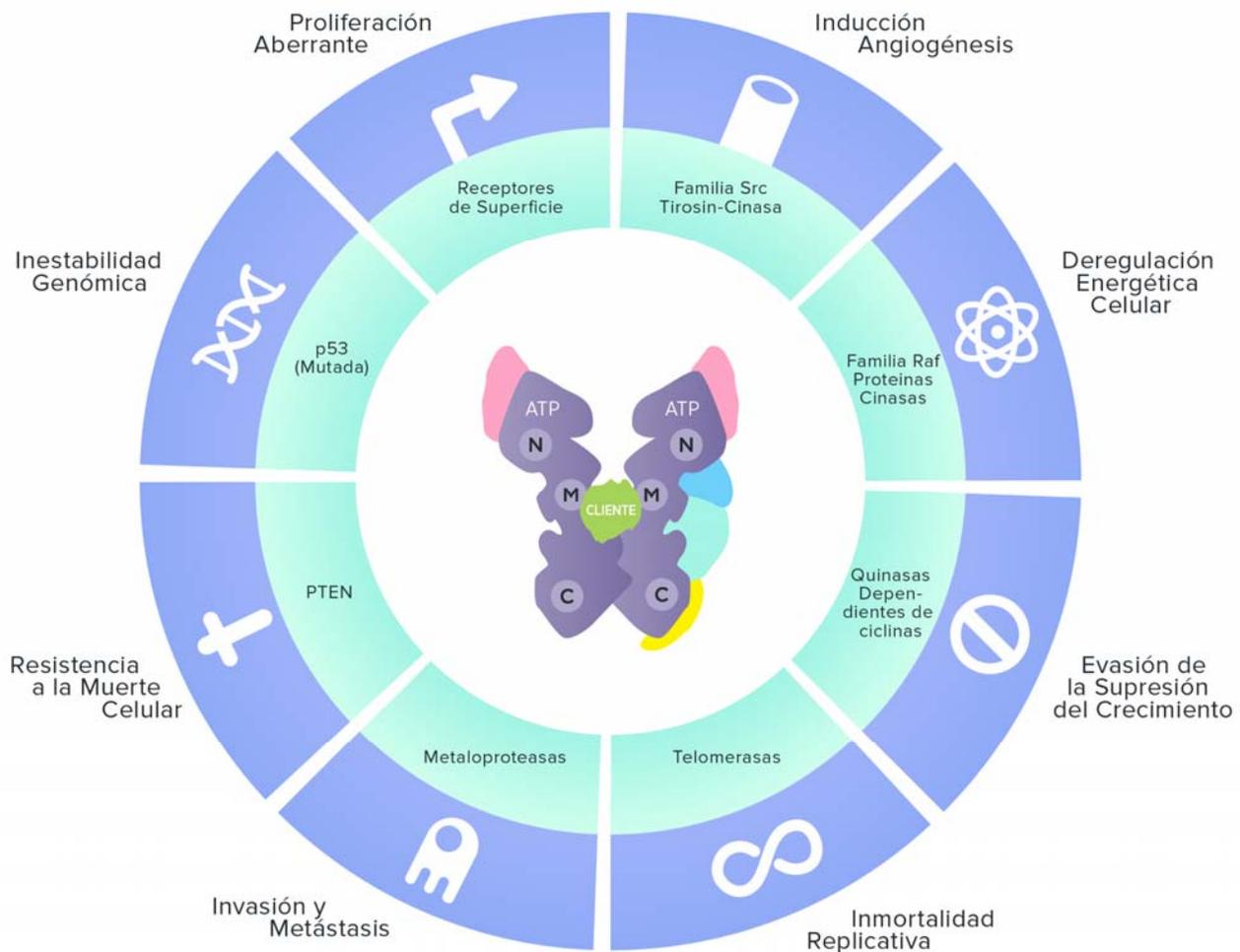


Figura 5. Hsp90 y los *Hallmarks* del cáncer. El cáncer es una enfermedad compleja, pero la mayoría de los tipos de cáncer comparten determinadas capacidades biológicas. Los *hallmarks* del cáncer son capacidades biológicas funcionales adquiridas que permiten a las células malignas proliferar y sobrevivir. Un número sorprendentemente grande de proteínas “cliente” de Hsp90 juegan un papel crucial en el establecimiento de los *hallmarks* del cáncer. En la imagen se muestra de manera resumida algunos tipos de proteínas “cliente” de Hsp90 involucradas en el establecimiento de diferentes *hallmarks* del cáncer. Figura modificada de Verma *et al.* (2016) ⁽⁴⁸⁾.



v. Terapia contra el cáncer basada en la inhibición farmacológica de Hsp90

Muchos factores promotores de tumores dependen de la función de Hsp90 ⁽⁸⁹⁾. Esto explica por qué la inhibición farmacológica de Hsp90 disminuye considerablemente la proliferación y el crecimiento de las células malignas ⁽⁸⁹⁾. Las células normales también requirieron de la función de Hsp90, sin embargo, cuanto más rápido proliferen las células, más dependerán de la actividad de ésta chaperona ⁽⁸⁹⁾. En otras palabras, la función de Hsp90 es imprescindible para la proliferación de las células malignas (Figura 6) ^(91,89).

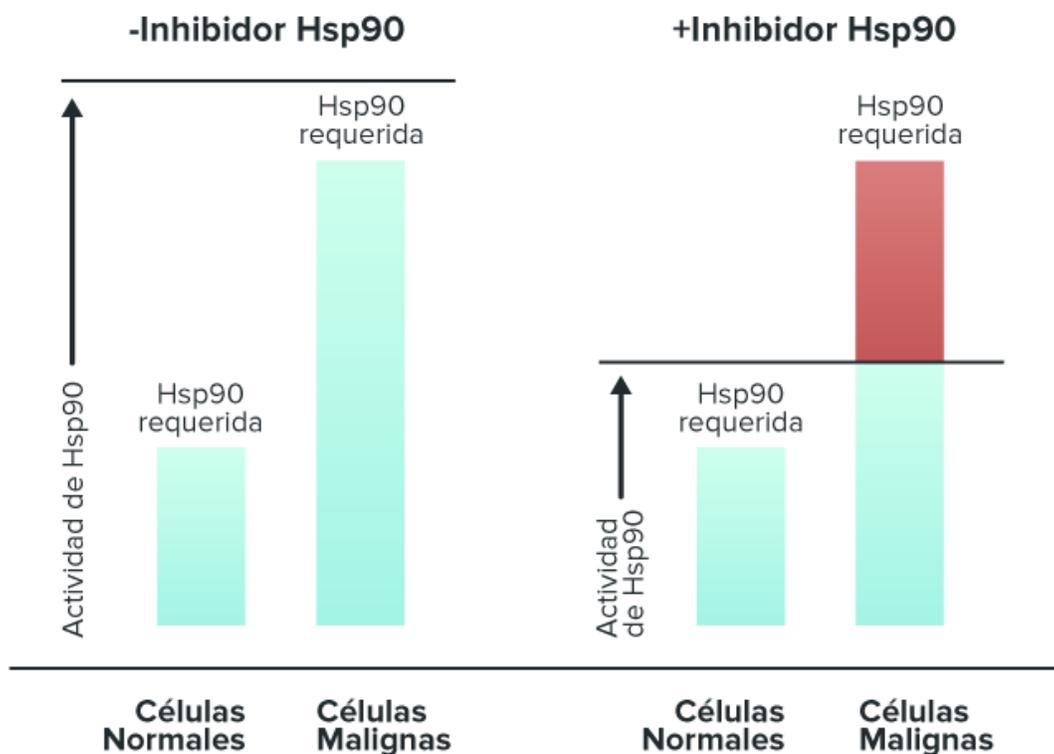


Figura 6. Dependencia de las células malignas a Hsp90. Ilustración esquemática que muestra los diferentes requerimientos cuantitativos de Hsp90 entre las células normales y las células tumorales. Tanto las células normales como las células tumorales requieren de Hsp90, sin embargo las células malignas muestran una mayor dependencia a la actividad de Hsp90. Cuando se trata con iHsp90, se reduce el nivel de actividad de Hsp90 y la actividad restante de Hsp90 es suficiente para las células normales, pero no para células tumorales, induciendo así la muerte selectiva de las células malignas. Figura modificada de Miyata *et al* (2013) ⁽⁸⁹⁾.



En un tumor sólido, un gran número de células crecen rápidamente, consumiendo una enorme cantidad de nutrientes y oxígeno ⁽⁸⁹⁾. Además, las células de rápida proliferación producen una gran cantidad de desechos metabólicos, provocando la disminución del pH en el microambiente ^(91,89). El hecho de que las células tumorales se encuentren expuestas a muchos estresores en un microambiente hostil (hipóxico, ácido y sin nutrientes) sustenta el por qué éstas células requieren mayores cantidades de Hsp90 ⁽⁸⁹⁾.

Por otro lado, existe una importante acumulación de proteínas “cliente” de Hsp90 (ya sea de tipo silvestre o mutadas) en las células malignas, lo que da lugar a un mayor requerimiento de la actividad de chaperona de Hsp90 ⁽⁸⁹⁾. Aunado a todo esto, Hsp90 existe preferencialmente en complejos multichaperónicos con una alta afinidad por sus proteínas “cliente” y con una alta actividad de ATPasa en las células tumorales ⁽⁹²⁾. En contraste, Hsp90 se encuentra mayoritariamente en un estado latente en las células normales ^(89,91,92). Todas estas razones explican porque las células tumorales son más sensibles a la inhibición de Hsp90 que las células normales. De hecho, la Hsp90 aislada de las células tumorales tiene una afinidad de unión a los inhibidores entre 20 y 200 veces mayor que la Hsp90 aislada de las células normales ⁽⁹²⁾.

La asociación de Hsp90 con una amplia gama de transductores de señales ha posicionado a ésta chaperona como una diana terapéutica prometedora para el tratamiento del cáncer ^(93,94). La inhibición farmacológica de Hsp90 resulta en la interrupción simultánea de múltiples vías de transducción de señales oncogénicas ⁽⁹⁵⁾. Esta estrategia es de particular interés en el tratamiento de cánceres en etapas avanzadas, en las que se producen múltiples alteraciones oncogénicas ⁽⁹⁵⁾.

En 1994, se encontró que la geldanamicina, un compuesto de origen natural con potencial antitumoral, era inhibidor de Hsp90 (iHsp90) (Figura 7) ⁽⁹⁶⁾. El 17-AAG (tanespimicina), un análogo de la geldanamicina, fue el primer iHsp90 en emplearse en ensayos clínicos en 1999 (Figura 7) ⁽⁹⁷⁾. Desde entonces, se ha avanzado considerablemente en la optimización de las propiedades farmacológicas de esta clase de inhibidores ⁽⁹⁷⁾.

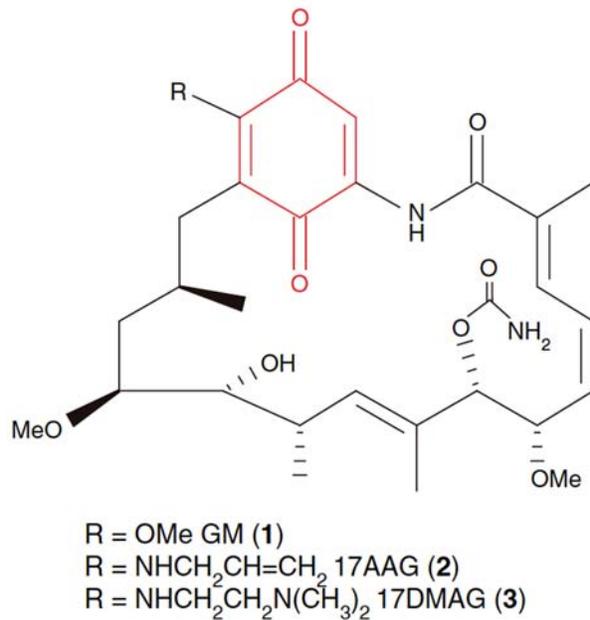


Figura 7. Los primeros inhibidores derivados de la geldanamicina.

El primer ligando que se encontró con la capacidad de interferir con la hidrólisis de ATP de la Hsp90 fue el antibiótico ansamicina geldanamicina (GM). Aunque la GM poseía una potente actividad antitumoral, su progreso hacia la clínica se detuvo debido a su inestabilidad y hepatotoxicidad observada a dosis terapéuticas durante los estudios preclínicos. Debido a esto, se desarrollaron nuevos análogos de la clase de ansamicina para uso clínico (17-AAG y 17-DMAG). El anillo de benzoquinona se marca en rojo. 17AAG, 17 - Alilamino - 17 - desmetoxigdaldanamicina; 17DMAG, 17 - dimetiletilamino - 17 - desmetoxigdaldanamicina; GM, Geldanamicina. Figura tomada de Chiosis *et al.* (2008) ⁽¹³⁶⁾.

La mayoría de los iHsp90 que encuentran actualmente disponibles, y todos los que se han evaluado clínicamente, se unen al pocket de unión a ATP en el dominio N-terminal (Tabla 2), lo que resulta en la interrupción del procesamiento de las proteínas “cliente” mediante la prevención de la hidrólisis de ATP ^(59,98,99). Esta acción frustra la finalización del ciclo cheperónico de Hsp90 y las proteínas clientes son posteriormente marcadas para ser degradadas vía el proteasoma ⁽⁵⁹⁾.

Los iHsp90 son capaces de inducir la degradación de todas las proteínas “cliente” de Hsp90 incluyendo las oncoproteínas fusionadas, factores de transcripción y cinasas activas ^(36,100).

A pesar de que en los ensayos pre-clínicos se predijo que los iHsp90 serían efectivos en una amplia variedad de tumores, se han observado resultados variables en los ensayos clínicos (Tabla 2) ⁽¹⁰⁸⁾. Aunque la actividad anti-neoplásica de algunos iHsp90 se han demostrado en algunos ensayos, en muchos otros se han obtenido resultados decepcionantes ^(95,109,110,111). En la Tabla 2 se muestran algunos de los iHsp90 empleados en diferentes ensayos clínicos para diferentes tipos de cáncer.



Tabla 2. Ensayos clínicos de inhibidores de Hsp90

Tipo de tumor	Tratamiento	Tipo de molécula	Sitio de Unión a Hsp90	Respuesta Clínica	Referencias
Cáncer de mama	Luminespib (AUY922)	Derivado del resorcinol	N-terminal Pocket de unión a ATP	RP 1/10 pts, respuesta metabólica parcial por TEP-FDG observada en 2 pacientes HER-2+	Schroder <i>et al.</i> 2011 ⁽¹⁰¹⁾
Tumores del estroma gastrointestinal	Clorhidrato de Retaspimicina (IPI-504)	Análogo de la geldanamicina	N-terminal Pocket de unión a ATP	RP TEP 8/54 pts (22%)	Wagner <i>et al.</i> 2008 ⁽¹⁰²⁾
Melanoma	Alvespimicina (17-DMAG)	Análogo de la geldanamicina	N-terminal Pocket de unión a ATP	RP 1/7 pts	Pacey <i>et al.</i> 2011 ⁽¹⁰³⁾
	Ganetespib (STA-9090)	Derivado del resorcinol	N-terminal Pocket de unión a ATP	1 RP	Cleary <i>et al.</i> 2010 ⁽¹⁰⁴⁾
Carcinoma de células no pequeñas	Clorhidrato de Retaspimicina (IPI-504)	Análogo de la geldanamicina	N-terminal Pocket de unión a ATP	RP 2/11 pts: wild-type EGFR (18%), 0 pts con RP con EGFR mutado	Sequist <i>et al.</i> 2009 ⁽¹⁰⁵⁾
Cáncer de próstata	Alvespimicina (17-DMAG)	Análogo de la geldanamicina	N-terminal Pocket de unión a ATP	RP 2/25 pts (8%)	Pacey <i>et al.</i> 2011 ⁽¹⁰³⁾
	Tanespimicina (17-AAG)	Análogo de la geldanamicina	N-terminal Pocket de unión a ATP	Sin respuesta objetiva ni confirmada a través APS	Heath <i>et al.</i> 2005 ⁽¹⁰⁶⁾
Cáncer renal (papilar y de células claras)	Tanespimicina (17-AAG)	Análogo de la geldanamicina	N-terminal Pocket de unión a ATP	Sin respuesta objetiva	Ronnen <i>et al.</i> 2006 ⁽¹⁰⁷⁾

TEP-Tomografía de Emisión de Positrones; FDG-Fluorodesoxiglucosa; RP-Respuesta Parcial; APS- Antígeno Prostático Específico; Pts- Pacientes.

vi. Terapéutica actual contra el cáncer de próstata. Papel de Hsp90

La inhibición de Hsp90 es de particular relevancia en el cáncer de próstata (CaP) debido a que Hsp90 es sobreexpresa por las células malignas de la próstata en comparación con las células del epitelio prostático normal, por tanto, Hsp90 proporciona un diana potencial selectiva ⁽¹¹²⁾. Además, muchas proteínas “cliente” de Hsp90 participan en la carcinogénesis de la próstata incluyendo HER-2, EGFR, CDK4, AKT, MEK, y en particular el receptor de andrógenos (AR) (Figura 8) ⁽¹¹³⁾.

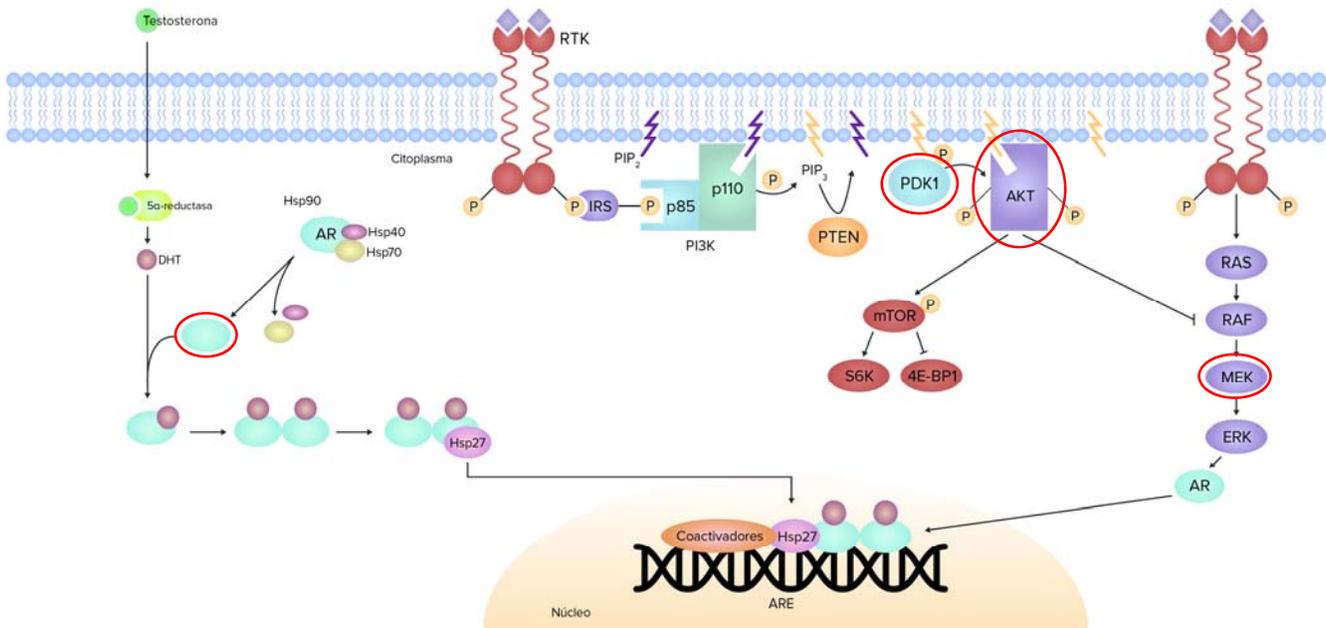


Figura 8. Principales vías de señalización desreguladas en cáncer de próstata. Ilustración esquemática y resumida que muestra el *crossstalk* entre las principales vías de señalización que participan en el desarrollo y progresión del CaP. Encerradas en rojo se encuentran las proteínas “cliente” de Hsp90. La inhibición de Hsp90 conduce a la interrupción simultánea de múltiples vías de señalización. AKT; proteína cinasa B/Akt; ARE, elementos de respuesta a andrógeno; AR, receptor de andrógeno; DHT, Dihidrotestosterona; ERK, cinasa regulada por señales extracelulares.; 4E-BP1, factor 4e eucariótico de iniciación de la traducción de unión a proteína 1; IRS, Substrato de receptor de insulina; MEK, Cinasa MAPK/ERK; PI3K, Fosfoinositol 3-cinasa; PDK1, proteína cinasa 1 dependiente de fosfoinositido; PIP₂, fosfatidilinositol 4,5-bifosfato; PIP₃, fosfatidil inositol 3,4,5 trifosfato; PTEN, fosfatasa y homólogo de tensina; RAF, fibrosarcoma acelerado rápidamente; RAS, oncogen de sarcoma de rata; RTK receptor de tirosina cinasa; S6K, Cinasa S6; mTOR, blanco de rapamicina en mamíferos.



El cáncer de próstata (CaP) es un padecimiento caracterizado por la activación persistente del eje andrógeno-AR ^(89,95,113). La inhibición de Hsp90 en el CaP proporciona un enfoque distinto y multifacético en comparación con los agentes quimioterapéuticos actuales tales como el acetato de abiraterona que bloquea la síntesis de andrógenos o el agente MDV3100 que inhibe la unión de andrógenos a su receptor ⁽¹¹³⁾. Los iHsp90 promueven la degradación del AR y suprimen el crecimiento dependiente de hormonas de las células tumorales ⁽⁸⁹⁾. Sin embargo la inhibición de Hsp90 en el CaP parece ser poco efectiva (Tabla 2) ⁽¹¹³⁾.

El IPI-504 (retaspimicina), un derivado hidrosoluble del 17-AAG, no fue eficaz como monoterapia en el CaP en un ensayo clínico Fase II ⁽¹¹⁴⁾. Por otro lado, no se observó ningún beneficio en un ensayo clínico fase II con el inhibidor 17-AAG en pacientes con CaP ⁽¹⁰⁶⁾. Estos resultados son consistentes con los experimentos en ratones que mostraron que el 17-AAG favorece el crecimiento del CaP en los huesos ⁽¹¹⁵⁾. Muchos de los iHsp90 que han sido ampliamente evaluados en el CaP no pudieron proporcionar pruebas convincentes de actividad antitumoral en los ensayos clínicos ⁽¹¹³⁾.

El diseño de terapias eficaces basadas en la inhibición de Hsp90 requiere de una comprensión adecuada de los mecanismos moleculares por los cuales los tumores no siempre responden al tratamiento ⁽¹⁰⁸⁾. Hay que considerar muchos aspectos, tales como la conformación de Hsp90, variaciones en el metabolismo del fármaco, los efectos de la inhibición de Hsp90 tanto en la fisiología normal como en la de células tumorales, la capacidad de causar quiescencia celular o apoptosis, y **las diferencias en la acción del inhibidor sobre las diversas isoformas de Hsp90** ⁽¹⁰⁸⁾. En la Tabla 3 se muestran los mecanismos de resistencia a los iHsp90 reportados hasta la fecha.



