

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

CARACTERIZACIÓN PROTEÓMICA DE LA INHIBICIÓN DE HSP90
EN EL ADENOCARCINOMA DE PULMÓN

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

ÁNGELA MARÍA MARRUGAL LORENZO

DIRECTOR

PROF. LUIS PAZ-ARES RODRÍGUEZ
DRA. SONIA MOLINA PINELO

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Medicina

Programa de Doctorado en Investigación Biomédica



CARACTERIZACIÓN PROTEÓMICA DE
LA INHIBICIÓN DE HSP90
EN EL ADENOCARCINOMA DE PULMÓN

Ángela María Marrugal Lorenzo

Directores

Prof. Luis Paz-Ares Rodríguez

Dra. Sonia Molina Pinelo

TESIS DOCTORAL

Madrid, 2019

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Medicina

Programa de Doctorado en Investigación Biomédica



CARACTERIZACIÓN PROTEÓMICA DE
LA INHIBICIÓN DE HSP90
EN EL ADENOCARCINOMA DE PULMÓN

Ángela María Marrugal Lorenzo

Directores

Prof. Luis Paz-Ares Rodríguez

Dra. Sonia Molina Pinelo

TESIS DOCTORAL

Madrid, 2019

Trabajo realizado bajo el amparo científico y material de la **Unidad de Investigación Clínica en Cáncer de Pulmón H12O-CNIO**, perteneciente al Instituto de Investigación del Hospital 12 de Octubre y al Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO), para optar al grado de Doctor en Investigación Biomédica.

Durante el desarrollo de la Tesis Doctoral se ha realizado una estancia de un total de cuatro meses, en el Instituto de Biomedicina de Sevilla, en el grupo de investigación de Biología Molecular del Cáncer bajo la supervisión del Dr. Amancio Carnero Moya.

Agradecimientos

Desde pequeña aprendí que *es de bien nacida ser agradecida* y por esta razón gracias es una de mis palabras favoritas. Por ello, espero haber mostrado mi agradecimiento en su justo momento a todas las personas que se han cruzado en mi camino. Aun así no voy a perder la oportunidad de dejarlo por escrito.

En primer lugar agradecerle a Luis la oportunidad de realizar mi tesis doctoral en un laboratorio de tan elevado prestigio, bajo su excelente dirección. Eres una mente brillante y he aprendido muchísimo de ti. Pero especialmente me gustaría agradecerte el haberme enseñado que siempre tenemos que tener aspiraciones y sobre todo, que por muy alto que llegues lo más importante es conservar la humanidad y utilizar nuestra posición para intentar ayudar a los demás.

Sonia, simplemente decirte que no podría haber tenido una directora mejor. Muchas gracias por enseñarme tantísimo científica y personalmente, por tus palabras de aliento en los momentos en los que más las he necesitado, por tu positividad, por escucharme y ponerte en mi lugar, en definitiva, por estar siempre ahí.

Muchas gracias a las dos personas que sin ser mis directoras han actuado como tales en infinidad de ocasiones. Mariló, gracias por enseñarme a dar mis primeros pasos con la proteómica y guiarme durante todo este laberíntico recorrido. Irene, gracias por tener siempre una respuesta para mis dudas, por hacerme crecer como científica y por estar en los buenos y malos momentos. Sin vosotras el camino hubiera sido mucho más complicado.

Gracias a Amancio, por compartir tu sabiduría y ayudarme a sentar las bases que me llevaron a alzar el vuelo como científica.

Gracias a mi tutora Rosa, por su buena predisposición y ayuda. Gracias a M.Ángeles, coordinadora del programa de doctorado, por contestar con tanta rapidez a todos los correos y hacerme mucho más fácil la burocracia.

Gracias de corazón a todos los que formaron parte del 215. Desde el primer momento me acogisteis y me hicisteis sentir en casa. Gracias Álvaro, por llevarme de tu mano en mis inicios en el laboratorio y enseñarme tanto. Desde nuestro primer desayuno supe que siempre estarías ahí y aunque ahora nos separa un océano confirmo que no me equivoqué. Llegarás (aún más) lejos y yo estaré aquí para celebrar todos tus éxitos. Laura, llegaste al laboratorio el día "del fin del mundo" para revolucionar el mío, y vaya suerte!. Poder compartir contigo cada momento de la tesis lo ha hecho todo mucho más fácil y divertido. El universo ha querido que seamos amigas y no seré yo la que lo contradiga. Rocío, eres un ejemplo de implicación y amor por la ciencia.

Muchísimas gracias por todo el cariño y apoyo que me has dado, especialmente el de esta última etapa. Gracias a Ricardo, Ana, Carmen, Mari Ángeles y Clarita que también formaron parte de esa familia que hacía que fuese tan feliz cada día al IBiS. Allí también dejé a muchos otros compañeros y amigos, Blanca, Manu, Antonio, Eva, Dani, Marcos, Sandra... son tantos los motivos por los que siempre os voy a recordar... pero por encima de todo os quiero agradecer las conversaciones y risas que hicieron tan llevaderas las infinitas horas en cultivos.

Gracias a todo el laboratorio H120-CNIO, solo por haberos incluido en mi vida ya ha merecido la pena el cambio a Madrid. Eva, un ejemplo como mujer y científica que se supera día a día. Javi, tan inteligente como buena persona, sé que llegarás donde te propongas. Ángel, eres todo corazón y la vida pronto te lo recompensará. Nuria, espero que sigas stat-ndo bien por siempre. Juanma y Arantxa, gracias por darme ánimos a diario. Mireia, David, Eva A., ha sido un placer ser vuestra compañera. Cristina, Patricia Y., Patricia C., Alicia, Alba, Santi, Laura, gracias por hacerme sentir en casa cada una de mis estancias en el CNIO. No puedo olvidar a colón, nuestro grupo hermano. Rocío GC, además de ser todo un referente, siempre he sentido tu apoyo. Mil gracias de corazón. Soldevilla, gracias por estar siempre tan dispuesta y por tan buenos momentos. Bea Gil, cariña, has sido el soplo de aire fresco que necesitaba en esta última etapa. Carlos, eres una gran persona, nunca olvidaré el detalle que tuviste conmigo. Bea Rubio y Geno, gracias por estar siempre ahí, os deseo lo mejor y espero que nuestra relación no termine aquí. Jacinto, Raúl, Patri y Alberto, hemos coincidido poco tiempo, sin embargo agradezco mucho vuestro ánimo para este último tramo. Gracias también a Teresa y Daniel, que siempre se han interesado por mi tesis y me han alentado. En definitiva gracias a todos por brindarme siempre vuestra ayuda y apoyo, por escucharme y por hacerme sentir tan querida. Estoy triste por no poder seguir compartiendo cada día con vosotros, pero sé que es señal de lo bien que he estado en el laboratorio.

Gracias a los servicios de proteómica de la Universidad de Córdoba (Raquel eres genial), del IBiS y del CNIO, los cuales han sido esenciales en el desarrollo de este trabajo.

Tampoco puedo olvidarme de Vicky, informática del i+12 y del grupo de delitos telemáticos de la Guardia Civil. Sin duda, el peor momento de la tesis fue cuando los rusos me hackearon el ordenador (no es broma) y perdí todos los datos de los últimos años. No hay palabras para agradecer vuestro trabajo e implicación. Me salvasteis la vida.

Gracias a mis amigos, la familia que se elige. Aris (inteligencia), Pacote (entrega), María (resolución), Alba

(libertad). Es una suerte teneros en mi vida y haber madurado a vuestro lado. Estar (casi) todos juntos en Madrid ha sido lo más.

Gracias a Antonio y Rubi, por abrirme las puertas de vuestra casa y considerarme una hija desde aquel 24 de Diciembre de hace ya muchos años, pero que nunca olvidaré. Gracias por vuestro apoyo, por ser siempre tan atentos y por alegraros con cada uno de mis éxitos.

Gracias a mi familia que siempre ha valorado muchísimo mi trabajo y me ha dado tanto amor. Especialmente a mi abuela Encarna y cada uno de los Marrugales, soy muy afortunada de pertenecer a esa piña. Gracias por estar siempre ahí cuando lo hemos necesitado. Y a mi abuela Asunción, mi segunda madre, aunque sigues regalándome primaveras desde el cielo me encantaría que estuvieras aquí.

Gracias a mi mejor (y único) hermano, mi niño. Mi primer recuerdo es del día que fuimos a recogerte al hospital, así que no concibo este mundo sin ti y no he podido ser más afortunada por ello. Te tengo total admiración por tu inteligencia, forma de ver la vida, valentía, gran corazón y es un orgullo compartir contigo genes y profesión. A Ángel, muchas gracias por cuidarlo.

Gracias a mi madre, la que nunca se harta de escucharme, la de los mejores consejos. Me enseñaste a estudiar aprendiéndote conmigo aquellos poemas que todavía no hemos olvidado. Sin tu perseverancia nada sería igual. Verte feliz es el mejor de los regalos. Gracias a mi padre, el hombre con el corazón más grande de este planeta. Sinónimo de talento, superación, fortaleza, trabajo duro, dedicación por todo y por todos, dar sin recibir nada a cambio... mi ejemplo a seguir. Nunca podré devolveros todo lo que me habéis dado. Sin vosotros no hubiera llegado hasta aquí.

Gracias a Argantonio, mi todo. Eres la persona más maravillosa que conozco y tengo la suerte de compartir la vida contigo. Pura constancia, inteligencia, creatividad, bondad, observador como pocos y excelente científico... son algunas de las aptitudes que te llevarán muy alto y que me hacen aprender de ti cada día. Solo tú podrías hacer tan fácil que los dos hiciéramos el doctorado a la vez, ya sabes, juntos es mejor. Es imposible agradecerte todo lo que has hecho pero... por acompañarme a hacer los extractos proteicos nocturnos o a revelar los geles 2D en fin de semana, por ayudarme con la estadística, por estar siempre al otro lado, por solucionarme tantísimos problemas, por hacerme la comida cada día, por las largas esperas, por levantarme cada vez que me he caído, por tranquilizarme, por hacerme cada día más feliz, por cuidarme, por crear esta maravillosa portada, por venirte conmigo a Madrid... te dedico esta tesis que también es tuya.

Índices

Índice de contenido

AGRADECIMIENTOS	XIII
ÍNDICES	XIX
Índice de contenido	XXI
Índice de figuras	XXV
Índice de tablas	XXVII
ABREVIATURAS	XXIX
RESUMEN	XXXVII
SUMMARY	XLI
INTRODUCCIÓN	1
1. Cáncer de pulmón.....	3
1.1. Epidemiología y factores de riesgo del cáncer de pulmón.....	3
1.2. Clasificación, diagnóstico, estadificación y pronóstico.....	4
1.3. Biología molecular del cáncer de pulmón.....	7
1.4. Genes conductores y sus terapias dirigidas en adenocarcinoma.....	9
2. Proteínas de choque térmico.....	14
2.1. HSP y cáncer.....	16
3. HSP90.....	17
3.1. La familia HSP90.....	17
3.2. Caracterización estructural de HSP90.....	18
3.3. Mecanismo de acción.....	19
3.4. Ciclo de la chaperona.....	20
3.5. Proteínas clientes.....	22
4. HSP90 en cáncer.....	22
4.1. HSP90 como diana terapéutica en cáncer.....	24
4.2. Inhibición de HSP90 en CPNM.....	26
5. Proteómica.....	31

5.1. Proteómica en la investigación en cáncer.....	31
5.2. Proteómica del cáncer de pulmón.....	35
5.3. Proteómica en el estudio de HSP90 y su inhibición.....	35
HIPÓTESIS	37
OBJETIVOS	41
MATERIALES Y MÉTODOS	45
1. Diseño.....	47
2. Cultivos celulares.....	47
2.1. Líneas celulares.....	47
2.2. Cultivo y conservación de las líneas celulares.....	48
2.3. Transfección celular.....	49
2.4. Determinación de la concentración inhibitoria media.....	50
3. Análisis de expresión a nivel de proteína.....	51
3.1. Anticuerpos.....	51
3.2. Extracción, conservación y cuantificación de proteína total.....	51
3.3. Western Blot.....	52
4. Tratamiento	53
4.1. Tratamiento con los inhibidores de HSPs y posterior evaluación de la respuesta....	53
4.2. Tratamiento con los inhibidores de HSPs previo a los ensayos de proteómica (2D-PAGE y iTRAQ) basados en espectrometría de masas.....	53
5. Electroforesis Bidimensional 2D-PAGE.....	54
5.1. Preparación de la muestra.....	54
5.1.1. Purificación y desnaturalización proteica.....	55
5.1.2. Cuantificación de las proteínas purificadas.....	55
5.2. Isoelectroenfoque o primera dimensión.....	55
5.3. Equilibrado.....	56
5.4. 2D-PAGE.....	57
5.5. Tinción del gel y obtención de la imagen.....	57

5.6. Análisis de la imagen del gel.	58
5.7. Espectrometría de masas post electroforesis 2-D.	58
5.7.1. Preparación de la muestra y análisis.	58
5.7.2. Identificación de proteínas mediante Huella Peptídica.	59
6. iTRAQ.....	60
6.1. Preparación de la muestra.	60
6.2. Digestión de la muestra.	61
6.3. Marcaje Isobárico.	61
6.4. Limpieza y pre-fraccionamiento de las proteínas.	62
6.5. Análisis LC-MS/MS para iTRAQ de 8 plex.....	62
6.6. Identificación y cuantificación relativa de proteínas.	63
7. Análisis bioinformático.	64
7.1. Análisis de los resultados obtenidos mediante electroforesis 2D-PAGE.....	64
7.2. Análisis de los resultados obtenidos a través de iTRAQ 8-plex.....	65
RESULTADOS	67
1.Estudio del perfil proteómico asociado a la inhibición de HSP90 en el adenocarcinoma de pulmón.....	69
1.1. Caracterización de la expresión proteica de HSP90 y proteínas relacionadas en líneas celulares de adenocarcinoma de pulmón.	69
1.2. Efectividad de los inhibidores de HSP90 en las líneas celulares de adenocarcinoma de pulmón.	70
1.3. Perfil proteico asociado a la respuesta a la inhibición de HSP90.	72
1.4. Análisis funcional de las proteínas diferencialmente expresadas.	81
1.5. Perfiles de expresión proteica y rutas de señalización asociadas con las diferentes familias de inhibidores de HSP90 en las líneas de adenocarcinoma de pulmón.	83
1.6. Validación de la expresión diferencial de las proteínas envueltas en la respuesta a los inhibidores de HSP90 en las líneas de adenocarcinoma de pulmón.	87
2. Análisis diferencial del proteoma tras la inhibición de HSP90 en diferentes subgrupos moleculares de adenocarcinoma de pulmón.....	90

2.1. Estudio de la expresión de HSP90 y proteínas relacionadas en distintos subtipos moleculares de adenocarcinoma de pulmón.	91
2.2. Estudio del efecto de la inhibición de HSP90 en distintos subgrupos moleculares de adenocarcinoma de pulmón.	92
2.3. Silenciamiento de HSP90 en las líneas de adenocarcinoma de pulmón.	96
2.4. Detección proteómica de las proteínas diferencialmente expresadas tras los tratamientos de estudio en las líneas de adenocarcinoma de pulmón.	98
2.5. Perfil proteómico de los efectos de la inhibición de HSP90 en los distintos subtipos moleculares de adenocarcinoma de pulmón.	101
2.6. Clasificación funcional de las proteínas desreguladas significativa y específicamente tras la inhibición de HSP90 en los distintos subtipos de adenocarcinoma de pulmón. .	104
3. Búsqueda de potenciales biomarcadores predictivos de la eficacia de la inhibición de HSP90 en el adenocarcinoma de pulmón.	109
3.1. Correlación de las proteínas identificadas con la respuesta a la inhibición de HSP90 en las líneas de adenocarcinoma de pulmón.	109
3.2. Identificación de potenciales biomarcadores predictivos de la respuesta a la inhibición de HSP90 en el adenocarcinoma de pulmón.	110
3.3. Análisis funcional de las proteínas relacionadas con sensibilidad y resistencia a los inhibidores de HSP90.	115
DISCUSIÓN	117
CONCLUSIONES	137
BIBLIOGRAFÍA	141
ANEXO I	165
ANEXO II	189
1. Producción científica derivada de la tesis doctoral.	191
1.1. Aportaciones a congresos.	191
1.2. Publicaciones científicas.	192

Índice de figuras

Figura 1. Incidencia y mortalidad por cáncer en 2018.....	3
Figura 2. Frecuencia de las alteraciones más relevantes descritas en adenocarcinoma de pulmón y en carcinoma epidermoide.....	9
Figura 3. Mecanismo de regulación de la síntesis de HSPs	15
Figura 4. Estructura y funciones biológicas de los dominios del homodímero de HSP90....	19
Figura 5. Representación esquemática del ciclo de hidrólisis del ATP de HSP90	20
Figura 6. Representación gráfica del ciclo de la chaperona.....	21
Figura 7. Flujo de trabajo de las técnicas proteómicas basadas en espectrometría de masas, dependientes o independientes de gel	33
Figura 8. Flujo de trabajo empleado en la metodología de electroforesis bidimensional	60
Figura 9. Diseño experimental seguido en el ensayo de iTRAQ	64
Figura 10. Caracterización de las líneas celulares de adenocarcinoma de pulmón (ADC) incluidas en este objetivo.....	69
Figura 11. Análisis de la sensibilidad a los inhibidores de HSP90 en las líneas celulares de adenocarcinoma de pulmón.....	71
Figura 12. Gel 2-DE representativo de las líneas celulares (A) HCC827, (B) H3122, (C) A549 y (D) H1437 en la condición control o tratadas con el inhibidor de HSP90 17AAG...	73
Figura 13. Gel 2-DE representativo de las líneas celulares (A) HCC827, (B) H3122, (C) A549 y (D) H1437 en la condición control o tratadas con el inhibidor de HSP90 IPI-504 ...	74
Figura 14. Gel 2-DE representativo de las líneas celulares (A) HCC827, (B) H3122, (C) A549 y (D) H1437 en la condición control o tratadas con el inhibidor de HSP90 STA-9090	75
Figura 15. Gel 2-DE representativo de las líneas celulares (A) HCC827, (B) H3122, (C) A549 y (D) H1437 en la condición control o tratadas con el inhibidor de HSP90 AUY-922.	76
Figura 16. Gel 2-DE representativo de las líneas celulares (A) HCC827, (B) H3122, (C) A549 y (D) H1437 en la condición control o tratadas con la combinación del inhibidor de HSP70 VER-155008 más el inhibidor de HSP90 17-AAG.....	77
Figura 17. Rutas canónicas, identificadas mediante PANTHER, asociadas a la inhibición de HSP90	82
Figura 18. Estudio de la respuesta a los inhibidores de HSP90 agrupados por familia	83
Figura 19. Validación mediante Western Blot de las proteínas identificadas, en los análisis de 2-DE y espectrometría de masas, como desreguladas tras la inhibición de HSP90	88

Figura 20. Validación de la tendencia en la variación de expresión de las proteínas de interés tras la inhibición de HSP90.....	90
Figura 21. Caracterización del panel de líneas celulares de adenocarcinoma de pulmón empleadas en este objetivo	91
Figura 22. Evaluación de la inhibición de HSP90 en las líneas de adenocarcinoma de pulmón	95
Figura 23. Efectividad del silenciamiento de HSP90 en el panel de líneas celulares de adenocarcinoma de pulmón	97
Figura 24. Proteínas diferencialmente expresadas identificadas por iTRAQ en las líneas de adenocarcinoma de pulmón	98
Figura 25. Representación de las proteínas significativas tras la inhibición de HSP90 en los distintos subtipos moleculares de adenocarcinoma de pulmón	102
Figura 26. Diagrama de Venn mostrando las proteínas desreguladas significativamente y de manera específica tras la inhibición de HSP90 en los distintos subgrupos moleculares de adenocarcinoma de pulmón	103
Figura 27. Distribución de las rutas alteradas tras la inhibición de HSP90 en los distintos subgrupos moleculares de adenocarcinoma de pulmón	106
Figura 28. Enumeración de los procesos biológicos más relevantes relacionados con las proteínas desreguladas en los distintos subtipos moleculares de adenocarcinoma de pulmón	108
Figura 29. Clasificación de las proteínas conforme a la respuesta a la inhibición de HSP90	111
Figura 30. Estudio de las proteínas asociadas con la sensibilidad, de acuerdo a la familia de inhibidores de HSP90, en el panel de líneas de adenocarcinoma de pulmón	112
Figura 31. Interactoma de las 52 proteínas relacionados con la resistencia a 17-AAG, IPI-504 y AUY-922	114

Índice de tablas

Tabla 1. Descriptores T, N y M de la última clasificación TNM del cáncer de pulmón.	5
Tabla 2. Agrupación por estadios de la última clasificación TNM del cáncer de pulmón.	7
Tabla 3. Breve resumen de la nomenclatura, genes codificantes, miembros y función de las principales familias de proteínas de choque térmico (HSP) en mamíferos.	14
Tabla 4. Proteínas clientes de HSP90 y su contribución al proceso tumoral [145, 160].	23
Tabla 5. Ensayos clínicos finalizados de los inhibidores de HSP90 en pacientes con cáncer de pulmón no microcítico.	28
Tabla 6. Ensayos clínicos, activos o finalizados sin resultados, de los inhibidores de HSP90 en pacientes con cáncer de pulmón no microcítico.	30
Tabla 7. Panel de líneas celulares de pulmón empleadas en el estudio.	47
Tabla 8. Plásmidos utilizados a lo largo del trabajo de tesis.	49
Tabla 9. Inhibidores empleados en este proyecto de tesis.	50
Tabla 10. Especificaciones de los anticuerpos así como de la procedencia y dilución empleada en su uso.	51
Tabla 11. Protocolo de isoelectroenfoque.	56
Tabla 12. Valores IC ₅₀ de los diferentes inhibidores de HSP90 y HSP70 en las líneas celulares de adenocarcinoma de pulmón.	71
Tabla 13. Número de <i>spots</i> proteicos emparejados, en las líneas celulares de adenocarcinoma de pulmón, bajo las diferentes condiciones de estudio.	78
Tabla 14. Número de proteínas diferencialmente expresadas, en los diferentes inhibidores con respecto a ausencia de tratamiento.	79
Tabla 15. Proteínas diferencialmente expresadas compartidas por los dos inhibidores de HSP90 derivados de geldanamicina.	84
Tabla 16. Proteínas diferencialmente expresadas compartidas por los dos inhibidores de HSP90 derivados de radicicol.	85
Tabla 17. Valores IC ₅₀ de los diferentes inhibidores de HSP90 y HSP70 en el panel de líneas celulares de adenocarcinoma de pulmón.	93
Tabla 18. Número de proteínas con cambios significativos de expresión tras el tratamiento con los inhibidores de HSP90 (17-AAG, IPI-504, STA-9090, AUY-922), el inhibidor de HSP70 (VER-155008), la inhibición combinada de HSP70 y HSP90 (VER-155008 + 17-AAG) o el silenciamiento génico de HSP90 identificadas en el panel de líneas de adenocarcinoma de pulmón.	100

Tabla 19. Determinación proteómica de la inhibición de HSP90 en los diferentes subtipos moleculares de adenocarcinoma de pulmón.	101
Tabla 20. Anotación funcional de la inhibición de HSP90 en los diferentes subtipos moleculares de adenocarcinoma de pulmón.	104
Tabla 21. Rutas biológicas relacionadas con las proteínas diferencialmente expresadas tras la inhibición de HSP90 en los diferentes subtipos moleculares de adenocarcinoma de pulmón.	105
Tabla 22. Proteínas asociadas a las rutas enriquecidas bajo la inhibición de HSP90 de manera común en los diferentes subtipos moleculares de adenocarcinoma de pulmón. .	107
Tabla 23. Proteínas relacionadas con la sensibilidad y resistencia a los diferentes inhibidores de HSP90 en el panel de líneas celulares de adenocarcinoma de pulmón.	110
Tabla 24. Rutas asociadas con la susceptibilidad o resistencia a la inhibición de HSP90 en el panel de líneas celulares de adenocarcinoma de pulmón.	115

Abreviaturas

17-AAG: tanespimicina
17-DMAG: alvespimicina
2D-DIGE: electroforesis bidimensional diferencial
2D-PAGE: electroforesis bidimensional en gel de poliacrilamida
5-HT: 5-hidroxitriptamina
ACN: acetonitrilo
ADC: adenocarcinoma de pulmón
ADI1: acireductona dioxigenasa 1
ADN: ácido desoxirribonucleico
AGK: acilglicerol quinasa
AGR2: homólogo 2 de la proteína de gradiente anterior
AHA1: homólogo 1 del activador de la ATPasa de HSP90
AK2: adenilato quinasa 2
AKT1: proteína quinasa de serina treonina RAC-beta
AKT2: proteína quinasa de serina treonina RAC-alfa
ALK: quinasa del linfoma anaplásico
ALK t+: con translocación en el gen ALK
APAF1: factor 1 activador de la proteasa apoptótica
ARN: ácido ribonucleico
ARNr: ARN ribosómico
ARNt: ARN de transferencia
ARNT: translocador nuclear del receptor de hidrocarburos de arilo
ARRB1: beta-arrestina 1
ARSA: arilsulfatasa A
AR-α: adrenoreceptor alfa
ASS1: arginosuccinato sintasa 1
AT13387: onalespib
ATCC: del inglés, *American Type Culture Collection*
ATP5D: subunidad δ de la ATP sintetasa mitocondrial
AUY-922: luminespib
Bcl2: proteína 2 de la leucemia/linfoma de células B
BRAF: producto del homólogo B del oncogén viral de sarcoma murino v-Raf
BSA: albumina sérica
CAD: complejo enzimático constituido por carbamilfosfato sintasa, aspartato transcarbamilasa y dihidroorotasa
CCDC90B: proteína 90B que contiene el dominio helicoide enrollado (*coiled-coil*)
CCKR: receptor de colecistoquinina
CDK: quinasa dependiente de ciclina
CDK11p110: quinasa dependiente de ciclina 11 (p110)
CDK4: quinasa dependiente de ciclina 4
CDKN2A: inhibidor 2A de quinasa dependiente de ciclina
CoQ10: coenzima Q10
CPM: cáncer de pulmón microcítico
CPNM: cáncer de pulmón no microcítico
CS: citrato sintasa

Abreviaturas

CSRP2: proteína 2 rica en cisteína y glicina
CTLA-4: antígeno-4 asociado al linfocito T citotóxico
DDR2: receptor con dominio discoidina 2
DLGAP5: proteína 5 asociada a discos grandes
DMSO: dimetilsulfóxido
DTT: ditioneitol
EA: efectos adversos
EDTA: ácido etilendiaminotetraacético
EE: estabilización de la enfermedad
EGF: factor de crecimiento epidérmico
EGFR: receptor del factor de crecimiento epidérmico
EGFR m+: con mutación en el gen EGFR
EHD4: proteína 4 con dominio EH
EIF3SI: subunidad I del factor de iniciación de la traducción eucariótico 3
ELISA: ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
EMA: Agencia Europea de Medicamentos
EML4-ALK: translocación del gen de la proteína 4 similar a proteína asociada a microtúbulos de equinodermo (EML4) y el gen de la quinasa del linfoma anaplásico (ALK)
EPOC: enfermedad pulmonar obstructiva crónica
ESI: ionización por electrospray
FBS: suero fetal bovino
FDA: Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos
FDR: del inglés, *False Discovery Rate*
FGF: factor de crecimiento fibroblástico
FGFR1: receptor del factor de crecimiento fibroblástico_1
FLT3: receptor tirosina quinasa clase III
FNBP1L: proteína 1 de unión a formina
GA: geldanamicina
GHL: girasa-HSP90-histidina quinasa-MutL
GNAI3: subunidad α de la proteína G (k) de unión a nucleótidos de guanina
GnRHR: receptor de la hormona liberadora de gonadotropina
GO: del inglés, *Gene Ontology*
GPAA1: proteína 1 accesorio de anclaje a glicosilfosfatidilinositol
GPS: del inglés, *Global Protein Service*
GRP78: proteína de 78kDa regulada por glucosa
GRP94: proteína de 94kDa regulada por glucosa
HDGFRP3: proteína 3 relacionada con el factor de crecimiento derivado del hepatoma
HDHD3: proteína 3 que contiene el dominio haloácido dehalogenasa hidrolasa
HER2: receptor-2 del factor de crecimiento epidérmico humano
HIF-1 α : factor inducible por hipoxia 1 α
HIP: proteína interactuante con HSP70
HMG1: 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A reductasa 1
HMGCS1: hidroximetilglutaril-CoA sintasa
HOP: proteína organizadora de HSP90-HSP70
HPLC: cromatografía líquida de alta resolución