Tabla 3. Resumen de los mecanismos de resistencia a los inhibidores de Hsp90

Mecanismo	Comentarios	Relevancia en tumores humanos	Referencias
Hsp90 latente (monomérica)	Casi todos los tumores poseen preferentemente Hsp90 en un complejo multi-chaperónico con alta afinidad por iHsp90	Los monómeros de Hsp90 tienen baja afinidad por los iHsp90	Moulick <i>et al.</i> ⁽¹¹⁶⁾ Kamal <i>et al.</i> ⁽⁹²⁾
Mutaciones de Hsp90	Estudios genéticos en levadura y en células de mamíferos revelaron cierto grado de resistencia a los inhibidores del dominio N-terminal de Hsp90	A la fecha no hay evidencia de resistencia como consecuencia de mutaciones en humanos	Millson <i>et al.</i> ⁽¹¹⁷⁾ McLellan <i>et al.</i> ⁽¹¹⁸⁾ David <i>et al.</i> ⁽¹¹⁹⁾
MDR sobre-expresión de P-gp	Únicamente relevante para los inhibidores derivados de la geldanamicina	Los iHsp90 derivados de purinas y de pirazol no son sustrato de la P-gp	Kim <i>et al.</i> ⁽¹²⁰⁾ Benckroun <i>et al.</i> ⁽¹²¹⁾ Zhang <i>et al.</i> ⁽¹²²⁾
Sub-expresión de NQO1	Únicamente relevante para los inhibidores derivados de la geldanamicina	Incierto	Guo <i>et al.</i> ⁽¹²³⁾ Gaspar <i>et al.</i> ⁽¹²⁴⁾ Kelland <i>et al.</i> ⁽¹²⁵⁾
Inducción respuesta de choque térmico por HSF-1	Los inhibidores del dominio N-terminal de Hsp90 aumentan los niveles de chaperonas (Hsp27 y Hsp70) que favorecen la sobrevivencia a través de HSF-1	Una terapia combinada adecuada podría evitar la inducción de la respuesta de choque térmico por HSF-1	Powers <i>et al.</i> ⁽¹²⁶⁾ McCollum <i>et al.</i> ⁽¹²⁷⁾
Modificaciones post-traduccionales de Hsp90	Un estado de fosforilación alterado de la Hsp90 es un probable mecanismo de resistencia	Incierto	Scroggins <i>et al.</i> ⁽¹²⁸⁾ Mollapour <i>et al.</i> ⁽¹²⁹⁾ Kurokawa <i>et al.</i> ⁽¹³⁰⁾
Niveles de co-chaperonas	Las co-chaperonas tienen diferentes efectos sobre las propiedades y la actividad de Hsp90	Se ha demostrado que la pérdida o la subexpresión de algunas co-chaperonas vuelve a las células hipersensibles a los inhibidores del dominio N-terminal de Hsp90	Piper <i>et al.</i> ⁽¹³¹⁾ Holmes <i>et al.</i> ⁽¹³²⁾ Forafonov <i>et al.</i> ⁽¹³³⁾
Isoformas de Hsp90	Distinta capacidad para activar algunas proteínas "cliente" y diferente selectividad de los iHsp90 por las isoformas	Aún no se esclarece si la inhibición selectiva de isoforma será ventajosa para un tipo particular de cáncer	Millson <i>et al.</i> ⁽¹³⁴⁾ Chan <i>et al.</i> ⁽¹³⁵⁾



vii. Expresión de las principales isoformas citoplásmicas de Hsp90 en tumores

Las funciones específicas de las principales isoformas citoplásmicas de Hsp90 (Hsp90 α y Hsp90 β) aún no han sido esclarecidas en su totalidad, sin embargo se ha encontrado una expresión alterada de éstas isoformas en los diferentes tipos de cáncer ⁽¹³⁷⁾.

Ogata *et al.* demostraron que en los tumores pancreáticos crónicos y malignos había una marcada expresión de Hsp90 α , mientras que los tumores benignos no ⁽¹³⁸⁾. Además, la sobreexpresión de Hsp90 α se ha asociado con un mal pronóstico en el cáncer de mama, carcinoma pancreático y en la leucemia ^(139,140,141,142). En pacientes con lupus eritematoso sistémico, la enfermedad se asoció con una mayor transcripción Hsp90 β ⁽¹⁴³⁾. Se ha demostrado que la expresión de Hsp90 β se ve aumentada en tumores crónicos ⁽¹³⁸⁾. Además, la expresión de Hsp90 β está implicada en la resistencia a múltiples fármacos, debido a que ésta isoforma es capaz de interactuar con la glicoproteína-P, un componente clave en el desarrollo de resistencia a múltiples agentes quimioterapéuticos ⁽¹⁴⁴⁾.

Se ha descrito que las isoformas tienen distinta capacidad para activar a sus proteínas cliente, además ambas isoformas difieren en su selectividad por los iHsp90 ^(134,135). Por ejemplo: Hsp90 α es más eficaz para activar a la proteína v-Src, que Hsp90 β ⁽¹³⁴⁾; por otro lado, la Hsp90 α extracelular interactúa y regula la actividad de la metaloproteínasa de matriz 2 (MMP2) ⁽¹⁴⁵⁾.

A pesar de que toda la evidencia sugiere una función diferencial de las isoformas, Hsp90 α y Hsp90 β , en la progresión del fenotipo maligno, todavía no es claro si un inhibidor isoforma-específico de Hsp90 sería más beneficioso en un tipo particular de cáncer ⁽¹³⁶⁾. Se requieren estudios que permitan dilucidar la función individual de Hsp90 α y Hsp90 β en diversas vías de señalización, así como su papel en la biología del cáncer.

En el CaP la expresión de las diferentes isoformas de Hsp90 no ha sido determinada ni su implicación funcional en la regulación de sus proteínas cliente.



Si la actividad y expresión de Hsp90 α y Hsp90 β se ven afectadas como consecuencia del tratamiento con un iHsp90 (inespecífico de isoforma), la actividad y expresión de las proteínas “cliente” de cada isoforma también se verán afectadas. Esto podría tener diferentes consecuencias sobre la progresión, agresividad (invasión y metástasis) y desarrollo de resistencia a los iHsp90 en el cáncer de próstata.

Esto destaca la importancia de investigaciones dirigidas a estudiar mecanismos moleculares isoforma-dependiente de Hsp90 que pueden explicar y mejorar la terapia basada en la inhibición de Hsp90.



PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA



La inhibición de Hsp90 conduce a la interrupción de múltiples vías de señalización y redes de transcripción en el cáncer de próstata, un padecimiento caracterizado por la activación persistente del eje andrógeno-receptor de andrógeno. Sin embargo, en el CaP ha sido poco explorado el papel específico de las principales isoformas citoplásmicas de Hsp90, Hsp90 α y Hsp90 β ; las cuales podrían determinar o conducir a niveles variables de resistencia a los inhibidores de Hsp90, tales como los derivados de la geldanamicina.



HIPÓTESIS Y OBJETIVOS



Hipótesis

El perfil de expresión de Hsp90 α y Hsp90 β dictaminará la resistencia al efecto pro-apoptótico y anti-proliferativo del inhibidor de Hsp90, 17-DMAG, en células de cáncer de próstata.



Objetivo General

Determinar si la expresión de las isoformas, Hsp90 α y Hsp90 β , participan en la resistencia intrínseca o adquirida al inhibidor de Hsp90, 17-DMAG, en líneas celulares de cáncer de próstata.

Objetivos Particulares

1. Evaluar el efecto del inhibidor de Hsp90, 17-DMAG, sobre la viabilidad de las líneas celulares de próstata PrEC, PC-3 y DU145.
2. Estudiar el efecto del inhibidor 17-DMAG sobre los niveles de expresión de las proteínas Hsp90T, Hsp90 α , Hsp90 β , co-chaperonas y algunas proteínas “cliente” de Hsp90, en las líneas celulares de próstata, a través de ensayos de Western blot.
3. Mediante ensayos de herida, evaluar la migración celular de las líneas de próstata tratadas con el inhibidor 17-DMAG.
4. Estudiar los cambios en el ciclo celular de las líneas celulares de próstata tratadas con 17-DMAG mediante la tinción con yoduro de propidio.
5. Mediante tinción nuclear con DAPI, evaluar la integridad del ADN de las líneas celulares de próstata, tratadas con 17-DMAG.



MATERIAL Y MÉTODOS



i. Reactivos

Los medios de cultivo *Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12* (D-MEM F-12) y *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (D-MEM), así como el suero fetal bovino (SFB), tripsina, antibiótico y otros suplementos, se obtuvieron de Gibco-Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA). El bromuro de metiltiazolildifeniltetrazolio (MTT) (Cat. M-5655), el yoduro de propidio (Cat. P4170) y el 4',6-diamidino-2-fenilindol, dihidrocloruro (DAPI) (Cat. D9542-1MG) se adquirieron de Sigma-Aldrich. El inhibidor de Hsp90, 17-(2-dimetil-aminoetil)-amino-17-dimetoxigeldanamicina (17-DMAG) (Cat. 100069) y la RNAsa (Cat. 556746) se obtuvieron de Calbiochem. Todos los buffers, reactivos para Western blot, el *Kit Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate* (Cat. WBKLS0500) y el *Kit DC Protein Assay* (Cat. 500-0116) se obtuvieron de Bio-Rad Laboratories (Herpes, CA, USA). El RIPA Lysis Buffer (Cat. 20-188) y el Blot-QuickBlocker Reagent (Cat. WB57) se adquirieron de Millipore. La membrana de difluoro polivinilideno (PVDF) (Cat. NEF1002) se adquirió de PerkinElmer.

Anticuerpos utilizados:

- i. Anticuerpos primarios: anti-pmTOR pS²⁴⁴⁸ (Cat. 441125G, Invitrogen) (1:1000); anti-GAPDH (Cat. (FL-335): sc-25778, Santa Cruz Biotechnology) (1:500); anti-Hsp90T (Cat. NBP2-12878, Novus Biologicals) (1:5000); anti-Hsp90 α (Cat. AB82588, Abcam) (1:2000); anti-Hsp90 β (Cat. AB32568, Abcam) (1:2000); anti-Hsp70 (Cat. AB9920, Millipore) (1:2500); anti-Hsp27 (Cat. MAD88051, Millipore) (1:1000); anti-HIF-1 α (Cat. ABE279, Millipore) (1:500); anti-Bcl-2 (Cat. 05-729, Millipore) (1:500); anti-Bax (Cat. 06-499, Millipore) (1:800); anti-PARP (Cat. AB16661, Millipore) (1:500); anti-caspasa 3 (Cat. 60-6663-82, eBioscience) (1:250).
- ii. Anticuerpos secundarios acoplados a HRP: anti-mouse (Cat. F2612, Santa Cruz) (1:10000), anti-rabbit (Cat. AP132p, Millipore) (1:20000), anti-goat (Cat. V805A, Promega) (1:10000).



ii. Estrategia experimental

Se evaluó el efecto del inhibidor de Hsp90 (17-DMAG) sobre la viabilidad de las líneas celulares de próstata. Posteriormente se evaluó el perfil de expresión de Hsp90 α y Hsp90 β y la migración de las líneas celulares de próstata tratadas con 17-DMAG. Además se estudiaron los cambios en el ciclo celular de las líneas celulares de próstata tratadas con 17-DMAG. Los hallazgos fueron validados mediante la tinción nuclear con DAPI.

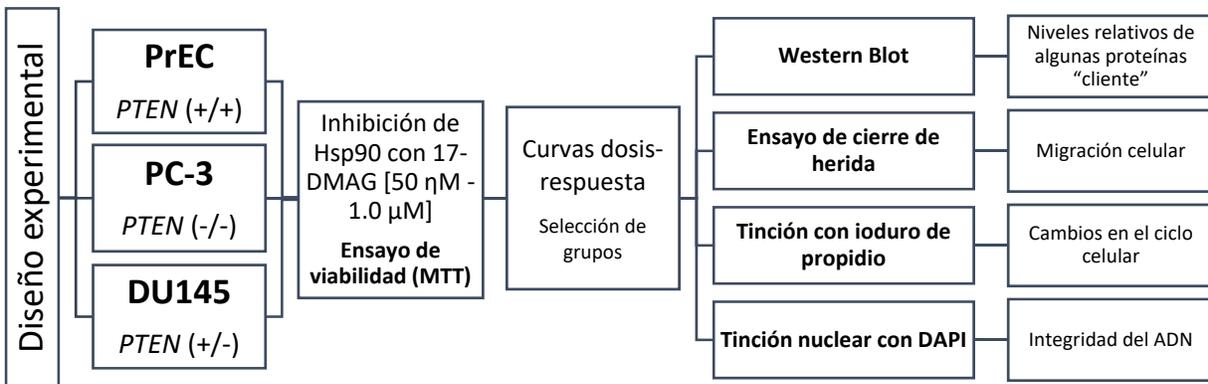


Figura 9. Estrategia experimental. Se emplearon tres líneas celulares de próstata con genotipo diferente para el gen *PTEN*. PrEC es una línea normal de próstata, mientras que PC-3 y DU145 son líneas celulares de cáncer de próstata. ADN, ácido de desoxirribonucleico; DAPI, 4',6-diamidino-2-fenilindol, dihidrocloruro; DU145, línea celular de cáncer de próstata, de *Homo sapiens*, derivada de sitio metastásico (cerebro), carcinoma; MTT, metiltiazolidifenil-tetrazolio; PC-3, línea celular de cáncer de próstata, de *Homo sapiens*, derivada de sitio metastásico (hueso), grado IV adenocarcinoma; PrEC, línea celular epitelial de próstata normal de *Homo sapiens*; *PTEN*, gen que codifica para la proteína PTEN (fosfatasa y homólogo de tensina).

iii. Cultivo celular

Las líneas celulares empleadas en éste estudio fueron PrEC, PC-3 y DU145. Las células PrEC y PC-3 se mantuvieron en el medio de cultivo D-MEM F-12 con antibiótico-antimicótico 1X, con 10% de SFB. Las células DU145 se mantuvieron en el medio D-MEM, antibiótico-antimicótico 1X, con 10% de SFB. Todas las líneas celulares se mantuvieron a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5%. En la



Tabla 4 se presenta en detalle las características de las líneas celulares reportadas en la literatura ⁽¹⁴⁶⁾.

Tabla 4. Características genotípicas y fenotípicas de las líneas celulares de próstata empleadas ⁽¹⁴⁶⁾

Línea celular	<i>PTEN</i> *	Sensibilidad a andrógenos	Metástasis
PrEC	+/+	++++	-
PC-3	-/-	-	++++
DU145	+/-	-	++

**PTEN*: gen que codifica para la proteína supresora de tumor fosfatidil-inositol-3,4,5-trifosfato-3-fosfatasa.

El inhibidor 17-DMAG fue empleado en los ensayos de inhibición. El 17-DMAG se disolvió en PBS 1X y se almacenó a -20°C. El inhibidor siempre fue protegido de la luz.

iv. Determinación de la viabilidad celular a través del compuesto bromuro de metiltiazolildifenil-tetrazolio (MTT)

La viabilidad celular se evaluó con MTT. Las células fueron cultivadas en placas de 96 pozos hasta que alcanzaron una confluencia del 75%. 24 horas antes del tratamiento, se reemplazó el medio de cultivo con medio sin antibiótico y sin SFB. Transcurridas las 24 horas, se trataron las células con 17-DMAG (50 η M - 1.0 μ M). 20 μ L/pozo de MTT (5 mg/mL) fueron añadidos después de haber transcurrido 0, 18, 36, 54, 72 horas después de la administración del iHsp90. Las células con MTT eran incubadas durante 4 horas a 37°C, transcurrido ese tiempo, los cristales formados eran disueltos con 150 μ L de DMSO al 10%. La absorbancia fue determinada en un espectrofotómetro (longitud de onda 570 nm).

v. Inmunodetección por Western blot

Se sembraron y cultivaron las células de próstata en cajas petri P60 hasta que se alcanzó una confluencia celular del 85%. Una vez alcanzada la confluencia, se



sincronizaron las células con medio de cultivo sin SFB y sin antibiótico durante 24 horas. Transcurridas las 24 horas, se trataron las células con el iHsp90, 17-DMAG.

Se extrajo proteína total de las células no tratadas y tratadas con 17-DMAG. Para ello se utilizó un buffer de lisis, constituido por RIPA, inhibidor de proteasas e inhibidor de fosfatasas. Después de haber obtenido los homogenados, éstos se centrifugaron a 13,000 x g/20 minutos a 4°C. Se obtuvo el sobrenadante y se determinó la concentración de proteínas por el método de Lowry. Los extractos proteicos se almacenaron a -20°C.

La electroforesis se realizó en geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 10%, empleando 30 μ g de proteína. Las condiciones electroforéticas fueron 60 volts por 30 minutos para el gel concentrador y 120 volts por 90 minutos para el gel separador.

Al finalizar la electroforesis las proteínas se transfirieron en un Transblot (método semi-seco) a una membrana de PVDF. Las condiciones de transferencia fueron 10 volts por 150 minutos.

Las membranas se bloquearon con leche (Blot-QuickBlocker) al 5% en buffer salino de tris (TBS); se bloqueó durante 1 hora a temperatura ambiente. Se incubaron a 4°C durante toda la noche los anticuerpos primarios. Por otro lado los anticuerpos secundarios se incubaron 1 hora a temperatura ambiente. Después de la incubación de los respectivos anticuerpos se le hicieron seis lavados con buffer TBS-T a las membranas. Se realizó la inmunodetección de las proteínas sobre la membrana y se expusieron las placas radiográficas sobre la quimioluminiscencia. Las placas radiográficas se revelaron y se fijaron. Las proteínas se cuantificaron por análisis densitométrico.

vi. Migración celular mediante ensayo de cierre de herida

La migración celular se evaluó mediante el ensayo de cierre de herida en placas de 24 pozos. Cuando se alcanzó una confluencia celular del 90%, se reemplazó el medio de cultivo con medio nuevo, esta vez sin SFB y sin antibiótico. Después de



24 horas se reemplazó nuevamente el medio con medio de cultivo con SFB al 10% y se realizó una herida sobre la monocapa celular empleando una punta de micropipeta de 20 μ L. Una vez que la herida fue hecha, se retiró el medio de cultivo y se realizaron lavados con PSB 1X. Posteriormente se trataron las células con el inhibidor de Hsp90 17-DMAG. Empleando un microscopio invertido (Marca Leica) se obtuvieron microfotografías de la herida a tiempos de 0 h, 24 h y 48 h con y sin tratamiento (17-DMAG 500 η M).

vii. Determinación del ciclo celular por citometría de flujo (tinción con yoduro de propidio)

Se sembraron y cultivaron las células de próstata en cajas petri P60 hasta que se alcanzó una confluencia celular del 75%. Una vez alcanzada la confluencia, se sincronizaron las células con medio de cultivo sin SFB y sin antibiótico durante 24 horas. Pasadas las 24 horas, se trataron las células con el con 17-DMAG. Transcurridas las horas del tratamiento con el 17-DMAG, se retiró el medio y se hicieron lavados con PBS 1X atemperado a 37°C. Se agregó tripsina 1X a cada caja y se dejó actuar el tiempo mínimo necesario para que las células se desprendieran de la superficie de la placa. Una vez que las células se desprendieron, se neutralizó la tripsina con medio de cultivo con SFB al 10%. Se recolectó la suspensión celular en tubos y se centrifugó a 1110 x g por 5 minutos. Se desechó el sobrenadante y se resuspendió el botón de células en 5mL de PBS frío. Se centrifugó nuevamente (1110 x g/5 minutos). El sobrenadante fue aspirado y se resuspendió el botón de células, esta vez en 85 μ L de PBS frío. Posteriormente se agregaron 700 μ L de etanol frío al 80%. Las muestras se pasarán a tubos de FACS y se centrifugaron a 1110 x g durante 5 min. Se resuspendieron las muestras en 500 μ L de solución de tinción (buffer de citrato de sodio al 1.1%, RNAsa 1.0 mg/mL, yoduro de propidio 0.01 mg/mL) y se incubaron en la obscuridad a 37°C por tres horas. Finalmente, se leyeron las muestras en el citómetro de flujo.



viii. Determinación de la integridad del ADN a través de la tinción nuclear con el compuesto 4',6-diamidino-2-fenilindol, dihidrocloruro (DAPI)

Se sembró la cantidad adecuada de células sobre cubreobjetos para obtener una confluencia aproximada del 80%. Se sincronizaron las células con medio de cultivo sin SFB y sin antibiótico durante 24 horas. Pasadas las 24 horas, se reemplazó el medio de cultivo con medio con 17-DMAG. Transcurridas las horas del tratamiento con el 17-DMAG, se retiró el medio y se hicieron lavados con PBS 1X. Posteriormente se fijaron las células con paraformaldehído al 4.0% (preparado en PBS), durante 10 minutos a temperatura ambiente. Después se lavaron las células con PBS 1X y se incubaron las células con triton X-100 0.1% (preparado en PBS), a temperatura ambiente durante 30 minutos. Posteriormente se lavaron las células con PBS 1X y se tiñeron con con DAPI (1.0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) por 30 minutos a temperatura ambiente. Finalmente se montaron los cubreobjetos en los portaobjetos empleando medio de montaje. Las imágenes se obtuvieron por microscopia de fluorescencia (Axiolmager, Zen Software, Carl Zeiss).

ix. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se empleó el software Graphpad Prism 6. Los experimentos se hicieron por triplicado. Los resultados se expresan como la media \pm error estándar. Las diferencias se consideraron significativas cuando el valor p fue menor a 0.05 empleando una prueba de *t* de student y/o de varianza. Asimismo para la representación gráfica de los datos se utilizó el software Graphpad Prism 6.



RESULTADOS



i. Efecto del inhibidor de Hsp90, 17-DMAG, sobre la viabilidad celular en líneas celulares de cáncer de próstata

PrEC, PC-3 y DU145 son líneas celulares de próstata con diferente genotipo para el gen *PTEN* (Tabla 4), el principal regulador negativo de la vía de señalización PI3K-AKT-mTOR. La vía PI3K-AKT-mTOR regula y modula el crecimiento, la supervivencia y la proliferación celular. Evidencia emergente ha demostrado un papel clave del eje de señalización PI3K-AKT-mTOR en el desarrollo y mantenimiento de CaP.

PrEC es una línea normal de próstata mientras que PC-3 y DU145 son líneas celulares de cáncer de próstata que difieren en su capacidad invasiva y en su capacidad para generar metástasis en modelos *in vivo* (Tabla 4). Es importante mencionar que PC-3 al ser una línea celular de cáncer de próstata con genotipo *PTEN* *-/-* es mucho más agresiva y metastásica que la línea celular DU145 con genotipo *PTEN* *+/-*.

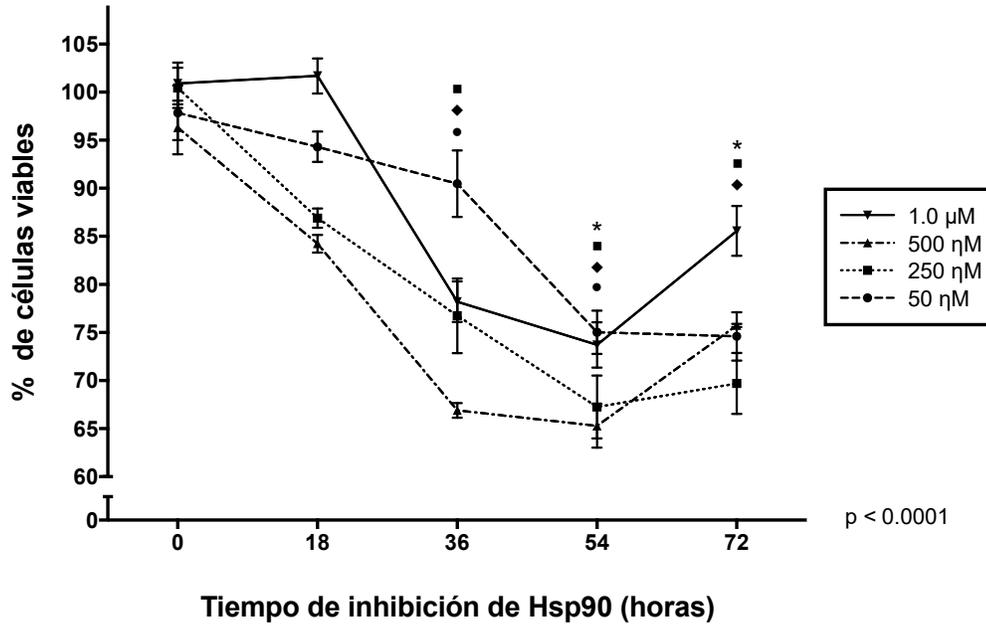
Con la finalidad de determinar el efecto del inhibidor de Hsp90, 17-DMAG, sobre la viabilidad de las tres líneas celulares con diferente genotipo, se empleó el ensayo de MTT. Se evaluaron diferentes concentraciones del iHsp90 [50 η M - 1.0 μ M] a diferentes tiempos (0 h - 72 h). Todas las concentraciones evaluadas disminuyeron el crecimiento de las tres líneas celulares, sin embargo se observó que la disminución de la viabilidad fue tiempo-dependiente (Figura 10).

Por el contrario, no se observó una relación clara entre la concentración del iHsp90 y la disminución de la viabilidad celular en las tres líneas celulares. De manera interesante, casi todas las concentraciones evaluadas condujeron al mismo porcentaje de viabilidad celular después de 72 horas de tratamiento con el iHsp90 en cada una de las líneas celulares (Figura 10).



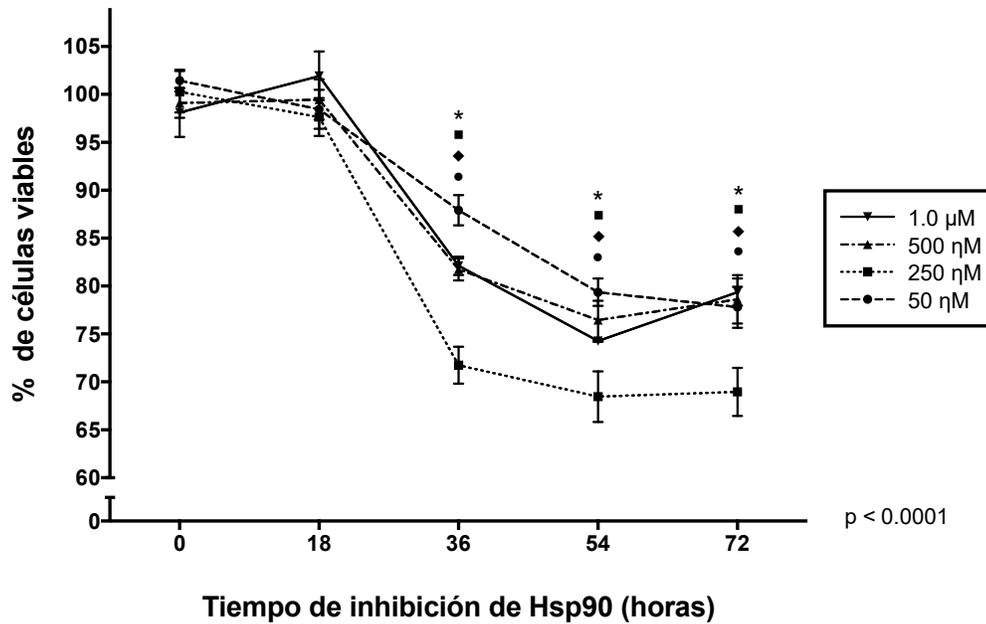
A

Línea celular PrEC tratada con 17- DMAG



B

Línea celular PC-3 tratada con 17- DMAG





C

Línea celular DU145 tratada con 17- DMAG

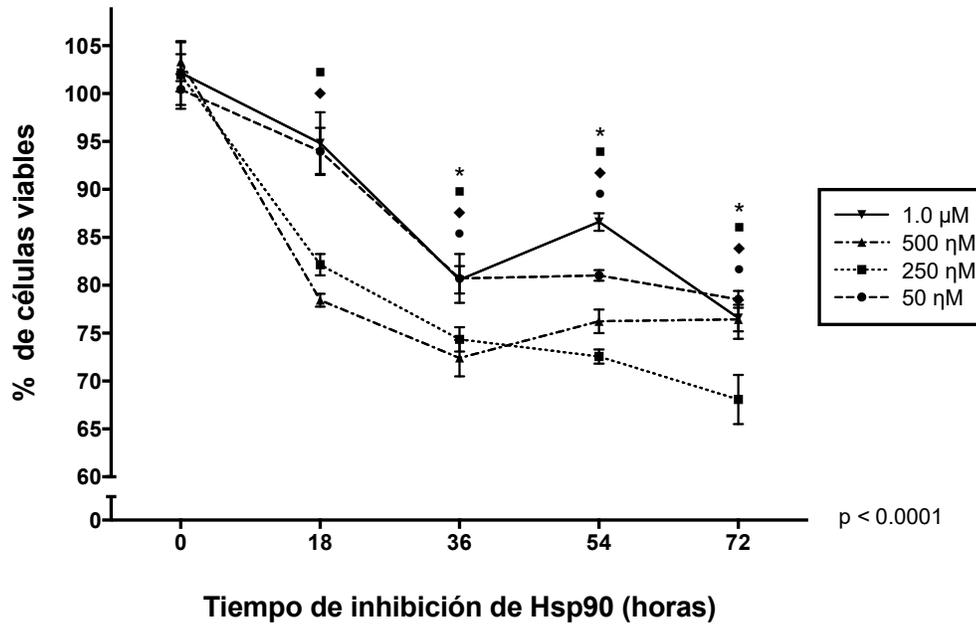


Figura 10. Efecto del inhibidor de Hsp90, 17-DMAG, sobre la viabilidad celular en líneas celulares de próstata. Las líneas celulares de próstata PrEC (A), PC-3 (B) y DU145 (C) fueron incubadas con diferentes concentraciones de 17-DMAG [50 n M - 1.0 μ M], durante varios intervalos de tiempo (0 h - 72 h). La viabilidad celular fue evaluada mediante MTT. Los datos representados en porcentaje son la media \pm error estandar de cuatro experimentos diferentes. $p < 0.0001$ en todos los casos usando anova de dos vías y prueba de comparación múltiple de Dunnett para la comparación entre el control (0 h) y cada intervalo de tiempo, para una sola concentración de 17-DMAG.

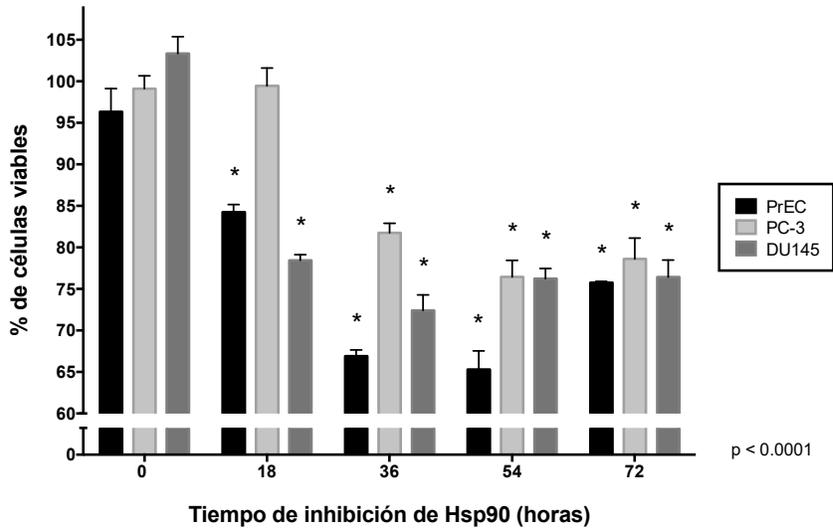
* 50 n M, ■ 250 n M, ◆ 500 n M, ● 1.0 μ M.

A 500 n M se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las tres líneas celulares (Figura 11). A las 18 horas se observó que el iHsp90 no es capaz de disminuir la viabilidad celular de PC-3 (Figura 11.B). Por otro lado el 17-DMAG redujo a casi un 80% la viabilidad de las líneas celulares PrEC y DU145 después de 18 horas de tratamiento (Figura 11.B). Curiosamente, después de 72 horas de tratamiento con 500 n M del iHsp90, las tres líneas celulares alcanzaron el mismo porcentaje de viabilidad celular.

Debido a estas observaciones se seleccionó la concentración de 500 n M de 17-DMAG y los tiempos 18 h (inhibición aguda) y 72 h (inhibición crónica) para los experimentos posteriores.

A

Viabilidad de las líneas celulares de próstata tratadas con 17-DMAG [500 η M]



B

Viabilidad de las líneas celulares de próstata tratadas con 17-DMAG [500 η M]

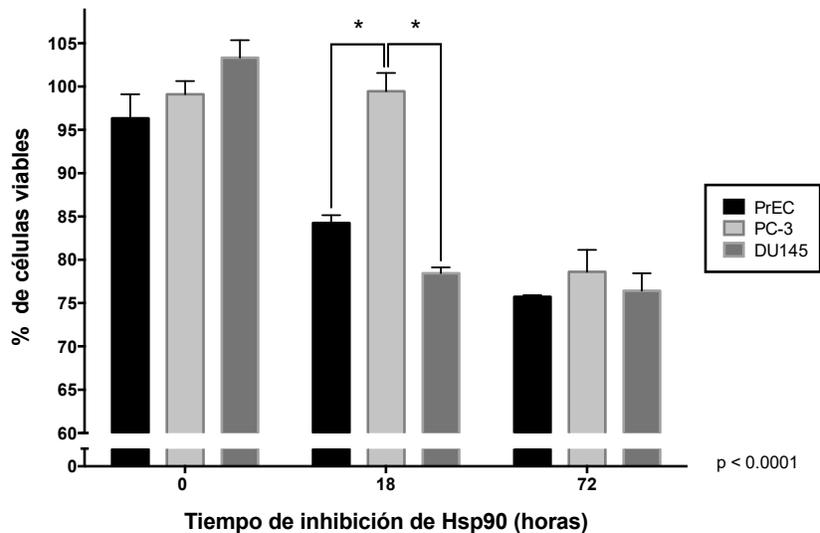


Figura 11. Diferencias estadísticamente significativas en la viabilidad celular de las líneas celulares de próstata a una concentración de 500 η M. (A) Se muestran los cambios en la viabilidad celular de las líneas celulares PrEC, PC3 y DU145 tratadas con una concentración de 500 η M de 17-DMAG. Los datos representados en porcentaje son la media \pm error estándar de cuatro experimentos diferentes. p < 0.0001 en todos los casos usando anova de dos vías y prueba de comparación múltiple de Dunnett para la comparación entre el control (0 h) y cada intervalo de tiempo. (B) Se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre las líneas celulares de próstata a 18 h de tratamiento con 500 η M de 17-DMAG. Los datos representados en porcentaje son la media \pm error estándar de cuatro experimentos diferentes. p < 0.0001 en todos los casos usando anova de dos vías y prueba de comparación múltiple de Tukey para la comparación entre las líneas celulares de próstata a cada intervalo de tiempo.



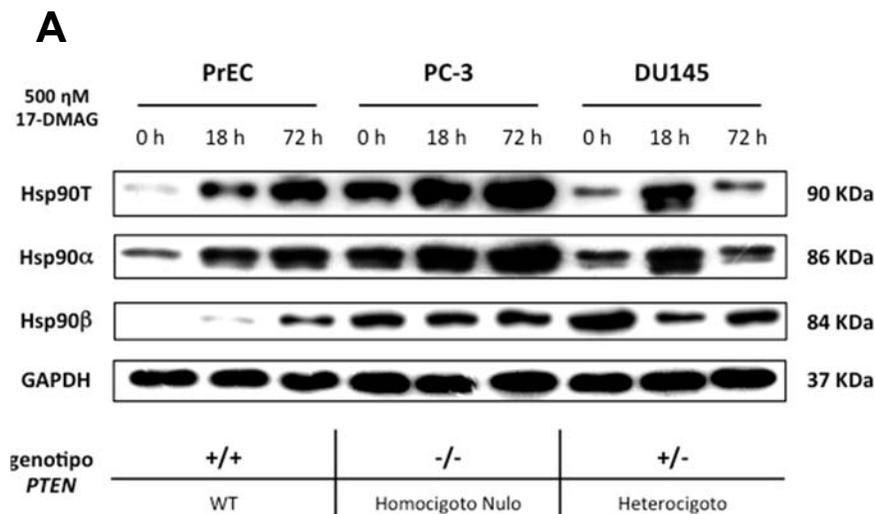
ii. Efecto del inhibidor 17-DMAG sobre los niveles relativos de las proteínas Hsp90 α , Hsp90 β , cochaperonas y proteínas “cliente” de Hsp90 en líneas celulares de cáncer de próstata

El siguiente objetivo fue determinar el efecto del inhibidor 17-DMAG [500 η M] sobre el perfil de expresión de Hsp90T y de las principales isoformas citoplásmicas de Hsp90, Hsp90 α y Hsp90 β , en las líneas celulares de próstata, a través de ensayos de Western blot.

El tratamiento indujo la sobreexpresión de Hsp90 total (Hsp90T) tanto en la línea celular PrEC como en PC-3 (Figura 12.A y 12.E). Por otro lado, la línea celular DU145 sobreexpresó Hsp90T a las 18 h, sin embargo a las 72 h de tratamiento, la expresión de Hsp90T fue reestablecida (Figura 12.D)

De manera general se observa (Figura 12) que el iHsp90, 17-DMAG, indujo cambios en el perfil de expresión de las isoformas de Hsp90 en las tres líneas celulares de próstata.

De manera interesante se observó que la sobreexpresión de Hsp90 α fue directamente proporcional al tiempo de inhibición de Hsp90 en las líneas celulares PrEC y PC-3 (Figura 12.A y 12.E). Por el contrario, la línea celular DU145 sólo sobreexpresó Hsp90 α después de 18 horas de tratamiento con el iHsp90.



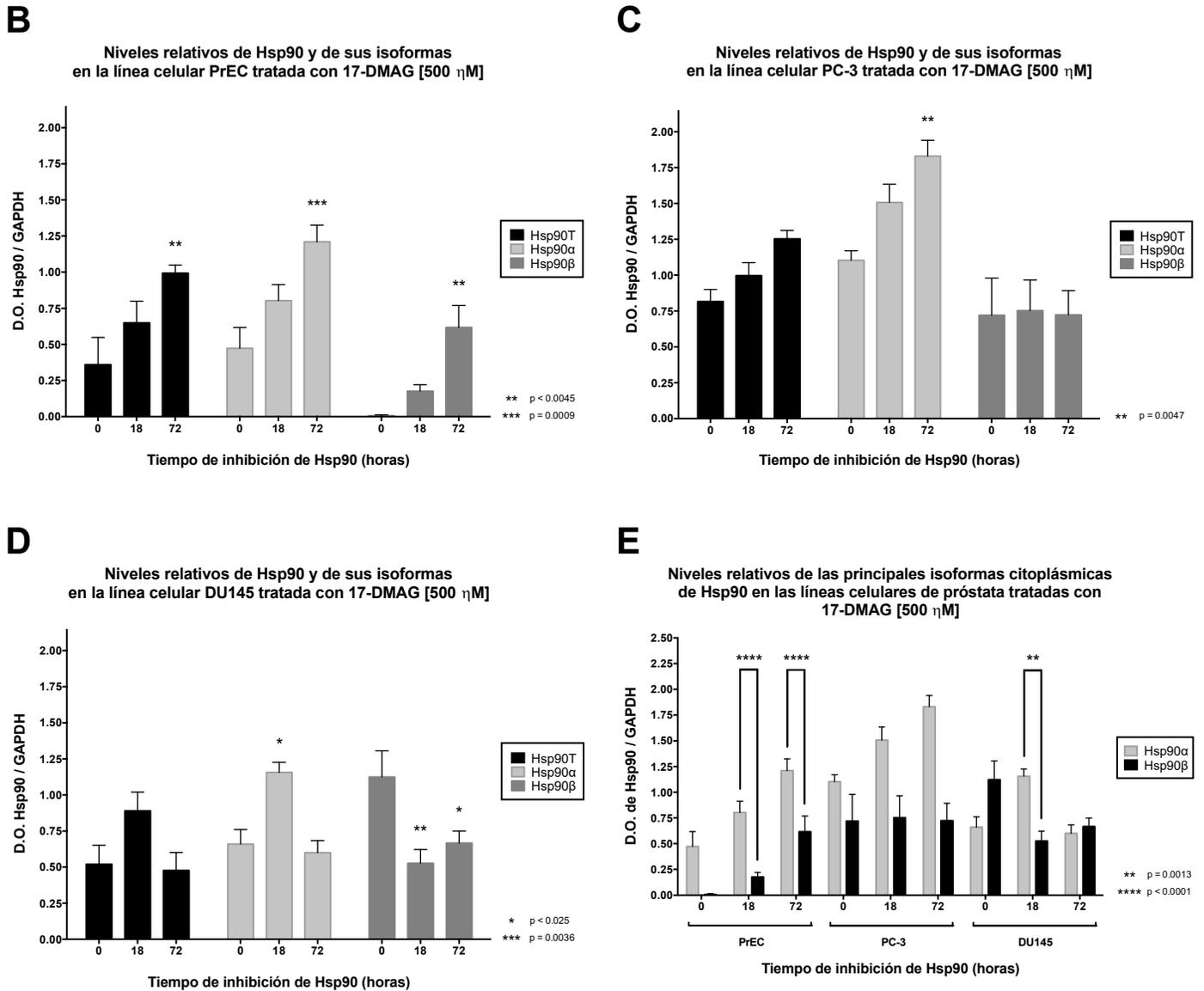


Figura 12. Efecto de la inhibición de Hsp90 sobre el perfil de expresión de Hsp90T, Hsp90 α y Hsp90 β .

Las líneas celulares de próstata PrEC, PC-3 y DU145 fueron tratadas con el inhibidor de Hsp90, 17-DMAG [500 η M] por 18 h y 72 h. (A) El efecto de la inhibición de Hsp90 sobre los perfiles de expresión de Hsp90T, Hsp90 α y Hsp90 β fue evaluado por Western blot. Se muestra de manera gráfica los niveles relativos de Hsp90 y de sus principales isoformas citoplásmicas en las líneas celulares PrEC (B), PC-3 (C) y DU145 (D). Los datos representados son la media \pm error estándar de tres experimentos diferentes. Las p se calcularon usando anova de dos vías y prueba de comparación múltiple de Dunnett para la comparación entre el control (0 h) y cada tiempo de cada proteína. (E) Se muestra de manera gráfica y resumida, el efecto del 17-DMAG sobre el perfil de expresión de Hsp90 α y Hsp90 β en las tres líneas celulares de próstata. Para el análisis estadístico, se normalizaron los valores con el respectivo control de cada línea y cada proteína. Las p se calcularon usando anova de dos vías y prueba de comparación múltiple de Sidak para la comparación entre las isoformas.

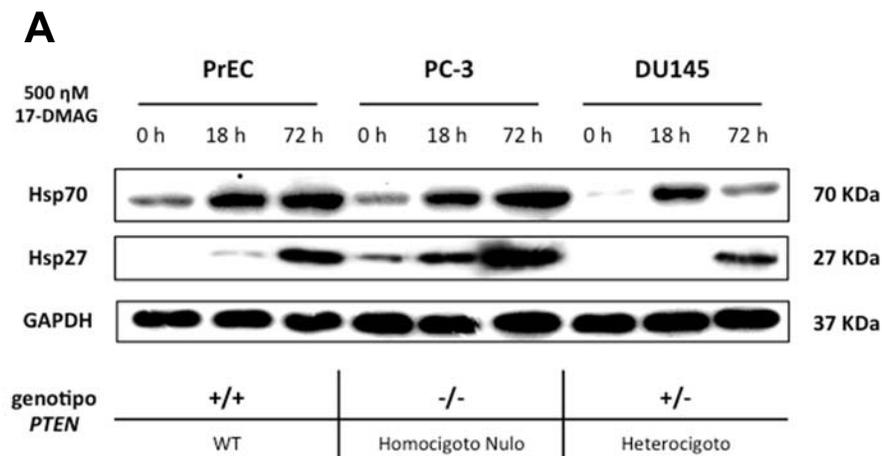
Curiosamente, después de 72 horas de tratamiento, la expresión de Hsp90 α fue reestablecida en la línea celular DU145.



Se observó una ligera sobreexpresión de Hsp90 β como consecuencia del tratamiento con el 17-DMAG en la línea celular PrEC (Figura 12.B). Por otra parte, no se observaron cambios estadísticamente significativos en el perfil de expresión de Hsp90 β en la línea celular PC-3 (Figura 12.C). Cabe destacar que el tratamiento con el iHsp90, 17-DMAG, indujo la subexpresión de Hsp90 β en la línea celular DU145 (Figura 12.D)

Posteriormente se quiso evaluar el efecto del inhibidor 17-DMAG sobre el perfil de expresión de la co-chaperonas Hsp27 y Hsp70 (Figura 13). El iHsp90 indujo la sobreexpresión tanto de Hsp27 como de Hsp70 en las líneas celulares PrEC y PC-3 (Figura 13.B y 13.C). Ésta sobreexpresión fue directamente proporcional al tiempo de inhibición de Hsp90.

No obstante, la inhibición de Hsp90 en la línea celular DU145 indujo la sobreexpresión de Hsp70 después de 18 horas de tratamiento (Figura 13.D). Sin embargo tras 72 horas de inhibición de la Hsp90, los niveles de expresión de Hsp70 fueron restablecidos en la células DU145 (Figura 13.D). En cambio, Hsp27 sólo fue sobreexpresada después de 72 horas de tratamiento con el 17-DMAG en la línea celular DU145 (Figura 13.D).



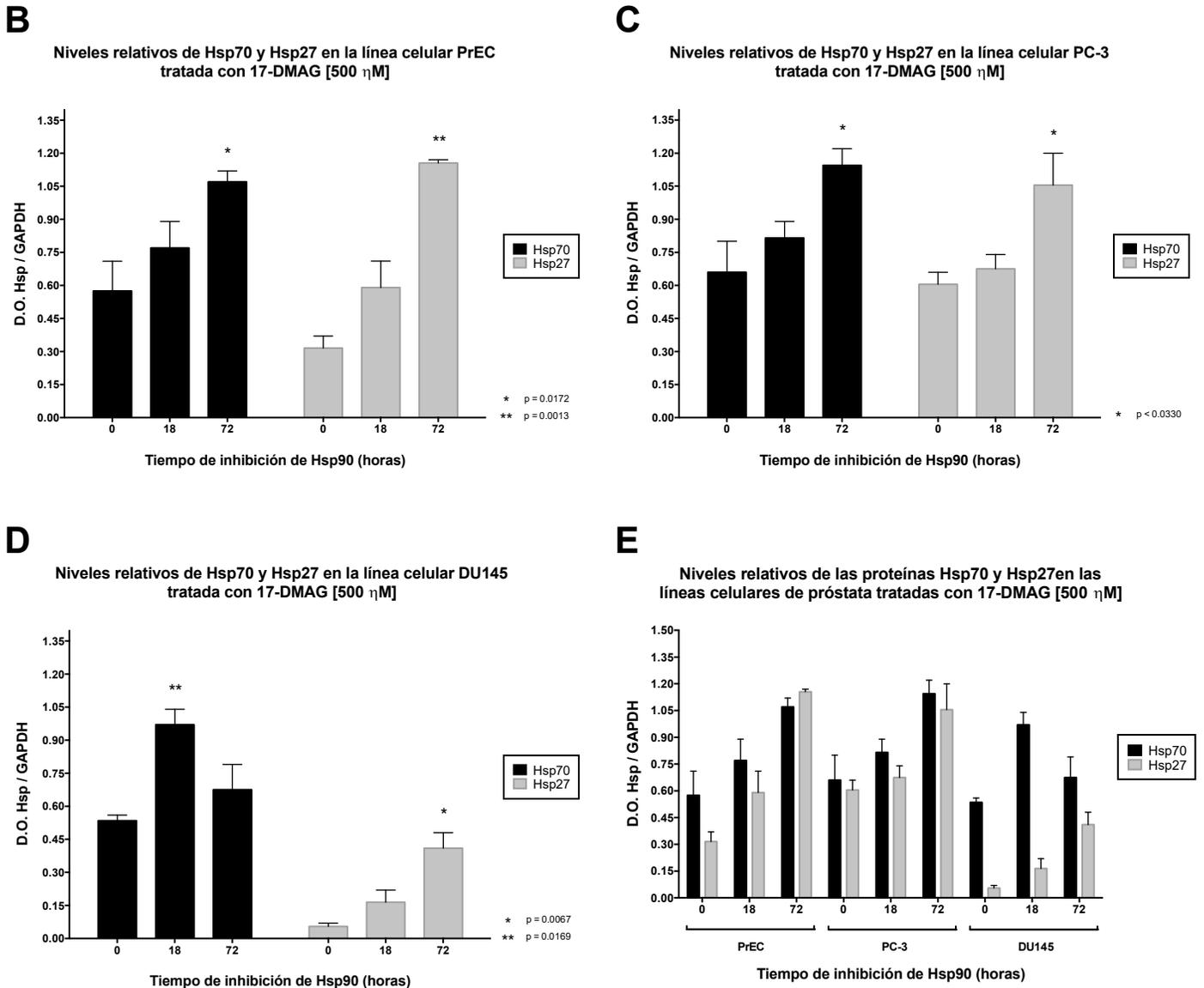


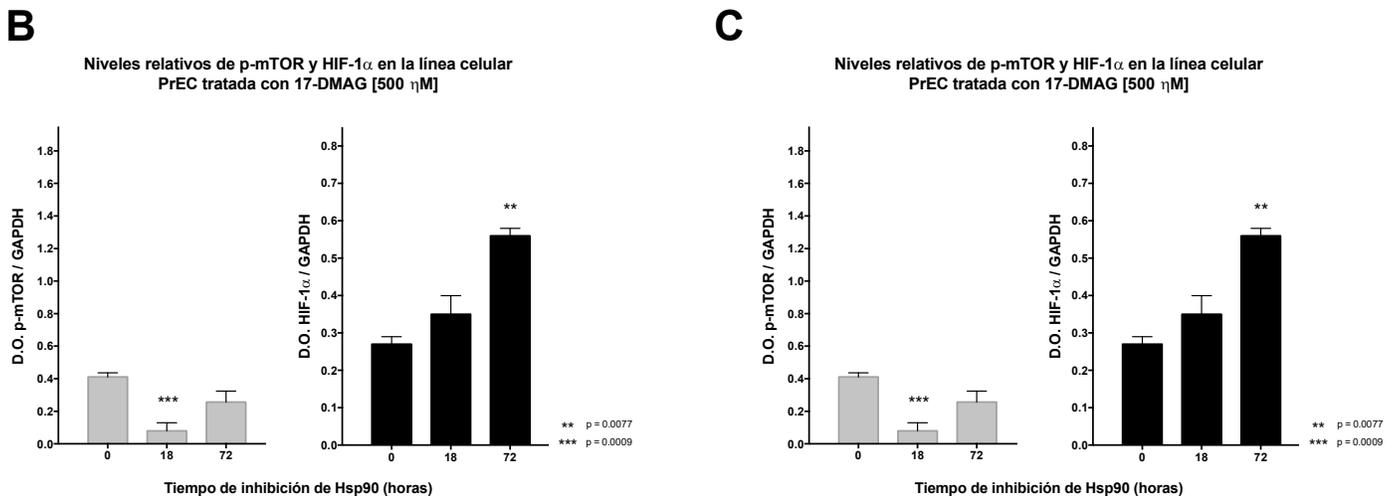
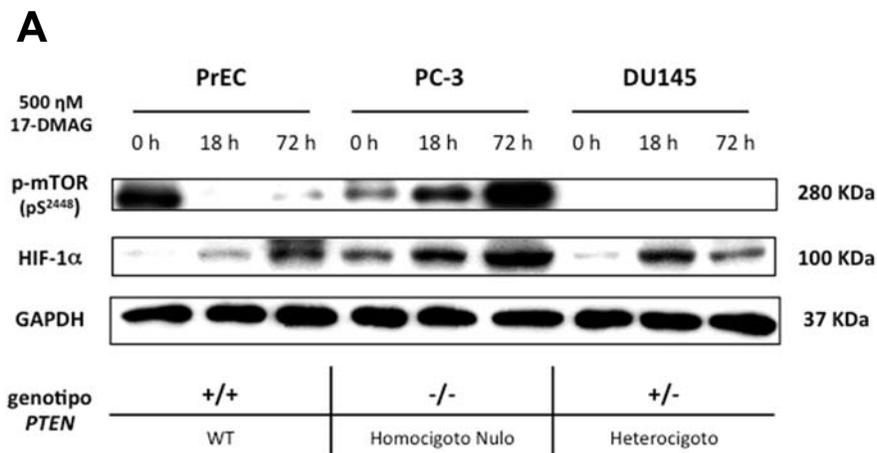
Figura 13. Efecto de la inhibición de Hsp90 sobre el perfil de expresión de las co-chaperonas Hsp70 y Hsp27. Las líneas celulares de próstata PrEC, PC-3 y DU145 fueron tratadas con el inhibidor de Hsp90, 17-DMAG [500 η M] por 18 h y 72 h. (A) El efecto de la inhibición de Hsp90 sobre los perfiles de expresión de Hsp70 y Hsp27 fue evaluado por Western blot. Se muestra de manera gráfica los niveles relativos de Hsp70 y Hsp27 en las líneas celulares PrEC (B), PC-3 (C) y DU145 (D). Los datos representados son la media \pm error estándar de tres experimentos diferentes. Las p se calcularon usando anova de dos vías y prueba de comparación múltiple de Dunnett para la comparación entre el control (0 h) y cada tiempo de cada proteína. (E) Se muestra de manera gráfica y resumida, el efecto del 17-DMAG sobre el perfil de expresión de Hsp70 y Hsp27 en las tres líneas celulares de próstata.