HSC70: proteína de choque térmico constitutiva de 70 KDa
HSC71: proteína de choque térmico constitutiva de 71 KDa
HSEs: elementos de choque térmico
HSFs: factores de choque térmico
HSP: proteína de choque térmico
HSP70: proteína de choque térmico inducible de 70 KDa
HSP90 α : proteína de choque térmico 90 alfa
HSP90 β : proteína de choque térmico 90 beta
HSPA6: proteína 6 de la familia HSP70
HSR: respuesta a choque térmico
IC₅₀: concentración inhibitoria media
IC₈₀: concentración inhibitoria 80
ICAT: marcaje de afinidad codificado por isótopos
IDH2: isocitrato deshidrogenasa dependiente de NADP+
IEF: isoelectroenfoque
IGBP1: proteína 1 de unión a inmunoglobulina
iGluR: receptor ionotrópico de glutamato
IKK: quinasa I κ B
IL: interleuquina
IPG: gradientes de pH inmovilizados en un soporte plástico
IPI-504: retaspimicina
IRAK: quinasa asociada con el receptor de interleuquina-1
ITCH: E3 ubiquitín-ligasa homólogo de Itchy
ITQ: inhibidor de tirosina quinasa
iTRAQ: etiquetas isobáricas para la cuantificación relativa y absoluta
KRAS: producto del gen homólogo al oncogén del virus del sarcoma de la rata Kirsten V-Ki-Ras2
KRAS m+: con mutación en el gen KRAS
LC: cromatografía líquida
LDH: lactato deshidrogenasa humana
LDHB: lactato deshidrogenasa B
LKB-1: quinasa hepática B1
MAFG: Factor de transcripción MafG
MALDI: desorción/ionización láser asistida por matriz
MEK-1: quinasa 1 estimulada por mitógenos de Erk
MET: receptor del factor de crecimiento hepatocitario
MHC-I: complejo mayor de histocompatibilidad clase I
MHC-II: complejo mayor de histocompatibilidad clase II
mitHSP70: HSP70 mitocondrial
MLH1: homólogo 1 de MutL
MMP2: metaloproteínasa de la matriz extracelular-2
MMP9: metaloproteínasa de la matriz extracelular-9
MMTS: metilo metanotiosulfonato
MRPS23: proteína ribosomal mitocondrial S23
MS: espectro de masas

Abreviaturas

MT1-MMP: metaloproteínasa de la matriz extracelular asociada a la membrana, tipo 1
mTOR: proteína quinasa de serina treonina mTOR
MTP70: proteína de choque térmico mitocondrial de 70 KDa
MYC: proto-oncogén homólogo del oncogén viral de mielocitomatosis aviar V-Myc
MYT1: Factor de transcripción de la mielina_1
NA: noradrenalina
NEK: quinasa relacionada con NIMA
NF-κB: factor de transcripción nuclear kappa B
NO: óxido nítrico
NOS: óxido nítrico sintasa
PA: activador del plasminógeno
PANTHER: del inglés, *Protein ANalysis THrough Evolutionary Relationships*
PBMCs: células mononucleares de sangre periférica
PCI: punto de control inmunitario
PD-1: molécula de muerte programada 1
PDGF: factor de crecimiento derivado de plaquetas
PDHX: piruvato deshidrogenasa mitocondrial
PDI: proteínas disulfuro isomerasas
PD-L1: ligando 1 de muerte programada
PDSS2: subunidad 2 de la decaprenil difosfato sintasa
PI3K: fosfatidilinositol 3 quinasa
PIK3CA: subunidad catalítica alfa de PI3K
PLK: serina-treonina proteína quinasa tipo Polo
PLP: piridoxal-5-fosfato
PPP: ruta de las pentosas fosfato
PRKAA1: subunidad catalítica alfa-1 de la proteína quinasa AMP-activada
PROTEÍNA G: proteína de bajo peso molecular que une guanosín trifosfato (GTP)
PTBP1: proteína 1 de unión al tracto de polipirimidina
PTBP3: proteína 3 de unión al tracto de polipirimidina
PTEN: homólogo de fosfatasa y tensina
RA: receptor androgénico
RD: radicol
RE: retículo endoplásmico
RET: reordenado durante la transfección
ROS1: ROS proto-oncogén 1, receptor tirosina quinasa
RP: respuesta parcial
RRAGA: proteína A de unión a GTP homóloga de Ras
RRP1: proteína 1 de procesamiento de ARN ribosómico
RRP12: homólogo de la proteína 12 de procesamiento de ARN ribosómico
RTKN: rotequina
SC: segmento cargado
SDS: sodio dodecilsulfato
SDS-PAGE: gel de poliacrilamida
SELDI: ionización/desorción láser inducida en superficie
SG: supervivencia global

SHMT1: serina hidroximetil transferasa 1
SHMT2: serina hidroximetil transferasa 2
sHSPs: pequeñas proteínas de choque térmico
SI: sistema inmune
SILAC: marcaje isotópico estable con aminoácidos en cultivos celulares
siRNA: pequeño fragmento de ARN de interferencia
SLC25A3: proteína transportadora de fosfato mitocondrial
SLP: supervivencia libre de progresión
SREBF1: proteína de unión al elemento regulador del colesterol
SSDF-1: factor 1 derivado de células estromales
STA-9090: ganetespib
STAT1: transductor de señal y activador de la transcripción 1
STRING: del inglés, *Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/proteins*
SUMO3: proteína 3 modificadora de pequeño tamaño tipo ubiquitina
TA: tolerabilidad aceptable
TAF4: subunidad 4 del factor de transcripción TFIID
TCE: tasa de control de la enfermedad
TCEP: tris-(2-carboxietil) fosfina
TEAB: tampón de bicarbonato de trietilamonio
TGFβ: factor de crecimiento transformante β
TIMP1: inhibidor tisular de la metaloproteínasa-1
TN: triple negativo; EGFR, ALK y KRAS silvestres
TNM: tumor-nódulo-metástasis
TOF: tiempo de vuelo
TOP1: topoisomerasa 1
TP53: proteína tumoral p53
TPR: repeticiones tetratricopeptídicas
TRAP-1: proteína 1 asociada al receptor del factor de necrosis tumoral
TRO: tasa de respuesta objetiva
TUBB2A: β-tubulina 2A
TUBB6: β-tubulina 6
UBE2L3: enzima E2 L3 conjugadora de ubiquitina
UFM1: ubiquitina dobladora modificadora-1
VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular
VEGFR: receptor del factor de crecimiento endotelial vascular
WB: western blot
wt: silvestre
ZFAND1: dedo de zinc AN1

Resumen

Las proteínas de choque térmico (HSPs) son inducidas, en respuesta a una amplia variedad de factores fisiológicos y ambientales estresantes, permitiendo a las células sobrevivir a condiciones que de otro modo hubieran sido letales. En concordancia con ello, las HSPs se hacen esenciales en el mantenimiento de la célula tumoral, describiéndose una expresión alterada de estas proteínas en casi todos los tipos tumorales. En concreto, la sobreexpresión de HSP90 ha sido relacionada con una pobre prognosis en cáncer, debido a su capacidad para regular y estabilizar un gran número de proteínas oncogénicas, denominadas clientes de HSP90. Particularmente, en el cáncer de pulmón no microcítico (CPNM), el subtipo histológico de adenocarcinoma de pulmón presenta diversas alteraciones moleculares conductoras que son clientes de HSP90 y algunas como EGFR o EML4-ALK exhiben una fuerte dependencia de la chaperona que las hace más sensibles a los inhibidores de HSP90. Sin embargo, tal y como se ha visto en los diferentes ensayos clínicos realizados hasta la fecha en esta patología, no todos los pacientes susceptibles de ser sensibles a la inhibición de HSP90 responden positivamente al tratamiento. Por todo esto, el objetivo de esta tesis doctoral es la identificación de la firma proteica subyacente a la inhibición de HSP90, así como la búsqueda de potenciales biomarcadores de sensibilidad y respuesta, esenciales para maximizar la eficacia del tratamiento en el adenocarcinoma de pulmón.

Para tal fin se han empleado diferentes líneas celulares de adenocarcinoma de pulmón, representativas de las alteraciones moleculares más relevantes en clínica (mutación en EGFR, reorganización EML4-ALK, mutación en KRAS o la forma silvestre de EGFR, ALK y KRAS). En ellas, para llevar a cabo el estudio de la respuesta a esta inhibición, HSP90 ha sido farmacológicamente inhibida mediante derivados de geldanamicina (17,AAG e IPI-504) y radicicol (STA-9090 y AUY-922), así como silenciada genéticamente mediante el uso de ARN de interferencia, para detectar efectos indirectos de su inhibición. Además, ha sido bloqueada la chaperona HSP70, sola o en combinación con HSP90, dada su estrecha relación con esta última. Finalmente, mediante el uso de técnicas proteómicas independientes, se han evaluado los perfiles proteómicos tras la inhibición de HSP90. Esto ha permitido, además de determinar las rutas biológicas involucradas en la respuesta, identificar proteínas susceptibles de ser empleadas como biomarcadores predictivos y de monitorización de la respuesta a la inhibición de esta chaperona en pacientes con adenocarcinoma de pulmón.

Nuestros resultados mostraron que todas las líneas celulares de adenocarcinoma de pulmón fueron más sensibles a los inhibidores de HSP90 que al inhibidor de HSP70 empleado. En lo que respecta a los inhibidores de HSP90, los análogos de radicicol fueron más eficientes que los análogos de geldanamicina. Por otra parte se demostró la correcta inhibición de HSP90, en todas las líneas celulares estudiadas, a través de la detección de la degradación de las proteínas clientes y la expresión compensatoria de HSP70, el único biomarcador de respuesta empleado hasta la fecha. Por último, se corroboró la mayor eficacia de la inhibición de HSP90 en las líneas celulares que presentaban mutación en EGFR o translocación EML4-ALK, debido a su elevada dependencia de HSP90.

A continuación, mediante electroforesis bidimensional, se analizaron los perfiles proteómicos implicados en la respuesta a inhibidores de HSP90, así como con la

combinación inhibitoria de HSP90 y HSP70. Los resultados revelaron 254 proteínas diferencialmente expresadas tras los tratamientos, entre los cuales, además de aquellas relacionadas con la propia respuesta a choque térmico (HSP70, HSP90 α y HSC71 entre otras), identificamos EIF3SI, transcetolasa, citrato sintasa, AGR2, MLH1 y Rab-37 como proteínas implicadas en la respuesta al bloqueo de HSP90 en el adenocarcinoma de pulmón. Posteriormente, debido a la alta heterogeneidad molecular presente en el adenocarcinoma de pulmón se estudió la respuesta a la inhibición de HSP90 en base a las alteraciones moleculares subyacentes a esta patología (mutación en EGFR, reorganización EML4-ALK, mutación en KRAS o la forma silvestre de EGFR, ALK y KRAS). Para tal fin, se usó la técnica proteómica de alto rendimiento iTRAQ, mediante la cual se identificaron casi 9000 proteínas relacionadas con la respuesta a la inhibición de HSP90 en el adenocarcinoma de pulmón. Posteriormente, se seleccionaron aquellas proteínas que, tras la inhibición de HSP90, fueron desreguladas específica y significativamente en el conjunto de líneas celulares representantes de cada alteración molecular estudiada. De las aproximadamente 2000 proteínas identificadas, solo ADI1 y RRP1 se encontraron desreguladas en todos los subgrupos moleculares estudiados; por lo que proponemos su posible papel como biomarcadores de respuesta a la inhibición de HSP90. Por otro parte, la anotación funcional de las proteínas alteradas en dichos análisis sugirió que los inhibidores de HSP90 afectan a un amplio número de rutas biológicas, muchas de las cuales fueron dependientes del inhibidor empleado así como del subgrupo molecular estudiado.

Finalmente, identificamos proteínas susceptibles de ser empleadas como biomarcadores predictivos de la respuesta a la inhibición de HSP90. Entre otras proteínas, subrayamos la relación de LDHB y TOP1 con la sensibilidad y resistencia a geldanamicina, respectivamente. Igualmente, rotequina y PDSS2 correlacionaron, respectivamente, con sensibilidad y resistencia a radicol. Sin diferenciar entre familias de inhibidores, se identificó la relación entre la resistencia a la inhibición de HSP90 y la ruta de p53 por privación de glucosa, asociada además con la respuesta en las líneas celulares con mutación en KRAS, representantes de los tumores con una peor respuesta clínica a estos inhibidores. Asimismo, nuestros resultados muestran como correlacionan la biosíntesis de arginina con la sensibilidad a los inhibidores de HSP90, previamente asociada con el correcto desarrollo de la misma en los subgrupos moleculares con mutación en EGFR y translocación EML4-ALK, siendo estos los tumores con mejor respuesta clínica.

En su conjunto, los resultados presentados, en forma de perfiles proteómicos y rutas alteradas, contribuyen a expandir nuestro conocimiento del mecanismo de acción subyacente a los inhibidores de HSP90 en el adenocarcinoma de pulmón. Además, se identifican proteínas susceptibles de ser empleadas como biomarcadores predictivos o de monitorización de la respuesta, que podrían mejorar la eficacia de la inhibición de HSP90 en este tipo tumoral.

Summary

Heat shock proteins (HSPs) are induced in response to a wide variety of physiological and environmental stress factors, allowing cells to survive conditions that would otherwise be lethal. Accordingly, HSPs become essential in the maintenance of the tumor cell and the altered expression of these proteins is described in almost all tumor types. Specifically, overexpression of HSP90 has been linked to a poor prognosis in cancer, principally due to its ability to regulate and stabilize a large number of oncogenic proteins, so-called HSP90 clients. Particularly, in the Non-Small Cell Lung cancer (NSCLC), the histological subtype lung adenocarcinoma presents various molecular alterations in gene drivers which are HSP90 clients, and some of them -such as EGFR or EML4-ALK- exhibit a strong dependence on this chaperone making them more sensitive to HSP90 inhibitors. However, not all patients liable to being sensitive to HSP90 inhibition respond positively to the treatment in clinical trials. Based on it, the objective of this Doctoral Thesis is the identification of the protein signature underlying HSP90 inhibition, as well as the search for potential biomarkers of sensitivity and response to this therapeutic strategy, essential to maximize the treatment efficacy in lung adenocarcinoma.

For this purpose, we utilised different lung adenocarcinoma cell lines that represent the most relevant molecular alterations found in lung adenocarcinoma patients: EGFR mutation, EML4-ALK rearrangement, and KRAS mutation, versus the wild type cell line. In order to study the response to this inhibition, we pharmacologically interrupted HSP90 using geldanamycin- (17-AAG and IPI-504) and radicicol- (STA-9090 and AUY-922) derivatives, as well as genetically silenced it with small interfering RNA, to detect off-target effects of its inhibition. In addition, we additionally inhibited HSP70, alone or in combination with HSP90, given the close relationship between both chaperones. Finally, we evaluated the proteomic profiles after HSP90 inhibition, using two independent proteomic techniques. This allowed the determination of the biological pathways involved in the response, and the identification of proteins that could be potentially used as biomarkers to predict and monitor the response to HSP90 inhibition in patients with lung adenocarcinoma.

Our results showed that the studied lung adenocarcinoma cell lines were more sensitive to the HSP90 inhibitors than to the HSP70 inhibitor employed. Regarding HSP90 inhibitors, radicicol derivatives were more efficient than geldanamycin derivatives. On the other hand, we confirmed the efficient inhibition of HSP90 in all the studied cell lines, through the detection of the degradation of HSP90 client proteins and the HSP70 induction, the only response biomarker currently used. Finally, we corroborated the greater efficacy of HSP90 inhibition in cell lines that presented mutations in EGFR or EML4-ALK translocation, due to their strong dependence on HSP90.

Next, we used two-dimensional electrophoresis to identify the proteomic profiles associated with the previously evaluated HSP90 inhibitors or with simultaneous treatment with HSP90 and HSP70 inhibitors. The results revealed 254 differentially expressed proteins after treatments, among which we identified proteins related to Heat Shock Response (HSP70, HSP90 α and HSC71 among others), and additionally we identified EIF3SI, transketolase, citrate synthase, AGR2, MLH1 and Rab-37 as proteins involved in the response to HSP90 inhibition in lung adenocarcinoma. Subsequently, due to the molecular

Summary

heterogeneity of lung adenocarcinoma, we studied the response to HSP90 inhibition based on the molecular alterations underlying this pathology (EGFR mutation, EML4-ALK rearrangement, KRAS mutation versus wild type). To this end, we used the high throughput proteomic technique iTRAQ, by which were identified about 9000 proteins related to the response to HSP90 inhibition in lung adenocarcinoma. Then, we selected proteins specifically and significantly deregulated after HSP90 inhibition, for each of the cell lines presenting a particular molecular alteration. Of the approximately 2000 proteins identified on the basis of that selection, only ADI1 and RRP1 were deregulated in all the molecular subgroups studied. Therefore, we propose their possible role as biomarkers of response to HSP90 inhibition. Specifically, the overexpression of ADI1 and the underexpression of RRP1 should be taken into consideration for monitoring the correct inhibition of HSP90 in lung adenocarcinoma, independently of the molecular subtype. On the other hand, the functional annotation of the altered proteins suggests that HSP90 inhibitors affect a large number of biological pathways, many of which are dependent on the inhibitor employed or the molecular subgroup studied.

Finally, we identified proteins that could be used as predictive biomarkers of response to HSP90 inhibition. Among other proteins, we highlight the relationship between LDHB and TOP1 with sensitivity and resistance to geldanamycin derivatives, respectively. Likewise, rhotekin and PDSS2 correlated with sensitivity and resistance to radicicol derivatives, respectively. From another perspective, we identified a relationship between resistance to HSP90 inhibition and p53 pathway by glucose deprivation. This pathway was also previously associated with the response in cell lines with mutation in KRAS, representative of tumors with the poorest clinical response to these inhibitors. Likewise, our results show how arginine biosynthesis correlates with sensitivity to HSP90 inhibitors which was related to the prediction of the response in the molecular subgroups with mutation in EGFR and EML4-ALK translocation, these being the tumors with the best clinical response.

The results presented in this Thesis contribute to expand our knowledge about the mechanism of action underlying HSP90 inhibitors in lung adenocarcinoma. In addition, we identify proteins that could be used as potential biomarkers to predict or monitor the response to HSP90 inhibitors, which could improve the efficacy of this therapeutic strategy in this tumor type.

Introducción

1. Cáncer de pulmón.

1.1. Epidemiología y factores de riesgo del cáncer de pulmón.

El cáncer es uno de los principales problemas de salud a nivel mundial, causando un elevado número de muertes anuales, las cuales se calcula que incrementarán desde 7.1 millones en 2002 hasta 11.5 millones en 2030 [1]. El cáncer de pulmón presenta una elevada incidencia (11.6%), y es globalmente sin discernir sexos, el tipo tumoral con mayor tasa de mortalidad, representando aproximadamente una de cada cinco muertes por cáncer. Diferenciando por sexo, en varones el cáncer de pulmón es tanto el cáncer más frecuente como el principal causante de muerte, sin embargo en mujeres es el tercer tipo tumoral más diagnosticado y la segunda causa de muerte (Figura 1) [2].

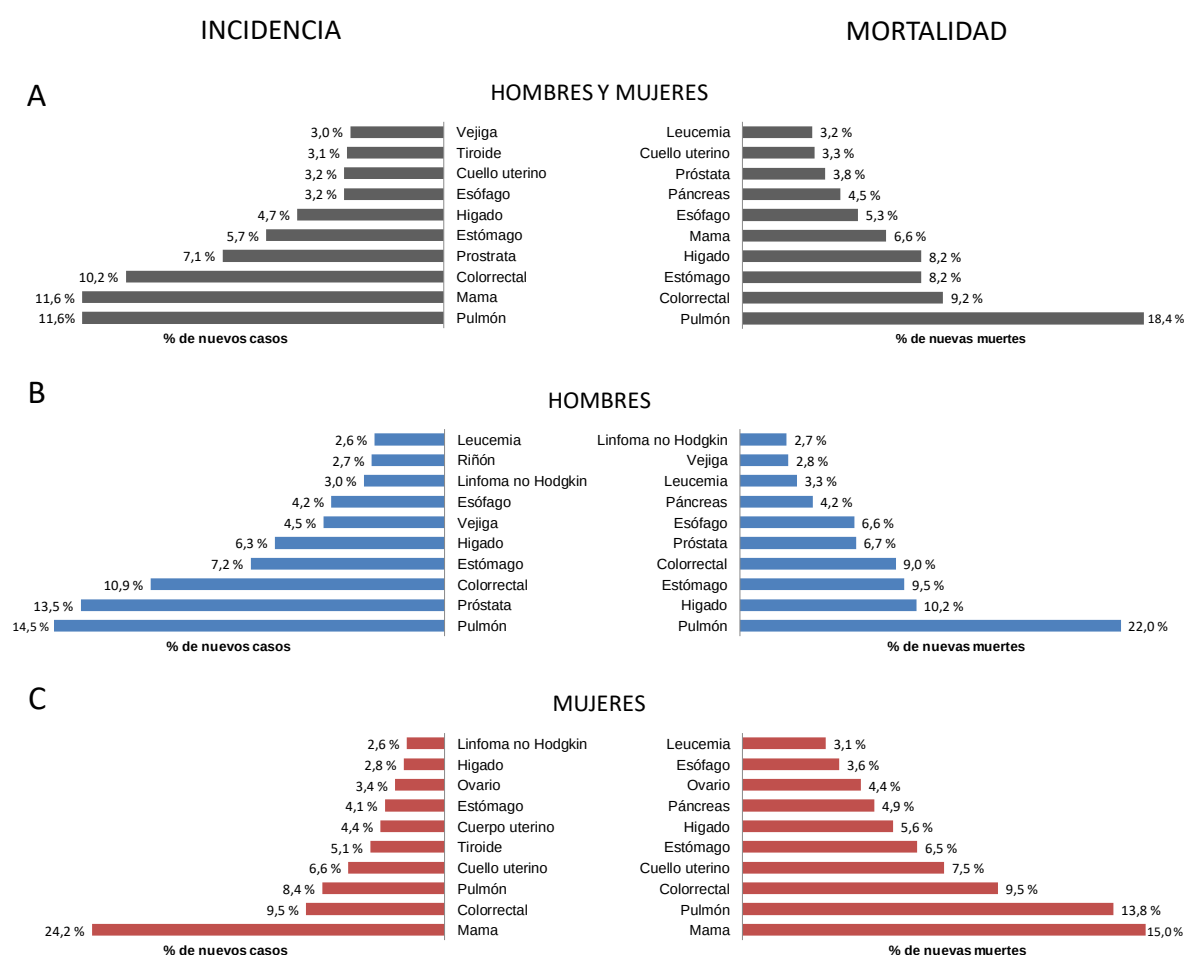


Figura 1. Incidencia y mortalidad por cáncer en 2018. Porcentaje de nuevos casos y nuevas muertes, de los tipos de cáncer más común, a nivel mundial en (A) ambos sexos, así como (B) en hombres y (C) mujeres de manera independiente.

En España, durante el transcurso del año 2019, se estima que serán diagnosticados 277.234 nuevos casos de cáncer. De estos, ocupando el tercer puesto detrás de los tumores colorrectales, de próstata y mama, 29.503 serán nuevos casos de cáncer de pulmón. Actualmente existe una mayor afectación en varones, donde es un 60% más frecuente que en mujeres. En los próximos años se estima un aumento de la incidencia con aproximadamente 35.000 nuevos casos esperados para 2025 y más de 40.000 para 2035. Con respecto a la tasa de mortalidad, en 2018 se produjeron 22.896 muertes debidas a cáncer de pulmón, y su prevalencia a los 5 años fue relativamente baja, con 28.833 pacientes (datos obtenidos del estudio Las Cifras del Cáncer en España 2019, llevado a cabo por la Sociedad Española de Oncología Médica).

Etiológicamente el principal factor de riesgo para el cáncer de pulmón es el hábito tabáquico, debido a los numerosos carcinógenos presentes en el humo, siendo responsable del 80% de todos los casos. La exposición a él aumenta considerablemente las probabilidades de sufrir esta patología, siendo estas proporcionales a la duración del hábito e intensidad de consumo. Por ello, un fumador tiene de 10 a 30 veces más riesgo de desarrollar cáncer de pulmón que un no fumador [3]. El hábito tabáquico es también el principal factor de riesgo para el desarrollo de la Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC), la cual conlleva una inflamación crónica del tracto respiratorio [4-6]. De hecho, la EPOC se asocia a un aumento en la incidencia de cáncer de pulmón [7]. Otros factores de riesgo incluyen una historia familiar de cáncer de pulmón [8], exposición a carcinógenos ambientales, radón o agentes ocupacionales como asbestos, sílice o metales pesados, así como factores hormonales, infecciosos o una alimentación inapropiada entre otros [9].

1.2. Clasificación, diagnóstico, estadificación y pronóstico.

La clasificación del carcinoma pulmonar, basada en las características histológicas, divide esta compleja enfermedad en cáncer de pulmón no microcítico (CPNM) y cáncer de pulmón microcítico (CPM), con una representación respectivamente del 85% y 15% de los casos totales. A su vez el CPNM es un subtipo histológico heterogéneo que puede ser clasificado en adenocarcinoma, carcinoma epidermoide y carcinoma de células grandes, representando respectivamente el 50%, 35% y 15% de los casos de CPNM [10]. La clasificación del cáncer de pulmón es un paso extremadamente importante en la evaluación del paciente; sin embargo, la correcta determinación de la extensión de la enfermedad es también necesaria para determinar el tratamiento y la prognosis. La estadificación del

cáncer de pulmón se basa en la clasificación tumor-nódulo-metástasis (TNM). El sistema TNM es usado para la mayoría de los tumores malignos y se basa en alcance de la enfermedad. Su objetivo es asistir la planificación del tratamiento, evaluación de los resultados del tratamiento y determinación del pronóstico. La letra T es indicativa del tamaño y del grado de diseminación local del tumor. La N indica el grado de afectación de los ganglios linfáticos regionales, y la M revela la presencia o ausencia de metástasis distantes [11]. En la Tabla 1 se definen las diferentes categorías de los descriptores T, N y M propuestas en la última edición de la clasificación TNM [12, 13].

Tabla 1. Descriptores T, N y M de la última clasificación TNM del cáncer de pulmón.

T: Tumor primario	
Tx	El tumor primario no puede ser evaluado o tumor evidenciado por la presencia de células malignas en esputo o lavados bronquiales pero no evidenciado en pruebas imagen o broncoscopia.
T0	Sin evidencia de tumor primario.
Tis	Carcinoma <i>in situ</i> .
T1	Tumor < o igual a 3 cm en su diámetro mayor rodeado por pulmón o pleura visceral sin evidencia mediante broncoscopia de invasión más proximal que el bronquio lobar ^A .
T1a (mi)	Adenocarcinoma mínimamente invasivo ^B .
T1a	Tumor ≤ a 1 cm en su diámetro mayor ^A .
T1b	Tumor > 1cm pero ≤ a 2 cm en su diámetro mayor ^A .
T1c	Tumor > 2cm pero ≤ a 3 cm en su diámetro mayor ^C .
T2	Tumor > 3 cm pero ≤ a 5 cm o tumor con alguno de los siguientes criterios ^C : - Afecta bronquio principal independientemente de la distancia desde carina pero sin afectación carinal. - Invade pleura visceral. - Asociado a atelectasia o neumonitis obstructiva que se extiende a la región hilar, afectando a parte o todo el pulmón.
T2a	Tumor > 3cm pero ≤ a 4 cm en su diámetro mayor.
T2b	Tumor de > 4 cm pero ≤ a 5 cm en su diámetro mayor.
T3	Tumor de > 5 cm pero ≤ a 7 cm en su diámetro mayor o con nódulos tumorales en el mismo lóbulo que el tumor primario o que invade directamente alguna de las siguientes estructuras: pared torácica (incluyendo pleura parietal y tumores del sulcus superior), nervio frénico, pericardio parietal.
T4	Tumor > 7 cm en su diámetro mayor o asociado a nódulos tumorales en distinto lóbulo ipsilateral al del tumor primario o invade alguna de las siguientes estructuras: diafragma, mediastino, corazón, grandes vasos, tráquea, nervio laríngeo recurrente, esófago, cuerpo vertebral y carina.
N: afectación de ganglios linfáticos regionales	
Nx	No se puede evaluar la afectación de los ganglios linfáticos regionales.
N0	No existe afectación de ganglios linfáticos regionales.
N1	Metástasis en ganglios linfáticos peribronquiales y/o hiliares e intrapulmonares ipsilaterales. Incluyendo afectación por extensión directa.
N2	Metástasis en ganglios linfáticos mediastínicos ipsilaterales y/o subcarinales.
N3	Metástasis en ganglios linfáticos mediastínicos contralaterales, hiliares contralaterales, escalénicos o supraclaviculares ipsilaterales o contralaterales.

M: metástasis a distancia

M0	No existen metástasis a distancia.
M1	Presencia de metástasis a distancia.
M1a	Nódulos tumorales presentes en lóbulo contralateral; tumor con nódulos pleurales o pericárdicos o derrame pleural o pericárdico malignos ^D .
M1b	Metástasis única extratorácica ^E .
M1c	Metástasis múltiples extratorácicas en uno o varios órganos.

A) El infrecuente tumor de cualquier tamaño que invade superficialmente con su componente invasivo limitado a la pared bronquial, que puede extenderse proximalmente al bronquio principal, también es clasificado como T1a. B) Adenocarcinoma solitario de 3 cm o menos con un predominante componente lepidico y 5 mm o menos de invasión en cualquier foco. C) Los tumores T2 con estas características se clasifican como T2a si son de 4 cm o menos en su diámetro mayor o si el tamaño no puede determinarse, y como T2b si son > 4cm pero menores o iguales a 5 cm en su diámetro mayor. D) La mayoría de los derrames pleurales (pericárdicos) con cáncer de pulmón son debidos al tumor. En pocos pacientes, sin embargo, múltiples exámenes del líquido pleural (pericárdico) son negativos para células neoplásicas y el líquido no es hemático ni un exudado. Cuando estos aspectos y el juicio clínico concluyen que el derrame no se relaciona con el tumor, el derrame debería ser excluido como descriptor de estadificación. E) Esto incluye la afectación de un único ganglio no regional.

Finalmente, según esta clasificación los pacientes de cáncer de pulmón se agrupan en estadios. La catalogación de los diferentes estadios según la última edición de la clasificación TNM del cáncer de pulmón se reproduce en la Tabla 2 [12, 13].

Debido a la ausencia de síntomas durante el desarrollo del cáncer de pulmón, en la mayoría de los pacientes (aproximadamente el 80%) el diagnóstico se produce en estadios avanzados de la enfermedad. En estos casos la resección del tumor, tratamiento potencialmente curativo, es impracticable. Por otra parte, solo un pequeño subgrupo de pacientes, aproximadamente el 20%, se diagnostican en estadios tempranos; sin embargo, la mitad de estos pacientes sufren recidivas tras la cirugía. Por ello, a pesar de los últimos avances en detección y tratamiento, la prognosis continúa siendo pobre. Teniendo en cuenta todos los estadios de cáncer de pulmón, la tasa de supervivencia a 5 años es de aproximadamente un 19%, la cual disminuye a un 5% si solo se incluyen los estadios avanzados [14, 15], haciendo por tanto imprescindible la búsqueda de nuevas dianas así como de estrategias terapéuticas más efectivas.

Tabla 2. Agrupación por estadios de la última clasificación TNM del cáncer de pulmón.

Estadio	T	N	M
Carcinoma Oculto	Tx	N0	M0
Estadio 0	Tis	N0	M0
Estadio IA1	T1a (mi)	N0	M0
	T1a (mi)	N0	M0
Estadio IA2	T1b	N0	M0
Estadio IA3	T1c	N0	M0
Estadio IB	T2a	N0	M0
Estadio IIA	T2b	N0	M0
Estadio IIB	T1a-c	N1	M0
	T2a	N1	M0
	T2b	N1	M0
	T3	N0	M0
Estadio IIIA	T1a-c	N2	M0
	T2a-b	N2	M0
	T3	N1	M0
	T4	N0	M0
	T4	N1	M0
Estadio IIIB	T1a-c	N3	M0
	T2a-b	N3	M0
	T3	N2	M0
	T4	N2	M0
Estadio IIIC	T3	N3	M0
	T4	N3	M0
Estadio IVA	Cualquier T	Cualquier N	M1a
	Cualquier T	Cualquier N	M1b
Estadio IVB	Cualquier T	Cualquier N	M1c

Tis, carcinoma *in situ*; T1a (mi), adenocarcinoma mínimamente invasivo

1.3. Biología molecular del cáncer de pulmón.

Las alteraciones genéticas son claves para el proceso de tumorigénesis y evolución del tumor. A pesar de que determinadas alteraciones pueden ser heredadas, la mayoría de ellas son resultado de errores durante el proceso de copia del ADN que tiene lugar en el ciclo celular y son denominadas alteraciones genómicas somáticas. Cuando estas

alteraciones se producen en un gen íntimamente imbricado en el proceso de tumorigenesis, y llevan a la inducción de una señalización aberrante y continuada de rutas oncogénicas, hablamos de adición oncogénica. El producto de esos genes alterados, de los que dependen la supervivencia celular, son denominados conductores oncogénicos [16]. Centrándonos en cáncer de pulmón, nos hallamos ante una enfermedad genética, participando en el proceso tumoral múltiples alteraciones moleculares. Estas alteraciones llevan a la activación de proteínas promotoras del crecimiento como KRAS (producto del gen homólogo al oncogén del virus del sarcoma de la rata Kirsten V-Ki-Ras2), EGFR (receptor de factor de crecimiento epidérmico), ALK (quinasa del linfoma anaplásico), BRAF (producto del homólogo B del oncogén viral de sarcoma murino v-Raf), MEK-1 (quinasa 1 estimulada por mitógenos de Erk), HER2 (receptor-2 del factor de crecimiento epidérmico humano), MET (receptor del factor de crecimiento hepatocitario) o RET (reordenado durante la transfección) y rutas relacionadas con ellas, así como a la inactivación de genes supresores de tumores como *TP53* (proteína tumoral p53), *PTEN* (homólogo de fosfatasa y tensina) o *LKB-1* (quinasa hepática B1) y rutas vinculadas [17].

A pesar de que en el cáncer de pulmón nos encontramos ante un escenario genómico heterogéneo, diversas mutaciones son coincidentes entre los subtipos histológicos. Por ejemplo, en CPM aproximadamente el 100% de los casos presentan mutaciones en *TP53*. Además, han sido observadas algunas mutaciones que inactivan a genes de la familia NOTCH (aproximadamente un 25% de los casos) o amplificaciones en miembros de la familia MYC (familia de proto-oncogenes homólogos del oncogén viral de mielocitomatosis aviar V-Myc) (16%), entre otras alteraciones genómicas [18, 19].

Sin embargo, los subtipos histológicos con mayor carga mutacional los encontramos en CPNM, concretamente adenocarcinoma y epidermoide. Centrándonos en adenocarcinoma, algunas de las alteraciones génicas más comunes son las mutaciones inactivantes del gen supresor de tumores *TP53*, presentes entre un 40 y 50% de los pacientes, o del gen *LKB-1* que codifica una serina-treonina proteína quinasa que inhibe mTOR y se encuentra truncada en un 10 o 20% de los tumores pertenecientes a este subtipo histológico [20]. Por otro lado, un porcentaje relevante de los adenocarcinomas pulmonares presentan alteraciones genómicas en genes conductores como *EGFR*, *KRAS*, *ALK*, *ROS1* (ROS proto-oncogén 1, receptor tirosina quinasa), *BRAF*, *MET*, *RET* o *HER2* (Figura 2A), hecho que ha propiciado el desarrollo de terapias dirigidas contra la mayoría de los productos de estos oncogenes [21, 22]. Por su parte, en aproximadamente el 91% de los casos de carcinoma epidermoide se reportan mutaciones inhibitoras del supresor de

tumores *TP53*. A su vez, son relativamente frecuentes alteraciones en oncogenes como amplificación de *PI3KCA* (38%) o *FGFR1* (factor de crecimiento fibroblástico 1) (10-15%) así como mutaciones en *CDKN2A* (inhibidor 2A de quinasa dependiente de ciclina) (17%), *PI3KCA* (16%), *NOTCH1* (8%), *PTEN* (10%) o *DDR2* (receptor con dominio discoidina 2) (2%) entre otros (Figura 2B). Sin embargo hasta el momento, a diferencia de lo que ocurre en adenocarcinoma, la terapia dirigida contra estas alteraciones moleculares esencialmente es inexistente o ineficaz [23-26].

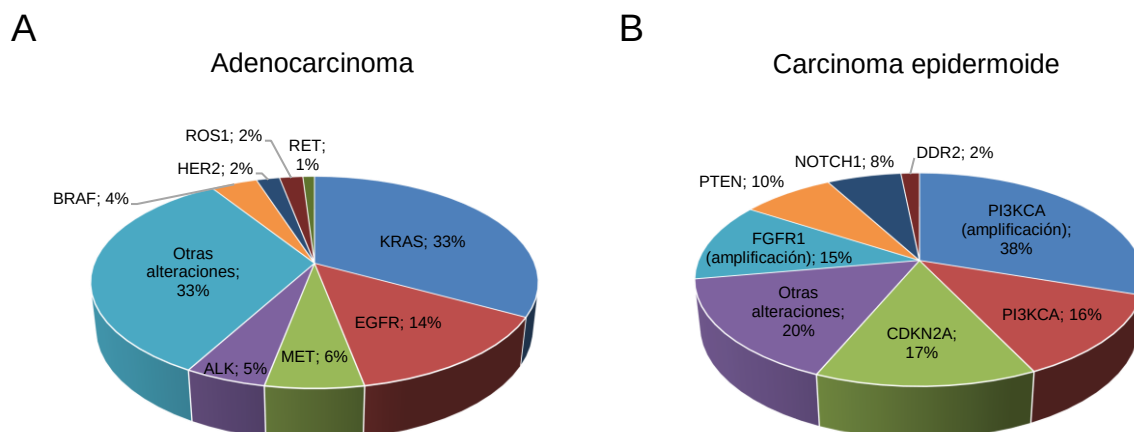


Figura 2. Frecuencia de las alteraciones más relevantes descritas en adenocarcinoma de pulmón y en carcinoma epidermoide. Alteraciones descritas en (A) adenocarcinoma y (B) carcinoma escamoso, los dos subtipos histológicos más comunes de cáncer de pulmón [21, 23].

1.4. Genes conductores y sus terapias dirigidas en adenocarcinoma.

La quimioterapia citotóxica es un tratamiento efectivo contra el cáncer incluido el pulmonar, sin embargo las reacciones que provoca en el paciente así como el frecuente desarrollo de resistencia son importantes obstáculos para su uso. Muchos tumores son adictos a la actividad continuada de un determinado conductor oncogénico, y por tanto su inhibición (genética o farmacológica) puede llevar a la pérdida del fenotipo maligno [27, 28]. Estas estrategias terapéuticas, dirigidas a dianas moleculares específicas están funcionando particularmente en el adenocarcinoma, debido a que un número relevante de casos presentan oncogenes conductores que son posibles dianas moleculares y tal hecho sucede raramente en otras histologías [29].

EGFR es uno de los principales oncogenes relacionados con el adenocarcinoma de pulmón. Este receptor regula múltiples procesos celulares tales como apoptosis, movilidad celular, angiogénesis y proliferación. Mutaciones en *EGFR* llevan a su activación constitutiva

provocando un impacto en el establecimiento y progresión del proceso tumoral [30, 31]. EGFR está mutado en el 14% de los casos de adenocarcinoma, y las mutaciones L858R (45-50%) en el exón 21 y las deleciones del exón 19 (45%) representan el 90% del total. Estas alteraciones son conocidas como mutaciones sensibilizantes del *EGFR*, puesto que implican una mejor respuesta a inhibidores de la tirosina quinasa asociada a EGFR (ITQs-EGFR) [32-34]. Por ello y en base al aumento de la tasa de respuesta global y supervivencia libre de progresión, al ser comparados con quimioterapia estándar, fue aprobado el uso de gefitinib [35-37], erlotinib [38-40] y afatinib [41, 42] en primera y segunda línea en pacientes con CPNM con mutación en *EGFR*. Sin embargo, la mayoría de los pacientes progresan en los dos siguientes años tras el inicio del tratamiento [43], siendo la adquisición de una mutación secundaria en el exón 20 (T790M) el mecanismo de resistencia más común (60%) [44-46]. Para hacer frente a esta necesidad clínica, y debido al beneficio sobre la quimioterapia estándar, fue aprobado el uso de osimertinib, ITQ-EGFR de tercera generación, para el tratamiento de estos pacientes [47, 48] aunque la emergencia de nuevas resistencias es evidente [49]. Por otra parte, centrándonos en el 10% de mutaciones no comunes, son relevantes los tumores que presentan inserciones en el exón 20 del gen *EGFR* [50] asociado con falta de sensibilidad a la primera generación de ITQs-EGFR [51, 52]. Por todo ello, se sigue investigando activamente en terapias más precisas que logren optimizar el pronóstico de los pacientes de CPNM con *EGFR* mutado [53-55].

Otra importante proteína conductora en el adenocarcinoma pulmonar, para la que además existen “terapias dirigidas”, es ALK. Esta tirosina quinasa transmembrana, se presenta translocada entre el 3-5% de individuos con adenocarcinoma de pulmón [56, 57]. La translocación en el 95% de los casos afecta a los genes *EML4* y *ALK*. Existen diferentes variantes de esta fusión, difiriendo en la longitud del fragmento de ambos genes, sin embargo la región codificante del dominio tirosina quinasa de ALK siempre está completa y constitutivamente activada en la proteína quimérica. Esta activación está ligada a proliferación celular e inhibición de la apoptosis [58, 59]. En 2011 fue aprobado crizotinib, como inhibidor dirigido frente a estas proteínas de fusión (ITQs-ALK), en pacientes con CPNM localmente avanzado o metastásico con translocación de *ALK* [60-62]. Sin embargo, es común la aparición de resistencias tras el tratamiento con los ITQs-ALK, ya sean dependientes (40%) o independientes (60%) de mutaciones en *ALK*. Centrándonos en las primeras, para contrarrestar el alto porcentaje de pacientes con mutaciones dentro del dominio tirosina quinasa de ALK [43] se generó una segunda generación de inhibidores

no selectivos para esta quinasa, entre los que destacan ceritinib y alectinib [63-65], los cuales han sido aprobados para el tratamiento de pacientes resistentes a crizotinib [66-69]. También han sido detectados distintos mecanismos de resistencia adquirida frente a estos inhibidores [70, 71] propiciando el desarrollo de una tercera generación de compuestos como lorlatinib, el cual está siendo evaluado en ensayos clínicos [72]. Por otro lado, es subrayable que los mecanismos de resistencia independientes de ALK, incluyen en determinados casos la activación de la ruta de señalización EGFR [73, 74].

Continuando con las alteraciones conductoras, también destacan las mutaciones en el gen *KRAS*, las más comunes en el adenocarcinoma pulmonar (33%) [75, 76]. *KRAS* codifica una proteína G (proteína de bajo peso molecular que une guanósín trifosfato (GTP)) crucial en el control de distintas rutas que regulan la proliferación celular, diferenciación y supervivencia. Determinadas mutaciones en *KRAS* están asociadas con peor pronóstico en pacientes con adenocarcinoma [77]. En la mayoría de los casos de CPNM, las mutaciones de *KRAS* ocurren en el codón 12 (G12C (39%), G12D (17%) o G12V (21%)) [78]. Sin embargo a pesar de que dichas mutaciones fueron las primeras descritas en estos tumores [79] siguen siendo una diana elusiva. Actualmente, debido al descubrimiento de la existencia de un bolsillo alostérico en *KRAS*, se ha logrado el desarrollo de inhibidores específicos del mutante G12C que llevarían a cabo la estabilización de *KRAS* en su forma inactiva [80]. AMG 510 ha sido el primer inhibidor de *KRAS*G12C en alcanzar la fase clínica de investigación, mostrando seguridad, tolerabilidad y actividad antitumoral, por lo que se presenta una oportunidad única para el tratamiento de los pacientes portadores de esta mutación [81].

Las translocaciones en *ROS1* (2%), mutación en *BRAF* (2-4%), o en el exón 14 de *MET* (8%), translocaciones en *RET* (1%) o alteraciones en *HER2* (2%), son otras alteraciones conductoras con interés como diana terapéutica en el adenocarcinoma de pulmón [21].

ROS1 es un oncogén que codifica un receptor tirosina quinasa, filogenéticamente relacionado con *ALK*, y sus translocaciones en cáncer de pulmón comparten propiedades carcinogénicas, características clínicas así como las vulnerabilidades terapéuticas [82]. Crizotinib, el inhibidor dual de *ALK*/*MET*, inhibe también a *ROS1* y es la única estrategia aprobada para el tratamiento de pacientes con CPNM con translocación en *ROS1* [83, 84]. Además, el uso clínico de una generación más avanzada de ITQs duales contra *ALK* y

ROS1 como lorlatinib y ceritinib, así como otros inhibidores de ROS1 (cabozantinib y foretinib) está en marcha [85-87].

BRAF codifica a la proteína B-Raf, la cual constituye un paso crucial en la ruta de señalización de las RAS-MAPK. La prevalencia de las mutaciones en el dominio quinasa de este gen es baja en CPNM siendo prácticamente exclusivas del adenocarcinoma [88]. Los inhibidores vemurafenib y dabrafenib unen selectivamente a la proteína B-Raf con mutación V600E, la más frecuente [89, 90]. Además, en CPNM *BRAF* V600E, el uso de dabrafenib en combinación con el inhibidor de MEK trametinib, incrementa la tasa de respuesta objetiva y la supervivencia libre de progresión, respecto al uso de dabrafenib en monoterapia [91, 92]. Sin embargo, se han descrito mecanismos de resistencia a esta terapia combinada [93].

MET es un oncogén que codifica el receptor tirosina quinasa MET, el cual presenta alteraciones moleculares conductoras del CPNM en aproximadamente un 1-3% de los casos [94]. Son destacables las mutaciones puntuales en el exón 14, la cuales impiden la degradación de MET y llevan a una señalización constitutiva del mismo. Estas mutaciones tienen un papel fundamental en la conducción del proceso tumoral y están presentes en aproximadamente un 2% de los casos de CPNM [95]. Por otra parte, la amplificación de MET, a pesar de ser la alteración conductora en menos de un 1% de los casos de CPNM, suele encontrarse frecuentemente asociada a mutaciones en el exón 14 (15-20%), además de como un evento secundario en pacientes con mutación EGFR y resistencia a los ITQs-EGFR [96, 97]. El inhibidor crizotinib ha demostrado actividad antitumoral en pacientes con CPNM presentando tanto un alto grado de amplificación [98, 99], como la mutación en el exón 14 de MET, los cuales también han mostrado sensibilidad a otros ITQs-MET [100, 101]. Sin embargo, con frecuencia aparecen mutaciones que confieren resistencia a los inhibidores de MET [102].

Las translocaciones en *RET*, las cuales llevan a la activación constitutiva del receptor tirosina quinasa homónimo, se observan en el 1% de los CPNMs [103]. Hasta recientemente el tratamiento de estos pacientes en la clínica se había limitado al uso de inhibidores multiquinasas como cabozantinib, vandetanib y lenvatinib [104-106]. Sin embargo, su baja especificidad y elevada toxicidad ha propiciado el desarrollado de ITQs-RET específicos, tales como BLU-667 o LOXO-292, que han mostrado una importante actividad y tolerabilidad en distintos ensayos clínicos abriendo por tanto, una nueva ventana terapéutica en estos pacientes [107, 108].

La activación del factor de crecimiento epidérmico 2 (HER2), la cual depende de la formación de heterodímero con otros receptores de la misma familia (como EGFR), lleva a la activación de distintas rutas como PI3K, MAPK o JAK/STAT [109]. Aproximadamente el 20% de los casos de CPNMs presentan sobreexpresión de *HER2*, perteneciendo la mayor parte de estos al subtipo histológico adenocarcinoma, donde la amplificación génica (3%) y las mutaciones del dominio tirosina quinasa (1%), alteraciones que no suelen coexistir, representan una potencial diana molecular [110, 111]. Con respecto al tratamiento de estos pacientes, la terapia combinada de trastuzumab y quimioterapia ha mostrado beneficios, sin embargo ITQs como afatinib, dacomitinib o neratinib han mostrado una eficacia limitada [112-114]. Actualmente se está ensayando en la clínica el uso de inhibidores selectivos de HER2, como poziotinib, con resultados prometedores en pacientes con inserciones en el exón 20 [115, 116].

A pesar de los avances hacia una medicina de precisión en cáncer de pulmón, más de la mitad de los casos de CPNM (incluyendo el alto porcentaje de tumores mutantes en *KRAS*) siguen sin poseer una terapia dirigida efectiva. Además, en aquellos casos que si la poseen, la aparición de resistencias adquiridas son un problema evidente. En paralelo y debido a la importancia del sistema inmune (SI) en el desarrollo y progresión del tumor, está emergiendo una nueva aproximación para el tratamiento, entre otros tipos tumorales, del cáncer de pulmón: la inmunoterapia. Este tratamiento consiste en la estimulación del SI del paciente, para inducir una respuesta humoral-celular que ataque y destruya las células malignas que hasta el momento estaban escapando al mismo [117]. Entre los mecanismos supresores del SI que se producen dentro del microambiente tumoral destaca la desregulación de las proteínas del punto de control inmunitario (PCI), teniendo especial interés en cáncer de pulmón, la molécula de muerte programada 1 (PD-1), el ligando 1 de muerte programada (PD-L1) y el antígeno-4 asociado al linfocito T citotóxico (CTLA-4). Centrándonos en el tándem PD-1-PD-L1, bajo condiciones normales la proteína del PCI PD-1 protege contra inflamación y autoinmunidad; sin embargo, cuando un neoplasma se desarrolla, PD-1 une a su ligando PD-L1 y causa inmunosupresión previniendo el ataque del sistema inmune a las células tumorales. Actualmente, para el tratamiento de CPNMs avanzados, los inhibidores más usados en clínica son nivolumab y pembrolizumab contra PD-1, y atezolizumab y durvalumab contra PD-L1 [118-120]. Sin embargo, la eficacia de esta terapia es limitada en tumores con alteraciones moleculares definidas como mutaciones en *EGFR* o *ALK*, que se caracterizan por una baja tasa de neoantígenos además de una escasa infiltración inmune [121, 122].

2. Proteínas de choque térmico.

Las proteínas de choque térmico (HSP) fueron descritas por primera vez en 1962 por Ritossa y colaboradores como un set de proteínas cuya expresión era inducida por hipertermia en las células de las glándulas salivales de *Drosophila melanogaster* [123]. Este grupo de proteínas aumenta su síntesis y ejercen su función de chaperonas moleculares facilitando el plegamiento y manteniendo la estructura innata de las proteínas celulares así como su función durante el estrés proteotóxico. Este se produce en respuesta no solo a altas temperaturas sino a un gran número de agravios físicos y ambientales como isquemia, anoxia, hipoxia, drogas, toxinas, metales pesados, luz ultravioleta o partículas virales entre otros [124]. Es esta función principal la que le otorga a las HSPs el nombre proteínas de estrés o chaperonas, con el que son tradicionalmente conocidas. Una expresión elevada de estas proteínas permite a las células mantener la homeostasis del proteoma y sobrevivir a condiciones que en otras circunstancias hubieran sido letales. Por todo ello, las HSPs están filogenéticamente conservadas así como ubicuamente expresadas [125].

Las HSPs se clasifican en base a su peso molecular relativo, siendo diferenciadas en mamíferos 6 familias: las pequeñas proteínas de choque térmico (sHSPs), la familia HSP40, la familia de chaperoninas humanas, la familia HSP70, la familia HSP90 y la familia de las HSPs grandes, cuya información más relevante es recogida en la Tabla 3 [126].

Tabla 3. Breve resumen de la nomenclatura, genes codificantes, miembros y función de las principales familias de proteínas de choque térmico (HSP) en mamíferos.

Familia	Genes Codificantes	Número de Miembros	Miembros Destacables	Actividad ATPasa	Función Principal
sHSPs	<i>HSPB</i>	11	HSP27	No	Chaperona molecular
HSP40	<i>DNAJ</i>	49	HSP40, Tid1	Si	Chaperona molecular
Chaperoninas	<i>HSPD, HSPE, CCT</i>	14	HSP60	Si	Chaperonina
HSP70	<i>HSPA</i>	13	HSP70, HSC70	Si	Chaperona molecular
HSP90	<i>HSPC</i>	5	HSP90 α , HSP90 β	Si	Chaperona molecular
HSPs grandes	<i>HSPH</i>	2	HSP110, GRP170	Si	Holdasa, chaperona molecular

sHSPs= pequeñas proteínas de choque térmico

La inducción de la expresión de HSPs en respuesta a estrés es colectivamente conocida como respuesta a choque térmico (HSR), la cual está modulada a nivel transcripcional por los factores de choque térmico (HSFs). En mamíferos encontramos

cuatro HSFs (HSF1-HSF4), sin embargo, HSF1 es reconocido como el principal regulador de la HSR [127].

Bajo condiciones fisiológicas, los monómeros de HSF1 permanecen inactivos y secuestrados en el citosol formando un complejo proteico con ciertas HSPs. Bajo condiciones de estrés proteotóxico, las chaperonas se separan del complejo para responder a la acumulación de proteínas mal plegadas, siendo liberados los monómeros de HSF1 los cuales trimerizan. Para la completa activación de HSF1 los trómeros son fosforilados, siendo también importantes otras modificaciones postraduccionales como la acetilación o sumoilación [128]. HSF1, trimerizado y activado, entra al núcleo donde se une a secuencias reguladoras en cis, conocidas como elementos de choque térmico (HSEs), situadas aguas arriba de los genes de HSPs cuya expresión será a continuación inducida. Finalmente, para asegurar que la HSR mediada por HSF1 es adecuada y proporcional al nivel de proteína dañada, se produce un bucle de retroalimentación negativa donde ciertas HSPs inducidas por HSF1 como HSP70 o HSP90 se unen al dominio de trimerización de HSF1 provocando su inhibición (Figura 3) [129]. Cabe destacar que existen excepciones a lo anteriormente descrito, puesto que hay varias HSPs como HSC70 (proteína de choque térmico constitutiva de 70 KDa), GRP78 (proteína de 78kDa regulada por glucosa), MTP70 (proteína de choque térmico mitocondrial de 70 KDa) y HSP90 β las cuales no requieren choque térmico ni ningún estrés para su inducción en las células ya que están constitutivamente expresadas bajo condiciones normales [130].

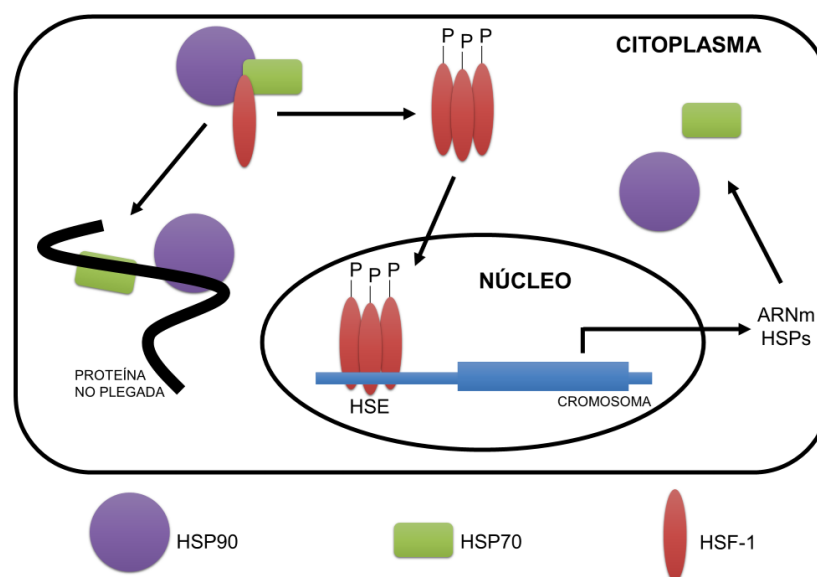


Figura 3. Mecanismo de regulación de la síntesis de HSPs. HSE= elemento de choque térmico, HSF-1= factor de choque térmico 1, HSP70= HSP de 70 KDa, HSP90= HSP de 90 KDa.

Con respecto a la funcionalidad, además del papel citoprotectivo en respuesta a estrés, en condiciones fisiológicas cada una de las chaperonas moleculares participa en el plegamiento del proteoma. Los distintos miembros de este grupo presentan propiedades y funciones sutilmente diferentes las cuales permiten paso a paso el modelaje de la estructura terciaria de la proteína hacia su forma activa y nativa. De este modo, las proteínas sintetizadas *de novo* pueden llevar a cabo la función para la que están genéticamente programadas, y de la misma manera los polipéptidos desdoblados pueden ser replegados continuando con sus actividades. A su vez, las distintas familias de HSPs también cooperan en algunas circunstancias. Por ejemplo, HSP27 puede formar grandes oligómeros, los cuales se asocian con las proteínas mal plegadas, previniendo su agregación. A continuación, estas proteínas rescatadas son pasadas una a una a HSP70 para su plegamiento y posteriormente a HSP90, la encargada de finalizar la producción de una proteína plegada y funcional. Las dos chaperonas HSP70 y HSP90 también requieren asistencia de otras HSPs, cochaperonas, que actúan como cofactores ayudando en los mecanismos de plegamiento proteico y con las que se encuentran formando complejos [131]. Por otro lado, las HSPs también están envueltas en otros procesos celulares relevantes como el ensamblaje, secreción, transporte, translocación y degradación proteica [132, 133].