Además se evaluó el efecto del inhibidor 17-DMAG sobre el perfil de expresión de HIF-1 α y los niveles relativos de pmTOR (Figura 14). El tratamiento con el iHsp90 condujo a la disminución de los niveles de pmTOR de una manera tiempo-

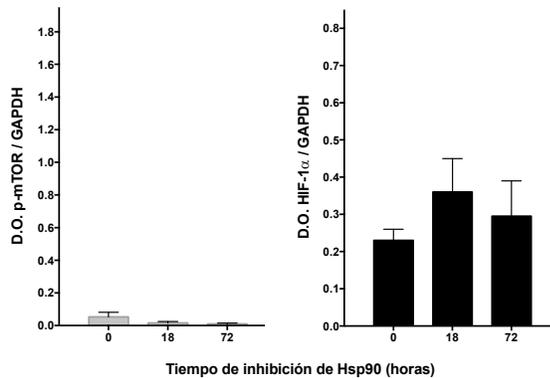


dependiente en la línea celular PrEC (Figura 14.B). Sucedió lo opuesto para la línea celular PC-3, donde la abundancia de p-mTOR fue directamente proporcional al tiempo de inhibición de Hsp90 (Figura 14.C). Por otro lado, no se detectó p-mTOR en la línea celular DU145.

Tanto para la línea celular PrEC como PC-3, el 17-DMAG indujo la sobreexpresión de HIF-1 α . La inhibición de Hsp90 en la línea celular DU145 indujo la sobreexpresión de HIF-1 α después de 18 horas de tratamiento (Figura 14.D). Sin embargo, tras 72 horas de inhibición de la Hsp90, los niveles de expresión de HIF-1 α fueron restablecidos en la células DU145 (Figura 14.A y 14.D).



D

Niveles relativos de p-mTOR y HIF-1 α en la línea celular DU145 tratada con 17-DMAG [500 η M]

E

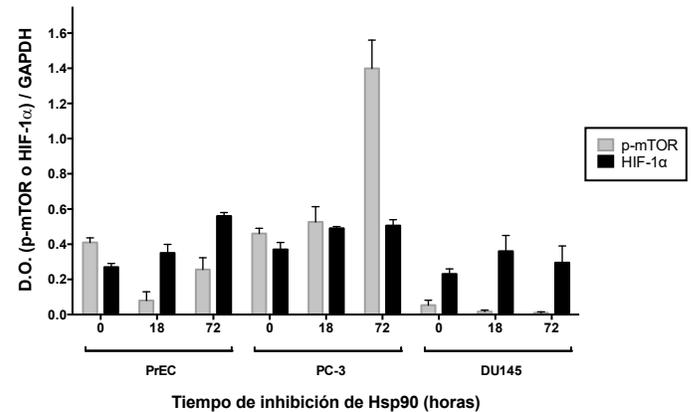
Niveles relativos de las proteínas p-mTOR y HIF-1 α en las líneas celulares de próstata tratadas con 17-DMAG [500 η M]

Figura 14. Efecto de la inhibición de Hsp90 sobre el perfil de expresión de HIF-1 α y los niveles relativos de p-mTOR (pS²⁴⁴⁸). Las líneas celulares de próstata PrEC, PC-3 y DU145 fueron tratadas con el inhibidor de Hsp90, 17-DMAG [500 η M] por 18 h y 72 h. (A) El efecto de la inhibición de Hsp90 sobre el perfil de expresión de HIF-1 α y los niveles relativos de p-mTOR fue evaluado por Western blot. Se muestra de manera gráfica los niveles relativos de HIF-1 α y p-mTOR en las líneas celulares PrEC (B), PC-3 (C) y DU145 (D). Los datos representados son la media \pm error estandar de tres experimentos diferentes. Las p se calcularon usando anova de dos vías y prueba de comparación múltiple de Dunnett para la comparación entre el control (0 h) y cada tiempo de cada proteína. (E) Se muestra de manera gráfica y resumida, el efecto del 17-DMAG sobre el perfil de expresión de HIF-1 α y los niveles relativos de p-mTOR en las tres líneas celulares de próstata.

Se evaluó el efecto de la inhibición de Hsp90 sobre el perfil de expresión de la proteína anti-apoptótica Bcl-2 y la proteína pro-apoptótica BAX (Figura 15).

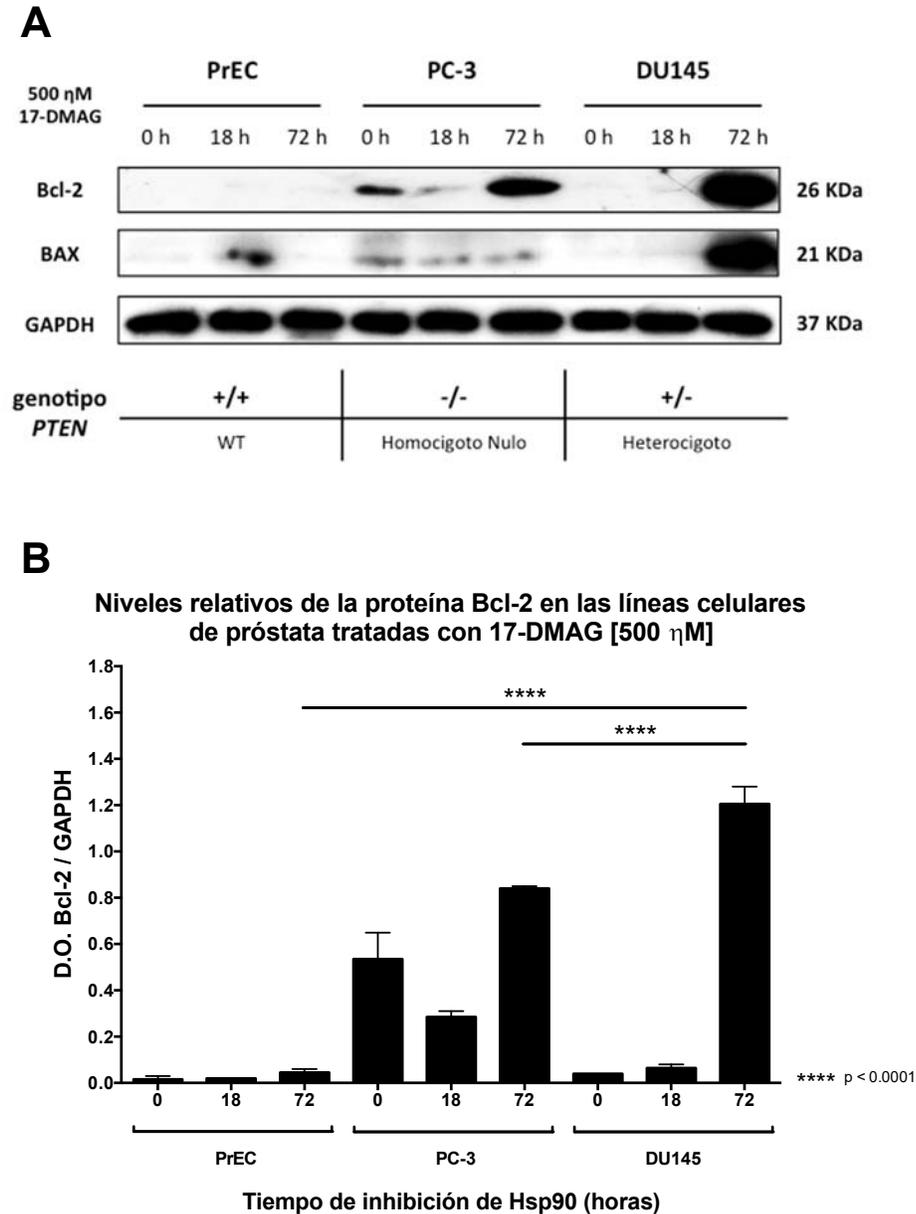
No se detectó a la proteína Bcl-2 en la línea celular PrEC en ninguna de las condiciones (Figura 15.A y 15.B). Por el contrario, tras 18 horas de tratamiento con el iHsp90, se encontró una ligera sobreexpresión de la proteína BAX en las células PrEC, sin embargo a las 72 horas de tratamiento, el perfil de expresión de ésta proteína se reestableció (Figura 15.A y 15.C).

La proteína Bcl-2 fue sobreexpresada tras 72 horas de tratamiendo con el 17-DMAG en la línea celular PC-3 (Figura 15.A y 15.B). Por otra parte, la ligera expresión de BAX se mantuvo casi igual en los tres tiempos evaluados en las células PC-3 (Figura 15.A y 15.C).

Se encontró una marcada sobreexpresión de las proteínas Bcl-2 y BAX en la línea



celular DU145 únicamente tras 72 horas de tratamiento con el 17-DMAG (Figura 15).



C

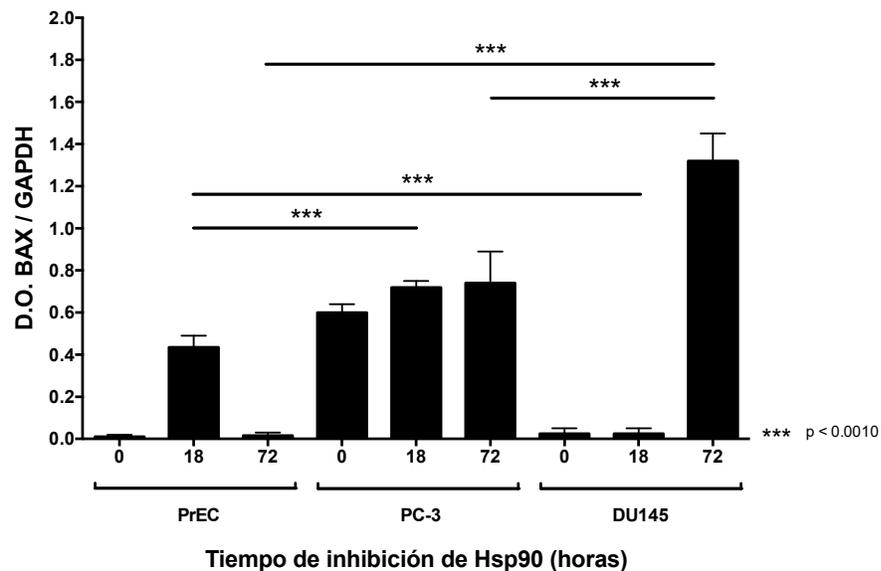
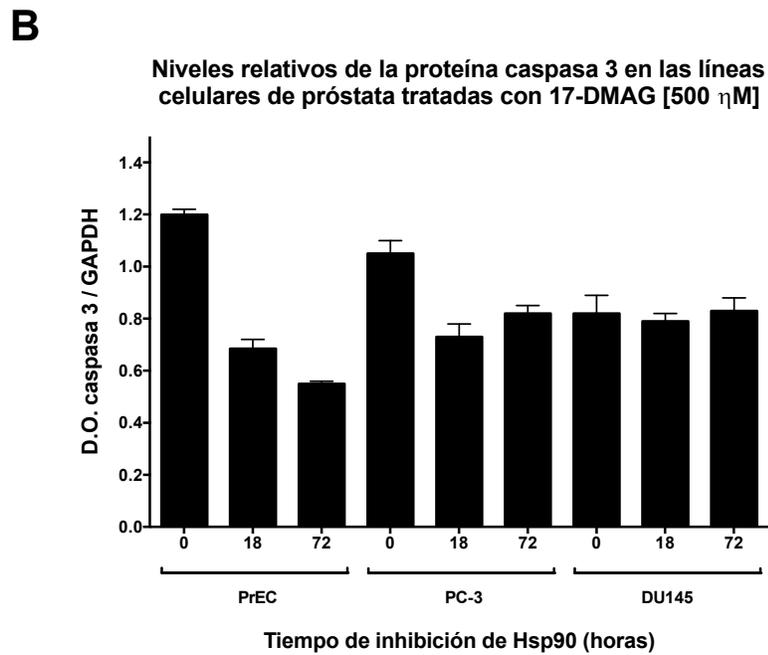
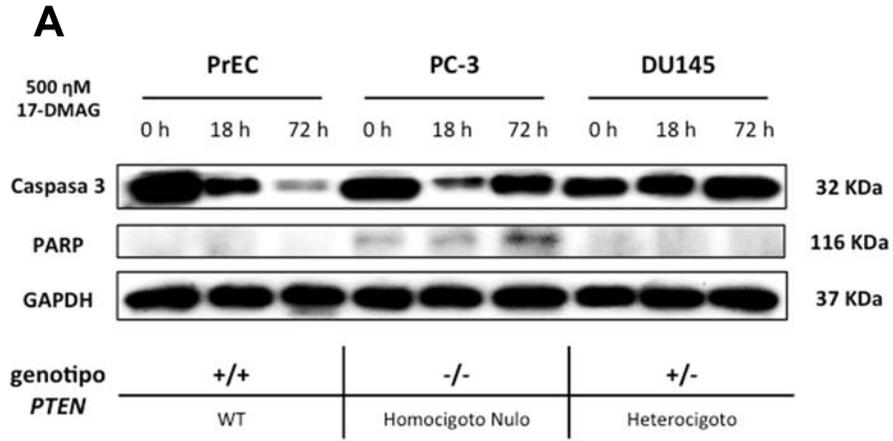
Niveles relativos de la proteína BAX en las líneas celulares de próstata tratadas con 17-DMAG [500 η M]

Figura 15. Efecto de la inhibición de Hsp90 sobre el perfil de expresión de la proteína anti-apoptótica Bcl-2 y la proteína pro-apoptótica BAX. Las líneas celulares de próstata PrEC, PC-3 y DU145 fueron tratadas con el inhibidor de Hsp90, 17-DMAG [500 η M] por 18 h y 72 h. (A) El efecto de la inhibición de Hsp90 sobre el perfil de expresión de Bcl-2 y BAX fue evaluado por Western blot. Se muestra de manera gráfica los niveles relativos de Bcl-2 (B) y BAX (C) en las líneas celulares de próstata PrEC, PC-3 y DU145. Los datos representados son la media \pm error estándar de tres experimentos diferentes. Para el análisis estadístico, se normalizaron los valores con el respectivo control de cada línea y cada proteína. Las p se calcularon usando anova de dos vías y prueba de comparación múltiple de Tukey para la comparación entre las líneas celulares de próstata.

Finalmente se evaluó el efecto del inhibidor 17-DMAG sobre el perfil de expresión de las proteínas caspasa 3 y PARP (Figura 16).

Al parecer la expresión de la caspasa 3 es inversamente proporcional al tiempo de inhibición de Hsp90 en la línea celular PrEC (Figura 16.A y 16.B). Por otro lado, se observó una subexpresión de la caspasa 3 en los grupos tratados con el iHsp90 en la línea celular PC-3 (Figura 16.A y 16.B). No se observaron cambios en los niveles de expresión de la caspasa 3 en la línea celular DU145 (Figura 16.A y 16.B).

Únicamente se encontró a la proteína PARP en la línea celular PC-3. La ligera expresión de PARP parece ser directamente proporcional al tiempo de inhibición de Hsp90 (Figura 16.A y 16.C). Es importante mencionar que no se encontró PARP escindido en ninguna línea celular de próstata (datos no presentados).



C

Niveles relativos de la proteína PARP en las líneas celulares de próstata tratadas con 17-DMAG [500 η M]

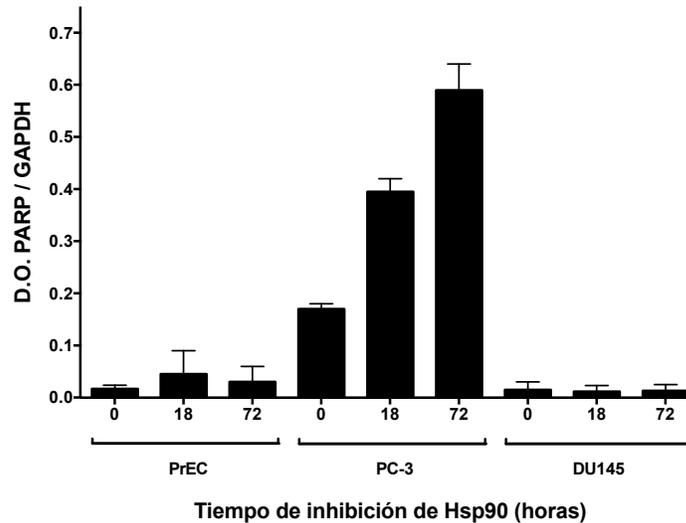


Figura 16. Efecto de la inhibición de Hsp90 sobre el perfil de expresión de Caspasa 3 y PARP. Las líneas celulares de próstata PrEC, PC-3 y DU145 fueron tratadas con el inhibidor de Hsp90, 17-DMAG [500 η M] por 18 h y 72 h. (A) El efecto de la inhibición de Hsp90 sobre el perfil de expresión de caspasa 3 y PARP fue evaluado por Western blot. Se muestra de manera gráfica los niveles relativos de Caspasa 3 (B) y PARP (C) en las líneas celulares de próstata PrEC, PC-3 y DU145. Los datos representados son la media \pm error estandar de tres experimentos diferentes.

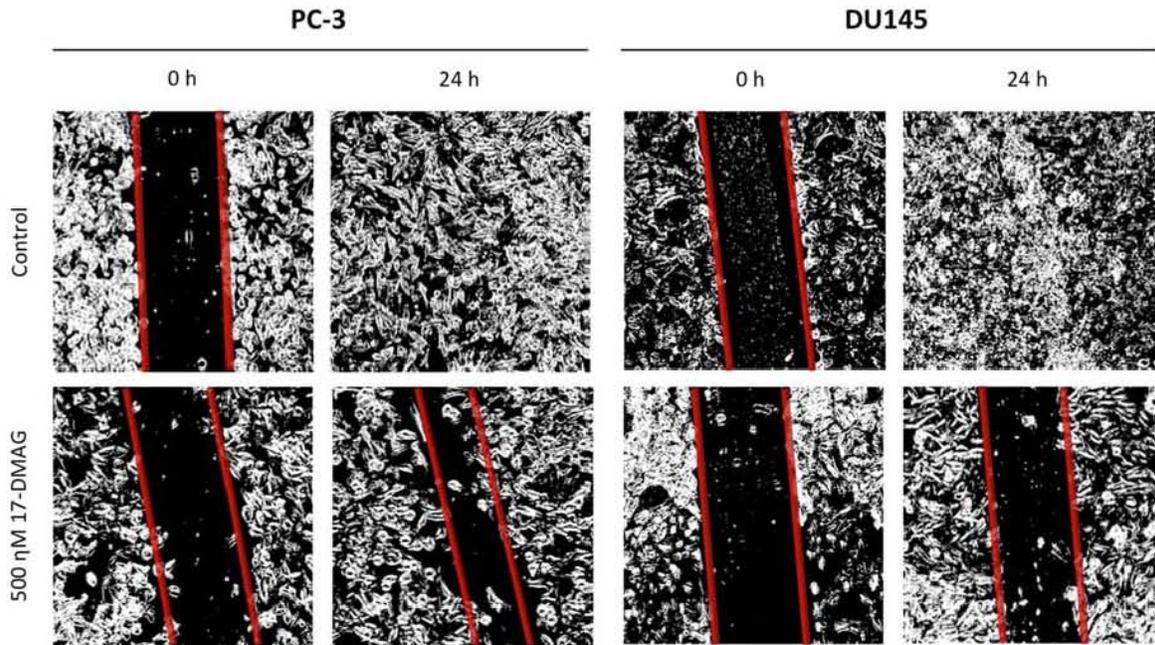
iii. Efecto del inhibidor de Hsp90, 17-DMAG, sobre la migración celular en líneas celulares de cáncer de próstata

Se evaluó la capacidad de migración que poseen las líneas celulares de próstata mediante ensayos de cierre de herida (Figura 17). Las líneas celulares de próstata se trataron con el inhibidor de Hsp90, 17-DMAG, durante 0, 24 y 48 horas respectivamente. Solamente se evaluó la migración de la línea celular PrEC a las 48 horas porque a ese tiempo se observó que el grupo de células control (sin 17-DMAG) fue capaz de cerrar la herida. Como era de esperarse las células control PrEC tardaron más en cerrar la herida que las células control de las líneas de cáncer de próstata. Las células control de las líneas celulares de cáncer de próstata fueron capaces de cerrar la herida a las 24 horas (Figura 17.B).

La inhibición de Hsp90 condujo a una disminución en la capacidad migratoria de todas las líneas celulares de próstata. Sin embargo de las dos líneas celulares de

cáncer de próstata, la línea celular DU145 fue la más sensible a la inhibición de Hsp90, mientras que la línea celular PC-3 pareciera ser resistente al iHsp90, ya que fue capaz de migrar muchísimo más que DU145 (Figura 17.A).