2.1. HSP y cáncer.

La transformación maligna conlleva importantes cambios en los procesos celulares los cuales perturban la homeostasis a nivel genético, metabólico y aún más notablemente a nivel proteómico, manteniendo a la célula tumoral en un estado de constante estrés [134]. Durante la evolución del tumor se produce un incremento en los niveles de oncogenes y mutaciones activadoras de estos, así como la aparición de mutaciones que conlleva a la pérdida de función en genes supresores de tumores, dando lugar a la amplificación del proteoma en células tumorales. Por otra parte, muchas de las oncoproteínas relevantes en distintos tipos tumorales, mutadas y con estructuras flexibles y frágiles, demandan un incremento en los niveles de chaperonaje molecular por parte de las HSPs para su plegamiento, estabilización, agregación, activación, función y degradación proteolítica [132, 135]. Además de lo anteriormente descrito las HSPs están activamente envueltas en muchos de los mecanismos que conducen a la transformación y progresión tumoral, incluyendo crecimiento independiente de estímulo, escape de apoptosis (espontánea o

inducida terapéuticamente), escape de senescencia, angiogénesis *de novo*, invasión, metástasis y reconocimiento del sistema inmune [131, 136].

En consecuencia, las células cancerígenas presentan mayor expresión y actividad de las chaperonas inducibles, principalmente de HSP27, HSP70 y HSP90, en comparación con las células normales [136, 137] en una amplia variedad de tipos tumorales incluyendo cáncer de pulmón [138-140]. Por ello, altos niveles de HSPs contribuyen a una pobre prognosis y se ha relacionado con resistencia a tratamientos antitumorales, como por ejemplo cisplatino, en varios tipos de cáncer [141]. Es evidente el potencial uso clínico de estas proteínas como biomarcadores, para diagnóstico de cáncer y predicción de prognosis, siendo a su vez una atractiva diana para la terapia dirigida [142, 143]. Por ello, la inhibición de estas y otras chaperonas moleculares ha emergido como una nueva estrategia terapéutica contra el cáncer, y distintos ensayos clínicos enfocados contra HSP27, HSP70 y HSP90 han mostrado resultados altamente positivos [144].

3. HSP90.

3.1. La familia HSP90.

En el ser humano, la familia HSP90 incluye 5 miembros clasificados conforme a su localización y codificados por los genes *HSC1-HSC5*. HSP90- α , HSP90- α A2 y HSP90- β están presentes en el citoplasma, GRP94 (proteína de 94kDa regulada por glucosa) se encuentra en el retículo endoplásmico (RE) y TRAP-1 (proteína 1 asociada al receptor del factor de necrosis tumoral) se localiza en la mitocondria. Todos los miembros de la familia HSP90 se encuentran como homodímeros flexibles dependientes de ATP, que tienen la capacidad de asistir en el plegamiento, maduración y tráfico de proteínas gracias a su actividad ATPasa intrínseca. Las dos isoformas principales y más estudiadas de HSP90 son aquellas localizadas en el citoplasma, la forma inducible HSP90 α y la constitutiva HSP90 β . La principal función de estas proteínas reside en su actuación como chaperona molecular de las denominadas proteínas clientes, las cuales son sus proteínas sustrato con las que interactúa a través de uniones no covalentes. HSP90 es una chaperona clave en la señalización celular debido a que sus clientes están asociados a multitud de rutas de señalización. Por otro lado, HSP90 está envuelta en la organización y mantenimiento de casi todo el citoesqueleto ya que interactúa con los filamentos de actina, tubulina y microtúbulos entre otros. Esta chaperona interviene en el ciclo de la célula y diferenciación

celular, a través del plegamiento de proteínas clientes como las quinasas dependientes de ciclinas CDK4 (quinasa dependiente de ciclina 4), CDK11p110 (quinasa dependiente de ciclina 11 (p110)) o Wee1. Además encontramos entre un 5 y 10% de HSP90 en el núcleo, porcentaje que aumenta en condiciones de estrés, donde transporta receptores esteroideos y quinasas. Otras funciones nucleares son la capacidad de modular la estructura del ADN a través de su unión a él, ARN o histonas, contribuyendo a la síntesis y procesamiento del ARN así como la interacción con muchos factores de transcripción con los que forma complejos, entre los que destacamos HSF1 o el factor inducible por hipoxia 1 α (HIF-1 α) [145]. Finalmente cabe destacar que ha sido documentada su secreción extracelular donde parece tener un papel en la motilidad y cicatrización de heridas, así como una posible actuación en distintas funciones inmunológicas [146]. Debido a su elevada homología así como similitud estructural y funcional, ambas isoformas son denominadas conjuntamente como HSP90 y representan entre el 1 y 2% de las proteínas celulares totales, cantidad que puede duplicarse en situaciones de estrés [147]. Con respecto a las isoformas restantes de la familia HSP90, parálogas de las citosólicas, el conocimiento existente es limitado. Sin embargo debe ser mencionado que GRP94 además de actuar como chaperona molecular en el RE, ayuda a prevenir el estrés proteotóxico en dicho orgánulo y media la homeostasis de calcio a nivel celular. Por su parte TRAP1, mantiene la integridad mitocondrial, actúa como chaperona molecular en el orgánulo y protege a las células de la apoptosis mitocondrial principalmente de aquella inducida por estrés oxidativo. Además, aunque su papel no ha sido descrito hasta fecha, tanto GRP94 como TRAP1 han sido detectadas extracelularmente [145].

3.2. Caracterización estructural de HSP90.

HSP90 conforma homodímeros flexibles, y cada uno de sus monómeros comprende tres partes: un dominio N-terminal (~25kDa), un dominio medio (~40kDa) y un dominio C-terminal (~12kDa) [148] (Figura 4). El dominio N-terminal contiene el bolsillo de unión a ATP muy específico y en forma de C, conocido como pliegue Bergerat. Este dominio define HSP90 como miembro de la familia de ATPasas GHKL (girasa-HSP90-histidina quinasa-MutL). Además de unir nucleótidos y funcionar como ATPasa, este dominio tiene la capacidad de unir cochaperonas. A continuación se encuentra un conector flexible, denominado segmento cargado, de longitud y composición variables pero siempre altamente cargado el cual es exclusivo de eucariotas y conecta el dominio N-terminal al

medio. El dominio medio contiene el lazo catalítico compuesto por tres regiones (un sándwich de tres capas α - β - α , un α -hélice de tres giros y bucles irregulares y un α -hélice de seis giros) que sirven como sitio de unión del γ -fosfato del ATP, modulando por tanto la actividad ATPasa, de las proteínas clientes de HSP90 así como de distintas chaperonas. El dominio C-terminal contribuye a la dimerización de HSP90 y además contiene una secuencia MEEVD conservada que es sitio de unión para el dominio TPR (repeticiones tetratricopeptídicas), el cual se encuentra en muchas cochaperonas, ayudando a interaccionar con ellas y a la progresión de la proteína cliente [149].

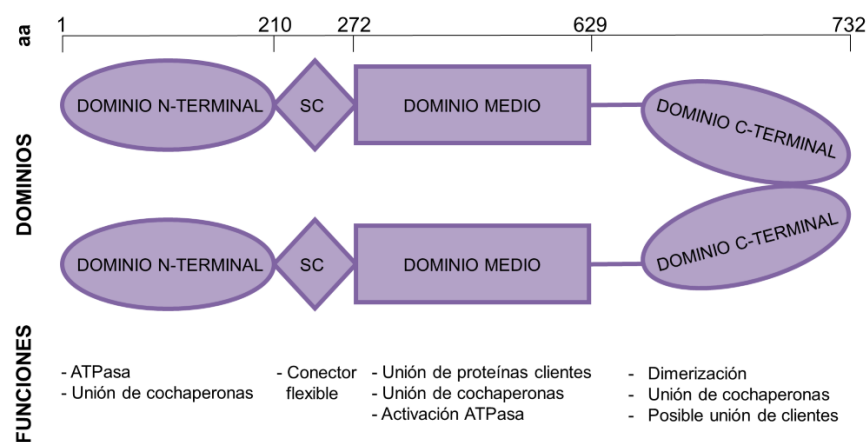


Figura 4. Estructura y funciones biológicas de los dominios del homodímero de HSP90. La posición aminoacídica de la proteína HSP90 en humanos se esquematiza en la parte superior de la figura. aa= aminoácido, SC= segmento cargado.

3.3. Mecanismo de acción.

La activación de HSP90 depende de la hidrólisis de ATP (Figura 5). El ciclo se inicia con el homodímero en estado inactivo, abierto y con el bolsillo de unión a ATP vacío. Posteriormente la unión de ATP produce una serie de cambios conformacionales, entre los que resalta la conexión de ambos extremos N-terminal, que finalizan en un estado cerrado en el que la proteína se encuentra activa. La posterior hidrólisis de ATP a ADP y fosfato inorgánico cierra el ciclo, llevando a la chaperona hasta su estado inicial inactivo. Para llevar a cabo el plegamiento de proteínas clientes, además del ciclo de actividad ATPásica, se requiere que cooperen con la maquinaria de HSP90 diferentes cochaperonas, proteínas asociadas e inmunofilinas que van formando un complejo dinámico, cuyo mecanismo de actuación es conocido como ciclo de la chaperona [150].

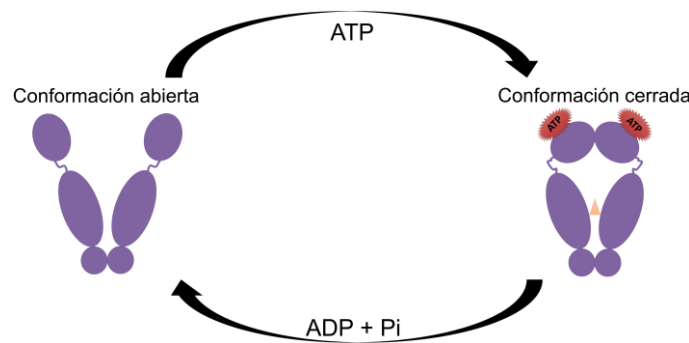


Figura 5. Representación esquemática del ciclo de hidrólisis del ATP de HSP90. Se muestran la conformación abierta y cerrada así como la adición a esta última de inmunofilina y ATP.

En lo que a regulación respecta, HSF1, como regulador dominante de la HSR, determina directamente los niveles de HSP90 y además, debido a su interacción con factores transcripcionales como STAT1 (transductor de señal y activador de la transcripción 1), integra diversas señales celulares que en última instancia modulan la expresión de HSP90. Por otro lado se produce la regulación directa de HSP90 a través de: modificaciones postraduccionales (fosforilación, acetilación, metilación y sumoilación, entre otras), su capacidad de detección del estrés térmico y la acción de sus cochaperonas (HOP o Cdc37 entre otras) y proteínas clientes que a su vez están sujetas a otros procesos regulatorios [151].

3.4. Ciclo de la chaperona.

El mecanismo de plegamiento proteico por HSP90, denominado ciclo de la chaperona, puede ser dividido en diferentes etapas las cuales son representadas y descritas en la Figura 6.

Debemos destacar que HSP90 es una de las pocas chaperonas que tiene la capacidad de unir algunas de sus proteínas clientes, generalmente aquellas más dinámicas y estructuralmente inestables, de una forma más permanente. En este caso, al final de la cascada de plegamiento, los complejos de HSPs no se disocian de la proteína cliente o por el contrario hay repetidos ciclos de liberación seguidos de reasociación. Estas interacciones, además de estabilizar la proteína cliente, tienen un importante papel regulador dentro de las células [136, 152].

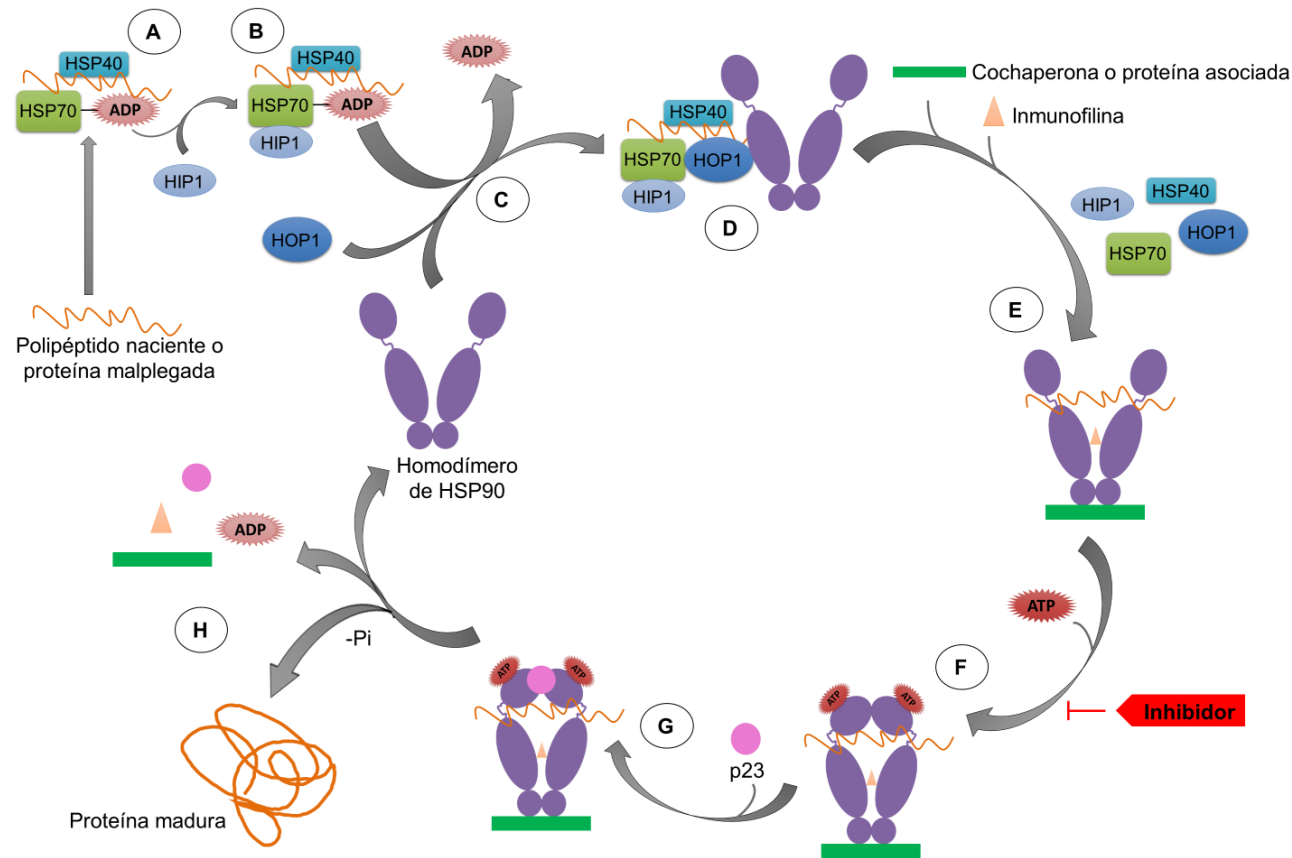


Figura 6. Representación gráfica del ciclo de la chaperona. (A) La proteína cliente desplegada o en forma de polipéptido naciente es incorporada al complejo HSP70/HSP40/ADP para evitar una posible agregación. (B) El complejo proteico formado es estabilizado por la co-chaperona HIP (proteína interactuante con HSP70) o Bcl2 (proteína 2 de la leucemia/linfoma de células B) que apoyaran el paso de ADP a ATP. (C) HSP90 une la proteína cliente amparada por el complejo HSP70/HSP40 para iniciar su activación. (D) La interacción entre HSP90 y HSP70 es facilitada por la proteína adaptadora HOP (proteína organizadora de HSP90-HSP70). Cabe destacar que si la proteína cliente es una quinasa se necesita además la co-chaperona CDC37 para cargar el cliente a HSP90. (E) Cuando la proteína cliente está cargada otras co-chaperonas o proteínas asociadas e inmunofilinas son añadidas al homodímero formando un complejo heteroproteico activado mientras que HSP70, HSP40, HIP y HOP son liberados. (F) La unión de ATP al dominio N-terminal de HSP90 cambia la conformación del estado abierto al cerrado. (G) Si no hay inhibidores interfiriendo con el ciclo de plegamiento, se da la asociación de otras co-chaperonas como AHA1 (homólogo 1 del activador de la ATPasa de HSP90) y p23. (H) Unión de AHA1, al dominio medio de HSP90, lo cual induce la hidrólisis de ATP y apoya el plegamiento del cliente unido, así como permite la liberación de las inmunofilinas y co-chaperonas [148, 150, 153].

3.5. Proteínas clientes.

Como hemos visto anteriormente, Hsp90 actúa como chaperona molecular sobre sus proteínas clientes, no solo promoviendo el plegamiento, maduración y degradación de estas, sino regulando además su estabilidad, actividad y función. Hasta el momento hay más de 300 proteínas descritas como clientes de HSP90 (<https://www.picard.ch/downloads/Hsp90interactors.pdf>) [154] siendo sorprendente su diversidad. Estas proteínas son muy diferentes en su estructura y secuencia por lo que se desconocen los determinantes que confieren a una proteína la condición de cliente. Sin embargo, se ha sugerido que la carga de la superficie así como la hidrofobicidad pueden determinar la unión a HSP90 de distintas proteínas [155-157]. Las proteínas clientes comprenden una elevada variedad de tipos funcionales, entre los que encontramos proteínas transductoras de señal, particularmente quinasas y factores de transcripción. Por ello las proteínas clientes de HSP90, y esta chaperona de manera directa, están involucradas en diversos procesos fisiológicos como la regulación del ciclo celular, comunicación de señales celulares y regulación de modificaciones postranscripcionales así como de la transcripción celular [157]. Por todo lo anteriormente descrito y puesto que cualquier enfermedad en general es un tipo de estrés sobre la maquinaria celular, HSP90 está relacionada con distintas condiciones patológicas como enfermedades neurodegenerativas [158], enfermedades infecciosas [159] y cáncer [156].

4. HSP90 en cáncer.

Entre las proteínas clientes de HSP90 encontramos un gran número de proteínas involucradas en procesos tumorales como quinasas de señalización, receptores de hormonas esteroideas y factores de transcripción, las cuales son imprescindibles tanto en la génesis como en la progresión tumoral [149]. Por ello HSP90, a través de sus proteínas clientes, juega un papel crucial en el establecimiento de los rasgos definitorios de los tumores malignos descritos por Hanahan y Weinberg (Tabla 4) [135].

Tabla 4. Proteínas clientes de HSP90 y su contribución al proceso tumoral [145, 160].

Proteína cliente	Papel en carcinogénesis
AKT, RA, IKK	Proliferación descontrolada
Telomerasas	Inmortalidad replicativa
NF-κB, p53, c-MET, Apaf-1, AKT, Survivina	Resistencia a muerte celular
HIF-1α, VEGFR, PI3K/AKT, NOS, flt-3	Angiogénesis
IRAK3	Escape de la destrucción inmune
ARNT, ARRB1, HIF-1α, HMG1, SREBF1	Desregulación de la energética celular
FANCA, MAFG, NEK8, NEK9, NEK11	Inestabilidad genómica y mutación
IL-6, IL-8, IRAK1, IRAK2, IRAK3	Inflamación promotora del tumor
Plk, Wee1, Myc1, CDK4, CDK6, Myt1	Evasión de supresores del crecimiento
MMP2, c-MET, SSDF-1	Invasión y metástasis

RA= receptor androgénico; IKK= quinasas Iκβ

Es preciso señalar que en las células cancerígenas, las mutaciones oncogénicas de estas proteínas clientes conllevan una inestabilidad conformacional la cual se traduce en la dependencia del complejo de HSP90 no solo para su plegamiento y maduración, sino para llevar a cabo su función [149]. Se ha demostrado que un número de oncoproteínas mutadas, incluyendo BRAF [161] y EGFR [162], son mucho más dependientes de HSP90 que la correspondiente proteína silvestre. Pero también lo son aquellas oncoproteínas traslocadas, amplificadas o sobreexpresadas en malignidad [163]. Por todo ello, ha sido aceptada la teoría de “adicción a chaperonas” [164] para explicar la gran demanda de HSPs y concretamente de HSP90 durante la progresión del tumor. Además de su papel apoyando las formas activadas o metaestables de estas oncoproteínas, HSP90 lleva a cabo otra función imprescindible en la célula cancerígena, la amortiguación de los distintos tipos de estrés celular (proteotóxico, déficit de nutrientes, hipoxia e inestabilidad genética). Por tanto, es evidente la elevada dependencia de HSP90 por parte de la célula tumoral donde esta chaperona se encuentra activa y formando complejos [163]. Por todo ello, no es de extrañar que HSP90 esté sobreexpresada en casi todos los tipos de cáncer entre los que incluimos de pulmón, páncreas, ovario, mama, endometrio y mieloma múltiple [139, 165, 166], y su elevada expresión se ha propuesto como biomarcador de peor pronóstico en cáncer de pulmón, esófago, vejiga, melanoma y leucemia entre otros [143, 167-170]. En consecuencia, HSP90 ha emergido en los últimos años como una diana molecular de interés y la terapia dirigida contra esta chaperona se presenta como una potencial herramienta para el tratamiento del cáncer.

4.1. HSP90 como diana terapéutica en cáncer.

La inhibición de HSP90 se traduce en una rápida suspensión de la actividad de sus proteínas clientes además de la degradación de las mismas. Por tanto, este fenómeno conlleva la disminución simultánea de múltiples oncoproteínas, una regulación a la baja de numerosas rutas de señalización oncogénicas y modulación de todos los rasgos del fenotipo maligno [171]. Debido que HSP90 es una proteína esencial, esta aproximación fue inicialmente vista con escepticismo. Sin embargo, se ha demostrado que las células cancerígenas son generalmente más sensibles a los inhibidores de HSP90 que las células somáticas fisiológicamente normales [172]. Esto parece estar relacionado con la activación de HSP90 y su aparición en forma de complejos multimoleculares en las células tumorales, favoreciendo su afinidad por los inhibidores. Por ello las células normales parecen requerir una proporción mucho menor de moléculas de HSP90 que las células cancerígenas dando lugar a una conveniente ventana terapéutica [173]. Además debemos considerar la adición a HSP90 por parte de las células cancerígenas, las cuales requieren esta chaperona para mantener las proteínas oncogénicas que inducen el fenotipo maligno [156].

La mayoría de los inhibidores de HSP90 desarrollados, se unen al bolsillo de unión a nucleótidos del dominio N-terminal y bloquean el procesamiento de las proteínas clientes debido a la imposibilidad de unión e hidrólisis del ATP [174]. Esta acción impide la finalización del ciclo de la chaperona HSP90, y sus clientes son a continuación etiquetados para la degradación proteosomal mediada por diferentes E3 ubiquitina ligasas [175, 176].

La terapia oncológica dirigida contra HSP90 empezó con los inhibidores naturales de unión al bolsillo de ATP geldanamicina (GA) y radicicol (RD). Estos exhibieron una destacada supresión de la proliferación y crecimiento tumoral, debido a su estructura similar al ATP que les permite unirse a HSP90 con mayor afinidad que los propios nucleótidos [177]. Aunque la eficacia anticancerígena de GA es evidente, esta no ha sido aprobada para el uso clínico debido a su inestabilidad estructural y hepatotoxicidad que llevaron a suspender el ensayo clínico en fase I inicial [178]. Por su parte RD fue inefectivo *in vivo* debido a su falta de estabilidad estructural [179].

Para superar estos problemas se desarrollaron en un primer momento análogos de GA, destacando entre los derivados iniciales 17-DMAG (alvespimicina) y 17-AAG (tanespimicina). Este último tuvo mayor desarrollo clínico, incluyendo un estudio en fase III para pacientes con mieloma múltiple [180]. A pesar de que su desarrollo fue abortado, a causa de la pobre solubilidad y biodisponibilidad oral, recientemente se ha retomado el

interés comercial por tanespimicina. También se desarrolló una segunda generación de derivados de GA entre ellos IPI-504 (retaspimicina), una forma reducida de 17-AAG que mejora la solubilidad en agua, la cual ha sido evaluada en múltiples ensayos clínicos en fase I/II donde ha mostrado actividad antitumoral en pacientes con sarcomas de tejido blando y tumores estromales gastrointestinales [181]. Sin embargo, los inhibidores de HSP90 más potentes han sido la segunda generación derivada de radicicol. AUY-922 (luminespib) es uno de los más destacados, y ha mostrado eficacia clínica relevante en una amplia variedad de tipos de cáncer como pulmón [182], colorectal [183], mieloma múltiple [184] o linfoma no Hodgkin [185] entre otros. Actualmente sigue siendo testado en ensayos clínicos en pacientes con CPNM (NCT02276027) y tumores del estroma gastrointestinal (NCT01389583). Onalespib (AT13387), es otro potente inhibidor de esta clase con una ventaja en su vida media demostrada en modelos preclínicos [186]. Su actividad fue confirmada en un estudio en fase I en tumores del estroma gastrointestinal [187], aunque es en cáncer de pulmón donde se pronostica una actividad óptima, la cual está aún bajo evaluación en diferentes ensayos clínicos (NCT01712217 y NCT02535338). No obstante, de este grupo de inhibidores el más prometedor es STA-9090 (ganetespib). Este compuesto ha demostrado eficacia en varios estudios clínicos tanto en monoterapia como combinado con otros fármacos en una amplia variedad de tipos tumorales [188] entre los que destacamos el cáncer de pulmón [189, 190] donde se ha llevado a cabo un ensayo en fase III (NCT01798485). Actualmente, este inhibidor sigue bajo evaluación clínica en distintos ensayos en pacientes con cáncer de ovario (NCT03783949), mama (NCT01042379), pulmón (NCT01579994) o mesotelioma pleural maligno (NCT01590160). Paralelamente, han sido desarrollados otros inhibidores de segunda generación, análogos de purina, debido a su eficiente capacidad para inhibir HSP90. BIIB021 o DEBIO0932, han sido evaluados en distintos ensayos clínicos sin resultados fructíferos debido a su elevada toxicidad, sin embargo resultados más prometedores se están obteniendo con el inhibidor PU-H71 el cual aún está en evaluación en diferentes ensayos clínicos (NCT01393509, NCT03166085, NCT03373877, NCT01269593) [191].

Por otro lado, existen inhibidores que se unen al dominio C-terminal de HSP90 y por tanto impiden las interacciones con las cochaperonas que contienen el dominio TPR. Un ejemplo de esta categoría es la novobiocina [192]. Otros inhibidores más específicos, como aquellos que rompen directamente la unión de HSP90 a sus cochaperonas, están aún en desarrollo [153].

Puesto que el estudio de la inhibición de HSP90 se inició con GA y RD, son los inhibidores análogos de estos compuestos los más optimizados y en los que más ha progresado el desarrollo clínico. Hasta la fecha los efectos terapéuticos de estos inhibidores han sido discretos, y por ello ningún inhibidor de HSP90 ha sido aprobado por las correspondientes agencias reguladoras (FDA, Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos y EMA, Agencia Europea de Medicamentos). No obstante, existen diferentes estrategias para aumentar el potencial terapéutico de la inhibición de HSP90. Una de las principales es la correcta estratificación de pacientes acorde a las características moleculares de los tumores, donde debe ser tomada en cuenta la dependencia de HSP90 por parte de determinados conductores oncogénicos, la cual parece extrema en CPNM con translocación EML4-ALK y en cáncer de mama con amplificación de HER2. Otra aproximación adecuada sería la reducción de la respuesta a estrés térmico a través de la inhibición de HSF1, HSP70 o HSP27, o mediante el uso de otros inhibidores asociados con una menor activación del HSF1 así como la inactivación adicional de HSP90 mediante modificaciones post-traduccionales o a través de sus cochaperonas. Combinar inhibidores de HSP90 con quimioterápicos, radioterapia o terapia dirigida sería otra estrategia para buscar efectos sinérgicos que incrementen la eficacia de estos tratamientos. Finalmente, la búsqueda de biomarcadores adecuados para monitorizar la respuesta a la inhibición de HSP90, ayudaría a identificar la dosis y esquemas óptimos potenciando los efectos terapéuticos de estos inhibidores [171].

4.2. Inhibición de HSP90 en CPNM.

HSP90 está involucrada directa o indirectamente en una amplia variedad de rutas de señalización en cáncer de pulmón, las cuales son alteradas tras su inhibición. Senju y colaboradores identificaron que la inhibición de HSP90, que se encontraba sobreexpresada en líneas celulares de cáncer de pulmón, causaba un arresto en la fase G2/M provocando la inhibición del crecimiento celular e inducción de la apoptosis [193]. A su vez, HSP90 se ha propuesto como reguladora del crecimiento tumoral a través de las rutas de señalización relacionadas con EGFR así como de las vías MEK-ERK-MAPK, PI3K/AKT, TGF y VEGF [194-198], las cuales se verían afectadas tras el bloqueo de esta chaperona. Sin embargo, lo más destacable respecto al efecto de la inhibición de HSP90 en cáncer de pulmón concierne a algunas de sus proteínas clientes tales como RAF, HER2, EGFR, MAK o TERT las cuales poseen papeles esenciales en el desarrollo de la enfermedad. Por todo ello, y en

base a los elevados niveles de esta chaperona requeridos en el cáncer de pulmón la inhibición de HSP90 se convierte en una plausible estrategia terapéutica [198]. Por consiguiente, el cese de la actividad de HSP90 en cáncer de pulmón, a través del uso de sus inhibidores, además de actuar contra múltiples oncogenes en paralelo provocaría la inhibición de la proliferación celular, motilidad y metástasis así como la inducción selectiva de la apoptosis en células tumorales [199].

Ha sido ampliamente documentado el aumento de la eficacia de la inhibición de HSP90 seleccionando a pacientes con tumores molecularmente adictos a proteínas conductoras dependientes de HSP90 y por tanto sensibles a su inhibición [200]. Por ello, no es de extrañar que los resultados más prometedores de la inhibición de HSP90 se hayan logrado en cáncer de pulmón no microcítico, concretamente en el subtipo histológico de adenocarcinoma. Esto es debido principalmente a que sus proteínas conductoras EGFR [162], HER2 [201], MET [202] y BRAF [203] así como el producto de la translocación EML4-ALK [204] son clientes de HSP90. En consecuencia la degradación de estas proteínas conductoras, tras la inhibición de HSP90, conlleva la pérdida de viabilidad de las células tumorales [205].

En relación con lo anteriormente descrito, se ha demostrado que la disminución en la expresión génica de HSP90 se asocia con un aumento de la supervivencia en pacientes con CPNM [206]. Y su elevada expresión, con un peor pronóstico clínico así como con resistencia a la quimioterapia y radioterapia [205]. Lo cual, además de sugerir a HSP90 como predictor de la respuesta en estos pacientes [207], avala su inhibición como estrategia terapéutica. Por ello, los inhibidores de HSP90 han demostrado un potencial significativo en CPNM en ensayos preclínicos y clínicos [208] además de actuar como quimiosensibilizantes [209], radiosensibilizantes [210] y previniendo la resistencia adquirida a las terapias dirigidas [211, 212].

Hasta el momento los inhibidores de HSP90 evaluados en ensayos clínicos en CPNM han sido IPI-504, AUY-922, STA-9090, onalespib y debio-0932. A partir de los resultados publicados de estos ensayos se demuestra como la estratificación de los pacientes con CPNM, acorde a las características moleculares de los tumores, mejora las tasas de respuesta (Tabla 5).

Tabla 5. Ensayos clínicos finalizados de los inhibidores de HSP90 en pacientes con cáncer de pulmón no microcítico.

Inhibidor de HSP90	Tipo de ensayo	Nº de pacientes	Estratificación molecular	Tratamiento	Respuesta	Comentarios	Identificador Ensayo Clínico
IPI-504	Fase Ib	16 (6 CPNM)	NA	IPI-504 + docetaxel	TRO: 26%	Mayor TRO en CPNM epidermoide KRAS silvestres y fumadores	NCT00606814
IPI-504	Fase II	226 CPNM	NA	A: IPI504 + docetaxel B: placebo + docetaxel	Sin mejora	La adición de IPI-504 tampoco mejoró la respuesta en pacientes epidermoides.	NCT01362400
IPI-504	Fase II	76 pretratados con ITQs-EGFR	EGFR wt EGFR+	Monoterapia	TRO GLOBAL: 7% TRO EGFR+: 4% TRO EML4-ALK: 67%	El único paciente EML4-ALK no respondedor presentó EE prolongada.	NCT00431015 [213]
IPI-504	Fase II	3 CPNM	EML4-ALK	A: IPI-504 en pacientes no tratados con ITQs-ALK B: IPI-504 en pacientes pretratados con ITQs-ALK	A: Sin respuesta B: Sin respuesta	Ensayo cerrado debido al bajo número de pacientes y falta de respuesta	NCT01228435
AUY-922	Fase I	101, nº desconocido de CPNM	NA	Monoterapia	TA		NCT00526045 [214]
AUY-922	Fase II	153 CPNM en estadio avanzado	EML4-ALK EGFR+ KRAS+ TN	Monoterapia	TRO EML4-ALK: 32% TRO EGFR+: 17% TRO KRAS+: 0% TRO TN: 9%	Los pacientes EGFR+ respondedores presentaban delección del exón 19, inserción en el exón 20 y mutación T790M	NCT01124864 [215]
AUY-922	Fase I/II	37 EGFR+ con resistencia adquirida a ITQs-EGFR	EGFR MUTADOS	AUY-922 + erlotinib	TRO: 16%	TRO independiente de la mutación T790M	NCT01259089 [182]
AUY-922	Fase II	10 (primera parte) CPNM	EGFR+ con inserción en el exón 20	Monoterapia	RP: 10% EE: 30%	A la espera de los resultados de la segunda parte del ensayo clínico	NCT01854034
STA-9090	Fase I	53 (10 CPNM)	NA	Monoterapia	TCE: 24%		NCT00687934 [216]

STA-9090	Fase II	381 CPNM IIIB/IV	NA	A: STA-9090 + docetaxel B: docetaxel	Prolongación SLP y SG	Aumento exclusivamente detectado en pacientes con adenocarcinoma	NCT01348126 [190]
STA-9090	Fase III	672 CPNM (adenocarcinoma)	NA	A: STA-9090 + docetaxel B: docetaxel	Sin beneficio en SG	Ensayo detenido prematuramente	NCT01798485
STA-9090	Fase II	98 CPNM	EGFR+ KRAS+ EGFR/KRAS wt	Monoterapia	SLP EGFR+:13.3% SLP KRAS+: 5.9% SLPL EGFR/KRAS WT: 19.7% RP: 4%	La RP se produjo exclusivamente en pacientes EML4-ALK	NCT01031225 [189]
STA-9090	Fase I	12 CPNM	ALK+, no tratados con ITQs-ALK	STA-9090 + crizotinib	RP: 67% TCE: 83%		NCT01579994
Onalespib	Fase I	62 (10 CPNM)	NA	Monoterapia	EA		NCT00878423 [217]
Onalespib	Fase I	31 (1 CPNM)	NA	Monoterapia	EA		NCT01246102 [218]
Debio0932	Fase I	50 (7 CPNM) + 30 (15 CPNM)	NA	Monoterapia	EE: 50%		NCT01168752 [219]

CPNM= Cáncer de Pulmón No Microcítico; wt= silvestre, del inglés *wild type*; EGFR+= mutación en el factor de crecimiento epidérmico (EGFR); ITQs-EGFR= inhibidores de tirosina quinasa frente a EGFR; EML4-ALK: translocación del gen de la proteína 4 similar a proteína asociada a microtúbulos de equinodermo (EML4) y el gen de la quinasa del linfoma anaplásico (ALK); ITQs-ALK= inhibidores de tirosina quinasa frente a ALK; KRAS+= mutación en el gen homólogo al oncogén del virus del sarcoma de la rata Kirsten V-Ki-Ras2 (KRAS); TN= Triple Negativo (EGFR, ALK, KRAS WT) NA= No Aplica; TRO= Tasa Respuesta Objetiva; RP= Respuesta Parcial; EE= Estabilización de la Enfermedad; SLP= Supervivencia Libre de Progresión; SG= Supervivencia Global; TCE= Tasa de Control de la Enfermedad; TA= Tolerabilidad Aceptable; EA= Efectos Adversos

Introducción

En base a los positivos resultados terapéuticos obtenidos con los inhibidores de HSP90, en determinados subtipos moleculares, la inclusión de pacientes en los nuevos ensayos clínicos se ha llevado a cabo atendiendo principalmente a la presencia de la translocación EML4-ALK y mutaciones EGFR (Tabla 6).

Tabla 6. Ensayos clínicos, activos o finalizados sin resultados, de los inhibidores de HSP90 en pacientes con cáncer de pulmón no microcítico.

Inhibidor de HSP90	Identificador Ensayo Clínico	Tipo de EC	EM	Grupo de pacientes	Tratamiento	Estado del ensayo
IPI-504	NCT01427946	Fase Ib/II	Si	CPNM mutados en KRAS	IPI-504 + everolimus	Completado. SR
AUY-922	NCT01784640	Fase Ib	No	CPNM estadio IV, pretratados	IPI-504 + premetrexed	Completado. SR
AUY-922	NCT01752400	Fase II	Si	CPNM EML4-ALK, con resistencia adquirida a ITQs-ALK	Monoterapia	Completado. SR
AUY-922	NCT01772797	Fase Ib	Si	CPNM EML4-ALK, con resistencia adquirida a ITQs-ALK	AUY + ceritinib	Completado. SR
AUY-922	NCT01922583	Fase II	Si	CPNM ESTADIO IV, alteraciones moleculares	Monoterapia	Completado. SR
STA-9090	NCT01562015	Fase II	Si	CPNM EML4-ALK, no tratados con ITQs-ALK	Monoterapia	Completado. SR
Onalespib	NCT02503709	Fase I	No	CPNM	Onalespib + AT7519M	Reclutando
Onalespib	NCT01712217	Fase I/II	Si	CPNM, EML4-ALK	Onalespib ± crizotinib	Completado. SR
Onalespib	NCT02535338	Fase I/II	Si	CPNM, EGFR+ con resistencia adquirida a ITQs-EGFR	Onalespib + erlotinib	Activo. No reclutando

EC= Ensayo Clínico; EM= Estratificación Molecular; CPNM= Cáncer de Pulmón No Microcítico; ; KRAS= gen homólogo al oncogén del virus del sarcoma de la rata Kirsten V-Ki-Ras2 (KRAS); EML4-ALK: translocación del gen de la proteína 4 similar a proteína asociada a microtúbulos de equinodermo (*EML4*) y el gen de la quinasa del linfoma anaplásico (*ALK*); ITQs-ALK= inhibidores de tirosina quinasa frente a ALK; EGFR+= mutación en el factor de crecimiento epidérmico (EGFR); ITQs-EGFR= inhibidores de tirosina quinasa frente a EGFR; SR= Sin Resultados

A pesar de que los resultados han sido alentadores, su uso como terapia en cáncer de pulmón es aún limitado, debido a una eficacia moderada, emergencia de resistencias y recurrencia temprana. Para mejorar estos parámetros se necesita mejorar el conocimiento acerca de cómo HSP90 regula a nivel molecular la tumorigénesis del cáncer del pulmón así como identificar biomarcadores que predigan y ayuden a monitorizar la respuesta a su inhibición en este tipo tumoral [198].

5. Proteómica.

Las proteínas son los causantes de la mayoría de los sistemas biológicos y rutas de señalización. Por ello, son piezas claves a nivel funcional y definen el fenotipo celular [220]. La totalidad de proteínas expresadas a nivel célula, tejido u órgano en un momento determinado es definida como proteoma. Su estudio, mediante técnicas o tecnologías dirigidas para la caracterización estructural y funcional del conjunto de proteínas, se denomina proteómica [221].

5.1. Proteómica en la investigación en cáncer.

Las proteínas, debido a sus papeles como efectores funcionales, nos ofrecen una información precisa sobre la enfermedad oncogénica, incluso mayor a la obtenida a través del análisis del ADN o ARN. Los análisis proteómicos posibilitan la cuantificación de los efectos de anormalidades moleculares relacionadas con la oncogénesis. Entre estos cambios cuantificables destacan la expresión diferencial de proteínas codificadas por genes con un número de copias alteradas, corte y empalme (*splicing*) alternativos, mutaciones, deleciones, inserciones así como regulación transcripcional mediado por microARN o cambios epigenéticos. Por consiguiente la proteómica, conectando las alteraciones genómicas con el fenotipo cancerígeno, puede mejorar nuestro conocimiento biológico del cáncer y ayudar en la búsqueda de nuevas dianas terapéuticas y biomarcadores claves para la enfermedad [222]. Las técnicas proteómicas más empleadas pueden ser divididas en aquellas basadas en anticuerpos y las basadas en espectrometría de masas, pudiendo estas últimas ser dependientes o independientes de gel.

Entre las aproximaciones basadas en anticuerpos encontramos tecnologías tradicionales de análisis proteicos como western blot, inmunohistoquímica, ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) y microarrays proteicos. Estas técnicas permiten la examinación sistemática del proteoma canceroso así como la evaluación de biomarcadores [223]. Sin embargo, estas aproximaciones se dirigen contra una diana específica, por lo que requieren un conocimiento previo de las proteínas esperadas en la muestra estudiada. Lo contrario ocurre en las técnicas basadas en espectrometría de masas, dependientes o independientes de gel, las cuales han permitido la identificación de proteomas complejos y hasta ahora desconocidos.

Entre las técnicas basadas en gel (Figura 7) destacamos la electroforesis bidimensional en gel de poliacrilamida (2D-PAGE), uno de los métodos preferentes de análisis proteómico debido a su bajo coste y elevada aplicabilidad. Esta técnica permite la separación proteica en dos dimensiones. En la primera dimensión, enfoque isoelectrico, las proteínas se separan conforme a su punto isoelectrico tras aplicar corriente eléctrica a la muestra previamente situada en un gradiente de pH. En la segunda dimensión, basada en el proceso de electroforesis en geles de poliacrilamida, las proteínas migran conforme a su peso molecular. Para tal fin las proteínas separadas en la primera dimensión son cargadas negativamente por sodio dodecilsulfato (SDS) antes de aplicar la corriente. Los *spots* proteicos resultantes son analizados y seleccionados para ser escindidos del gel, digeridos e identificados mediante espectrometría de masas. Esta técnica permite el estudio de un gran número de polipéptidos en un solo experimento, además mediante la evaluación de múltiples geles, podemos observar la variación del proteoma entre diferentes condiciones de estudio [224]. Sin embargo existen limitaciones asociadas a esta aproximación, incluyendo bajo rendimiento y sensibilidad, la dificultad de separar proteínas con un peso molecular o punto isoelectrico extremo, la necesidad de grandes cantidades de muestra así como la variación entre geles. Para solventar este último hándicap se desarrolló la electroforesis bidimensional diferencial (2D-DIGE). Esta variación de la 2D-PAGE permite el análisis de tres condiciones (caso, control, referencia) en el mismo gel y la evaluación de diferencias cuantitativas, entre las diferentes condiciones, por el uso de fluorocromos derivados de cianinas (Cy2, Cy3 y Cy5) [225].

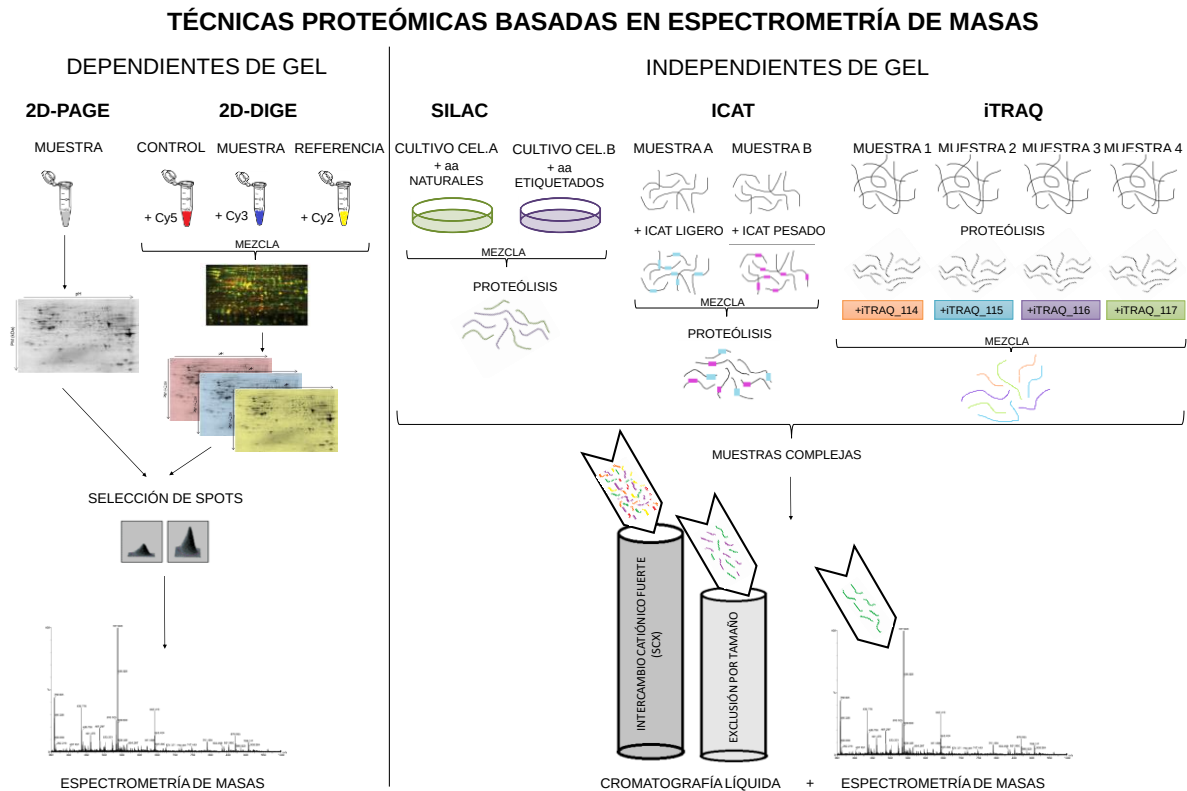


Figura 7. Flujo de trabajo de las técnicas proteómicas basadas en espectrometría de masas, dependientes o independientes de gel. El método proteómico clásico 2D-PAGE y el posteriormente desarrollado 2D-DIGE son esquematizados en la parte izquierda de la figura. Las técnicas libres de gel y con marcaje isotópico ICAT, SILAC e iTRAQ se resumen en la parte derecha de la figura. El paso final en todas estas aproximaciones, por lo que son agrupadas conjuntamente, es la identificación proteómica mediante espectrometría de masas.

Por otro lado, existen técnicas dependientes de espectrometría de masas pero libres de separación en gel (Figura 7). Estas ofrecen una alta reproducibilidad en la cuantificación de proteínas, disminuyéndose la variabilidad que aporta el gel [226]. Estas técnicas son la cromatografía líquida (LC) y la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) que emparejadas a la espectrometría de masas nos permite identificar las proteínas contenidas en una muestra biológica compleja. Tras digerir enzimáticamente la muestra de estudio, las moléculas resultantes son separadas en una fase móvil líquida empleando una fase estacionaria sólida. Entonces, la cantidad de cada péptido es analizado y cuantificado mediante espectrometría de masas. Estos métodos son conocidos como proteómica de segunda generación o alto rendimiento, y en la mayoría de los casos suelen estar acoplados a aproximaciones que previamente marquen con isótopos no radiactivos las muestras a analizar [223].

Entre las técnicas de marcaje basado en isótopos, en la cuales es esencial la incorporación de etiquetas, destacamos SILAC (marcaje isotópico estable con aminoácidos en cultivos celulares), ICAT (marcaje de afinidad codificado por isótopos) y iTRAQ (etiquetas isobáricas para la cuantificación relativa y absoluta). SILAC permite identificar dos poblaciones idénticas creciendo en medios de cultivo distintos, uno con aminoácidos naturales y otro con aminoácidos sustituidos con núcleos isotópicos estables. Comparando las diferencias de intensidad nos permite realizar una cuantificación relativa de las proteínas de un cultivo celular. ICAT emplea reactivos químicos ligeros o pesados para etiquetar y comparar pares de muestras, por tanto evadiendo el marcaje *in vivo*. iTRAQ ofrece la posibilidad de analizar hasta 8 muestras en paralelo en el mismo experimento. En esta innovadora aproximación, tras la digestión por tripsina, las muestras son etiquetadas independientemente con los reactivos iTRAQ. Durante los análisis de espectrometría de masas, los grupos reporteros de los reactivos iTRAQ se separan de los péptidos y generan pequeños fragmentos para cada muestra con un ratio masa/carga (m/z) de 114, 115, 116 y 117 para iTRAQ 4-plex además de 113, 118, 119 y 121 en iTRAQ 8-plex. La intensidad de cada pico se correlaciona con la cantidad de cada grupo reportero y por tanto con la cantidad del péptido [227].

El análisis por espectrometría de masas es el paso final y pilar fundamental de los análisis proteómicos actuales. Esta técnica es ampliamente usada para la secuenciación e identificación de las proteínas y péptidos a través de la medida del peso molecular y carga (ratio m/z) de sus iones. El primer paso es la ionización de la muestra por una fuente de iones. Los principales métodos de ionización son ESI (ionización por electrospray), MALDI (desorción/ionización láser asistida por matriz) y SELDI (ionización/desorción láser inducida en superficie) donde la muestra es introducida en forma de aerosol, matriz o chip, respectivamente. Posteriormente, las muestras ionizadas son inyectadas en un analizador de masas, donde los iones son separados de acuerdo a su ratio m/z . Los analizadores más utilizados para este propósito son el tiempo de vuelo (TOF), la transformada de Fourier, la trampa de iones cuadrupolar y un cuadrupolo. Si es añadido un segundo analizador de masa (espectrometría de masas en tándem) pueden ser identificados tanto las proteínas como los péptidos de la muestra [221]. Por todo ello es común el uso en la investigación oncológica de la espectrometría de masas especialmente en la búsqueda y aplicación de biomarcadores [228].

5.2. Proteómica del cáncer de pulmón.

Las técnicas proteómicas permiten el análisis de las proteínas asociadas con la presencia tumoral, ofreciendo la capacidad de mejorar el conocimiento de la biología y patogénesis de esta enfermedad. En consecuencia, estas técnicas posibilitan el desarrollo de nuevos biomarcadores así como la identificación de alteraciones en la red de proteínas asociadas con el pronóstico clínico y resistencia a agentes antitumorales [229, 230].

Concretamente, el uso de electroforesis bidimensional emparejada a espectrometría de masas ha sido la técnica más empleada para analizar los perfiles de expresión proteicos e identificar nuevos biomarcadores de diagnóstico, pronóstico o predictivos en cáncer de pulmón [231-235]. Actualmente sigue siendo utilizada, dado su bajo coste y fácil establecimiento en el laboratorio, aunque la proteómica de segunda generación está siendo cada vez más implantada, debido a sus evidentes ventajas. Estas técnicas permiten una caracterización rápida y precisa de varios miles de proteínas en un solo estudio, generando una gran cantidad de datos en los estudios proteómicos de cáncer de pulmón. El método iTRAQ está siendo muy usado en la investigación del cáncer de pulmón debido principalmente a su elevada exactitud en la cuantificación y comparación de muestras [236, 237] ayudando a estudiar los efectos mecanísticos de diferentes fármacos o químicos [238, 239], y a su capacidad para detectar las proteínas minoritariamente representadas, aumentando las posibilidades de descubrir nuevos biomarcadores [240, 241].

Hasta el momento la búsqueda de biomarcadores predictivos se ha centrado en la evaluación de la respuesta frente a las estrategias terapéuticas clásicas con quimioterapia o inhibición de EGFR en pacientes con cáncer de pulmón [242-244]. Debido al reciente aumento de dianas y opciones terapéuticas en este tipo tumoral, siendo un claro ejemplo la inhibición de HSP90, la necesidad de estudios que aumenten las posibilidades de estos nuevos tratamientos es evidente.

5.3. Proteómica en el estudio de HSP90 y su inhibición.

Debido al complejo interactoma de HSP90 y la elevada cantidad de procesos celulares en los cuales está envuelto, es habitual el uso de herramientas proteómicas para el estudio de esta chaperona y sus clientes [245]. Investigaciones recientes se han centrado en estudiar las alteraciones proteómicas producidas a nivel celular tras la inhibición de HSP90 [246, 247], así como en las consecuencias de su inhibición en

diferentes tipos de tumores [248]. A pesar de ello, en cáncer de pulmón es evidente la falta de información minuciosa de la respuesta diferencial a los inhibidores de HSP90. Aunque la adición a una determinada proteína cliente de HSP90 (EML4-ALK o EGFR) es necesaria para el éxito del tratamiento, no todos los tipos tumorales que cumplen esta condición tienen el mismo grado de sensibilidad [200]. Por ello, la caracterización de los mecanismos envueltos en la respuesta son claves para un exitoso desarrollo clínico. En la misma línea, y como se ha realizado en otros tipos tumorales [249], es evidente la necesidad de llevar a cabo estudios proteómicos para la identificación de biomarcadores predictores de respuesta que nos permitan seleccionar a aquellos pacientes más susceptibles de beneficiarse de los inhibidores de HSP90.

Asimismo es patente la necesidad de identificar biomarcadores que ayuden a monitorizar la respuesta a los inhibidores de HSP90. Hasta el momento en los ensayos clínicos, el estudio de los efectos farmacodinámicos tras la inhibición de HSP90 se ha basado principalmente en el análisis de la inducción de HSP70 [250]. Concretamente, este aumento de expresión es analizada mediante técnicas proteómicas en las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs), debido a su facilidad de extracción en comparación con biopsias u otro tipo de muestras. Sin embargo, la farmacocinética [172] y sensibilidad [173] de los inhibidores de HSP90 difieren significativamente entre tejido tumoral y normal, lo cual hace cuestionable la fiabilidad del estudio de expresión de HSP70 en PBMCs. De hecho hasta el momento no se ha detectado una correlación significativa entre este biomarcador y la respuesta, requiriéndose la identificación de predictores adicionales que optimicen el desarrollo clínico de los inhibidores de HSP90.

Hipótesis

La dependencia de la chaperona HSP90, por parte de los principales conductores oncogénicos del adenocarcinoma de pulmón, hace que su inhibición sea una estrategia potencial para el tratamiento de este tipo tumoral. La eficacia demostrada ha sido diferencial y limitada, por ello el análisis proteómico de su inhibición podría mejorar el entendimiento del papel de HSP90 en el adenocarcinoma de pulmón así como proporcionar el conocimiento de los cambios moleculares asociados a la eficacia de sus inhibidores. Por tanto, el estudio proteómico podría permitir identificar biomarcadores que ayuden a predecir y monitorizar la respuesta a los inhibidores de HSP90 en pacientes con adenocarcinoma de pulmón.

Objetivos

1. Estudio del perfil proteómico asociado a la inhibición de HSP90 en el adenocarcinoma de pulmón.
2. Análisis diferencial del proteoma tras la inhibición de HSP90 en diferentes subgrupos moleculares de adenocarcinoma de pulmón.
3. Búsqueda de potenciales biomarcadores predictivos de la eficacia de la inhibición de HSP90 en el adenocarcinoma de pulmón.

Materiales y métodos

1. Diseño.

A fin de elucidar la eficacia y efectos de la inhibición de HSP90 en el adenocarcinoma pulmonar, se inhibieron farmacológicamente tanto esta chaperona como HSP70, dada su estrecha relación con HSP90, en distintas líneas celulares. Asimismo, se silenció genéticamente HSP90 con el fin de detectar los cambios relacionados exclusivamente con el bloqueo de esta chaperona.

A continuación, tras comprobar la eficacia de la inhibición y silenciamiento génico de HSP90 en las líneas de adenocarcinoma de pulmón estudiadas, se llevó a cabo el estudio proteómico mediante dos técnicas independientes: electroforesis bidimensional (2D-PAGE) y marcaje isobárico (iTRAQ). Estos ensayos proteómicos fueron empleados con el fin de identificar las proteínas relacionadas con la respuesta al bloqueo de HSP90 y estudiar su potencial como posibles biomarcadores.

Finalmente, se realizó la anotación funcional de todas las proteínas alteradas en respuesta a los inhibidores de HSP90, con la finalidad de dilucidar los procesos y rutas biológicas relevantes asociadas con la inhibición de HSP90 en el adenocarcinoma pulmonar.

2. Cultivos celulares.

2.1. Líneas celulares.

Las características de las líneas celulares de pulmón utilizadas en el presente estudio, incluyendo tipo histológico, presencia o no de mutaciones conductoras, medio de cultivo empleado y procedencia de la línea, se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7. Panel de líneas celulares de pulmón empleadas en el estudio.