A



B

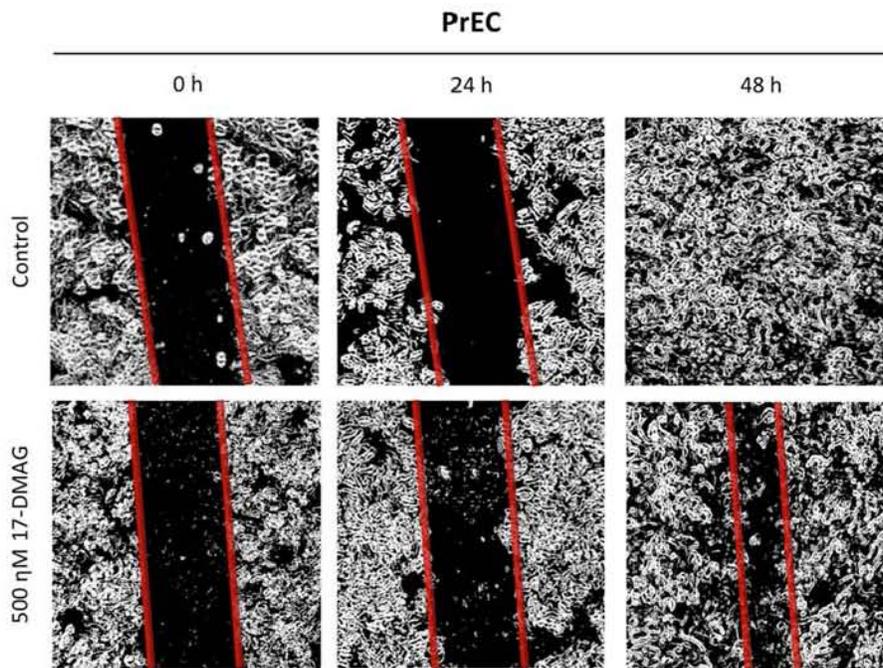


Figura 17. Efecto del inhibidor de Hsp90, 17-DMAG, sobre la migración de las líneas celulares de CaP. Se evaluó de manera cualitativa la migración celular de las líneas celulares de próstata a través del ensayo de cierre de



herida. (A) Se evaluó la migración de las líneas celulares de cáncer de próstata PC-3 y DU145 tratadas (500 η M 17-DMAG) y no tratadas a 0 h y 24 h. Magnificación 400X. (B) Se evaluó la migración de la línea celular normal de próstata PrEC tratada (500 η M 17-DMAG) y no tratada a 0 h, 24 h y 48 h. Magnificación 400X.

iv. Efecto del inhibidor 17-DMAG sobre el ciclo celular en líneas celulares de cáncer de próstata

El efecto del inhibidor 17-DMAG sobre el ciclo celular de las líneas celulares de próstata fue determinado por tinción con yoduro de propidio y citometría de flujo.

De manera general se observó que el iHsp90 condujo a cambios en el ciclo celular de las tres líneas celulares de próstata (Figura 18).

En la línea celular PC-3, después de 72 horas de tratamiento con el 17-DMAG, se observó una disminución en el porcentaje de células en la fase G₁ del ciclo celular y un aumento marcado en el porcentaje de células en la fase S del ciclo celular (Figura 18.A).

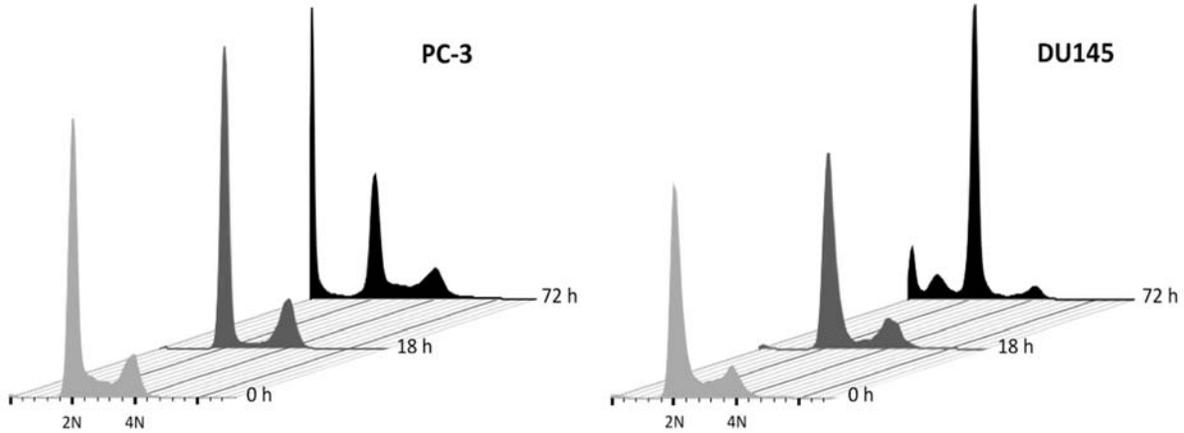
De manera interesante el inhibidor de Hsp90 indujo el arresto en la fase G₁ del ciclo celular de la línea celular DU145 después de 72 horas de tratamiento con el iHsp90 (Figura 18.A).

Además, cabe destacar que el 17-DMAG indujo más muerte celular en la línea celular PC-3 que en DU145 (Figura 18.A).

Por otro lado, el inhibidor 17-DMAG provocó el arresto de las células PrEC en la fase G₂/M del ciclo celular después de 18 horas de tratamiento (Figura 18.B).



A



Línea celular	Tiempo de inhibición de Hsp90 con 17-DMAG [500 η M] (horas)	G ₁ (%)	S (%)	G ₂ /M (%)	Muertas (%)
PC-3	0*	60.4	27.9	11.7	0.0
	18*	67.6	11.2	21.2	0.0
	72*	49.0	34.5	16.5	29.8
DU145	0 *	59.5	34.6	5.9	0.0
	18 *	66.9	22.0	11.1	0.0
	72*	82.4	13.8	3.8	9.5

* 10,000 eventos contados (por grupo)

B

Cambios en el ciclo celular de la línea PrEC tratada con 17-DMAG [500 η M]

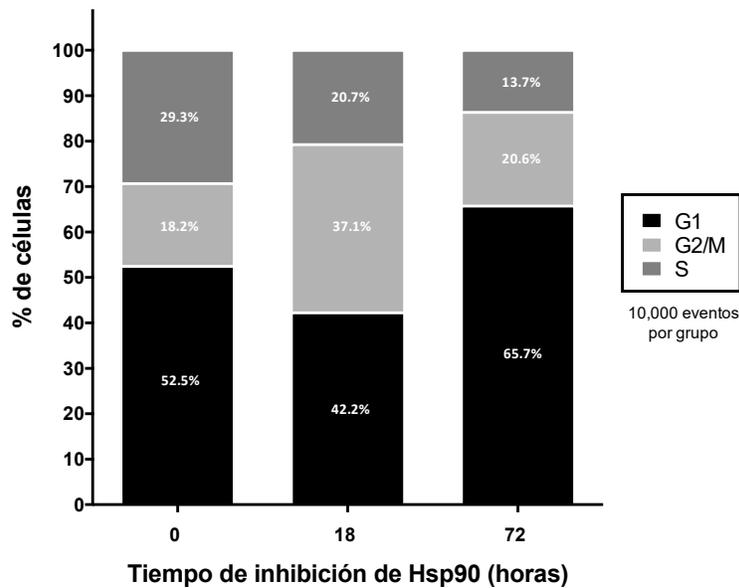


Figura 18. Efecto del inhibidor 17-DMAG sobre el ciclo celular de las líneas celulares de CaP. Se muestran los cambios en el ciclo celular de las líneas celulares de próstata PrEC (B), PC-3 (A) y DU145 (A) tratadas con el inhibidor de Hsp90, 17-DMAG. La distribución del ciclo celular se midió por citometría de flujo utilizando yoduro de propidio. El porcentaje de las fases del ciclo celular se evaluó después de 18 h y 72 h del tratamiento. Se registraron 10³ eventos por grupo.



v. Efecto del inhibidor de Hsp90, 17-DMAG, sobre la integridad del ADN en líneas celulares de cáncer de próstata

Para corroborar los hallazgos encontrados por citometría de flujo y observar el efecto del inhibidor de Hsp90 sobre la integridad del ADN de las tres líneas celulares, se tiñó el ADN con el compuesto 4',6-Diamidino-2-Fenilindol, dihidrocloruro (DAPI).

El 17-DMAG provocó la condensación del ADN en las tres líneas celulares de próstata tras 18 horas de tratamiento (Figura 19), no obstante, se encontró un mayor número de células con ADN condensado en la línea celular PC-3 (Figura 19.B).

Tras 72 horas de tratamiento con el iHsp90, tanto la línea celular PrEC como DU145 fueron capaces de recuperar la integridad de su ADN (Figura 19.A y 19.C). Sin embargo y de manera muy interesante, la línea celular PC-3 fue incapaz de esto y por el contrario, se observó fragmentación del ADN en un gran número de células (Figura 19.B).

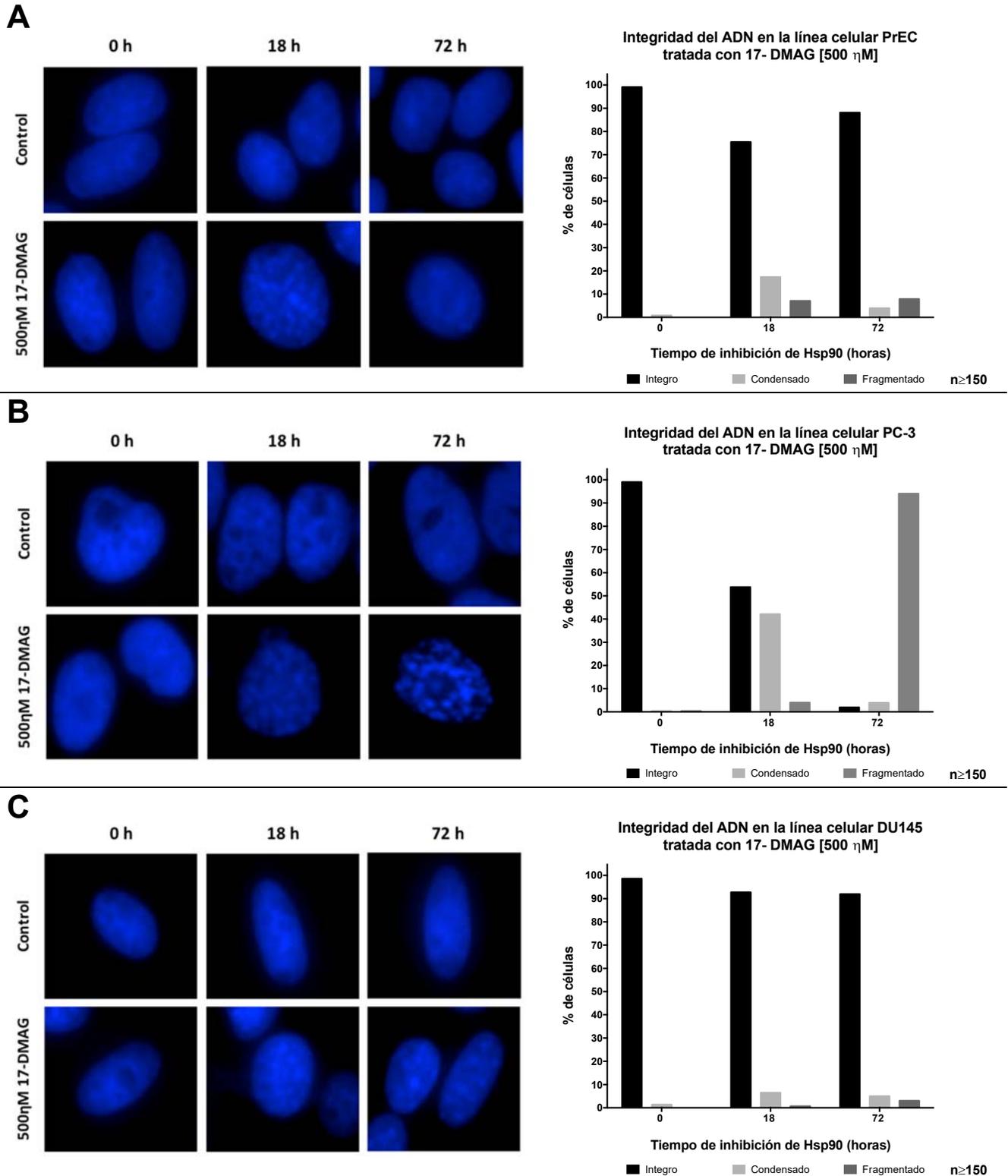


Figura 19. Efecto del inhibidor de Hsp90, 17-DMAG, sobre la integridad del ADN de las líneas celulares de CaP. Las células no tratadas y tratadas con 17-DMAG [500 nM] se tiñeron con DAPI y se observaron bajo un microscopio fluorescente (400X). Se observan cambios morfológicos (condensación de la cromatina y fragmentación del ADN) en las células PrEC, PC-3 y DU145. Se contaron al menos 150 células por grupo de tiempo, para cada línea celular.



DISCUSIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS



En el CaP la expresión de las diferentes isoformas de Hsp90 no había sido determinada, ni su implicación en la resistencia (intrínseca o adquirida) al inhibidor de Hsp90 derivado de la geldanamicina, 17-DMAG. En el presente proyecto se asoció, por primera vez, la expresión de las proteínas Hsp90 α y Hsp90 β , con la resistencia al inhibidor 17-DMAG, en líneas celulares de CaP. Estos hallazgos son novedosos ya que sugieren que los iHsp90 (inespecíficos de isoforma) empleados en la clínica, podrían favorecer la progresión y agresividad (invasión y metástasis) de algunos subtipos de CaP, probablemente a través de las proteínas “cliente” que regula cada isoforma.

i. Efecto del inhibidor de Hsp90, 17-DMAG, sobre la viabilidad celular en líneas celulares de cáncer de próstata

Con base en la literatura, se seleccionaron tres líneas celulares de próstata: PrEC, PC-3 y DU145. Estas líneas celulares poseen diferente genotipo para el gen *PTEN* (Tabla 4), el principal regulador negativo de la vía de señalización PI3K-AKT-mTOR⁽¹⁴⁷⁾.

La evidencia emergente ha demostrado un papel clave del eje de señalización PI3K-AKT-mTOR en el desarrollo y mantenimiento del CaP⁽¹⁴⁷⁾. Se ha demostrado que la desregulación de la vía PI3K-AKT-mTOR como resultado de la pérdida de *PTEN* está asociada con la insensibilidad a andrógenos y con el desarrollo de cáncer de próstata resistente a la castración (CPRC)^(147,148,149). Además, la vía de señalización PI3K-AKT-mTOR que se ve desregulada en la mayoría de los CaP avanzados, sirve como un nexo crítico en la integración de señales de crecimiento con procesos celulares tales como la síntesis de proteínas, la proliferación, la supervivencia, el metabolismo y la diferenciación⁽¹⁴⁷⁾. Por otro lado, los estudios preclínicos han elucidado que existe una interacción dinámica entre la vía de señalización PI3K-AKT-mTOR y el eje andrógeno-AR^(149,150,151,152,153,154).



Una vez seleccionado el modelo experimental, se evaluó el efecto del inhibidor 17-DMAG sobre la viabilidad de las tres líneas celulares de próstata con diferente genotipo.

Se ha informado que la geldanamicina y sus análogos (17-AAG y 17-DMAG), poseen una actividad inhibitoria y afinidad de unión en el intervalo de 0.3-10.0 μM (50,99,155). Sin embargo en este estudio se evaluaron concentraciones en el rango de 50 ηM - 1.0 μM del inhibidor 17-DMAG, ya que se ha observado que la adición de los inhibidores en concentraciones nanomolares a los medios de cultivo, dan lugar a concentraciones micromolares intracelulares, debido a su acumulación (50,156,157). Al emplear concentraciones en el rango de 50 ηM - 1.0 μM del iHsp90 nos aseguramos que los cambios en la viabilidad celular fueron el resultado biológico de la inhibición de Hsp90 y no de un efecto citotóxico del 17-DMAG. Todas las concentraciones del iHsp90 provocaron la disminución de la viabilidad celular de las tres líneas celulares de próstata de una manera tiempo-dependiente. No obstante, se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre la viabilidad de las líneas celulares de próstata a una concentración de 500 ηM . Después de 18 horas de tratamiento con 17-DMAG [500 ηM], la línea celular PC-3 mostró ser resistente a la inhibición de Hsp90, en comparación con las otras líneas celulares. Esto sugiere que la línea celular de cáncer de próstata PC-3, posee una resistencia intrínseca al inhibidor 17-DMAG. Curiosamente, después de 72 horas de tratamiento con 500 ηM del iHsp90, las tres líneas celulares alcanzaron el mismo porcentaje de viabilidad celular.

La evidencia sugiere que en varias líneas celulares tumorales, incluidas las de próstata, Hsp90 podría estar complejada con co-chaperonas en un estado de alta afinidad por ATP/ADP, mientras que en tejidos normales Hsp90 podría existir principalmente en un estado latente de baja afinidad, sin asociarse a otras proteínas (92,158). Kamal *et al.* han proporcionado pruebas bioquímicas y celulares de que los iHsp90 derivados de la geldanamicina se unen con una alta afinidad e inhiben principalmente a los complejos multiproteicos de Hsp90 que consisten de Hsp90, Hsp70, Hsp40, Hop y p23 (92). El hecho de que la línea celular PC-3 fuera menos sensible al 17-DMAG después de 18 horas de tratamiento, probablemente



se debe a que a ese tiempo, la fracción de Hsp90 que se encontraba formando complejos multiproteicos no era tan abundante.

Por otro lado, se ha propuesto que las propiedades fisicoquímicas de las ansamicinas dan lugar a su acumulación intracelular, lo que conduce a una actividad antiproliferativa potente ^(50,156,157). Probablemente a las 18 horas de tratamiento con el 17-DMAG [500 η M] no hubo una acumulación suficiente del iHsp90, capaz de inhibir la proliferación de la línea celular PC-3, esto explicaría por qué la línea celular mostró resistencia. Si la acumulación intracelular del 17-DMAG y por lo tanto su efecto anti-proliferativo, son directamente proporcionales al tiempo del tratamiento, entonces esto explicaría por qué tras 72 horas de tratamiento, las tres líneas celulares de próstata alcanzaron el mismo porcentaje de proliferación celular. Es necesario demostrar que la acumulación del inhibidor 17-DMAG, es responsable del efecto observado en la viabilidad celular a las 72 h de tratamiento en las tres líneas celulares de próstata, para ello se podrían tratar las células con 17-DMAG marcado radiactivamente y tras 18 h y 72 h de tratamiento medir la radioactividad asociada a las células.

Las tres líneas celulares de próstata empleadas en este estudio, poseen diferente genotipo y fenotipo y ello determinó en parte la resistencia o sensibilidad al 17-DMAG. Además la resistencia a los iHsp90 se puede ver influenciada por la activación/inactivación del fármaco, las diferentes isoformas de Hsp90, el eflujo del fármaco, la inhibición de la muerte celular, la heterogeneidad celular inherente o cualquier combinación de estos factores.

ii. Efecto del inhibidor 17-DMAG sobre los niveles relativos de las proteínas Hsp90 α , Hsp90 β , cochaperonas y proteínas “cliente” de Hsp90 en líneas celulares de cáncer de próstata

- Hsp90 α y Hsp90 β



El paradigma actual y en particular el de este estudio, fue determinar la participación de las principales isoformas citoplásmicas de Hsp90, Hsp90 α y Hsp90 β , en la resistencia (ya sea intrínseca o adquirida) al inhibidor 17-DMAG. Para ello, se determinó el efecto del inhibidor 17-DMAG [500 η M] sobre el perfil de expresión de Hsp90T, Hsp90 α y Hsp90 β , en las líneas celulares de próstata, a través de ensayos de Western blot.

La inhibición de Hsp90 con 17-DMAG indujo cambios en los perfiles de expresión de las principales isoformas citoplásmicas de Hsp90 en las líneas celulares de próstata. Estudios recientes sugieren que algunos iHsp90 pueden ser selectivos de isoforma y, por lo tanto, afectar de diferente manera la expresión y actividad de cada una de las isoformas de Hsp90 ^(134,135). La existencia de una mayor fracción de Hsp90 α o Hsp90 β en complejos multichaperónicos con alta afinidad por proteínas cliente, podría explicar porque algunos iHsp90 son selectivos de isoforma, ya que estos complejos multiproteicos poseen una mayor afinidad por los iHsp90.

La expresión de Hsp90 α y Hsp90 β se vio claramente influenciada por el tiempo de exposición al iHsp90. La línea celular de cáncer de próstata PC-3, que mostró resistencia al 17-DMAG a las 18 horas de tratamiento, sobreexpresó Hsp90 α de una manera tiempo-dependiente. Por otro lado, la línea celular DU145 sobreexpresó Hsp90 α tras 18 horas de tratamiento, sin embargo a las 72 horas se observó que los niveles de Hsp90 α fueron reestablecidos.

Estos hallazgos son relevantes y novedosos, ya que no ha sido reportado, que la expresión de Hsp90 α y Hsp90 β varíe entre líneas celulares de un mismo tipo tumoral. Mucho menos han sido descritas las diferencias en la expresión Hsp90 α y Hsp90 β en líneas celulares de próstata tratadas con un iHsp90.

- Papel Hsp70 y Hsp27

Hsp90 es un regulador negativo del factor de transcripción de choque térmico 1 (HSF-1), de tal manera que la inhibición de Hsp90 conduce a la formación de homotrimeros activos de HSF-1 necesarios para la inducción de la respuesta de



choque térmico ^(159,160). La respuesta de choque térmico se ha reconocido como una de las causas más importantes de resistencia adquirida a los inhibidores de Hsp90 del dominio N-terminal ⁽¹⁰⁸⁾. Las chaperonas que están sujetas a una fuerte inducción por HSF-1 (notablemente son Hsp70 y Hsp27) tienen importantes funciones que favorecen la supervivencia al inhibir al citocromo c y la muerte celular mediada por TNF ^(126,127,161,162). Varios estudios han demostrado que la regulación positiva de estas chaperonas conduce a la evasión de la apoptosis ⁽¹⁰⁸⁾.

Como se esperaba, la inhibición de Hsp90 con el 17-DMAG indujo la sobreexpresión de Hsp70 y Hsp27 de una manera tiempo-dependiente en las líneas celulares PrEC y PC-3. Estos hallazgos son interesantes ya que como se verá en los apartados siguientes, la sobreexpresión de Hsp70 y Hsp27 en la línea celular PC-3, no fue asociada a la supervivencia celular. A pesar de que las funciones anti-apoptóticas de las proteínas Hsp70 y Hsp27 han sido ampliamente descritas, en los últimos años se ha hablado de que su función depende del tipo tumoral y del contexto celular. Existen estudios que han demostrado contundentemente que tanto Hsp70 como Hsp27 son capaces de sensibilizar a las células a ciertos estímulos apoptóticos ^(163,164,165,166,167). Por el contrario, la sobreexpresión de Hs27 y Hsp70 fue asociada con la sobrevivencia de la línea celular PrEC.

No obstante, para la línea celular DU145 sólo se observó la sobreexpresión de Hsp70 a las 18 horas ya que tras 72 horas de inhibición, los niveles de Hsp70 disminuyeron (algo similar a lo ocurrido con la expresión de Hsp90 α). Por otra parte, solamente se observó sobreexpresión de Hsp27 a las 72 horas de tratamiento. La expresión tardía de Hsp27 y el reestablecimiento de los niveles de expresión de Hsp70 en ésta línea celular, probablemente se debe a que el 17-DMAG no es insulto fisiológico capaz de inducir una respuesta al estrés.

- p-mTOR y HIF-1 α



En nuestro modelo de estudio, las dos líneas celulares de cáncer de próstata tienen defectos en la vía de señalización PI3K-AKT-mTOR. Dentro de esta vía de señalización, mTOR juega un papel clave en la activación de proteínas río abajo.

mTOR es una proteína cinasa de serina/treonina, que se expresa de forma ubicua en todo el cuerpo, capaz de modular el metabolismo, la supervivencia celular, la transcripción génica y los componentes del citoesqueleto ⁽¹⁶⁸⁾. mTOR existe en dos complejos distintos denominados como mTOR complejo 1 (mTORC1) y complejo 2 (mTORC2) ^(169,170). mTOR se activa a través de la fosforilación de sus residuos específicos en respuesta a factores de crecimiento, nutrientes, mitógenos y hormonas ⁽¹⁶⁸⁾. La serina 2448 es un blanco de fosforilación de la cinasa AKT y la cinasa p70 ribosomal S6 (p70S6K) y ocurre predominantemente en mTORC1 ^(168,171). El hallmark del cáncer mejor caracterizado en el que contribuye mTORC1 es la angiogénesis a través de la proteína HIF-1 α ^(168,172,173,174). La activación de mTORC1 estabiliza el factor inducible de hipoxia 1-alfa (HIF-1 α), ésta última es una oncoproteína implicada en la angiogénesis, el efecto de Warburg y la metástasis ^(168,173,175,176). HIF-1 α es una oncoproteína que orchestra una amplia gama de procesos intracelulares que conducen a la adaptación de las células tumorales a su microambiente hostil ^(177,178).

La síntesis de HIF-1 α es regulada a través de mecanismos independientes de O₂, mientras que su degradación se regula principalmente a través de mecanismos dependientes de O₂ ^(177,178). Dentro de los mecanismos independientes de O₂ que se encuentran desregulados en el CaP destacan la vía de señalización P13K-AKT-mTOR, Hsp90, Ras/Raf/MEK ^(177,178). Cabe destacar que HIF-1 α es proteína “cliente” de Hsp90 ^(177,178).

A diferencia de lo descrito en la literatura ^(2,3,59), el tratamiento con 17-DMAG no provocó la disminución de la proteína “cliente” de Hsp90, HIF-1 α , en ninguna de las líneas celulares de próstata. A la fecha no se ha reportado si HIF-1 α es una proteína “cliente” de Hsp90 α y/o de Hsp90 β . Sin embargo se ha reportado que los iHsp90 son selectivos de isoforma y eso afecta la expresión y abundancia de las proteínas “cliente” de cada isoforma de Hsp90. Al parecer la abundancia de HIF-



1 α depende de Hsp90 α , ya que el perfil de expresión de ambas proteínas en las tres líneas celulares de próstata es muy parecido.

En la línea celular PC-3 se observó que los niveles de p-mTOR (serina 2448) y de HIF-1 α incrementaron de una manera tiempo-dependiente. La sobreexpresión de HIF-1 α fue asociada con la activación de mTOR en la línea celular PC-3.

Por otra parte en la línea celular PrEC, los niveles de p-mTOR (serina 2448) disminuyeron abruptamente como consecuencia del tratamiento con el 17-DMAG. No obstante se observó un incremento tiempo-dependiente en la expresión de HIF-1 α . Probablemente el incremento en los niveles de HIF-1 α fue provocado por una acumulación de ésta proteína o porque su síntesis fue estimulada por otra vías de señalización.

De manera interesante no se encontró a p-mTOR (serina 2448) en la línea celular DU145 en ninguna de las condiciones evaluadas. Por otro lado, se encontró que la inhibición de Hsp90 condujo a una sobreexpresión de HIF-1 α tras 18 horas de tratamiento, sin embargo a las 72 horas se observó que los niveles de ésta proteína disminuyeron. No cabe duda que los cambios en los niveles de HIF-1 α son independientes de p-mTOR. Seguramente la expresión o acumulación de HIF-1 α se ve influenciada por otras vías tales como las vías relacionadas con pVHL, la vía FIH-1, la vía de degradación proteasomal mediada por Mdm2-p53, Ras/Raf/MEK, entre otras ^(177,178).

- Bcl-2, BAX, Caspasa 3 y PARP.

Diferentes estímulos pueden provocar que una célula sufra apoptosis, ya sea por la vía de muerte intrínseca o mitocondrial, o por la vía de muerte extrínseca o mediada por receptores ⁽¹⁰⁸⁾. Ambas vías (intrínseca o extrínseca) tienen como denominador común la inhibición o activación de proteínas de la familia de proteínas Bcl-2. Dentro de esta familia están incluidas proteínas pro-apoptóticas (por ejemplo, Bax) y anti-apoptóticas (por ejemplo, Bcl-2) ⁽¹⁰⁸⁾. Éstas proteínas son capaces de promover o inhibir la apoptosis, respectivamente, a través de su acción directa sobre el poro de transición de permeabilidad mitocondrial (MPT)



(108). Bax forma el poro, mientras que Bcl-2 inhiben su formación (108). En general, la apoptosis se produce en respuesta a la liberación de citocromo c mitocondrial, que luego se une al apoptosoma Apaf-1/caspasa-9 (108). El apoptosoma escinde a la pro-caspasa-9 dando lugar a la forma activa: caspasa-9, ésta a su vez activa a la caspasa-3 (108).

PARP es una proteína con dominios de unión al ADN (dedos de Zinc) que cataliza la síntesis de poli(ADP-ribosa) a partir de su sustrato β -NAD⁺ (179). PARP está implicada en la cascada de señalización que se desencadena por el daño al ADN y en el mantenimiento de la estabilidad genómica (179). PARP puede ser escindida selectivamente por las caspasas durante la apoptosis volviendola incapaz de responder al daño del ADN (179). La escisión de PARP es catalizada por la caspasa 7 pero principalmente por la caspasa 3 (180,181,182). Puesto que PARP es una de las potenciales moléculas diana de las caspasas efectoras (activas o escindidas), la escisión de PARP se ha considerado como una evidencia de la activación de caspasas y se ha utilizado ampliamente como una característica distintiva de la apoptosis celular (179,180,181,182).

La línea celular PC-3 fue la única línea celular donde se encontró a PARP, al parecer el tratamiento con 17-DMAG indujo ligeramente la expresión de esta proteína de una manera tiempo-dependiente. Además, es importante mencionar que no se encontró PARP escindido en ninguna línea celular. Esto sugiere que la muerte celular que genera el 17-DMAG en estas líneas celulares de próstatas es independiente de la activación de caspasas.

De manera interesante la línea celular de cáncer de próstata DU145, sobreexpresó las proteínas BAX y Bcl-2 sólo después de 72 horas de tratamiento con 17-DMAG. Esto sugiere que el 17-DMAG induce estrés mitocondrial, sin embargo ésta línea celular es capaz de mantener el equilibrio entre las proteínas pro- y anti-apoptóticas, de hecho, como se verá mas adelante, ésta línea celular mostró ser resistente al tratamiento.

La expresión de BAX y Bcl-2 varía con respecto al tiempo de inhibición de Hsp90 en la línea celular PC-3, sin embargo se observa que a las 72 h de tratamiento hubo una marcada sobreexpresión de Bcl-2. A pesar de que la proteína anti-



apoptótica fue sobreexpresada a las 72 h la línea celular PC-3 fue sensible al tratamiento (se muestra en las secciones siguientes).

A las 72 horas de tratamiento no hubo expresión de Bcl-2 ni de BAX en la línea celular PrEC sin embargo, como se verá más adelante ésta línea celular mostró ser resistente al tratamiento con 17-DMAG.

Finalmente, no se observaron cambios significativos en la expresión de caspasa 3 total en ninguna de las líneas celulares de próstata.

Bcl-2 y Bax no son las únicas proteínas anti y pro-apoptóticas dentro de la célula que dictaminan el destino de una célula. La resistencia que mostraron las líneas celulares PrEC y DU145 se puede deber a la participación o cambios en la expresión de otras proteínas tales como, survivina, Apaf-1, NF- κ B, Bad y Bcl-XL.

iii. Efecto del inhibidor de Hsp90, 17-DMAG, sobre la migración celular en líneas celulares de cáncer de próstata

Empleando nuestro modelo de inhibición de Hsp90, se evaluó el efecto del inhibidor sobre la migración celular de las líneas celulares de CaP. El 17-DMAG provocó cambios en la migración de las tres líneas celulares de próstata. De las dos líneas celulares de cáncer de próstata, las células tumorales DU145 fueron las más sensibles al tratamiento con el 17-DMAG, por el contrario la línea celular PC-3 fue la menos sensible a la inhibición de Hsp90. Como se esperaba de una línea celular normal de próstata y a diferencia de las células tumorales, las células control PrEC tardaron 48 horas en cerrar la herida, incluso tratándolas con el 17-DMAG no fueron capaces de cerrar la herida a las 48 horas.

La fuerte inhibición de la migración no podía explicarse únicamente por la reducción en la viabilidad o proliferación de las líneas celulares de próstata. Algunos estudios han demostrado por Western blot que los mecanismos complejos que subyacen a los efectos anti-migratorios y anti-invasivos de los iHsp90, implican múltiples vías de señalización aparentemente específicas de líneas celulares y tipo mural ^(183,184).



Se ha demostrado además que los iHsp90 regulan a la baja la expresión de varias proteínas “cliente” de Hsp90 tales como ILK1, Raf-1, MEK, FAK/p-FAK, y también alteran la expresión y abundancia de las proteínas RhoA y Erk2, todas estas proteínas están involucradas en la regulación del citoesqueleto de actina, la adhesión celular y la motilidad ^(183,184). Esto explicaría por que el 17-DMAG disminuyó la migración de las líneas celulares.

De particular relevancia para este estudio, las vías de señalización Ras/Raf/MEK/MAPK y PI3K-AKT-mTOR desempeñan un papel clave en la regulación de la migración e invasión de las células tumorales ^(183,184,185,186).

De manera interesante, la migración de las líneas celulares de cáncer de próstata se asoció con su capacidad para mantener la expresión de Hsp90 β . Esta reportado en la literatura que PC-3 es una línea celular agresiva, invasiva y metástasica ⁽¹⁴⁶⁾, ésta línea celular matuvo la expresión de Hsp90 β hasta las 72 horas de tratamiento con el 17-DMAG. Por el contrario, en la línea celular DU145 el tratamiento con el 17-DMAG provocó la disminución en los niveles de expresión de Hsp90 β .

iv. Efecto del inhibidor 17-DMAG sobre el ciclo celular en líneas celulares de cáncer de próstata

Las células tumorales tratadas con iHsp90 derivados de ansamicinas (como lo es el 17-DMAG) generalmente arrestan las células en la fase G₂/M del ciclo celular, sin embargo, algunas líneas celulares son arrestan en la fase G₁ ^(187,188,189,190). Los mecanismos moleculares que subyacen al arresto de las células tumorales, en alguna fase del ciclo celular en particular, son dependientes del tipo celular e implican la interrupción de múltiples y diferentes vías responsables de la señalización mitogénica ^(188,189).

El tratamiento con el 17-DMAG provocó cambios en el ciclo celular de las tres líneas celulares de próstata.



Se ha descrito que la inhibición de Hsp90 tiene como consecuencia primaria la detención del ciclo celular en la fase G₁ a causa de hipofosforilación de la proteína retinoblastoma (RB) y la regulación a la baja de las vías que requieren de la cinasa dependiente de ciclina tipo D ^(187,188). La subexpresión de la ciclina D debido al tratamiento con los iHsp90 derivados de ansamicinas parece ser uno de sus principales mecanismos de acción ^(187,188). Esto explica porque el tratamiento con 17-DMAG indujo la disminución abrupta de la fase S y el arresto en la fase G₁ del ciclo celular en la línea DU145 después de 72 horas de tratamiento.

Se ha reportado en la literatura que el arresto de las células en la fase G₂/M del ciclo celular como consecuencia del tratamiento con los iHsp90 se debe primordialmente a la regulación negativa de las proteínas cdc25c y cdc2 y a la pérdida subsiguiente de la actividad de cinasa de cdc2 ^(189,190). El tratamiento con los iHsp90 derivados de la ansamicina afecta la estabilidad de estas proteínas, induciendo su degradación ^(189,190). Ambas proteínas cdc2 y cdc25c son proteínas “cliente” de Hsp90. Cdc2 (o cdk1) es la cinasa dependiente de ciclina responsable de la entrada y salida de la fase G₂ y mitosis ^(189,190). Esto explica porque el tratamiento con 17-DMAG provocó el arresto celular en la fase G₂/M del ciclo celular en la línea PrEC después de 18 horas de tratamiento. Sin embargo tras 72 horas de tratamiento se observó una disminución de la fase S y arresto en la fase G₁ del ciclo celular ésta línea celular (comparando contra el control).

Como era de esperar, la proporción de células muertas también aumentó con el aumento del tiempo de exposición al iHsp90, lo que sugiere que la muerte celular es el principal contribuyente a la actividad antiproliferativa de 17-DMAG a las 72 horas de tratamiento pero no a las 18 horas. Es importante destacar que el inhibidor 17-DMAG provocó más muerte celular en la línea PC-3 en comparación con la línea celular DU145 (a las 72).

Como se verá mas adelante, el arresto en la fase G₁ del ciclo celular de las líneas celulares PrEC y DU145, a las 72 horas de tratamiento, fue asociado con la resistencia que presentaron estas líneas celulares al 17-DMAG.



v. Efecto del inhibidor de Hsp90, 17-DMAG, sobre la integridad del ADN en líneas celulares de cáncer de próstata

Se ha descrito que las células que sufren apoptosis presentan cúpulas de ampollas, retracción nuclear e irregularidad en su forma ⁽¹⁹¹⁾. Además las células apoptóticas pueden ser identificadas por la condensación de la cromatina ^(192,193).

La inhibición de Hsp90 con el 17-DMAG provocó cambios en la morfología celular de las tres líneas celulares de próstata, sin embargo la morfología de la línea celular PC-3 fue la más afectada (datos no mostrados).

La tinción con DAPI ha sido ampliamente utilizada para hacer evidente la condensación de la cromatina y para identificar a las células apoptóticas ^(194,195,196,197,198). La intensidad de la tinción con DAPI aumenta cuando la cromatina en los núcleos se condensa en varios pequeños gránulos, una morfología nuclear típica observada cuando las células están atravesando por un proceso de muerte de celular ^(192,193).

El 17-DMAG indujo cambios en la integridad del ADN de todas las líneas celulares de próstata. Tras 18 horas de tratamiento se observó una condensación de la cromatina en todas las líneas celulares.

De manera interesante las líneas celulares PrEC y DU145 fueron capaces de recuperar la integridad de su ADN después del 72 horas de tratamiento. No obstante el 17-DMAG provocó la fragmentación del ADN en la línea celular PC-3, después de 72 horas.

En resumen, el desarrollo de la heterogeneidad celular dentro de los tumores de CaP es una característica importante para la promoción y progresión de estas neoplasias. No sólo este fenómeno es científicamente desafiante, sino que también tiene profundas connotaciones en el tratamiento del CaP. La generación de variantes resistentes a los fármacos con diferentes capacidades biológicas es un área de la biología del cáncer que está recibiendo atención considerable. Por lo



tanto, el estudio del papel de Hsp90 para la comprensión de las bases de la evolución del fenotipo maligno en el CaP es un paso lógico.

Las redes de interacciones que han surgido de experimentos a gran escala demuestran que Hsp90 desempeña un papel central en múltiples vías de señalización y procesos celulares que favorecen la transformación y progresión maligna de las células de la próstata. Es por esto que Hsp90 ha surgido como una potencial diana para el tratamiento del CaP, sin embargo en algunas circunstancias y modelos celulares específicos, se ha observado que los inhibidores de Hsp90 pueden promover en lugar de inhibir la progresión del cáncer. Esta discrepancia podría estar relacionada con la inhibición preferencial de los iHsp90 por Hsp90 α o Hsp90 β (depende del fármaco y del tipo de celular).

Debido a esto, en este proyecto se estudió el papel de las principales isoformas citoplásmicas de Hsp90, Hsp90 α y Hsp90 β , en la resistencia al efecto pro-apoptótico y anti-proliferativo del inhibidor 17-DMAG, en células de CaP. En conjunto, nuestro estudio identificó que el 17-DMAG posee una alta actividad contra la línea celular PC-3 (*PTEN -/-*) y una baja citotoxicidad contra las líneas celulares PrEC (*PTEN +/+*) y DU145 (*PTEN +/-*). El 17-DMAG indujo cambios en el perfil de expresión de Hsp90 α y Hsp90 β en las tres líneas celulares de próstata, sin embargo la línea celular PC-3, que mostró ser sensible al inhibidor 17-DMAG después de 72 horas de tratamiento, fue incapaz de reestablecer sus niveles de Hsp90 α . Por otro lado la resistencia adquirida por la línea celular DU145 al 17-DMAG, después de 72 horas de tratamiento, fue asociada al restablecimiento de los niveles de Hsp90 α y al arresto en la fase G₁ del ciclo celular. Además la migración celular de las líneas celulares de próstata fue asociada con la capacidad de éstas para mantener la expresión de Hsp90 β .

Es claro que la muerte generada por el 17-DMAG en la línea celular PC-3 no fue dependiente de caspasas, por lo que la vía de apoptosis no fue la responsable de la fragmentación del ADN en ésta línea celular. Es necesario evaluar la expresión y participación de otras proteínas involucradas en otros procesos de muerte celular. Se ha sugerido que otras variantes de la apoptosis, así como la necrosis y



autofagia pueden ser responsables de la muerte celular como resultado de la inhibición de Hsp90.

Nuestros datos sugieren que las vías de señalización que se encuentran prendidas en las líneas celulares de próstata estudiadas, son diferentes. Muchos estudios sugieren que Hsp90 α y Hsp90 β , podrían tener diferentes funciones en las células (134,135,138,139,140,141,142,143,144). Probablemente existen vías de señalización desreguladas en los diferentes subtipos de CaP donde la participación de alguna isoforma de Hsp90 en específico es imprescindible.

Se hace cada vez más evidente el papel específico de la expresión de las isoformas de Hsp90 en la iniciación, progresión y resistencia a los iHsp90. No obstante la causa exacta de tal expresión en los diferentes tumores humanos no ha sido vinculada a la activación de vías de señalización específicas que pudieran dar lugar a una regulación transcripcional diferencial. Aunque nuestra comprensión básica del papel de Hsp90 en la biología del cáncer ha recorrido un largo camino en un corto tiempo, el reto sigue siendo traducir éstos hallazgos en el mejoramiento del tratamiento del cáncer en los próximos años.



CONCLUSIONES



El 17-DMAG posee una alta actividad contra la línea celular PC-3 y una baja citotoxicidad contra las líneas celulares PrEC y DU145.

El 17-DMAG indujo cambios en el perfil de expresión de Hsp90 α y Hsp90 β en las tres líneas celulares de próstata, sin embargo la línea celular de CaP PC-3 (*PTEN* -/-) mostró ser sensible al inhibidor 17-DMAG, esto se asoció con su incapacidad para reestablecer sus niveles de Hsp90 α . Por otro lado la resistencia adquirida al 17-DMAG por la línea celular DU145 (*PTEN* +/-), fue asociada con el restablecimiento de los niveles de Hsp90 α y al arresto en la fase G₁ del ciclo celular.

Por otra parte, la migración celular de las líneas celulares de próstata fue asociada con la capacidad de éstas para mantener la expresión de Hsp90 β .



PERSPECTIVAS



Como perspectivas del presente trabajo es necesario determinar que implicaciones tiene la expresión de una u otra isoforma a nivel funcional y como éstas isoformas afectan la sensibilidad y resistencia de las células de CaP a el inhibidor de Hsp90, 17-DMAG.

Es necesario determinar qué tipo de muerte celular es responsable de la fragmentación del ADN en la línea celular PC-3, para ello se podría emplear la técnica de TUNEL y/o anexina V / yoduro de propidio.

Con lo anterior, surge la necesidad de evaluar si las células de CaP son capaces de recuperarse del estrés generado por la inhibición de Hsp90 y ver si éste estrés provoca que las células de CaP adquieran un fenotipo más agresivo en un modelo *in vivo*.

Por otro lado, es importante estudiar el efecto de la inhibición de Hsp90 sobre la conformación (monómero/dímero) y localización subcelular de las isoformas Hsp90 α y Hsp90 β en las líneas celulares de CaP, así como asosociar éstos patrones a la resistencia (intrínseca o adquirida) o sensibilidad al 17-DMAG, dado que se ha observado que estas características juegan un papel importante en la progresión de la enfermedad.

Asimismo, es necesario explorar y describir el efecto de la sobreexpresión y subexpresión de las isoformas Hsp90 α y Hsp90 β en un modelo *in vitro* e *in vivo* ortotópico de CaP empleando ARN's de interferencia.

Determinar por co-inmunoprecipitación qué proteínas "cliente" específicas de isoformas, podrían estar involucradas en la adquisición de resistencia al 17-DMAG.

Finalmente, sería interesante evaluar la expresión, conformación y localización de las principales isoformas de Hsp90, Hsp90 α y Hsp90 β , en un modelo *in vivo* e *in vitro* de cáncer de próstata resistente a la castración (CPRC).



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS



1. Mosser D.D., Morimoto R.I. (2004). ***Molecular chaperones and the stress of oncogenesis***. Oncogene. 2004 Apr 12;23(16):2907-18.
2. Creagh E.M., Sheehan D., Cotter T.G. (2000). ***Heat shock proteins-modulators of apoptosis in tumour cells***. Leukemia. 2000 Jul;14(7):1161-73.
3. Söti C., Csermely P. (2007). ***Protein stress and stress proteins: implications in aging and disease***. J Biosci. 2007 Apr;32(3):511-5.
4. Parsell D.A., Lindquist S. (1994). ***The Biology of Heat Shock Proteins and Molecular Chaperones***, Georgopoulos C (ed). Cold Spring Harbor Press: Cold Spring Harbor, New York, pp. 457–494.
5. Kojika S., Sugita K., Inukai T., Saito M., Iijima K., Tezuka T., Goi K., Shiraishi K., Mori T., Okazaki T., Kagami K., Ohyama K., Nakazawa S. (1996). ***Mechanisms of glucocorticoid resistance in human leukemic cells: implication of abnormal 90 and 70 kDa heat shock proteins***. Leukemia. 1996 Jun;10(6):994-9.
6. Kim S.H., Yeo G.S., Lim Y.S., Kang C.D., Kim C.M., Chung B.S. (1998). ***Suppression of multidrug resistance via inhibition of heat shock factor by quercetin in MDR cells***. Exp Mol Med. 1998 Jun 30;30(2):87-92.
7. Konno A., Sato N., Yagihashi A., Torigoe T., Cho J.M., Torimoto K., Hara I., Wada Y., Okubo M., Takahashi N., Kikuchi K. (1989). ***Heat- or stress-inducible transformation-associated cell surface antigen on the activated H-ras oncogene-transfected rat fibroblast***. Cancer Res. 1989 Dec 1;49(23):6578-82.
8. Amm I., Sommer T., Wolf D.H. (2014). ***Protein quality control and elimination of protein waste: the role of the ubiquitin-proteasome system***. Biochim Biophys Acta. 2014 Jan;1843(1):182-96.
9. Bartlett A.I., Radford S.E. (2009). ***An expanding arsenal of experimental methods yields an explosion of insights into protein folding mechanisms***. Nat Struct Mol Biol. 2009 Jun;16(6):582-8.
10. Bozaykut P., Ozer N.K., Karademir B. (2014). ***Regulation of protein turnover by heat shock proteins***. Free Radic Biol Med. 2014 Dec;77:195-209.
11. Kästle M., Grune T. (2012). ***Interactions of the proteasomal system with chaperones: protein triage and protein quality control***. Prog Mol Biol Transl



- Sci. 2012;109:113-60.
12. Doyle S.M., Genest O., Wickner S. (2013). ***Protein rescue from aggregates by powerful molecular chaperone machines.*** Nat Rev Mol Cell Biol. 2013 Oct;14(10):617-29.
 13. Cyr D.M., Höhfeld J., Patterson C. (2002). ***Protein quality control: U-box-containing E3 ubiquitin ligases join the fold.*** Trends Biochem Sci. 2002 Jul;27(7):368-75.
 14. Ritossa F. (1962). ***A new puffing pattern induced by heat shock and DNP in Drosophila.*** Experientia 1962; 18: 571-573.
 15. Tissieres A., Mitchell H.K., Tracy U.M. (1974). ***Protein synthesis in salivary glands of Drosophila melanogaster: relation to chromosome puffs.*** J Mol Biol 1974; 84: 389-398.
 16. Doyle S.M., Genest O., Wickner S. (2013). ***Protein rescue from aggregates by powerful molecular chaperone machines.*** Nat Rev Mol Cell Biol. 2013 Oct;14(10):617-29.
 17. Calderwood S.K. (2005). ***Evolving connections between molecular chaperones and neuronal function.*** Int J Hyperthermia. 2005 Aug;21(5):375-8.
 18. Mayer M.P., Bukau B. (2005). ***Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism.*** Cell Mol Life Sci. 2005 Mar;62(6):670-84.
 19. D'Andrea L.D., Regan L. (2003). ***TPR proteins: the versatile helix.*** Trends Biochem Sci. 2003 Dec;28(12):655-62.
 20. Bozaykut P., Sozen E., Kaga E., Ece A., Ozaltin E., Ek B., Ozer N.K., Grune T., Bergquist J., Karademir B. (2013). ***The role of heat stress on the age related protein carbonylation.*** J Proteomics. 2013 Aug 26;89:238-54.
 21. Cortés González C.C. (2011). ***Regulación de la sintasa de óxido nítrico endotelial (eNOS) por las proteínas de choque térmico, Hsp90 α y Hsp90 β : su implicación en proceso isquemia/reperfusión renal.*** Tesis de doctorado. Universidad Nacional Autónoma de México.
 22. Freeman B.C., Michels A., Song J., Kampinga H.H., Morimoto R.I. (2000). ***Analysis of molecular chaperone activities using in vitro and in vivo approaches.*** Methods Mol Biol. 2000;99:393-419.