Línea Celular	Tipo Histológico	Mutación Conductora	Medio de Cultivo	Crecimiento	Proveedor
HCC827	ADC	EGFR E746-E750 del	RPMI-1640	Adherentes	ATCC
H1975	ADC	EGFR L858R/T790M	RPMI-1640	Adherentes	ATCC
H1650	ADC	EGFR E746-E750 del	RPMI-1640	Adherentes	ATCC

A549	ADC	KRAS p.G12S	DMEM *	Adherentes	Dr.Sánchez
H2009	ADC	KRAS p.G12A	RPMI-1640	Adherentes	ATCC
H358	ADC	KRAS p.G12C	RPMI-1640	Adherentes	ATCC
H3122	ADC	EML4-ALK v1	RPMI-1640	Adherentes	Dr. Koivunen
H2228	ADC	EML4-ALK v3	RPMI-1640	Adherentes	ATCC
Calu-3	ADC	TN	DMEM	Adherentes	ATCC
H1437	ADC	TN	RPMI-1640	Adherentes	ATCC
H1781	ADC	TN	RPMI-1640	Adherentes	ATCC

ADC= adenocarcinoma de pulmón, EGFR= receptor de factor de crecimiento epidérmico ;KRAS= homólogo al oncogén del virus del sarcoma de la rata Kirsten V-Ki-Ras2; EML4-ALK= translocación del gen de la proteína 4 similar a proteína asociada a microtúbulos de equinodermo (*EML4*) y el gen de la quinasa del linfoma anaplásico (*ALK*); TN= EGFR, KRAS, ALK silvestres; ATCC= del inglés, *American Type Culture Collection*; *= suplementado con aminoácidos no esenciales, HEPES y piruvato de sodio

2.2. Cultivo y conservación de las líneas celulares.

Todas las líneas celulares se crecieron en medio completo acorde a las recomendaciones de la ATCC o del laboratorio de origen. Consistiendo el mismo en el medio específico para cada línea celular, suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS; TICO Europe), 1% de glutamina (Sigma-Aldrich) y 1% de solución antibiótica/antimitótica (Sigma-Aldrich). Para su crecimiento las líneas fueron sembradas en placas de 10 centímetros (Falcon) y para su mantenimiento se subcultivaron 1:4-1:6, realizándose estas diluciones con la solución tripsina/EDTA (Sigma-Aldrich) cada dos o tres días. Las manipulaciones de las líneas celulares se llevaron a cabo en una campana de flujo laminar (cabina de seguridad biológica II tipo A2, Telstar/NuAire). Las líneas celulares fueron incubadas a 37°C en atmósfera humidificada con un 5% de CO₂ (Thermo/NuAire).

La conservación de las líneas celulares durante un periodo elevado de tiempo, se realizó en nitrógeno líquido a -196°C. Para ello las células fueron conservadas, en criotubos de 2ml, en su correspondiente medio completo con un 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) como agente crioprotectivo. Previamente a ser introducidos en el tanque de nitrógeno, los criotubos fueron alojados en contenedores de isopropanol y congelados a -80°C. Para su descongelación, los criotubos se sumergieron en un baño de agua a 37°C durante una media de 2 minutos. Posteriormente, el volumen total del criotubo fue resuspendido en 10ml de medio completo en un falcon de 15ml, el pellet celular obtenido tras la centrifugación fue resuspendido en su medio específico para finalmente sembrarse en una placa de 10cm.

2.3. Transfección celular.

Las líneas celulares fueron transfectadas con pequeños fragmentos de ARN de interferencia (siRNAs) (señalados en la Tabla 8) para inducir, de manera transitoria, el silenciamiento de los genes de interés. Los siRNAs de la casa comercial Origene fueron los empleados, para silenciar HSP90 α y HSP90 β , en todas las líneas del panel celular a excepción de las líneas H3122 y H1437 en las que se emplearon los de la casa comercial Dharmacon.

Tabla 8. Plásmidos utilizados a lo largo del trabajo de tesis.

Nombre	Referencia	Proveedor	Uso
HSP90AA1 Trilencer-27 Human siRNA	SR302262	Origene	Silenciamiento de HSP90 α (ID 3320)
HSP90AB1 Trilencer-27 Human siRNA	SR302264	Origene	Silenciamiento de HSP90 β (ID 3326)
TYE 563™ Fluorescent- labeled transfection control siRNA duplex	SR30002	Origene	Monitorización de la transfección mediante marcaje fluorescente.
ON-TARGETplus HSP90AA1 siRNA	LQ-005186-00-0002	Dharmacon	Silenciamiento de HSP90 α (ID 3320)
ON-TARGETplus HSP90AB1 siRNA	LQ-005187-00-0002	Dharmacon	Silenciamiento de HSP90 β (ID 3326)

Para tal fin se utilizó Lipofectamine™ RNAiMAX (Invitrogen), un reactivo de transfección basado en lípidos catiónicos, que optimiza la formación de complejos ácido nucleico-lípido facilitando así la entrada del siRNA en las células eucariotas. Para llevar a cabo este procedimiento las células fueron sembradas a una concentración adecuada para alcanzar, en las siguientes 24 horas, una confluencia del 60-80%. El día de la transfección se procedió según las directrices del fabricante y posteriormente se incubaron las células con los complejos de transfección, durante 48 ó 72 horas a 37°C, antes de ser utilizadas en los correspondientes experimentos.

Además, con el fin de silenciar simultáneamente dos genes, las líneas fueron co-transfectadas. Para ello se utilizó el mismo volumen, que en la transfección individual, para cada uno de los dos siRNAs. Por lo demás se siguieron las instrucciones del comerciante.

2.4. Determinación de la concentración inhibitoria media.

La concentración inhibitoria media (IC_{50}) corresponde a la concentración de un fármaco requerida para lograr una inhibición del 50% de la proliferación celular *in vitro*. Los fármacos utilizados en el presente trabajo se detallan en la Tabla 9.

Tabla 9. Inhibidores empleados en este proyecto de tesis.

Fármaco	Referencia	Proveedor	Descripción
Tanespimicina (17-AAG)	S1141	Selleckchem	Inhibidor de HSP90, análogo de geldanamicina
Hidrocloruro de retaspimicina (IPI-504)	EDO-10210	Eurodiagnóstico	Inhibidor de HSP90, análogo de geldanamicina
Ganetespib (STA-9090)	S1159	Selleckchem	Inhibidor de HSP90, análogo de radicicol
Luminespib (AUY-922)	S1069	Selleckchem	Inhibidor de HSP90, análogo de radicicol
VER-155008	A4387	ApexBio	Inhibidor de HSP70, derivado de adenosina

Con el fin de determinar el rango de concentración donde se encuentra la IC_{50} se sembraron, por línea celular de estudio, 3×10^3 células por pocillo en las doce columnas de tres filas de placas de 96 pocillos. A los 11 primeros pocillos se añadieron concentraciones decrecientes de fármaco desde 20 μ M hasta 0.33 nM dejando el último pocillo como control sin tratar. Las células se incubaron durante 96 horas en presencia del fármaco, a continuación fueron fijadas con glutaraldehído al 0.5% en PBS durante 30 minutos y tras lavar se tiñeron con cristal violeta al 1% en agua durante otros 30 minutos aproximadamente. Transcurrido ese tiempo, las placas fueron nuevamente lavadas y secadas al aire durante 24 horas. Posteriormente el cristal violeta, adherido a las células que han sobrevivido al tratamiento, fue disuelto en ácido acético al 20% y la absorbancia fue medida a 595 nm en el equipo de lectura óptica VICTOR X3 (PerkinElmer). Finalmente, para realizar las curvas de dosis-respuesta y establecer el valor IC_{50} se utilizó el software de análisis bioestadístico GraphPad Prism.

3. Análisis de expresión a nivel de proteína.

3.1. Anticuerpos.

Las características principales de los anticuerpos utilizados durante este proyecto se detallan en la Tabla 10.

Tabla 10. Especificaciones de los anticuerpos así como de la procedencia y dilución empleada en su uso.

Anticuerpo	Tipo	PM proteína diana	Referencia	Proveedor	Dilución
HSP90α	M-Ratón	90kDa	ab79849	Abcam	1:2000
HSP90β	M-Ratón	90kDa	ab53497	Abcam	1:2000
GRP94	P-Conejo	94kDa	ab18055	Abcam	1:1000
HSP70	M-Conejo	70kDa	ab45133	Abcam	1:2000
HSP27	M-Ratón	27kDa	2402	CST	1:1000
EGFR	M-Conejo	175kDa	4267	CST	1:1000
pEGFR	M-Conejo	175kDa	2234	CST	1:1000
ALK	M-Conejo	117kDa EML4-ALK v1 86 kDa EML4-ALK v3	3633	CST	1:2000
CDK4	M-Ratón	34kDa	ab3112	Abcam	1:2000
EIF3SI	P-Conejo	36kDa	ab40745	Abcam	1:1000
Citrato sintasa	M-Conejo	45kDa	14309	CST	1:1000
α-tubulina	M-Ratón	55kDa	T9026	Sigma-Aldrich	1:5000
β-actina	M-Ratón	42kDa	A5316	Sigma-Aldrich	1:5000
Secundario anti-Rabbit (Peroxidasa ácida de rábano)	P-Cabra		7074	CST	1:5000
Secundario anti-Mouse (Peroxidasa ácida de rábano)	P-Caballo		7076	CST	1:5000

PM = Peso Molecular; M= Anticuerpo Monoclonal; P= Anticuerpo Policlonal; CST=Cell Signaling Technology; EGFR = Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico; EIF3SI = Factor de Iniciación de la Traducción Eucariótico 3 Subunidad I o 2.

3.2. Extracción, conservación y cuantificación de proteína total.

Las células se lavaron dos veces con PBS y sobre ellas se añadió un volumen apropiado de tampón de lisis. La solución RIPA (Sigma-Aldrich) fue el tampón usado para la extracción proteica, suplementado a su vez, con un cóctel de inhibidores de proteasas (cOmplete Mini EDTA-free, Roche) y un cóctel de inhibidores de fosfatasa (PhosSTOP EASYpack, Roche) a la concentración recomendada por el fabricante. Los lisados se

recogieron, en hielo, mediante raspado y se almacenaron en un tubo de 1.5 ml. Posteriormente, fueron centrifugados a 15000 x g durante 10 minutos a 4°C, para eliminar los restos no proteicos que quedan sedimentados y el sobrenadante (extracto proteico) se recuperó y se guardó en alícuotas a -80°C hasta su posterior empleo en la detección de proteínas.

La cuantificación de los extractos proteicos se realizó usando el método Bradford modificado (BioRad) según las instrucciones del fabricante, utilizando como control concentraciones conocidas de albumina sérica (BSA). Una vez determinada la cantidad apropiada de proteína, estas se resuspendieron en tampón de carga (Tris-HCl 62.5 mM pH 6.8, glicerol 10%, SDS 1%, 2-mercaptoethanol 5%, azul de bromofenol 0.0025%) y se desnaturalizaron durante 5 minutos a 95°C. A continuación, se procedió a la carga de las proteínas desnaturalizadas en el correspondiente gel de electroforesis para realizar el ensayo de Western Blot.

3.3. Western Blot.

La inmunodetección de proteínas sobre membranas de PDVF (GE Healthcare) se llevó a cabo siguiendo un protocolo estándar. Inicialmente, los extractos proteicos se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida (con una concentración variable entre el 7.5 y 15% según el peso molecular de la proteína a detectar), en presencia de SDS. La separación de las proteínas fue llevada a cabo utilizando el sistema Mini-Protean 3 (BioRad) y un tampón de electroforesis (1X Tris-HCl 0.13 M, glicina 0.95 M, SDS 0.5%). A continuación, las proteínas fueron transferidas a membranas de PDVF mediante el equipo Mini Trans-Blot Cell (BioRad). La transferencia se realizó a 200 mA durante 3 horas en tampón de transferencia (Tris-HCl 0.025 M, glicina 0.2 M, 20% metanol). Las membranas se bloquearon en agitación, durante 2 horas a temperatura ambiente, con el tampón de bloqueo que contenía TBS (Tris-buffered saline), 0.1% Tween 20 y 2% de BSA. A continuación las membranas se incubaron, con la dilución adecuada de anticuerpo primario, durante toda la noche a 4°C. Posteriormente, las membranas fueron lavadas varias veces con TBS 0,1% Tween 20 y entonces se incubaron, durante una hora a temperatura ambiente, con una dilución 1:5000 del correspondiente anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa. Tras lavar y eliminar los restos de anticuerpo secundario, se realizó la detección de las bandas mediante una reacción quimioluminiscente (ECL Clarity, Biorad) y su correspondiente visualización por medio de un equipo de detección de

luminiscencia (ChemiDoc XRS+, BioRad). Para cuantificar por densitometría, las bandas detectadas en los ensayos de western blot, se utilizó el software (ImageLab, BioRad) asociado al equipo de detección de quimioluminiscencia. El volumen, de la banda correspondiente a la proteína de interés, fue cuantificado y posteriormente normalizado con respecto al volumen de la banda del control de carga, normalmente α -tubulina o β -actina cuyos genes son expresados constitutivamente.

4. Tratamiento

4.1. Tratamiento con los inhibidores de HSPs y posterior evaluación de la respuesta.

Se sembraron 4 placas de 10 cm, por línea celular, a una concentración determinada con el fin de alcanzar el 60-70% de confluencia a las 24 horas. En tal punto se realizó la extracción proteica, siguiendo el protocolo básico de extracción de proteína total (apartado 3.2), de una de las placas. Dicho extracto proteico fue utilizado como control sin tratar del experimento. En paralelo se llevó a cabo el tratamiento, de las placas restantes, con el inhibidor de proteína de choque térmico seleccionado. Para ello, se preparó una disolución del fármaco a su concentración inhibitoria 80 (IC_{80}), en el medio de cultivo adecuado según la línea celular. A continuación, las 3 placas de células tratadas fueron incubadas a 37° y se realizó la extracción proteica de las mismas a las 10, 24 y 48 horas respectivamente, siguiendo el protocolo anteriormente citado de extracción de proteína total. Finalmente se realizó el ensayo de western blot para, a través del estudio del cambio de expresión de las proteínas HSP90 α , HSP70, EGFR, EML4-ALK y/o CDK4, evaluar los efectos de los inhibidores de HSPs empleados.

4.2. Tratamiento con los inhibidores de HSPs previo a los ensayos de proteómica (2D-PAGE y iTRAQ) basados en espectrometría de masas.

Se sembraron 3 placas por línea celular a la concentración adecuada para alcanzar una confluencia del 60-70% al día siguiente. Se realizó la extracción proteica de una de las placas (como control sin tratar) siguiendo el protocolo de obtención de muestras para experimentos de proteómica.

Para ello, las células fueron tripsinizadas y recolectadas en un tubo de 15ml en el que se centrifugaron en frío a 1000x g durante 5 minutos. A continuación el debrís celular fue eliminado y el pellet resuspendido en un mililitro de PBS frío. Posteriormente el volumen final fue pasado a un tubo de 2ml y fueron repetidos los sucesivos pasos de centrifugación, retirada de sobrenadante y lavado del pellet en PBS frío. Para finalizar se realizó una última centrifugación en la que, tras retirar el sobrenadante, el pellet fue congelado instantáneamente en nitrógeno líquido. Posteriormente, los pellets fueron conservados a -80°C hasta su posterior uso en las técnicas proteómicas con espectrometría de masas.

Las dos placas restantes fueron tratadas, con el inhibidor o inhibidores correspondientes, a su IC_{80} disuelto en medio de cultivo. En el caso de la inhibición conjunta de HSP90 y HSP70 se añadió el volumen correspondiente a la IC_{80} de cada uno de los inhibidores. Las células fueron incubadas a 37°C y pasadas 24 horas, se obtuvieron los extractos proteicos siguiendo el mismo protocolo de extracción anteriormente descrito.

5. Electroforesis Bidimensional 2D-PAGE.

La técnica 2D-PAGE implica el análisis proteico en dos etapas. En la primera dimensión, también descrita como isoelectroenfoque (IEF), las proteínas fueron separadas en una tira IPG (gradientes de pH inmovilizados en un soporte plástico) permitiendo a las proteínas separarse conforme a su punto isoelectrico. En la segunda dimensión, la tira fue situada sobre un gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) en el cual las proteínas enfocadas migraron conforme a su peso molecular. El resultado final fue un gel donde, después de ser teñido, los *spots* proteicos fueron observados mostrando un patrón característico.

5.1. Preparación de la muestra.

El pellet proteico fue descongelado en hielo y posteriormente resuspendido, según el tamaño del mismo, en un volumen de 200 a 350 μ l de HEN buffer. La solución estaba constituida por HEPES (Sigma-Aldrich) a 50 mM, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (Invitrogen Ambion) a 5 mM y cloruro sódico (Panreac) a 250 mM, suplementada con ditiotreitól (DTT) a 5 mM (GE Healthcare), ortovanadato de sodio (Sigma-Aldrich) a 1 mM, 0.2% de IGEPAL (Sigma-Aldrich) y 5 μ l de cóctel de inhibidor de proteasas (Sigma-Aldrich). Para lograr una completa disgregación del pellet, se realizaron repetidas agitaciones de 1

minuto en vórtex durante una hora. A continuación, se procedió a cuantificar la concentración proteica total mediante el método Bradford (Bio-Rad), descrito en el apartado 3.2.

5.1.1. Purificación y desnaturalización proteica.

Las muestras requieren la eliminación de sales, tioles, desnaturalizantes y otros contaminantes que pudieran estar presentes e interferir con el protocolo de 2D-PAGE. Con tal fin, las muestras fueron limpiadas con el kit 2-D Clean-Up (GE Healthcare) siguiendo las directrices del fabricante. En el último paso, el pellet proteico fue resuspendido en una solución compatible con 2D-PAGE. Esta solución contenía urea (GE Healthcare) a 8 M, 4% de CHAPS (GE Healthcare), 2% de IPG buffer para un rango de pH 3-11 no lineal (NL) (GE Healthcare) y DTT (GE Healthcare) a 40 mM. Para lograr la disolución completa de la muestra en la solución, el tubo que contenía la muestra se mantuvo en agitación a 4°C durante toda la noche. La urea es un agente caotrópico que provoca la desnaturalización de las proteínas, por ruptura de puentes de hidrógenos, dejando expuestos los residuos hidrofóbicos a los que atacara el agente surfactante (CHAPS), y el DTT es el agente reductor que completa la desnaturalización por ruptura de los puentes disulfuro.

5.1.2. Cuantificación de las proteínas purificadas.

Finalmente, debido a la pérdida proteica producida durante la limpieza, se procedió a una cuantificación pre-carga a través del ensayo 2-D Quant-Kit (GE-Healthcare) siguiendo las instrucciones del fabricante. Con este método, compatible con los reactivos en los que se han disuelto las muestras, se conoció la concentración final de las mismas.

5.2. Isoelectroenfoque o primera dimensión.

Muestras control y tratadas con los distintos inhibidores de HSP90 (17-AAG, IPI-504, STA-9090 y AUY-922) y la combinación de HSP90 (17-AAG) y HSP70 (VER-155008) de las líneas celulares seleccionadas para este experimento (HCC827, A549, H3122 y H1437) fueron sometidas de manera independiente a la primera dimensión. El isoelectroenfoque (IEF) se realizó en tiras IPG DryStrips de 13cm con un rango de pH 3-10 NL.

Para ello fue preparada una mezcla de 240 µg de proteína de cada muestra, solución de rehidratación DeStreak (GE Healthcare) y 0.5% de IPG buffer pH 3-11 NL en un volumen final de 250 µl. Esta mezcla fue entonces aplicada cubriendo toda la base del sarcófago de isoelectroenfoque (GE Healthcare) donde se llevó a cabo la primera dimensión. A continuación, la lámina protectora que cubría la tira se retiró cuidadosamente desde el extremo positivo al negativo. Entonces la tira fue situada sobre el sarcófago, empezando por el extremo positivo y con el lado del gel hacia abajo, logrando una distribución uniforme de la muestra. Finalmente, la tira fue cubierta con aceite mineral y los distintos sarcófagos fueron situados sobre el Ettan IPGphor II (GE Healthcare) para llevar a cabo el protocolo de isoelectroenfoque (Tabla 11).

Tabla 11. Protocolo de isoelectroenfoque.

Paso	Voltaje (V)	Tiempo
1	30 V	14 horas
2	500 V	250 V/hora
3	1000 V	500 V/hora
4	5000 V	8500 V/hora
5	5000 V	30 minutos

5.3. Equilibrado.

Después del protocolo de isoelectroenfoque, antes de la separación proteica mediante SDS-PAGE, las tiras IPG enfocadas fueron sometidas a un procedimiento de equilibración en un buffer apropiado. La solución de equilibrado fue preparada con urea a 6 M, Tris-HCl (pH 8.8) a 75 mM, 29.3% de glicerol, 2% de SDS y 0.002% de azul de bromofenol en agua Milli-Q.

La equilibración se inició con la incubación de las tiras en 5ml de solución de equilibrado suplementada con DTT (100mg por 10 ml de solución), llevando a cabo 2 repeticiones de 7.5 minutos, para romper los puentes disulfuro. Posteriormente, se prosiguió con la incubación de las tiras en 5 ml de solución de equilibrado suplementada con iodacetamida (Bio-Rad) (250 mg por 10 ml de solución de equilibrado), durante 7.5 minutos y repitiendo dos veces, con el fin de prevenir la reformación de los puentes disulfuro. Una vez finalizada la equilibración, las tiras fueron sumergidas durante unos

minutos en buffer de carrera Tris/Glycinie/SDS (Bio-Rad) 1x, con el fin de mantener la lubricación hasta su uso en la segunda dimensión.

5.4. 2D-PAGE.

La segunda dimensión fue llevada a cabo en geles Criterion™ TGX-stain free de 8-16% de acrilamida (Bio-Rad). Inicialmente fue preparada una solución de agarosa de bajo punto de fusión (USB corporation) al 0.5% en buffer de carrera, a la que fueron añadidas cantidades traza de azul de bromofenol. Una vez calentada, la solución fue depositada en la parte superior del gel de acrilamida. A continuación, la correspondiente tira IPG equilibrada y lubricada, fue depositada sobre la agarosa con el soporte plástico hacia adentro. Entonces, con ayuda de pinzas de punta plana, la tira fue bajada suavemente hasta quedar en total contacto con el gel de acrilamida. Finalmente, en el pocillo situado en el margen derecho del gel y destinado al marcador, fueron depositados 5 µl de 2D SDS-PAGE standard (Bio-Rad).

La electroforesis fue llevada a cabo en un Criterion Dodeca™ cell (Bio-Rad), la carrera se realizó a un voltaje de 30V durante 30 minutos, 90V durante 30 minutos y 120V hasta que el frente alcanzó el final del gel. Seis 2D-PAGES fueron llevadas a cabo simultáneamente, con las respectivas muestras tratadas (17-AAG, IPI-504, STA-9090, AUY-922 y 17-AAG + VER-155008) y control, de cada línea celular analizada.

5.5. Tinción del gel y obtención de la imagen.

Después de la segunda dimensión se llevó a cabo la tinción de los geles, para permitir la visualización de los *spots* y el subsiguiente análisis. Teniendo en cuenta que los *spots* proteicos, tras ser extraídos del gel SDS-PAGE, iban a ser sometidos a análisis por espectrometría de masas, se utilizó el método de tinción fluorescente con SYPRO® (Bio-Rad) compatible con este procedimiento. Previamente, los geles fueron fijados utilizando un buffer de pre-tinción (10% de etanol y 7% de ácido acético glacial en agua) durante un mínimo de una hora. Transcurrido este tiempo, la solución fue eliminada y la tinción se llevó a cabo incubando con SYPRO toda la noche en oscuridad. Una vez retirada la tinción se prosiguió con la incubación de los geles, durante 30 minutos en oscuridad, con la solución de post-tinción (10% de etanol y 7% de ácido acético glacial en agua). Los geles fueron

entonces lavados con agua durante 10 minutos en oscuridad y revelados en el escáner de fluorescencia Typhoon 9400 (GE Healthcare) con el fin de adquirir las imágenes digitalizadas. Finalmente los geles fueron preservados, hasta su posterior uso, en una solución al 2% de ácido acético glacial.

5.6. Análisis de la imagen del gel.

El procesamiento de las imágenes 2D-PAGE a través de la detección, emparejamiento y edición de los *spots*, así como los análisis cuantitativos y cualitativos de los mismos, fueron llevados a cabo usando el software PD-Quest (Bio-Rad). Las imágenes de los 6 geles, correspondientes a los 5 tratamientos y el control de una determinada línea celular, fueron visualizadas conjuntamente en el programa. En primer lugar, se sometieron a evaluación de la calidad con la finalidad de corregir posibles errores posicionales en la imagen. A continuación, éstas fueron alineadas para permitir el emparejamiento de los *spots* proteicos. Una vez que el emparejamiento computarizado fue llevado a cabo, los *spots* detectados fueron manualmente editados para una mayor precisión. Posteriormente, se realizaron los análisis cualitativos y cuantitativos de los *spots*, atendiendo a las diferencias de abundancia de los mismos. Los *spots* que estuvieran presentes en solo una condición o aquellos que presentaran cambios cuantitativos, de al menos dos veces, fueron los seleccionadas para su identificación mediante espectrometría de masas.

5.7. Espectrometría de masas post electroforesis 2-D.

5.7.1. Preparación de la muestra y análisis.

En primer lugar, se procedió a escindir los *spots* proteicos de interés del gel dónde fueron resueltos. Este proceso de extracción se llevó a cabo usando la estación automática de picado de geles ProPic (Genomic Solutions). El siguiente paso consistió en la digestión de las proteínas mediante tripsina (Progema) con el fin de generar un conjunto de péptidos que pasaron a ser analizados por espectrometría de masas.

Los péptidos resultantes de la digestión de proteínas se depositaron, muestra a muestra, sobre una placa MALDI (Applied Biosystems) junto con una matriz (α -ciano-4-hidroxicinámico). La estación Automática de Dispensación de Proteínas sobre Placa MALDI (Genomic Solutions) fue usada para tal fin y a continuación se permitió la cocrystalización

muestra-matriz a temperatura ambiente. Entonces la placa fue situada en el espectrómetro de masas MALDI-TOF/TOF (4800 Proteomics Analyzer) (Applied Biosystems), para el análisis de las muestras depositadas.

En primer lugar la mezcla cristalizada fue irradiada, utilizando la fuente de ionización MALDI (desorción/ionización láser asistida por matriz). Los cristales fueron golpeados con el láser, absorbiendo la matriz la energía, permitiendo la ionización de la muestra. Los iones creados, fueron acelerados por medio de un campo eléctrico y pasaron a través del tubo de vuelo del analizador de masas TOF (tiempo de vuelo) finalizando con su impacto en el detector. Posteriormente, en el analizador de masas TOF se midió el tiempo de vuelo de los iones. Siendo el tiempo total de vuelo, de un ion viajando a través del sistema, una combinación del tiempo de vuelo pasado en la fuente de iones y el pasado en el tubo antes de golpear el detector. Las moléculas más pequeñas viajan más rápidamente y alcanzan el detector antes que los iones más grandes. Para este estudio se utilizó concretamente un analizador TOF/TOF que proporciona un mejor enfoque de los iones ya que en un primer TOF los iones fueron acelerados a bajo voltaje, favoreciendo la fragmentación metaestable. Posteriormente, se seleccionaron un determinado ion padre y sus iones fragmento, los cuales fueron acelerados a un potencial mayor, separándose en el segundo TOF. Finalmente cuando el detector es golpeado por los iones, el espectro fue registrado como la relación masa/carga (m/z) de los iones y sus intensidades relativas. El espectro de masas obtenido (MS) es denominado “Huella Peptídica”. Adicionalmente, se obtienen espectros de fragmentación (MS/MS) de las 3-5 masas mayoritarias dentro de cada una de las huellas peptídicas.

5.7.2. Identificación de proteínas mediante Huella Peptídica.

Se utilizó el sistema GPS (del inglés, *Global Protein Service*) acoplado a los datos del TOF-TOF para realizar la identificación automática de proteínas. Con tal fin se usó la combinación de ambos tipos de espectros (MS-MS/MS) obtenidos para cada muestra y fue empleado el motor de búsqueda MASCOT (MatrixScience), con una tolerancia de masa sobre las 50 partes por millón, sobre bases de datos públicas de secuencias de proteínas, concretamente Swiss-prot. A partir de estos resultados se creó una base de datos en la que se asoció cada *spot* con la correspondiente proteína identificada. Se emplearon, como criterios de aceptación de la identificación proteica, el número de péptidos macheados, el porcentaje de cobertura en la comparación de secuencias, la masa molecular y el punto

Materiales y métodos

isoelectrico, entre otras variables. Además, tanto el peso molecular como el punto isoelectrico de cada proteína identificada fueron verificados a través de la localización del *spot* original en el gel 2D-PAGE mediante el software PD-QUEST.

Una representación gráfica del análisis proteómico mediante 2D-PAGE y espectrometría de masas, empleado en este estudio puede ser encontrado en la Figura 8.