23. Lanneau D., Wettstein G., Bonniaud P., Garrido C. (2010). **Heat shock proteins: cell protection through protein triage.** ScientificWorldJournal. 2010 Aug 3;10:1543-52.
24. Haslbeck M., Franzmann T., Weinfurter D., Buchner J. (2005). **Some like it hot: the structure and function of small heat-shock proteins.** Nat Struct Mol Biol. 2005 Oct;12(10):842-6.
25. Sun Y., MacRae T.H. (2005). **Small heat shock proteins: molecular structure and chaperone function.** Cell Mol Life Sci. 2005 Nov;62(21):2460-76.
26. Garrido C. (2002). **Size matters: of the small HSP27 and its large oligomers.** Cell Death Differ. 2002 May;9(5):483-5.
27. Garrido C., Brunet M., Didelot C., Zermati Y., Schmitt E., Kroemer G. (2006). **Heat shock proteins 27 and 70: anti-apoptotic proteins with tumorigenic properties.** Cell Cycle. 2006 Nov;5(22):2592-601.
28. Bukau B., Deuerling E., Pfund C., Craig E.A. (2000). **Getting newly synthesized proteins into shape.** Cell. 2000 Apr 14;101(2):119-22.
29. Moro F., Okamoto K., Donzeau M., Neupert W., Brunner M. (2002). **Mitochondrial protein import: molecular basis of the ATP-dependent interaction of MtHsp70 with Tim44.** J Biol Chem. 2002 Mar 1;277(9):6874-80.
30. Pratt W.B., Toft D.O. (2003). **Regulation of signaling protein function and trafficking by the hsp90/hsp70-based chaperone machinery.** Exp Biol Med (Maywood). 2003 Feb;228(2):111-33.
31. Evans C.G., Chang L., Gestwicki J.E. (2010). **Heat shock protein 70 (hsp70) as an emerging drug target.** Med Chem. 2010 Jun 24;53(12):4585-602.
32. Rüdiger S., Schneider-Mergener J., Bukau B. (2001). **Its substrate specificity characterizes the DnaJ co-chaperone as a scanning factor for the DnaK chaperone.** EMBO J. 2001 Mar 1;20(5):1042-50.
33. Hao H., Naomoto Y., Bao X., Watanabe N., Sakurama K., Noma K., Motoki T., Tomono Y., Fukazawa T., Shirakawa Y., Yamatsuji T., Matsuoka J., Takaoka M. (2010). **HSP90 and its inhibitors.** Oncol Rep. 2010 Jun;23(6):1483-92.
34. Csermely P., Schnaider T., Soti C., Prohászka Z., Nardai G. (1998). **The 90-kDa molecular chaperone family: structure, function, and clinical**



- applications. A comprehensive review.** Pharmacol Ther. 1998 Aug;79(2):129-68.
35. Bagatell R., Whitesell L. (2004). **Altered Hsp90 function in cancer: a unique therapeutic opportunity.** Mol Cancer Ther. 2004 Aug;3(8):1021-30.
36. Whitesell L., Lindquist S.L. (2005). **HSP90 and the chaperoning of cancer.** Nat Rev Cancer. 2005 Oct;5(10):761-72.
37. Wegele H., Müller L., Buchner J. (2004). **Hsp70 and Hsp90--a relay team for protein folding.** Rev Physiol Biochem Pharmacol. 2004;151:1-44. Epub 2004 Jan 23.
38. Picard D., Khursheed B., Garabedian M.J., Fortin M.G., Lindquist S., Yamamoto K.R. (1990). **Reduced levels of hsp90 compromise steroid receptor action in vivo.** Nature. 1990 Nov 8;348(6297):166-8.
39. Freeman B.C., Yamamoto K.R. (2002). **Disassembly of transcriptional regulatory complexes by molecular chaperones.** Science. 2002 Jun 21;296(5576):2232-5.
40. Zeng Y., Feng H., Graner M.W., Katsanis E. (2003). **Tumor-derived, chaperone-rich cell lysate activates dendritic cells and elicits potent antitumor immunity.** Blood. 2003 Jun 1;101(11):4485-91. Epub 2003 Feb 6.
41. Parmiani G., Testori A., Maio M., Castelli C., Rivoltini L., Pilla L., Belli F., Mazzaferro V., Coppa J., Patuzzo R., Sertoli M.R., Hoos A., Srivastava P.K., Santinami M. (2004). **Heat shock proteins and their use as anticancer vaccines.** Clin Cancer Res. 2004 Dec 15;10(24):8142-6.
42. Bagatell R., Whitesell L. (2004). **Altered Hsp90 function in cancer: a unique therapeutic opportunity.** Mol Cancer Ther. 2004 Aug;3(8):1021-30.
43. Prodromou C., Pearl LH. (2003). **Structure and functional relationships of Hsp90.** Curr Cancer Drug Targets. 2003 Oct;3(5):301-23.
44. Ratzke C., Mickler M., Hellenkamp B., Buchner J., Hugel T. (2010). **Dynamics of heat shock protein 90 C-terminal dimerization is an important part of its conformational cycle.** Proc Natl Acad Sci U S A. 2010 Sep 14;107(37):16101-6.
45. Garnier C., Lafitte D., Tsvetkov P.O., Barbier P., Leclerc-Devin J., Millot J.M., Briand C., Makarov A.A., Catelli M.G., Peyrot V. (2002). **Binding of ATP to**



- heat shock protein 90: evidence for an ATP-binding site in the C-terminal domain.** J Biol Chem. 2002 Apr 5;277(14):12208-14. Epub 2002 Jan 22.
46. Stebbins C.E., Russo A.A., Schneider C., Rosen N., Hartl F.U., Pavletich N.P. (1997). **Crystal structure of an Hsp90-geldanamycin complex: targeting of a protein chaperone by an antitumor agent.** Cell. 1997 Apr 18;89(2):239-50.
47. Prodromou C., Roe S.M., Piper P.W., Pearl L.H. (1997). **A molecular clamp in the crystal structure of the N-terminal domain of the yeast Hsp90 chaperone.** Nat Struct Biol. 1997 Jun;4(6):477-82.
48. Verma S., Goyal S., Jamal S., Singh A., Grover A. (2016). **Hsp90: Friends, clients and natural foes.** Biochimie. 2016 Aug;127:227-40.
49. Obermann W.M., Sondermann H., Russo A.A., Pavletich N.P., Hartl F.U. (1998). **In vivo function of Hsp90 is dependent on ATP binding and ATP hydrolysis.** J Cell Biol. 1998 Nov 16;143(4):901-10.
50. Panaretou B., Prodromou C., Roe S.M., O'Brien R., Ladbury J.E., Piper P.W., Pearl L.H. (1998). **ATP binding and hydrolysis are essential to the function of the Hsp90 molecular chaperone in vivo.** EMBO J. 1998 Aug 17;17(16):4829-36.
51. Pearl L.H., Prodromou C. (2006). **Structure and mechanism of the Hsp90 molecular chaperone machinery.** Annu Rev Biochem. 2006;75:271-94.
52. Hawle P., Siepmann M., Harst A., Siderius M., Reusch H.P., Obermann W.M. (2006). **The middle domain of Hsp90 acts as a discriminator between different types of client proteins.** Mol Cell Biol. 2006 Nov;26(22):8385-95.
53. Meyer P., Prodromou C., Hu B., Vaughan C., Roe S.M., Panaretou B., Piper P.W., Pearl L.H. (2003). **Structural and functional analysis of the middle segment of hsp90: implications for ATP hydrolysis and client protein and cochaperone interactions.** Mol Cell. 2003 Mar;11(3):647-58.
54. Bose S., Weikl T., Bügl H., Buchner J. (1996). **Chaperone function of Hsp90-associated proteins.** Science. 1996 Dec 6;274(5293):1715-7.
55. Wegele H., Muschler P., Bunck M., Reinstein J., Buchner J. (2003). **Dissection of the contribution of individual domains to the ATPase mechanism of Hsp90.** J Biol Chem. 2003 Oct 10;278(41):39303-10.
56. Prodromou C., Panaretou B., Chohan S., Siligardi G., O'Brien R., Ladbury J.E.,



- Roe S.M., Piper P.W., Pearl L.H. (2000). ***The ATPase cycle of Hsp90 drives a molecular 'clamp' via transient dimerization of the N-terminal domains.*** EMBO J. 2000 Aug 15;19(16):4383-92.
57. Smith D.F. (2004). ***Tetratricopeptide repeat cochaperones in steroid receptor complexes.*** Cell Stress Chaperones. 2004 Summer;9(2):109-21.
58. Li Y., Zhang D., Xu J., Shi J., Jiang L., Yao N., Ye W. (2012). ***Discovery and development of natural heat shock protein 90 inhibitors in cancer treatment.*** Acta Pharm. Sin. B, 2 (2012), pp. 238–245
59. Butler L.M., Ferraldeschi R., Armstrong H.K., Centenera M.M., Workman P. (2015). ***Maximizing the Therapeutic Potential of HSP90 Inhibitors.*** Mol Cancer Res. 2015 Nov;13(11):1445-51.
60. Ali M.M., Roe S.M., Vaughan C.K., Meyer P., Panaretou B., Piper P.W., Prodromou C., Pearl L.H. (2006). ***Crystal structure of an Hsp90-nucleotide-p23/Sba1 closed chaperone complex.*** Nature. 2006 Apr 20;440(7087):1013-7.
61. Pearl L.H., Prodromou C., Workman P. (2008). ***The Hsp90 molecular chaperone: an open and shut case for treatment.*** Biochem J. 2008 Mar 15;410(3):439-53.
62. Smith D.F., Whitesell L., Nair S.C., Chen S., Prapapanich V., Rimerman R.A. (1995). ***Progesterone receptor structure and function altered by geldanamycin, an hsp90-binding agent.*** Mol Cell Biol. 1995 Dec;15(12):6804-12.
63. Sreedhar A.S., Kalmár E., Csermely P., Shen Y.F. (2004). ***Hsp90 isoforms: functions, expression and clinical importance.*** FEBS Lett. 2004 Mar 26;562(1-3):11-5.
64. Lee A.S. (2014). ***Glucose-regulated proteins in cancer: molecular mechanisms and therapeutic potential.*** Nat Rev Cancer. 2014 Apr;14(4):263-76.
65. Altieri D.C., Stein G.S., Lian J.B., Languino L.R. (2012). ***TRAP-1, the mitochondrial Hsp90.*** Biochim Biophys Acta. 2012 Mar;1823(3):767-73.
66. Langer T., Fasold H. (2001). ***Isolation and quantification of the heat shock protein 90 alpha and beta isoforms from rat liver.*** Protoplasma. 2001;218(1-



- 2):54-6.
67. Welch W.J. (1991). ***The role of heat-shock proteins as molecular chaperones.*** Curr Opin Cell Biol. 1991 Dec;3(6):1033-8.
68. Lindquist S., Craig E.A. (1988). ***The heat-shock proteins.*** Annu Rev Genet. 1988;22:631-77.
69. Kregel K.C. (2002). ***Heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance.*** J Appl Physiol. 2002 May;92(5):2177-86.
70. Kupatt C., Dessy C., Hinkel R., Raake P., Daneau G., Bouzin C., Boekstegers P., Feron O. (2004). ***Heat shock protein 90 transfection reduces ischemia-reperfusion-induced myocardial dysfunction via reciprocal endothelial NO synthase serine 1177 phosphorylation and threonine 495 dephosphorylation.*** Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2004 Aug;24(8):1435-41.
71. Shen Y., Liu J., Wang X., Cheng X., Wang Y., Wu N. (1997). ***Essential role of the first intron in the transcription of hsp90beta gene.*** FEBS Lett. 1997 Aug 11;413(1):92-8.
72. Zhang S.L., Yu J., Cheng X.K., Ding L., Heng F.Y., Wu N.H., Shen Y.F. (1999). ***Regulation of human hsp90alpha gene expression.*** FEBS Lett. 1999 Feb 5;444(1):130-5.
73. Didenko T., Duarte A.M., Karagöz G.E., Rüdiger S.G. (2012). ***Hsp90 structure and function studied by NMR spectroscopy.*** Biochim Biophys Acta. 2012 Mar;1823(3):636-47.
74. Rizzolo K., Wong P., Tillier E.R.M., Houry W.A. (2014). ***Chapter 5 The Interaction Network of the Hsp90 Molecular Chaperone.*** En Walid A. Houry (Ed.), The Molecular Chaperones Interaction Networks in Protein Folding and Degradation (pp. 111-118). Montreal, Canadá: Series Editor.
75. Röhl A., Rohrberg J., Buchner J. (2013). ***The chaperone Hsp90: changing partners for demanding clients.*** Trends Biochem Sci. 2013 May;38(5):253-62.
76. Taipale M., Jarosz D.F., Lindquist S. (2010). ***HSP90 at the hub of protein homeostasis: emerging mechanistic insights.*** Nat Rev Mol Cell Biol. 2010 Jul;11(7):515-28.



77. Brugge J.S., Erikson E., Erikson R.L. (1981). ***The specific interaction of the Rous sarcoma virus transforming protein, pp60src, with two cellular proteins.*** Cell. 1981 Aug;25(2):363-72.
78. Lipsich L.A., Catt J.R., Brugge J.S. (1982). ***Association of the transforming proteins of Rous, Fujinami, and Y73 avian sarcoma viruses with the same two cellular proteins.*** Mol Cell Biol. 1982 Jul;2(7):875-80.
79. Joab I., Radanyi C., Renoir M., Buchou T., Catelli M.G., Binart N., Mester J., Baulieu E.E. ***Common non-hormone binding component in non-transformed chick oviduct receptors of four steroid hormones.*** Nature. 1984 Apr 26-May 2;308(5962):850-3.
80. Schuh S., Yonemoto W., Brugge J., Bauer V.J., Riehl R.M., Sullivan W.P., Toft D.O. (1985). ***A 90,000-dalton binding protein common to both steroid receptors and the Rous sarcoma virus transforming protein, pp60v-src.*** J Biol Chem. 1985 Nov 15;260(26):14292-6.
81. Sanchez E.R., Toft D.O., Schlesinger M.J., Pratt W.B. (1985). ***Evidence that the 90-kDa phosphoprotein associated with the untransformed L-cell glucocorticoid receptor is a murine heat shock protein.*** J Biol Chem. 1985 Oct 15;260(23):12398-401.
82. García-Cardena G., Fan R., Shah V., Sorrentino R., Cirino G., Papapetropoulos A., Sessa W.C. ***Dynamic activation of endothelial nitric oxide synthase by Hsp90.*** Nature. 1998 Apr 23;392(6678):821-4.
83. Holt S.E., Aisner D.L., Baur J., Tesmer V.M., Dy M., Ouellette M., Trager J.B., Morin G.B., Toft D.O., Shay J.W., Wright W.E., White M.A. (1999). ***Functional requirement of p23 and Hsp90 in telomerase complexes.*** Genes Dev. 1999 Apr 1;13(7):817-26.
84. Minet E., Mottet D., Michel G., Roland I., Raes M., Remacle J., Michiels C. (1999). ***Hypoxia-induced activation of HIF-1: role of HIF-1 α -Hsp90 interaction.*** FEBS Lett. 1999 Oct 29;460(2):251-6.
85. Sato N., Yamamoto T., Sekine Y., Yumioka T., Junicho A., Fuse H., Matsuda T. (2003). ***Involvement of heat-shock protein 90 in the interleukin-6-mediated signaling pathway through STAT3.*** Biochem Biophys Res Commun. 2003 Jan 24;300(4):847-52.



86. Sepehrnia B., Paz I. B., Dasgupta G., Momand, J. (1996). ***Heat shock protein 84 forms a complex with mutant p53 protein predominantly within a cytoplasmic compartment of the cell.*** J. Biol. Chem. 271, 15084–15090 (1996).
87. Tariq M., Nussbaumer U., Chen Y., Beisel C., Paro R. (2009). ***Trithorax requires Hsp90 for maintenance of active chromatin at sites of gene expression.*** Proc Natl Acad Sci U S A. 2009 Jan 27;106(4):1157-62.
88. Pratt W.B. ***The hsp90-based chaperone system: involvement in signal transduction from a variety of hormone and growth factor receptors.*** Proc Soc Exp Biol Med. 1998 Apr;217(4):420-34.
89. Miyata Y., Nakamoto H., Neckers L. (2013). ***The therapeutic target Hsp90 and cancer hallmarks.*** Curr Pharm Des. 2013;19(3):347-65.
90. Hanahan D., Weinberg R.A. (2011). ***Hallmarks of cancer: the next generation.*** Cell. 2011 Mar 4;144(5):646-74.
91. Jego G., Hazoumé A., Seigneuric R., Garrido C. (2013). ***Targeting heat shock proteins in cancer.*** Cancer Lett. 2013 May 28;332(2):275-85.
92. Kamal A., Thao L., Sensintaffar J., Zhang L., Boehm M.F., Fritz L.C., Burrows F.J. (2003). ***A high-affinity conformation of Hsp90 confers tumour selectivity on Hsp90 inhibitors.*** Nature. 2003 Sep 25;425(6956):407-10.
93. Neckers L., Workman P. (2012). ***Hsp90 molecular chaperone inhibitors: are we there yet?*** Clin Cancer Res. 2012 Jan 1;18(1):64-76.
94. Travers J., Sharp S., Workman P. (2012). ***HSP90 inhibition: two-pronged exploitation of cancer dependencies.*** Drug Discov Today. 2012 Mar;17(5-6):242-52.
95. Trepel J., Mollapour M., Giaccone G., Neckers L. (2010). ***Targeting the dynamic HSP90 complex in cancer.*** Nat Rev Cancer. 2010 Aug;10(8):537-49.
96. Whitesell L., Mimnaugh E.G., De Costa B., Myers C.E., Neckers L.M. (1994). ***Inhibition of heat shock protein HSP90-pp60v-src heteroprotein complex formation by benzoquinone ansamycins: essential role for stress proteins in oncogenic transformation.*** Proc Natl Acad Sci U S A. 1994 Aug 30;91(18):8324-8.
97. Jhaveri K., Modi S. (2012). ***HSP90 inhibitors for cancer therapy and***



- overcoming drug resistance.** Adv Pharmacol. 2012;65:471-517.
98. Prodromou C., Roe S.M., O'Brien R., Ladbury J.E., Piper P.W., Pearl L.H. (1997). **Identification and structural characterization of the ATP/ADP-binding site in the Hsp90 molecular chaperone.** Cell. 1997 Jul 11;90(1):65-75.
99. Roe S.M., Prodromou C., O'Brien R., Ladbury J.E., Piper P.W., Pearl L.H. (1999). **Structural basis for inhibition of the Hsp90 molecular chaperone by the antitumor antibiotics radicicol and geldanamycin.** J Med Chem. 1999 Jan 28;42(2):260-6.
100. Workman P., Burrows F., Neckers L., Rosen N. (2007). **Drugging the cancer chaperone HSP90: combinatorial therapeutic exploitation of oncogene addiction and tumor stress.** Ann N Y Acad Sci. 2007 Oct;1113:202-16.
101. Schroder C.P., Pedersen J.V., Chua S., Swanton C., Akimov M., Ide S., Fernandez-Ibarra C., Dzik-Jurasz A., De Vries E., Gaykema S.B., Banerji. (2011). **Use of biomarkers and imaging to evaluate the treatment effect of AUY922, an HSP90 inhibitor, in patients with HER2+ or ER+ metastatic breast cancer.** J Clin Oncol 2011;29. abstr e 11024.
102. Wagner A.J., Chugh R., Rosen L.S., Morgan J.A., George S., Gordon M., Dunbar J., Normant E., Grayzel D., Demetri G.D. (2013). **A phase I study of the HSP90 inhibitor retaspimycin hydrochloride (IPI-504) in patients with gastrointestinal stromal tumors or soft-tissue sarcomas.** Clin Cancer Res. 2013 Nov 1;19(21):6020-9.
103. Pacey S., Wilson R.H., Walton M., Eatock M.M., Hardcastle A., Zetterlund A., Arkenau H.T., Moreno-Farre J., Banerji U., Roels B., Peachey H., Aherne W., de Bono J.S., Raynaud F., Workman P., Judson I. (2011). **A phase I study of the heat shock protein 90 inhibitor alvespimycin (17-DMAG) given intravenously to patients with advanced solid tumors.** Clin Cancer Res. 2011 Mar 15;17(6):1561-70.
104. Cleary J. M., Heath E. I., Kwak E. L., Dezube B. J., Gandhi L., Zack C., Bradley R., Vukovic V. M., Shapiro G., LoRusso P. (2010). **A phase I dose-escalation study of the Hsp90 inhibitor STA-9090 administered twice**



- weekly in patients with solid tumors.* J Clin Oncol 2010;28.
105. Sequist L. V., Gettinger S., Natale R., Martins R., Lilenbaum R., Jänne P., Gray J., Samuel T. A., Grayzel D., Lynch T. J. (2009). **A phase II trial of IPI-504 (retaspimycin hydrochloride), a novel Hsp90 inhibitor, in patients with relapsed and/or refractory stage IIIb or stage IV non-small cell lung cancer (NSCLC) stratified by EGFR mutation status.** J Clin Oncol 2009;27.
106. Heath E.I., Hillman D.W., Vaishampayan U., Sheng S., Sarkar F., Harper F., Gaskins M., Pitot H.C., Tan W., Ivy S.P., Pili R., Carducci M.A., Erlichman C., Liu G. (2008). **A phase II trial of 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin in patients with hormone-refractory metastatic prostate cancer.** Clin Cancer Res. 2008 Dec 1;14(23):7940-6.
107. Ronnen E.A., Kondagunta G.V., Ishill N., Sweeney S.M., Deluca J.K., Schwartz L., Bacik J., Motzer R.J. (2006). **A phase II trial of 17-(Allylamino)-17-demethoxygeldanamycin in patients with papillary and clear cell renal cell carcinoma.** Invest New Drugs. 2006 Nov;24(6):543-6.
108. Piper P.W., Millson S.H. (2011). **Mechanisms of Resistance to Hsp90 Inhibitor Drugs: A Complex Mosaic Emerges.** Pharmaceuticals (Basel). 2011 Oct 25;4(11):1400-1422.
109. Kang B.H., Altieri D.C. (2009). **Compartmentalized cancer drug discovery targeting mitochondrial Hsp90 chaperones.** Oncogene. 2009 Oct 22;28(42):3681-8.
110. Kim Y.S., Alarcon S.V., Lee S., Lee M.J., Giaccone G., Neckers L., Trepel J.B. (2009). **Update on Hsp90 inhibitors in clinical trial.** Curr Top Med Chem. 2009;9(15):1479-92.
111. Bohonowych J.E., Gopal U., Isaacs J.S. (2010). **Hsp90 as a gatekeeper of tumor angiogenesis: clinical promise and potential pitfalls.** J Oncol. 2010;2010:412985.
112. Cardillo M.R., Ippoliti F. (2006). **IL-6, IL-10 and HSP-90 expression in tissue microarrays from human prostate cancer assessed by computer-assisted image analysis.** Anticancer Res. 2006 Sep-Oct;26(5A):3409-16.
113. Centenera M.M., Fitzpatrick A.K., Tilley W.D., Butler L.M. (2013). **Hsp90: still a viable target in prostate cancer.** Biochim Biophys Acta. 2013



- Apr;1835(2):211-8.
114. Oh W.K., Galsky M.D., Stadler W.M., Srinivas S., Chu F., Bubley G., Goddard J., Dunbar J., Ross R.W. (2011). **Multicenter phase II trial of the heat shock protein 90 inhibitor, retaspimycin hydrochloride (IPI-504), in patients with castration-resistant prostate cancer.** *Urology*. 2011 Sep;78(3):626-30.
115. Yano A., Tsutsumi S., Soga S., Lee M.J., Trepel J., Osada H., Neckers L. (2008). **Inhibition of Hsp90 activates osteoclast c-Src signaling and promotes growth of prostate carcinoma cells in bone.** *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Oct 7;105(40):15541-6.
116. Moulick K., Ahn J.H., Zong H., Rodina A., Cerchietti L., Gomes DaGama E.M., Caldas-Lopes E., Beebe K., Perna F., Hatzi K., Vu L.P., Zhao X., Zatorska D., Taldone T., Smith-Jones P., Alpaugh M., Gross S.S., Pillarsetty N., Ku T., Lewis J.S., Larson S.M., Levine R., Erdjument-Bromage H., Guzman M.L., Nimer S.D., Melnick A., Neckers L., Chiosis G. (2011). **Affinity-based proteomics reveal cancer-specific networks coordinated by Hsp90.** *Nat Chem Biol*. 2011 Sep 25;7(11):818-26.
117. Millson S.H., Chua C.S., Roe S.M., Polier S., Solovieva S., Pearl L.H., Sim T.S., Prodromou C., Piper P.W. (2011). **Features of the Streptomyces hygroscopicus HtpG reveal how partial geldanamycin resistance can arise with mutation to the ATP binding pocket of a eukaryotic Hsp90.** *FASEB J*. 2011 Nov;25(11):3828-37.
118. McLellan C.A., Turbyville T.J., Wijeratne E.M., Kerschen A., Vierling E., Queitsch C., Whitesell L., Gunatilaka A.A. (2007). **A rhizosphere fungus enhances Arabidopsis thermotolerance through production of an HSP90 inhibitor.** *Plant Physiol*. 2007 Sep;145(1):174-82.
119. David C.L., Smith H.E., Raynes D.A., Pulcini E.J., Whitesell L. (2003). **Expression of a unique drug-resistant Hsp90 ortholog by the nematode Caenorhabditis elegans.** *Cell Stress Chaperones*. 2003 Spring;8(1):93-104.
120. Kim H.J., Lee K.Y., Kim Y.W., Choi Y.J., Lee J.E., Choi C.M., Baek I.J., Rho J.K., Lee J.C. (2015). **P-glycoprotein confers acquired resistance to 17-DMAG in lung cancers with an ALK rearrangement.** *BMC Cancer*. 2015 Jul



- 29;15:553.
121. Benchekroun M.N., Schneider E., Safa A.R., Townsend A.J., Sinha B.K. (1994). ***Mechanisms of resistance to ansamycin antibiotics in human breast cancer cell lines.*** Mol Pharmacol. 1994 Oct;46(4):677-84.
122. Zhang H., Neely L., Lundgren K., Yang Y.C., Lough R., Timple N., Burrows F. (2010). ***BIIB021, a synthetic Hsp90 inhibitor, has broad application against tumors with acquired multidrug resistance.*** Int J Cancer. 2010 Mar 1;126(5):1226-34.
123. Guo W., Reigan P., Siegel D., Zirrolli J., Gustafson D., Ross D. (2005). ***Formation of 17-allylamino-demethoxygeldanamycin (17-AAG) hydroquinone by NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1: role of 17-AAG hydroquinone in heat shock protein 90 inhibition.*** Cancer Res. 2005 Nov 1;65(21):10006-15.
124. Gaspar N., Sharp S.Y., Pacey S., Jones C., Walton M., Vassal G., Eccles S., Pearson A., Workman P. (2009). ***Acquired resistance to 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin (17-AAG, tanespimycin) in glioblastoma cells.*** Cancer Res. 2009 Mar 1;69(5):1966-75.
125. Kelland L.R., Sharp S.Y., Rogers P.M., Myers T.G., Workman P. (1999). ***DT-Diaphorase expression and tumor cell sensitivity to 17-allylamino, 17-demethoxygeldanamycin, an inhibitor of heat shock protein 90.*** J Natl Cancer Inst. 1999 Nov 17;91(22):1940-9.
126. Powers M.V., Jones K., Barillari C., Westwood I., van Montfort R.L., Workman P. (2010). ***Targeting HSP70: the second potentially druggable heat shock protein and molecular chaperone?*** Cell Cycle. 2010 Apr 15;9(8):1542-50.
127. McCollum A.K., Teneyck C.J., Sauer B.M., Toft D.O., Erlichman C. (2006). ***Up-regulation of heat shock protein 27 induces resistance to 17-allylamino-demethoxygeldanamycin through a glutathione-mediated mechanism.*** Cancer Res. 2006 Nov 15;66(22):10967-75.
128. Scroggins B.T., Robzyk K., Wang D., Marcu M.G., Tsutsumi S., Beebe K., Cotter R.J., Felts S., Toft D., Karnitz L., Rosen N., Neckers L. (2007). ***An acetylation site in the middle domain of Hsp90 regulates chaperone***



- function.** Mol Cell. 2007 Jan 12;25(1):151-9
129. Mollapour M., Tsutsumi S., Kim Y.S., Trepel J., Neckers L. (2011). **Casein kinase 2 phosphorylation of Hsp90 threonine 22 modulates chaperone function and drug sensitivity.** Oncotarget. 2011 May;2(5):407-17.
130. Kurokawa M., Zhao C., Reya T., Kornbluth S. (2008). **Inhibition of apoptosome formation by suppression of Hsp90beta phosphorylation in tyrosine kinase-induced leukemias.** Mol Cell Biol. 2008 Sep;28(17):5494-506.
131. Piper P.W., Millson S.H., Mollapour M., Panaretou B., Siligardi G., Pearl L.H., Prodromou C. (2003). **Sensitivity to Hsp90-targeting drugs can arise with mutation to the Hsp90 chaperone, cochaperones and plasma membrane ATP binding cassette transporters of yeast.** Eur J Biochem. 2003 Dec;270(23):4689-95.
132. Holmes J.L., Sharp S.Y., Hobbs S., Workman P. **Silencing of HSP90 cochaperone AHA1 expression decreases client protein activation and increases cellular sensitivity to the HSP90 inhibitor 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin.** Cancer Res. 2008 Feb 15;68(4):1188-97.
133. Forafonov F., Toogun O.A., Grad I., Suslova E., Freeman B.C., Picard D. (2008). **p23/Sba1p protects against Hsp90 inhibitors independently of its intrinsic chaperone activity.** Mol Cell Biol. 2008 May;28(10):3446-56. doi: 10.1128/MCB.02246-07.
134. Millson S.H., Truman A.W., Rácz A., Hu B., Panaretou B., Nuttall J., Mollapour M., Söti C., Piper P.W. (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 J. 2007 Sep;274(17):4453-63.
135. Chan C.T., Paulmurugan R., Gheysens O.S., Kim J., Chiosis G., Gambhir S.S. (2008). **Molecular imaging of the efficacy of heat shock protein 90 inhibitors in living subjects.** Cancer Res. 2008 Jan 1;68(1):216-26.
136. Chiosis G., Kang Y., Sun W. (2008). **Discovery and development of purine-scaffold Hsp90 inhibitors.** Expert Opin Drug Discov. 2008



- Jan;3(1):99-114.
137. Sreedhar A.S., Kalmár E., Csermely P., Shen Y.F. (2004). Hsp90 isoforms: functions, expression and clinical importance. *FEBS Lett.* 2004 Mar 26;562(1-3):11-5.
138. Ogata M., Naito Z., Tanaka S., Moriyama Y., Asano G. (2000). ***Overexpression and localization of heat shock proteins mRNA in pancreatic carcinoma.*** *J Nippon Med Sch.* 2000 Jun;67(3):177-85.
139. Jameel A., Skilton R.A., Campbell T.A., Chander S.K., Coombes R.C., Luqmani Y.A. (1992). ***Clinical and biological significance of HSP89 alpha in human breast cancer.*** *Int J Cancer.* 1992 Feb 1;50(3):409-15.
140. Gress T.M., Müller-Pillasch F., Weber C., Lerch M.M., Friess H., Büchler M., Beger H.G., Adler G. (1994). ***Differential expression of heat shock proteins in pancreatic carcinoma.*** *Cancer Res.* 1994 Jan 15;54(2):547-51.
141. Yufu Y., Nishimura J., Nawata H. (1992). ***High constitutive expression of heat shock protein 90 alpha in human acute leukemia cells.*** *Leuk Res.* 1992 Jun-Jul;16(6-7):597-605.
142. Tian W.L., He F., Fu X., Lin J.T., Tang P., Huang Y.M., Guo R., Sun L. (2014). ***High expression of heat shock protein 90 alpha and its significance in human acute leukemia cells.*** *Gene.* 2014 Jun 1;542(2):122-8.
143. Twomey B.M., Dhillon V.B., McCallum S., Isenberg D.A., Latchman D.S. (1993) ***Elevated Levels of the 90 kD Heat Shock Protein in Patients with Systemic Lupus Erythematosus are Dependent upon Enhanced Transcription of the hsp90 β Gene*** *J. Autoimmun.*, 6 (1993), pp. 495–506.
144. Bertram J., Palfner K., Hiddemann W., Kneba M. (1996). ***Increase of P-glycoprotein-mediated drug resistance by hsp 90 beta.*** *Anticancer Drugs.* 1996 Nov;7(8):838-45.
145. Eustace B.K., Sakurai T., Stewart J.K., Yimlamai D., Unger C., Zehetmeier C., Lain B., Torella C., Henning S.W., Beste G., Scroggins B.T., Neckers L., Ilag L.L., Jay D.G. (2004). ***Functional proteomic screens reveal an essential extracellular role for hsp90 alpha in cancer cell invasiveness.*** *Nat Cell Biol.* 2004 Jun;6(6):507-14. Epub 2004 May 16.
146. Ding G., Feng C., Jiang H., Ding Q., Zhang L., Na R., Xu H., Liu J.



- Combination of rapamycin, CI-1040, and 17-AAG inhibits metastatic capacity of prostate cancer via Slug inhibition.** PLoS One. 2013 Oct 10;8(10):e77400.
147. Edlind M.P., Hsieh A.C. (2014). **PI3K-AKT-mTOR signaling in prostate cancer progression and androgen deprivation therapy resistance.** Asian J Androl. 2014 May-Jun;16(3):378-86.
148. Wang S., Gao J., Lei Q., Rozengurt N., Pritchard C., Jiao J., Thomas G.V., Li G., Roy-Burman P., Nelson P.S., Liu X., Wu H. (2003). **Prostate-specific deletion of the murine Pten tumor suppressor gene leads to metastatic prostate cancer.** Cancer Cell. 2003 Sep;4(3):209-21.
149. Jiao J., Wang S., Qiao R., Vivanco I., Watson P.A., Sawyers C.L., Wu H. (2007). **Murine cell lines derived from Pten null prostate cancer show the critical role of PTEN in hormone refractory prostate cancer development.** Cancer Res. 2007 Jul 1;67(13):6083-91.
150. Mulholland D.J., Tran L.M., Li Y., Cai H., Morim A., Wang S., Plaisier S., Garraway I.P., Huang J., Graeber T.G., Wu H. (2011). **Cell autonomous role of PTEN in regulating castration-resistant prostate cancer growth.** Cancer Cell. 2011 Jun 14;19(6):792-804.
151. Carver B.S., Chapinski C., Wongvipat J., Hieronymus H., Chen Y., Chandralapaty S., Arora V.K., Le C., Koutcher J., Scher H., Scardino P.T., Rosen N., Sawyers C.L. (2011). **Reciprocal feedback regulation of PI3K and androgen receptor signaling in PTEN-deficient prostate cancer.** Cancer Cell. 2011 May 17;19(5):575-86.
152. Nauseef J.T., Henry M.D. (2011). **Epithelial-to-mesenchymal transition in prostate cancer: paradigm or puzzle?** Nat Rev Urol. 2011 Jun 21;8(8):428-39.
153. Marín-Aguilera M., Codony-Servat J., Reig Ò., Lozano J.J., Fernández P.L., Pereira M.V., Jiménez N., Donovan M., Puig P., Mengual L., Bermudo R., Font A., Gallardo E., Ribal M.J., Alcaraz A., Gascón P., Mellado B. (2014). **Epithelial-to-mesenchymal transition mediates docetaxel resistance and high risk of relapse in prostate cancer.** Mol Cancer Ther. 2014 May;13(5):1270-84.



154. Wang J., Li Z., Lin Z., Zhao B., Wang Y., Peng R., Wang M., Lu C., Shi G., Shen Y. (2015). ***17-DMCHAG, a new geldanamycin derivative, inhibits prostate cancer cells through Hsp90 inhibition and survivin downregulation.*** Cancer Lett. 2015 Jun 28;362(1):83-96.
155. Chiosis G., Rosen N., Sepp-Lorenzino L. (2001). ***LY294002-geldanamycin heterodimers as selective inhibitors of the PI3K and PI3K-related family.*** Bioorg Med Chem Lett. 2001 Apr 9;11(7):909-13.
156. Chiosis G., Huezo H., Rosen N., Mimnaugh E., Whitesell L., Neckers L. (2003). ***17AAG: low target binding affinity and potent cell activity--finding an explanation.*** Mol Cancer Ther. 2003 Feb;2(2):123-9.
157. Gooljarsingh L.T., Fernandes C., Yan K., Zhang H., Grooms M., Johanson K., Sinnamon R.H., Kirkpatrick R.B., Kerrigan J., Lewis T., Arnone M., King A.J., Lai Z., Copeland R.A., Tummino P.J. (2006). ***A biochemical rationale for the anticancer effects of Hsp90 inhibitors: slow, tight binding inhibition by geldanamycin and its analogues.*** Proc Natl Acad Sci U S A. 2006 May 16;103(20):7625-30.
158. Vilenchik M., Solit D., Basso A., Huezo H., Lucas B., He H., Rosen N., Spampinato C., Modrich P., Chiosis G. (2004). ***Targeting wide-range oncogenic transformation via PU24FCI, a specific inhibitor of tumor Hsp90.*** Chem Biol. 2004 Jun;11(6):787-97.
159. Zou J., Guo Y., Guettouche T., Smith D.F., Voellmy R. (1998). ***Repression of heat shock transcription factor HSF1 activation by HSP90 (HSP90 complex) that forms a stress-sensitive complex with HSF1.*** Cell. 1998 Aug 21;94(4):471-80.
160. Bagatell R., Paine-Murrieta G.D., Taylor C.W., Pulcini E.J., Akinaga S., Benjamin I.J., Whitesell L. (2000). ***Induction of a heat shock factor 1-dependent stress response alters the cytotoxic activity of hsp90-binding agents.*** Clin Cancer Res. 2000 Aug;6(8):3312-8.
161. Arya R., Mallik M., Lakhota S.C. (2007). ***Heat shock genes - integrating cell survival and death.*** J Biosci. 2007 Apr;32(3):595-610.
162. Powers M.V., Clarke P.A., Workman P. (2008). ***Dual targeting of HSC70 and HSP72 inhibits HSP90 function and induces tumor-specific apoptosis.***



- Cancer Cell. 2008 Sep 9;14(3):250-62.
163. Guo Y., Ziesch A., Hocke S., Kampmann E., Ochs S., De Toni E.N., Göke B., Gallmeier E. (2015). **Overexpression of heat shock protein 27 (HSP27) increases gemcitabine sensitivity in pancreatic cancer cells through S-phase arrest and apoptosis.** J Cell Mol Med. 2015 Feb;19(2):340-50.
164. Xia W., Voellmy R., Spector N.L. (2000). **Sensitization of tumor cells to fas killing through overexpression of heat-shock transcription factor 1.** J Cell Physiol. 2000 Jun;183(3):425-31.
165. Liossis S.N., Ding X.Z., Kiang J.G., Tsokos G.C. (1997). **Overexpression of the heat shock protein 70 enhances the TCR/CD3- and Fas/Apo-1/CD95-mediated apoptotic cell death in Jurkat T cells.** J Immunol. 1997 Jun 15;158(12):5668-75.
166. Ran R., Lu A., Zhang L., Tang Y., Zhu H., Xu H., Feng Y., Han C., Zhou G., Rigby A.C., Sharp F.R. (2004). **Hsp70 promotes TNF-mediated apoptosis by binding IKK gamma and impairing NF-kappa B survival signaling.** Genes Dev. 2004 Jun 15;18(12):1466-81.
167. Curry H.A., Clemens R.A., Shah S., Bradbury C.M., Botero A., Goswami P., Gius D. (1999). **Heat shock inhibits radiation-induced activation of NF-kappaB via inhibition of I-kappaB kinase.** J Biol Chem. 1999 Aug 13;274(33):23061-7.
168. Shibuya N., Inoue K., Kubota K. (2016). **Chapter 26 Metabolic Shunt Pathways, Carcinoma and mTOR.** En Kenneth Maiese (Ed.), MOLECULES TO MEDICINE WITH mTOR; Translating Critical Pathways into Novel Therapeutic Strategies. (pp. 429-439). Londres, Reino Unido: ELSEVIER.
169. Loewith R., Jacinto E., Wullschleger S., Lorberg A., Crespo J.L., Bonenfant D., Oppliger W., Jenoe P., Hall M.N. (2002). **Two TOR complexes, only one of which is rapamycin sensitive, have distinct roles in cell growth control.** Mol Cell. 2002 Sep;10(3):457-68.
170. Bai X., Jiang Y. (2010). **Key factors in mTOR regulation.** Cell Mol Life Sci. 2010 Jan;67(2):239-53.
171. Chiang G.G., Abraham R.T. (2005). **Phosphorylation of mammalian target of rapamycin (mTOR) at Ser-2448 is mediated by p70S6 kinase.** J



- Biol Chem. 2005 Jul 8;280(27):25485-90.
172. Guba M., Von Breitenbuch P., Steinbauer M., Koehl G., Flegel S., Hornung M., Bruns C.J., Zuelke C., Farkas S., Anthuber M., Jauch K.W., Geissler E.K. (2002). **Rapamycin inhibits primary and metastatic tumor growth by antiangiogenesis: involvement of vascular endothelial growth factor.** Nat Med. 2002 Feb;8(2):128-35.
173. Thomas G.V., Tran C., Mellinghoff I.K., Welsbie D.S., Chan E., Fueger B., Czernin J., Sawyers C.L. (2006). **Hypoxia-inducible factor determines sensitivity to inhibitors of mTOR in kidney cancer.** Nat Med. 2006 Jan;12(1):122-7.
174. Phung T.L., Ziv K., Dabydeen D., Eyiah-Mensah G., Riveros M., Perruzzi C., Sun J., Monahan-Earley R.A., Shiojima I., Nagy J.A., Lin M.I., Walsh K., Dvorak A.M., Briscoe D.M., Neeman M., Sessa W.C., Dvorak H.F., Benjamin L.E. (2006). **Pathological angiogenesis is induced by sustained Akt signaling and inhibited by rapamycin.** Cancer Cell. 2006 Aug;10(2):159-70.
175. Bernardi R., Guernah I., Jin D., Grisendi S., Alimonti A., Teruya-Feldstein J., Cordon-Cardo C., Simon M.C., Rafii S., Pandolfi P.P. (2006). **PML inhibits HIF-1 α translation and neoangiogenesis through repression of mTOR.** Nature. 2006 Aug 17;442(7104):779-85.
176. Hudson C.C., Liu M., Chiang G.G., Otterness D.M., Loomis D.C., Kaper F., Giaccia A.J., Abraham R.T. (2002). **Regulation of hypoxia-inducible factor 1 α expression and function by the mammalian target of rapamycin.** Mol Cell Biol. 2002 Oct;22(20):7004-14.
177. Semenza G.L. (2003). **Targeting HIF-1 for cancer therapy.** Nat Rev Cancer. 2003 Oct;3(10):721-32.
178. Masoud G.N., Li W. (2015). **HIF-1 α pathway: role, regulation and intervention for cancer therapy.** Acta Pharm Sin B. 2015 Sep;5(5):378-89.
179. Yang Y., Zhao S., Song J. (2004). **Caspase-dependent apoptosis and -independent poly(ADP-ribose) polymerase cleavage induced by transforming growth factor beta1.** Int J Biochem Cell Biol. 2004 Feb;36(2):223-34.
180. Salvesen G.S., Dixit V.M. (1997). **Caspases: intracellular signaling by**



- proteolysis.** Cell. 1997 Nov 14;91(4):443-6.
181. Tewari M., Quan L.T., O'Rourke K., Desnoyers S., Zeng Z., Beidler D.R., Poirier G.G., Salvesen G.S., Dixit V.M. (1995). ***Yama/ CPP32 beta, a mammalian homolog of CED-3, is a CrmA-inhibitable protease that cleaves the death substrate poly(ADP-ribose) polymerase.*** Cell. 1995 Jun 2;81(5):801-9.
182. Germain M., Affar E.B., D'Amours D., Dixit V.M., Salvesen G.S., Poirier G.G. (1999). ***Cleavage of automodified poly(ADP-ribose) polymerase during apoptosis. Evidence for involvement of caspase-7.*** J Biol Chem. 1999 Oct 1;274(40):28379-84.
183. Hartmann S., Günther N., Biehl M., Katzer A., Kuger S., Worschech E., Sukhorukov V.L., Krohne G., Zimmermann H., Flentje M., Djuzenova C.S. (2013). ***Hsp90 inhibition by NVP-AUY922 and NVP-BEP800 decreases migration and invasion of irradiated normoxic and hypoxic tumor cell lines.*** Cancer Lett. 2013 May 1;331(2):200-10.
184. Ma J., Zhang L., Zhang J., Liu M., Wei L., Shen T., Ma C., Wang Y., Chen Y., Zhu D. (2013). ***15-lipoxygenase-1/15-hydroxyeicosatetraenoic acid promotes hepatocellular cancer cells growth through protein kinase B and heat shock protein 90 complex activation.*** Int J Biochem Cell Biol. 2013 Jun;45(6):1031-41.
185. Hennessy B.T., Smith D.L., Ram P.T., Lu Y., Mills G.B. (2005). ***Exploiting the PI3K/AKT pathway for cancer drug discovery.*** Nat Rev Drug Discov. 2005 Dec;4(12):988-1004.
186. Ko H.S., Lee H.J., Kim S.H., Lee E.O. (2012). ***Piceatannol suppresses breast cancer cell invasion through the inhibition of MMP-9: involvement of PI3K/AKT and NF- κ B pathways.*** J Agric Food Chem. 2012 Apr 25;60(16):4083-9.
187. Srethapakdi M., Liu F., Tavorath R., Rosen N. (2000). ***Inhibition of Hsp90 function by ansamycins causes retinoblastoma gene product-dependent G1 arrest.*** Cancer Res. 2000 Jul 15;60(14):3940-6.
188. Münster P.N., Srethapakdi M., Moasser M.M., Rosen N. ***Inhibition of heat shock protein 90 function by ansamycins causes the morphological and***



- functional differentiation of breast cancer cells.** Cancer Res. 2001 Apr 1;61(7):2945-52.
189. Hostein I., Robertson D., DiStefano F., Workman P., Clarke P.A. (2001). **Inhibition of signal transduction by the Hsp90 inhibitor 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin results in cytostasis and apoptosis.** Cancer Res. 2001 May 15;61(10):4003-9.
190. García-Morales P., Carrasco-García E., Ruiz-Rico P., Martínez-Mira R., Menéndez-Gutiérrez M.P., Ferragut J.A., Saceda M., Martínez-Lacaci I. (2007). **Inhibition of Hsp90 function by ansamycins causes downregulation of cdc2 and cdc25c and G(2)/M arrest in glioblastoma cell lines.** Oncogene. 2007 Nov 8;26(51):7185-93.
191. Cohen J.J. (1993). **Apoptosis.** Immunol Today. 1993 Mar;14(3):126-30.
192. Darzynkiewicz Z., Bedner E., Li X., Gorczyca W., Melamed M.R. (1999). **Laser-scanning cytometry: A new instrumentation with many applications.** Exp Cell Res. 1999 May 25;249(1):1-12.
193. Dmitrieva N.I., Burg M.B. (2008). **Analysis of DNA breaks, DNA damage response, and apoptosis produced by high NaCl.** Am J Physiol Renal Physiol. 2008 Dec;295(6):F1678-88.
194. Li Y., Yao J., Chang M., Cuendet M., Bolton J.L. (2004). **Altered apoptotic response in MCF 10A cells treated with the equine estrogen metabolite, 4-hydroxyequilenin.** Toxicol Lett. 2004 Dec 30;154(3):225-33.
195. Yim S.V., Kim K.H., Kim C.J., Chung J.H. (2000). **Serotonin induces apoptosis in PGT-beta pineal gland tumor cells.** Jpn J Pharmacol. 2000 Sep;84(1):71-4.
196. Kim K.H., Joo K.J., Park H.J., Kwon C.H., Jang M.H., Kim C.J. (2005). **Nicotine induces apoptosis in TM3 mouse Leydig cells.** Fertil Steril. 2005 Apr;83 Suppl 1:1093-9.
197. Huang W.W., Yang J.S., Pai S.J., Wu P.P., Chang S.J., Chueh F.S., Fan M.J., Chiou S.M., Kuo H.M., Yeh C.C., Chen P.Y., Tsuzuki M., Chung J.G. (2012). **Bufalin induces G0/G1 phase arrest through inhibiting the levels of cyclin D, cyclin E, CDK2 and CDK4, and triggers apoptosis via mitochondrial signaling pathway in T24 human bladder cancer cells.** Mutat



Res. 2012 Apr 1;732(1-2):26-33.

198. Chiang J.H., Yang J.S., Ma C.Y., Yang M.D., Huang H.Y., Hsia T.C., Kuo H.M., Wu P.P., Lee T.H., Chung J.G. (2011). ***Danthron, an anthraquinone derivative, induces DNA damage and caspase cascades-mediated apoptosis in SNU-1 human gastric cancer cells through mitochondrial permeability transition pores and Bax-triggered pathways.*** Chem Res Toxicol. 2011 Jan 14;24(1):20-9.