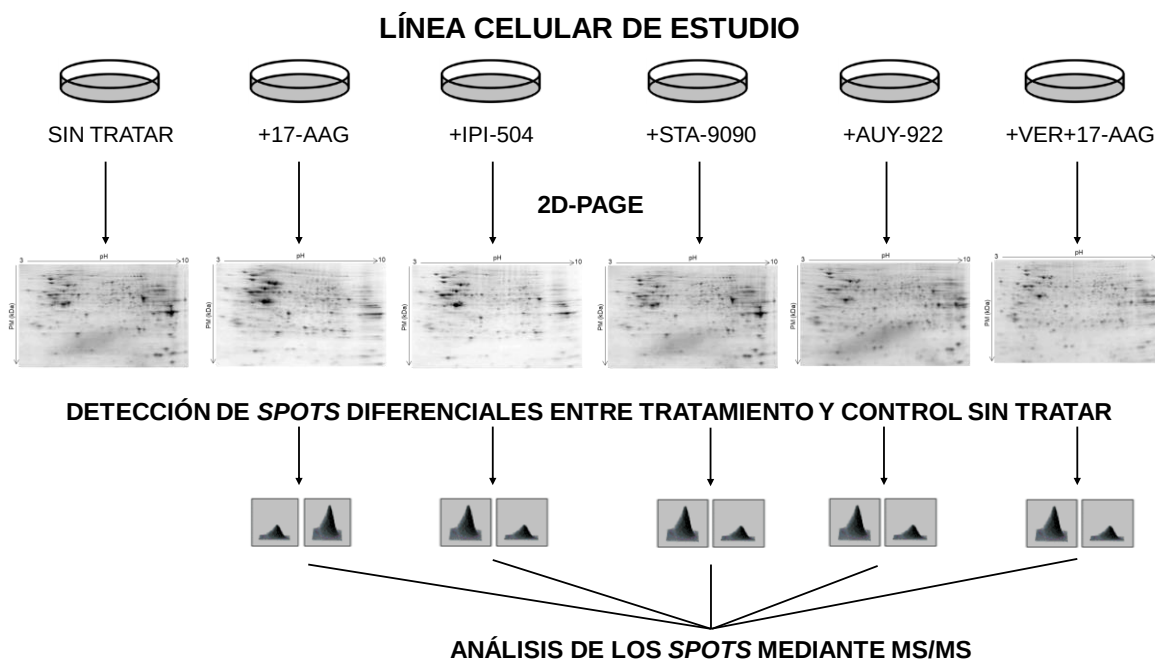


Figura 8. Flujo de trabajo empleado en la metodología de electroforesis bidimensional. 240 μ g de proteínas provenientes de las diferentes condiciones a analizar, para cada una de las 4 líneas celulares de estudio, fueron sometidas a 2D-PAGE. Los gels resultantes fueron computarizados y analizados para llevar a cabo la detección de los spots con abundancia diferencial entre los diferentes tratamientos y el control sin tratar. Finalmente las proteínas correspondientes con cada uno de los spots seleccionados fueron identificadas mediante espectrometría de masas.

6. iTRAQ

6.1. Preparación de la muestra.

Los pellets proteicos fueron resuspendidos en un buffer de lisis, el cual estaba compuesto por TEAB (Tampón de Bicarbonato de Trietilamonio) (Sigma-Aldrich) 1 M, SDS al 0.05%, cóctel de inhibidor de fosfatasa (PhosSTOP EASYpack, Roche) 1:100, cóctel de inhibidor de proteasas (cOmplete™ Mini EDTA-free, Roche) 1:100, y benzonasa al 0.002% (Novagen) en agua. Inicialmente los pellets fueron agitados en vórtex hasta su disolución. A continuación, los lisados se mantuvieron en hielo durante 1 hora y fueron agitados cada diez minutos hasta la completa disociación del pellet. Posteriormente, para eliminar las

partículas no proteicas, fueron centrifugados en frío a 14000 rpm durante 15 minutos. El sobrenadante fue aislado y se procedió a la cuantificación proteica mediante fluorimetría (Qubit, Life Technologies). Finalmente, se realizaron alícuotas con 100 µg de proteínas y se almacenaron a -80°C hasta su uso.

6.2. Digestión de la muestra.

Se llevó a cabo la digestión enzimática de 100 µg de proteínas, de cada condición a ser analizada (células sin tratar y tratadas con 17-AAG, IPI-504, STA-9090, AUY-922, VER-155008, 17-AAG+VER-155008 y siRNA HSP90α+siRNA HSP90β) en el panel completo de líneas celulares usado en el presente estudio (Tabla 1). En primer lugar se adicionó a cada una de las muestras TCEP (tris-(2-carboxietil) fosfina, AB Sciex) a una concentración final de 50 mM y estas fueron calentadas a 60°C en agitación durante 1 hora, con el fin de reducir los puentes disulfuro de las proteínas. En segundo lugar se alquilaron las proteínas, para tal fin se añadió MMTS (metilo metanotiosulfonato, AB Sciex) a una concentración final de 200 mM, incubándose a temperatura ambiente durante 30 minutos. Posteriormente se procedió a la digestión enzimática, con el fin de obtener los péptidos proteicos a analizar, mediante el uso de tripsina porcina (Promega) en una ratio 10:1 e incubando a 37°C en agitación suave toda la noche. Por último, los péptidos fueron secados mediante el uso de una centrifuga concentradora de vacío.

6.3. Marcaje Isobárico.

Para el análisis semi-cuantitativo de las muestras a analizar se utilizó marcaje isobárico iTRAQ 8 plex (AB Sciex). Los péptidos procedentes de cada una de las muestras fueron reconstituidos en 20 µl de TEAB 1M, para posteriormente ser marcados con la correspondiente etiqueta de iTRAQ (113, 114, 115, 116, 117, 118, 119 y 121), incubando durante 2 horas a temperatura ambiente. A continuación, todas las muestras correspondientemente marcadas fueron unidas en un único tubo y desecadas a 45°C mediante una centrifuga concentradora de vacío. Por último, las muestras se mantuvieron a 4°C durante toda la noche.

6.4. Limpieza y pre-fraccionamiento de las proteínas.

Inicialmente se procedió a la limpieza de la muestra mediante el uso de cartuchos Oasis HLB C18 (Waters). A continuación se usaron las columnas MCX Oasis (Waters) para realizar el pre-fraccionamiento mediante intercambio catiónico, utilizando disoluciones crecientes de formiato de amonio 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800 y 900 mM y 1, 1.5 y 2 M, obteniendo así un total de 13 fracciones, las cuales a continuación fueron individualmente limpiadas con cartuchos Oasis HLB C18 (Waters).

6.5. Análisis LC-MS/MS para iTRAQ de 8 plex.

Los péptidos de cada una de las fracciones fueron separados utilizando nanocromatografía líquida y analizados por Electrospray (nano LC-MS/MS). El experimento se llevó a cabo en un sistema nano HPLC de Thermo (nano LC 1000) acoplado on-line a un espectrómetro de masas Q Exactive Plus Orbitrap (Thermo Electron) equipado con una fuente de ionización nanospray (Proxeon Biosystems). En primer lugar se cargaron 13 µl de cada fracción, a continuación los péptidos fueron pre-concentrados y lavados en una pre-columna Acclaim PepMap (75 µm x 2 cm, nanoViper, C18, 3 µm, 100 Å) (Thermo Fisher Scientific). Posteriormente fueron separados, en una columna analítica (50 µm x 15 cm, nanoViper, C18, 2 µm, 100 Å (Acclaim PepMap RSLC)) (Thermo Fisher Scientific), durante 240 minutos a una velocidad de flujo de 200 nl/min.

Se utilizaron, la solución A (0.1% de ácido fórmico en H₂O al 100%) y la solución B (0.1% de fórmico en ACN (acetonitrilo) al 100%) en calidad LC/MS. El gradiente utilizado fue el siguiente: 0-220 min 0-35% de solución B, 220-230 min 35- 45% de solución B y 230-240 min 45-95% de solución B. El Q Exactive Plus Orbitrap operó en modo de ionización positivo y detección de datos dependiente de la adquisición. Se realizó el barrido MS en el Orbitrap entre 200 y 1800 *m/z* con una resolución de 70000 FWHM para un *m/z* igual a 100. Se seleccionaron hasta 15 precursores de los más intensos, con carga mayor o igual a 2, y se incorporaron en una lista de exclusión. La identificación y cuantificación de péptidos se realizó teniendo en cuenta los espectros HCD. Esta fragmentación HCD se llevó a cabo con energía de colisión del 32% para maximizar la abundancia de los iones reporteros o etiquetados de iTRAQ.

6.6. Identificación y cuantificación relativa de proteínas.

La identificación de proteínas se llevó a cabo de forma automática utilizando el motor de búsqueda Sequest HT y Percolator, ambos incluidos en el programa Proteome Discoverer 1.4 (Thermo Fisher Scientific). Los espectros de fragmentación MS/MS se enfrentaron contra la base de datos Uniprot con restricción taxonómica a *Homo sapiens*. Fueron utilizadas como modificaciones fijas: iTRAQ 8-plex peptide label (N-terminal) y iTRAQ 8-plex peptide label en lisinas; y como modificaciones variables: oxidación en metioninas y carboxiamidometilación de cisteínas.

Posteriormente se realizó la cuantificación relativa, para cada reportero o etiqueta, en función de las áreas de los picos. Para ello se relacionó la variación en la cantidad de proteína, para las diferentes condiciones, con el ratio de las áreas de las etiquetas de los péptidos que las identifican. Fueron consideradas proteínas cuantificables aquellas que se identificaron con más de 2 péptidos únicos con un nivel de confianza mayor o igual al 95% y un ratio con un p valor menor o igual a 0,05 y un factor de error menor de 2 con cada una de las etiquetas elegidas como referencia.

Una representación gráfica del análisis proteómico mediante iTRAQ y espectrometría de masas emparejada a cromatografía líquida, empleado en este estudio puede ser encontrado en la Figura 9.

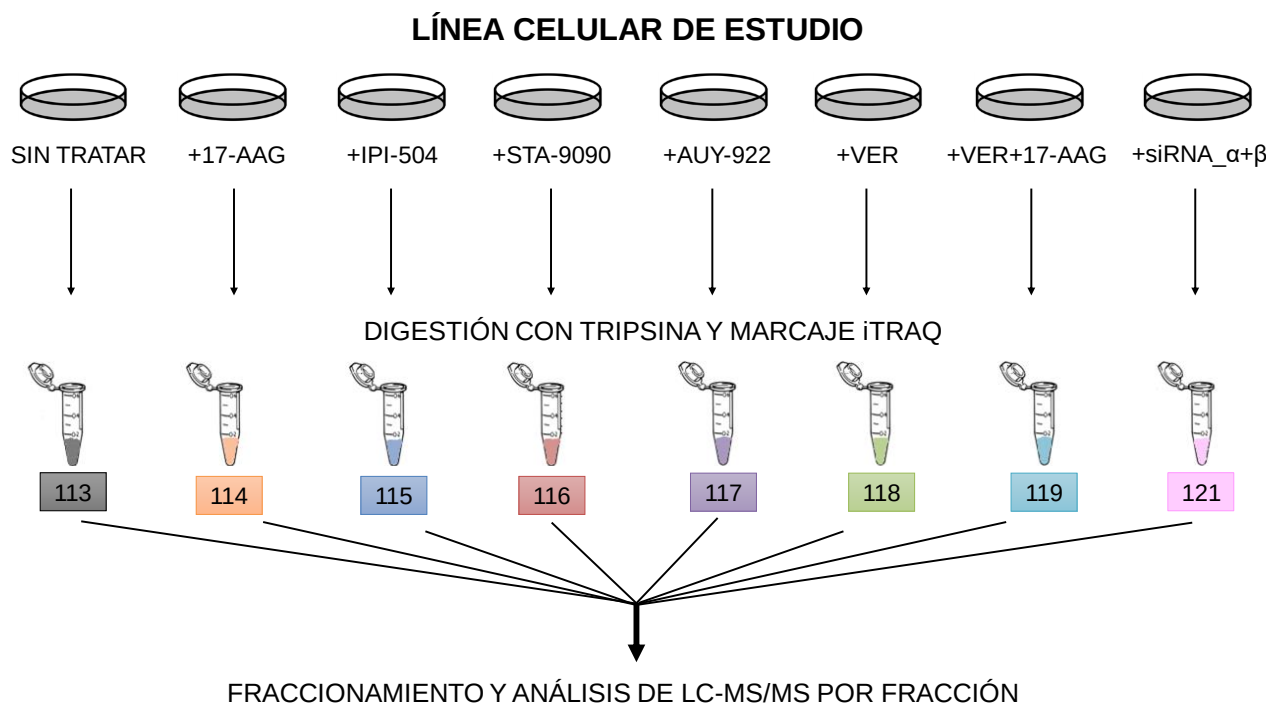


Figura 9. Diseño experimental seguido en el ensayo de iTRAQ. 100 µg de proteínas procedentes de de las diferentes condiciones a analizar, para cada línea celular de estudio, fueron digeridas con tripsina y marcadas con los reactivos de iTRAQ. Los péptidos marcados fueron combinados en un mismo vial y fraccionados por cromatografía de intercambio catiónico. Cada una de las trece fracciones obtenidas se analizó por LC-MS/MS y los datos se combinaron para hacer la correspondiente identificación y cuantificación proteica. VER= VER-155008; siRNA_α+β= silenciamiento génico de HSP90α y HSP90β.

7. Análisis bioinformático.

7.1. Análisis de los resultados obtenidos mediante electroforesis 2D-PAGE.

Las proteínas seleccionadas a partir de los experimentos de 2D-PAGE y posteriormente identificadas por espectrometría de masas fueron analizadas a través del recurso web Gene Ontology (GO) (<http://www.geneontology.org/>). Los resultados nos proporcionaron las funciones moleculares, procesos biológicos, componentes celulares y clase de las proteínas previamente seleccionadas.

En paralelo, PANTHER (del inglés, *Protein ANalysis THrough Evolutionary Relationships*) una base de datos online (<http://www.pantherdb.org/>) fue la herramienta usada para la clasificación de las proteínas alteradas. Este software fue utilizado para detectar las rutas relevantes, asociadas con las proteínas estudiadas, que están alteradas de manera significativa en nuestro conjunto de datos.

Solo aquellos resultados cuyo p-valor ajustado fue más bajo de 0,05 fueron considerados estadísticamente significativos e incluidos en el estudio.

7.2. Análisis de los resultados obtenidos a través de iTRAQ 8-plex.

Con el fin de analizar el proteoma diferencial tras la inhibición de HSP90, segundo objetivo del presente estudio, para cada una de las proteínas identificadas en las líneas de adenocarcinoma de pulmón se calcularon los ratios de expresión entre los diferentes tratamientos estudiados y el correspondiente control sin tratar. A continuación estos datos fueron transformados [$\log_2(x)$] y filtrados de manera que se incluyeran solo las proteínas en las que al menos un grupo de estudio contuviera más del 50% de valores válidos.

Posteriormente, los datos proteómicos fueron procesados/analizados usando el software PERSEUS (www.perseus-framework.org). Este programa permitió conocer la distribución global de los datos a través de histogramas, el cálculo de la media y desviación estándar de los mismos así como la visualización de los agrupamientos gracias al cluster jerárquico. Además, la herramienta one-sample t-test fue usada para realizar la búsqueda de proteínas diferencialmente expresadas en los distintos grupos de estudio. Los valores de p-valor fueron ajustados mediante el test de Benjamini-Hochberg para la corrección FDR (del inglés, *False Discovery Rate*) ($FDR < 0.05$) y visualizados a través de la creación de distintos gráficos volcano.

En paralelo y con la finalidad de buscar posibles biomarcadores predictivos de la eficacia de la inhibición de HSP90, tercer objetivo de la presente tesis doctoral, se analizó la correlación entre la abundancia e IC_{50} de aquellas proteínas identificadas que estuvieran relacionadas con sensibilidad y resistencia.

Para ello el primer paso fue el de calcular la abundancia proteica en las líneas celulares sin tratar, a partir de la suma de las intensidades de los péptidos identificados. A continuación se seleccionaron aquellas proteínas que fueron comunes entre las tres líneas más sensibles y resistentes a cada inhibidor de HSP90 estudiado. Para cada una de estas proteínas asociadas con una mayor sensibilidad o resistencia se analizó la correlación, mediante el coeficiente de Spearman, entre la abundancia basal y el valor de IC_{50} obtenido para cada inhibidor. Solo aquellas proteínas que presentaron una correlación estadísticamente significativa ($p\text{-valor} < 0,05$) fueron empleadas en los posteriores análisis.

Materiales y métodos

El paso final en ambos objetivos fue el empleo de las herramientas bioinformáticas anteriormente descritas, PANTHER y GO, para realizar la anotación funcional de las proteínas de interés. Finalmente, el recurso web STRING (del inglés, *Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/proteins*) (<https://string-db.org/>) fue la herramienta utilizada para construir las redes de interacciones proteína-proteína, tanto conocidas como previamente predichas, entre las proteínas de interés. Fueron considerados en el estudio aquellos resultados cuyo p-valor ajustado fuera menor de 0,05 y por tanto considerados estadísticamente significativos.

Resultados

1. Estudio del perfil proteómico asociado a la inhibición de HSP90 en el adenocarcinoma de pulmón.

La finalidad de este objetivo es estudiar el efecto de la inhibición de HSP90 en el adenocarcinoma de pulmón. Para ello, se han identificado *in vitro* las proteínas relacionadas con la respuesta a diferentes inhibidores de esta chaperona.

1.1. Caracterización de la expresión proteica de HSP90 y proteínas relacionadas en líneas celulares de adenocarcinoma de pulmón.

El estudio se inició con la selección de líneas celulares de adenocarcinoma de pulmón, las cuales fueron caracterizadas a través del análisis de la expresión proteica de las proteínas de interés para nuestro estudio: HSP90, otras HSPs relacionadas así como EGFR y EML4-ALK, proteínas clientes de HSP90 (Figura 10).

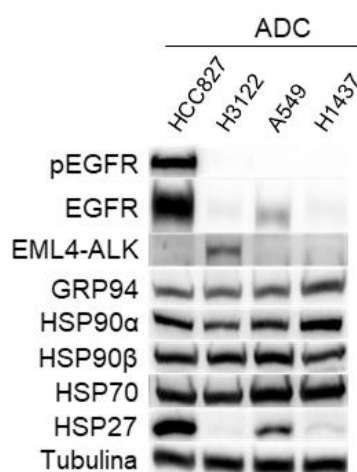


Figura 10. Caracterización de las líneas celulares de adenocarcinoma de pulmón (ADC) incluidas en este objetivo. Análisis de la expresión de EGFR, EGFR fosforilado (pEGFR), GRP94, HSP90α, HSP90β, HSP70 y HSP27 mediante la técnica de Western Blot. Cada experimento se realizó por triplicado. La figura corresponde a una muestra representativa de las réplicas.

La línea celular HCC827, con mutación en EGFR (EGFR m+), presentó una alta expresión de este receptor, el cual estaba también expresado en la línea A549 con mutación en KRAS (KRAS m+). Sin embargo, solo la línea con mutación en EGFR presentó activación del receptor, identificada a través de los niveles de fosforilación del mismo (pEGFR). Por su parte, la presencia de la proteína de fusión EML4-ALK fue detectada exclusivamente en la línea celular H3122, portadora de la translocación correspondiente

(ALK t+). Centrándonos en las HSPs, los niveles proteicos de HSP90 α y HSP90 β (las HSP90 citosólicas) fueron similares para todas las líneas de estudio con la excepción de H1437. Esta línea triple negativa (*EGFR*, *ALK* y *KRAS* silvestre) (TN) presentó niveles más altos de HSP90 α y más bajos de HSP90 β que el resto de líneas celulares analizadas. Lo mismo ocurrió con GRP94 (la HSP90 del retículo endoplásmico), de la que se detectó un mayor nivel de expresión en la línea H1437. Con respecto a HSP70 se detectó una expresión proteica similar en todas las líneas celulares de estudio. Por el contrario, encontramos niveles realmente diferenciales de la proteína HSP27; una alta expresión en las líneas HCC827 y A549, y prácticamente indetectable en las restantes líneas celulares de estudio.

1.2. Efectividad de los inhibidores de HSP90 en las líneas celulares de adenocarcinoma de pulmón.

Para analizar la sensibilidad a los inhibidores de HSPs, las células fueron tratadas con un rango de concentraciones de diferentes inhibidores de HSP90 (17-AAG, IPI-504, STA-9090 y AUY-922) o bien del inhibidor de HSP70 VER-155008. A partir de los resultados obtenidos, se calcularon los valores de concentración inhibitoria 50 (IC₅₀) para cada fármaco en cada línea celular (Tabla 12).

Las líneas celulares estudiadas, especialmente la línea H3122, fueron más sensibles a los inhibidores de HSP90 que a los de HSP70 puesto que sus valores de IC₅₀ oscilaban en el rango de nanomolar (nM) y micromolar (μ M), respectivamente. Centrándonos en la inhibición de HSP90, los valores IC₅₀ fluctuaron de 2,814 a 30,733 μ M. Debe ser subrayado que los valores más bajos, y por tanto la mayor sensibilidad, principalmente en las líneas HCC827 y H3122, se detectaron frente a los inhibidores de HSP90 derivados de radicicol (STA-9090 y AUY-922).

Tabla 12. Valores IC₅₀ de los diferentes inhibidores de HSP90 y HSP70 en las líneas celulares de adenocarcinoma de pulmón.

Línea Celular	Inhibidores de HSP90				Inhibidor de HSP70	Alteración Molecular
	Derivado de geldanamicina		Derivado de radicicol			
	IC ₅₀	IC ₅₀	IC ₅₀	IC ₅₀	IC ₅₀	
	17-AAG	IPI-504	STA-9090	AUY-922	VER-155008	
	nM	nM	nM	nM	μM	
HCC827	26,255	17,145	5,138	4,167	2,081	Mutación en EGFR
H3122	26,165	28,371	7,991	9,110	33,898	Translocación EML4-ALK
A549	16,296	19,492	6,310	30,733	24,487	Mutación en KRAS
H1437	3,708	3,473	6,794	2,814	24,811	EGFR, ALK y KRAS wt

IC₅₀= concentración inhibitoria media; nM= nanomolar; μM= micromolar; wt= silvestre

Posteriormente la respuesta a la inhibición de HSP90, considerando el valor IC₈₀ de los respectivos inhibidores, fue evaluada en diferentes tiempos de tratamiento (Figura 11).

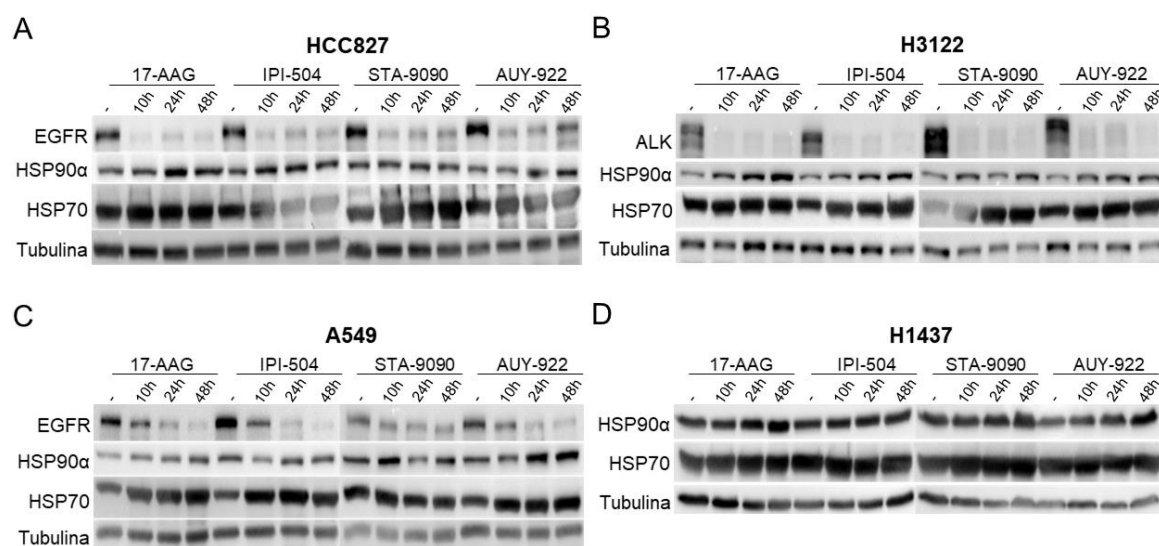


Figura 11. Análisis de la sensibilidad a los inhibidores de HSP90 en las líneas celulares de adenocarcinoma de pulmón. Determinación de los efectos del tratamiento con 17-AAG, IPI-504, STA-9090 y AUY-922 en las líneas celulares de adenocarcinoma de pulmón presentando (A) mutación en EGFR, (B) translocación EML4-ALK, (C) mutación en KRAS y (D) EGFR, ALK y KRAS silvestre. En cada una de las líneas celulares se analizó la expresión de HSP90α y HSP70 así como de las proteínas clientes EGFR y EML4-ALK. Los ensayos se realizaron por triplicado y la imagen corresponde a la de una réplica representativa.

Resultados

Se identificó la inducción de una expresión compensatoria, tanto de la propia chaperona HSP90 como de HSP70, confirmando la correcta inhibición de HSP90. A su vez, se constató una reducción significativa de la expresión de EGFR y EML4-ALK, proteínas clientes de HSP90, a partir de las 10h de exposición a cualquiera de los tratamientos analizados en este estudio. La degradación de EGFR fue más rápida y notable en la línea celular HCC827, cuyo conductor oncogénico es este receptor mutado, que la detectada en la línea A549. Finalmente cabe señalar que la inhibición de HSP90 en la línea H3122 provocó la degradación total durante las 48 horas del ensayo, de su conductor oncogénico y cliente de HSP90 EML4-ALK.

1.3. Perfil proteico asociado a la respuesta a la inhibición de HSP90.

Para identificar las proteínas relacionadas con la inhibición de HSP90, se analizaron mediante electroforesis bidimensional el proteoma de cada línea celular tratada con los respectivos inhibidores de HSP90, la combinación inhibitoria de HSP90 (17-AAG) y HSP70 (VER-155008) o el vehículo del tratamiento (condición control). Para eliminar la variación entre geles, tanto el isoelectroenfoco como la segunda dimensión de todas las condiciones de cada línea celular, fueron llevadas a cabo simultáneamente en un único ensayo. Tras la visualización y análisis de las imágenes resultantes, se identificaron patrones proteómicos altamente diferenciales entre los grupos tratados y control en cada línea celular analizada (Figuras 12-16).

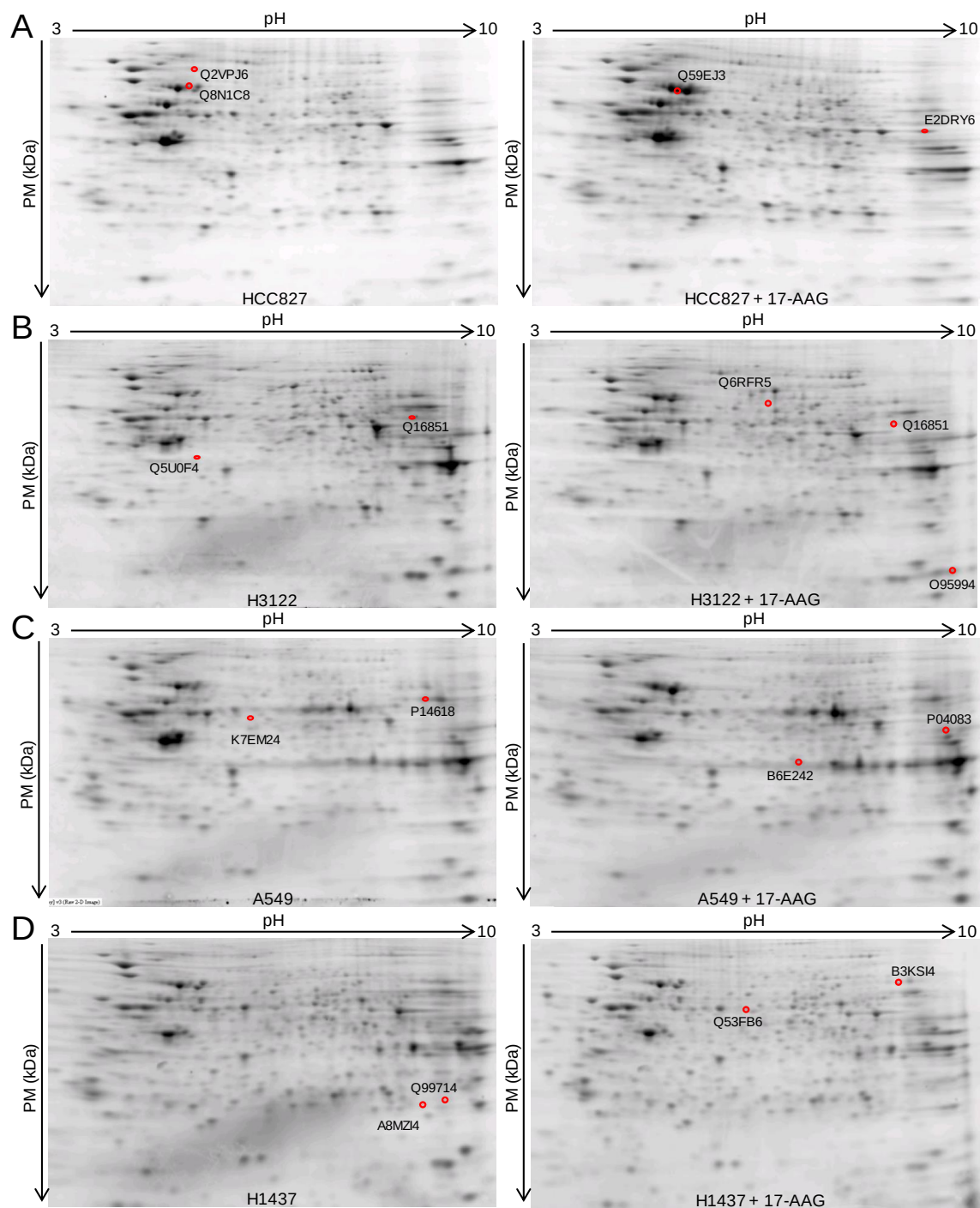


Figura 12. Gel 2-DE representativo de las líneas celulares (A) HCC827, (B) H3122, (C) A549 y (D) H1437 en la condición control o tratadas con el inhibidor de HSP90 17AAG. Para cada línea celular, los dos spots más sobreexpresados e infraexpresados son marcados con círculos rojos. La identificación proteica de los spots, a través de su número de acceso UniProt, puede ser encontrada en las Tablas A1-A4 del Anexo 1.

Resultados

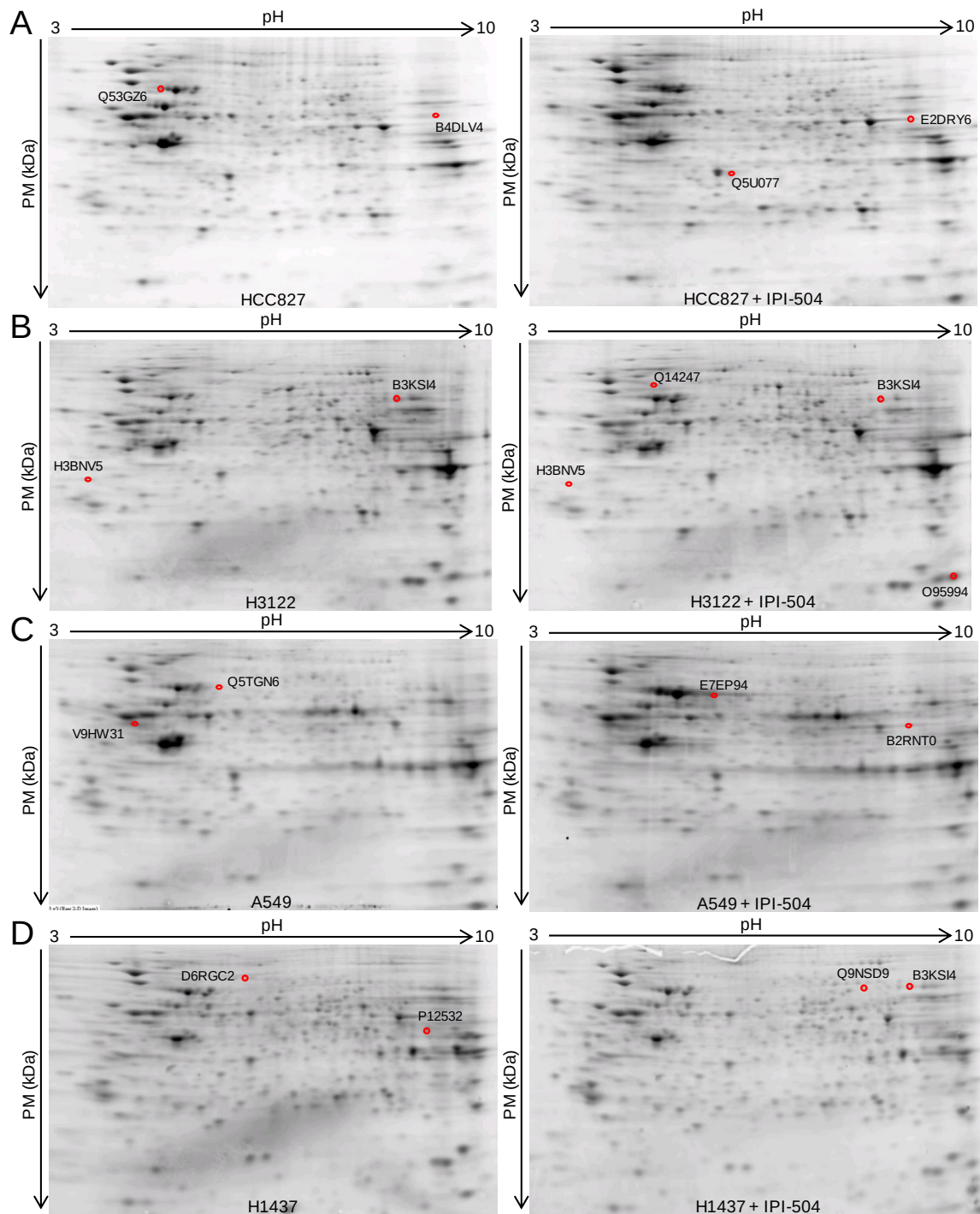


Figura 13. Gel 2-DE representativo de las líneas celulares (A) HCC827, (B) H3122, (C) A549 y (D) H1437 en la condición control o tratadas con el inhibidor de HSP90 IPI-504. Para cada línea celular, los dos spots más sobreexpresados e infraexpresados son marcados con círculos rojos. La identificación proteica de los spots, a través de su número de acceso UniProt, puede ser encontrada en las Tablas A5-A8 del Anexo 1.

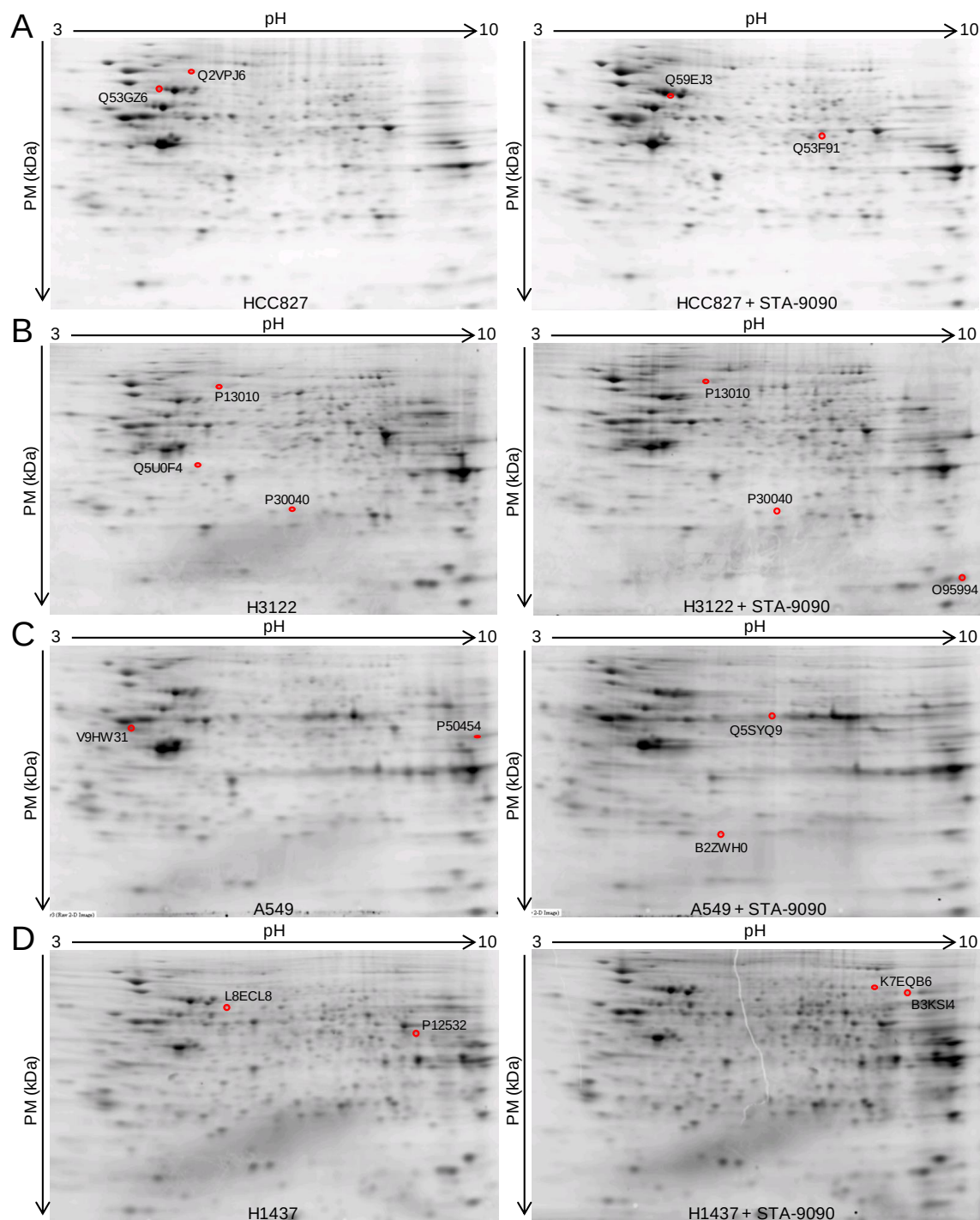


Figura 14. Gel 2-DE representativo de las líneas celulares (A) HCC827, (B) H3122, (C) A549 y (D) H1437 en la condición control o tratadas con el inhibidor de HSP90 STA-9090. Para cada línea celular, los dos spots más sobreexpresados e infraexpresados son marcados con círculos rojos. La identificación proteica de los spots, a través de su número de acceso UniProt, puede ser encontrada en las Tablas A9-A12 del Anexo 1.

Resultados

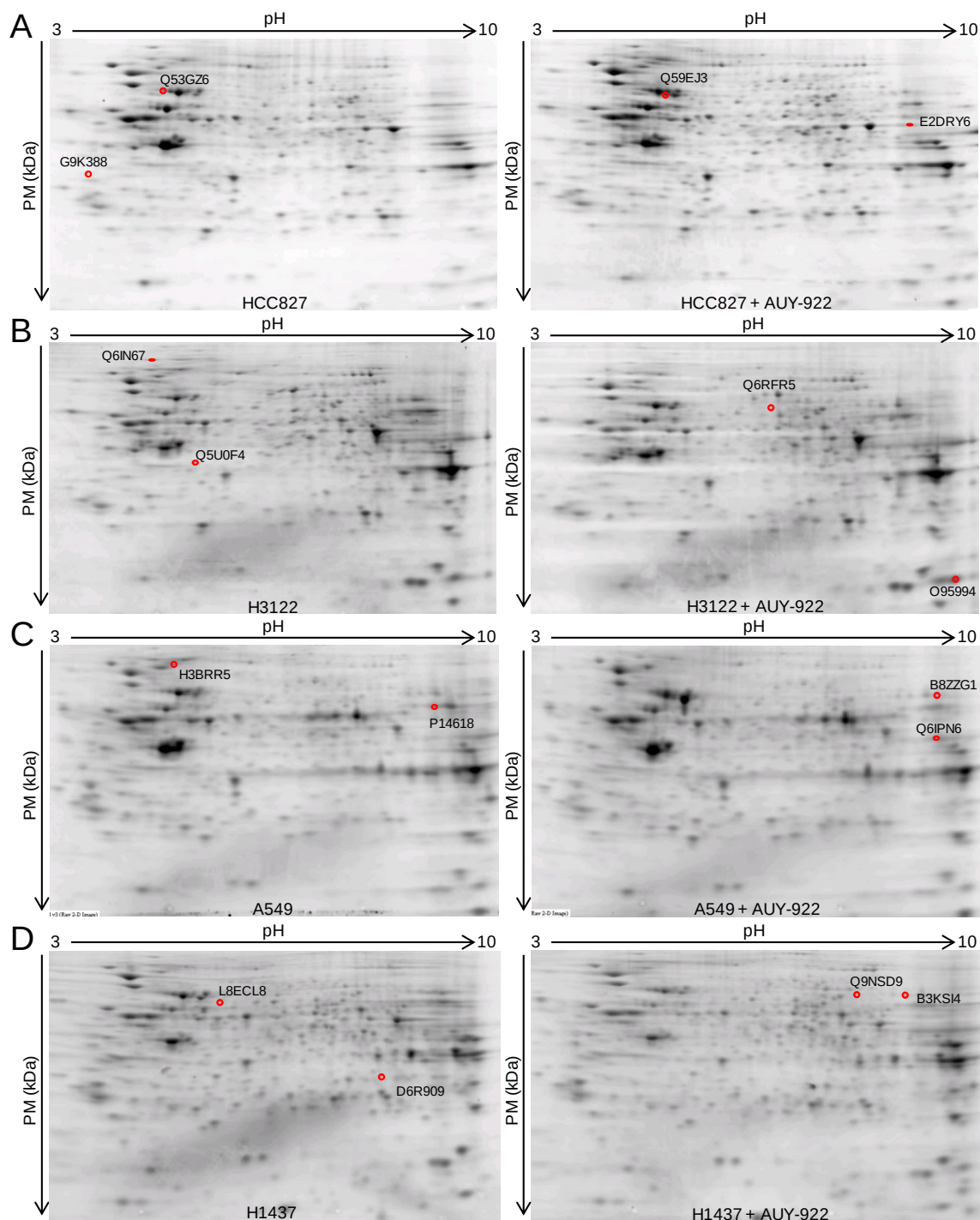


Figura 15. Gel 2-DE representativo de las líneas celulares (A) HCC827, (B) H3122, (C) A549 y (D) H1437 en la condición control o tratadas con el inhibidor de HSP90 AUY-922. Para cada línea celular, los dos spots más sobreexpresados e infraexpresados son marcados con círculos rojos. La identificación proteica de los spots, a través de su número de acceso UniProt, puede ser encontrada en las Tablas A13-A16 del Anexo 1.

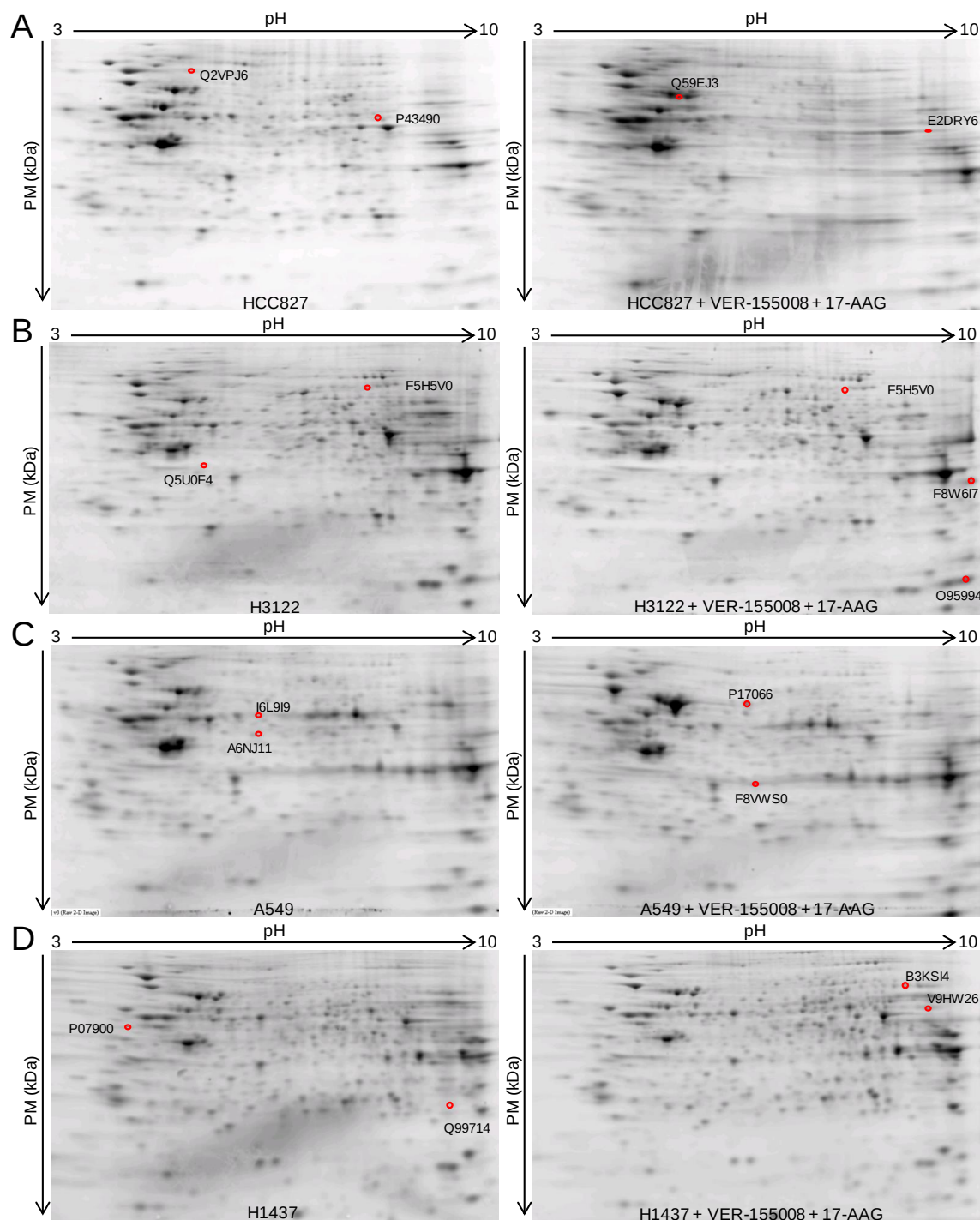


Figura 16. Gel 2-DE representativo de las líneas celulares (A) HCC827, (B) H3122, (C) A549 y (D) H1437 en la condición control o tratadas con la combinación del inhibidor de HSP70 VER-155008 más el inhibidor de HSP90 17-AAG. Para cada línea celular, los dos *spots* más sobreexpresados e infraexpresados son marcados con círculos rojos. La identificación proteica de los *spots*, a través de su número de acceso UniProt, puede ser encontrada en las Tablas A17-A20 del Anexo 1.

Resultados

Una media de 473, 201, 257 y 263 *spots* proteicos fueron detectados, cuantificados, normalizados y emparejados entre los distintos geles en las líneas HCC827, H3122, A549 y H1437, respectivamente (Tabla 13).

Tabla 13. Número de *spots* proteicos emparejados, en las líneas celulares de adenocarcinoma de pulmón, bajo las diferentes condiciones de estudio.

Condición	Línea Celular			
	HCC827 (EGFR m+)	H3122 (ALK t+)	A549 (KRAS m+)	H1437 (TN)
Control	492	199	263	253
17-AAG	488	200	259	264
IPI-504	480	202	266	262
STA-9090	499	200	235	265
AUY-922	507	197	259	261
VER+17AAG	374	209	257	275

EGFR m+= mutación en EGFR ; ALK t+= translocación EML4-ALK; KRAS m+= mutación en KRAS; TN= triple negativo (EGFR, ALK y KRAS silvestre)

Los *spots* proteicos incluidos en el análisis fueron aquellos con diferencias significativas ya sean cuantitativas, con una variación de expresión entre los tratamientos y control de al menos 2 veces, o cualitativas, presente solo en la condición control o en alguno de los tratamientos. Tras el análisis por espectrometría de masas se identificaron las proteínas correspondientes con cada uno de los *spots* diferenciales. EL total de proteínas diferencialmente expresadas, teniendo en consideración todas las condiciones y líneas celulares de estudio, se exponen en las Tablas A1-A20 del Anexo 1. En conjunto, se identificaron 254 proteínas relacionadas con la inhibición de HSP90, muchas de las cuales fueron coincidentes en distintos tratamientos o líneas celulares. La variación de expresión de estas proteínas, tras la inhibición de HSP90 o la combinación inhibitoria de HSP90 y HSP70, se resumen en la Tabla 14.

Analizando las proteínas diferencialmente expresadas, bajo el tratamiento con los diferentes inhibidores de HSP90, puede ser destacado que el derivado de radicicol STA-9090 fue el tratamiento que provocó una mayor desregulación proteica y el único que presentó un mayor número de proteínas infraexpresadas que sobreexpresadas.

Tabla 14. Número de proteínas diferencialmente expresadas, en los diferentes inhibidores con respecto a ausencia de tratamiento.

Tratamiento	Cambio de Expresión	Línea Celular			
		HCC827 (EGFR m+)	H3122 (ALK t+)	A549 (KRAS m+)	H1437 (TN)
17-AAG (GA)	+	23	4	9	10
	-	15	3	2	3
IPI-504 (GA)	+	26	3	11	18
	-	16	2	6	3
STA-9090 (RD)	+	25	14	6	9
	-	18	4	32	3
AUY-922 (RD)	+	23	5	6	9
	-	8	4	11	5
VER+17AAG	+	30	10	12	15
	-	61	6	15	3

GA= inhibidor de HSP90 análogo de geldanamicina; RD= inhibidor de HSP90 análogo de radicicol; + = sobreexpresión; - = infraexpresión; EGFR m+= mutación en EGFR ; ALK t+= translocación EML4-ALK; KRAS m+= mutación en KRAS; TN= triple negativo (EGFR, ALK y KRAS silvestre)

Por otro lado, el derivado de geldanamicina IPI-504 desencadenó, tras STA-9090, la segunda mayor desregulación proteica. Además, este inhibidor produjo el número más elevado de proteínas sobreexpresadas, debido principalmente a la respuesta de las líneas A549 y H1437. Finalmente, la inhibición combinada de HSP70 (VER-155008) y HSP90 (17-AAG) llevó a la desregulación de un mayor número de proteínas en comparación con los inhibidores de HSP90 estudiados. Bajo este tratamiento, en la línea celular HCC827 se identificó el mayor número de proteínas desreguladas, y fue en esta línea EGFR m+ así como en la KRAS m+ en las únicas donde se identificaron más proteínas infraexpresadas que sobreexpresadas.

El estudio de la inhibición con los derivados de geldanamicina, llevó a identificar 65 proteínas diferencialmente expresadas bajo el tratamiento con 17-AAG, 4 de las cuales se observaron desreguladas en varias de las líneas celulares estudiadas. EIF3SI fue infraexpresada en la línea HCC827 (EGFR m+) y en la H3122 (ALK t+). MHC-I fue detectado infraexpresado en HCC827 y sobreexpresado en la línea A549. También fueron identificados en las líneas celulares A549 y H1437 las proteínas transcetolasa y Rab-37. Transcetolasa fue sobreexpresada en ambas líneas celulares, sin embargo Rab-37, fue sobreexpresada tras la inhibición en A549 pero infraexpresada en H1437. En el caso del tratamiento con IPI-504, se identificaron 79 proteínas diferencialmente expresadas de las cuales 5 fueron desreguladas en más de una línea celular. HSP90 α fue infraexpresada en la

Resultados

línea HCC827 pero sobreexpresada en la línea H3122. Las variantes 1A y 1B de HSP70 se encontraron sobreexpresadas en las líneas HCC827 y A549. Transcetolasa fue detectada de nuevo, esta vez en tres líneas celulares diferentes, siendo su expresión disminuida en H3122 e incrementada en A549 y H1437. Finalmente, HSC71 (proteína de choque térmico constitutiva de 71 KDa) se encontró infraexpresada en HCC827 y a la inversa en H1437.

Respecto a los derivados de radicicol, la inhibición con STA-9090 llevó a identificar 107 proteínas con cambios en su expresión, incluyendo 4 desreguladas en más de una línea celular. HSP90 α y HSP60 mitocondrial, fueron infraexpresadas en HCC827 pero sobreexpresadas en H3122. Rab-37 fue identificada como infraexpresada en las líneas HCC827 y A549. Finalmente el complejo mayor de histocompatibilidad clase II (MHC-II), fue sobreexpresado en H3122 e infraexpresado en A549. Tras el tratamiento con AUY-922, fueron detectadas 69 proteínas diferencialmente expresadas. Solo dos proteínas fueron comunes en más de una línea celular; HSP70, sobreexpresada en HCC827 y A549, y transcetolasa, sobreexpresada en A549 y H1437.

Por último, la combinación de los inhibidores de HSP70 y HSP90 (VER-155008+17-AAG) dio lugar a la identificación de 143 proteínas diferencialmente expresadas, 9 de las cuales fueron desreguladas en dos líneas celulares. Seis proteínas fueron comunes a HCC827 y A549. El receptor del ácido retinoico RXR-beta, lipoamida aciltransferasa (subunidad E2) del complejo deshidrogenasa de alfa-cetoácidos de cadena ramificada y la proteína CSRP2 (proteína 2 rica en cisteína y glicina) fueron identificadas infraexpresadas y HSP70 sobreexpresada en ambas líneas. Proteína 1 que contiene los dominios SAM y SH3 fue sobreexpresada en HCC827 e infraexpresada en A549, por el contrario MHC-I se detectó infraexpresada en HCC827 y sobreexpresada en A549. Por otra parte, en las líneas celulares H3122 y A549 se identificó sobreexpresión de la proteína 6 de la familia HSP70 (HSPA6). La proteína ribosómica P0 de la subunidad 60S fue una de las proteínas que, bajo este tratamiento, más aumentó su expresión en las líneas A549 y H1437. Por su parte transcetolasa fue detectada sobreexpresada tras la inhibición combinada en las líneas HCC827 y H1437.

Finalmente, teniendo en consideración tanto las proteínas desreguladas bajo diferentes inhibidores de HSP90, como aquellas con mayores cambios de expresión tras la inhibición (Tablas A1-A20), de las 254 proteínas identificadas destacaron 9 proteínas (HSP70, HSP90 α , HSC71, EIF3SI, transcetolasa, Rab-37, citrato sintasa, AGR2 y MLH1) comúnmente alteradas, y por tanto, susceptibles de estar involucradas en la respuesta a la inhibición de HSP90.

1.4. Análisis funcional de las proteínas diferencialmente expresadas.

Las proteínas diferencialmente expresadas, tras el tratamiento con los diferentes inhibidores de HSPs, fueron analizadas usando la herramienta bioinformática PANTHER que permitió mapear las rutas biológicas en las que estaban implicadas (Figura 17).

Los resultados mostraron que las proteínas desreguladas bajo la inhibición de 17-AAG participaron en 9 rutas incluyendo la ruta de las pentosas fosfato (PPP), la única enriquecida en dos líneas celulares diferentes (A549 y H1437) (Figura 17A). En el caso del otro inhibidor derivado de geldanamicina, IPI-504, se encontraron 19 rutas enriquecidas incluyendo la ruta del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y la ruta de señalización de las interleuquinas (IL), las cuales fueron compartidas por la línea HCC827 y la H3122. Además, otras dos rutas fueron coincidentes, apoptosis en HCC827, A549 y H1437, así como PPP en H3122, A549 y H1437 (Figura 17B). Por otro lado, centrándonos en los derivados de radicicol, el set de proteínas asociadas con STA-9090 fueron asignadas a 16 rutas, 3 de las cuales fueron compartidas por diferentes líneas. La ruta de biosíntesis de serina y glicina fue detectada en las líneas HCC827 y H3122, la glucólisis fue desregulada en H3122 y A549, y la síntesis de ATP fue identificada en las líneas A549 y H1437 (Figura 17C). AUY-922 fue el inhibidor de HSP90 con más rutas compartidas, 6 de las 14 identificadas, entre las diferentes líneas de estudio. La biosíntesis de serina y glicina fue detectada de nuevo en las líneas HCC827 y H3122. La glucólisis fue enriquecida en las líneas celulares HCC827, A549 y H1437. Por su parte, la apoptosis se detectó desregulada en las líneas HCC827 y A549. Finalmente, A549 y H1437 mostraron un enriquecimiento en la síntesis de ATP, PPP y metabolismo del piruvato (Figura 17D).

Es destacable que el mayor número de rutas desreguladas, debido a cambios en la expresión proteica, se detectó tras la inhibición combinada de HSP70 y HSP90 (VER-155008+17-AAG). Cuatro de las 21 rutas fueron compartidas entre las líneas celulares de estudio. La glucólisis se encontró alterada en las líneas HCC827, H3122 y H1437. La biosíntesis de serina y glicina se detectó desregulada en las líneas HCC827 y A549, y la síntesis de ATP se encontró enriquecida en las líneas H3122 y H1437. Finalmente, se detectó desregulación de la degradación de 5-hidroxitriptamina (5-HT) en las líneas A549 y H1437 (Figura 17E).

Resultados

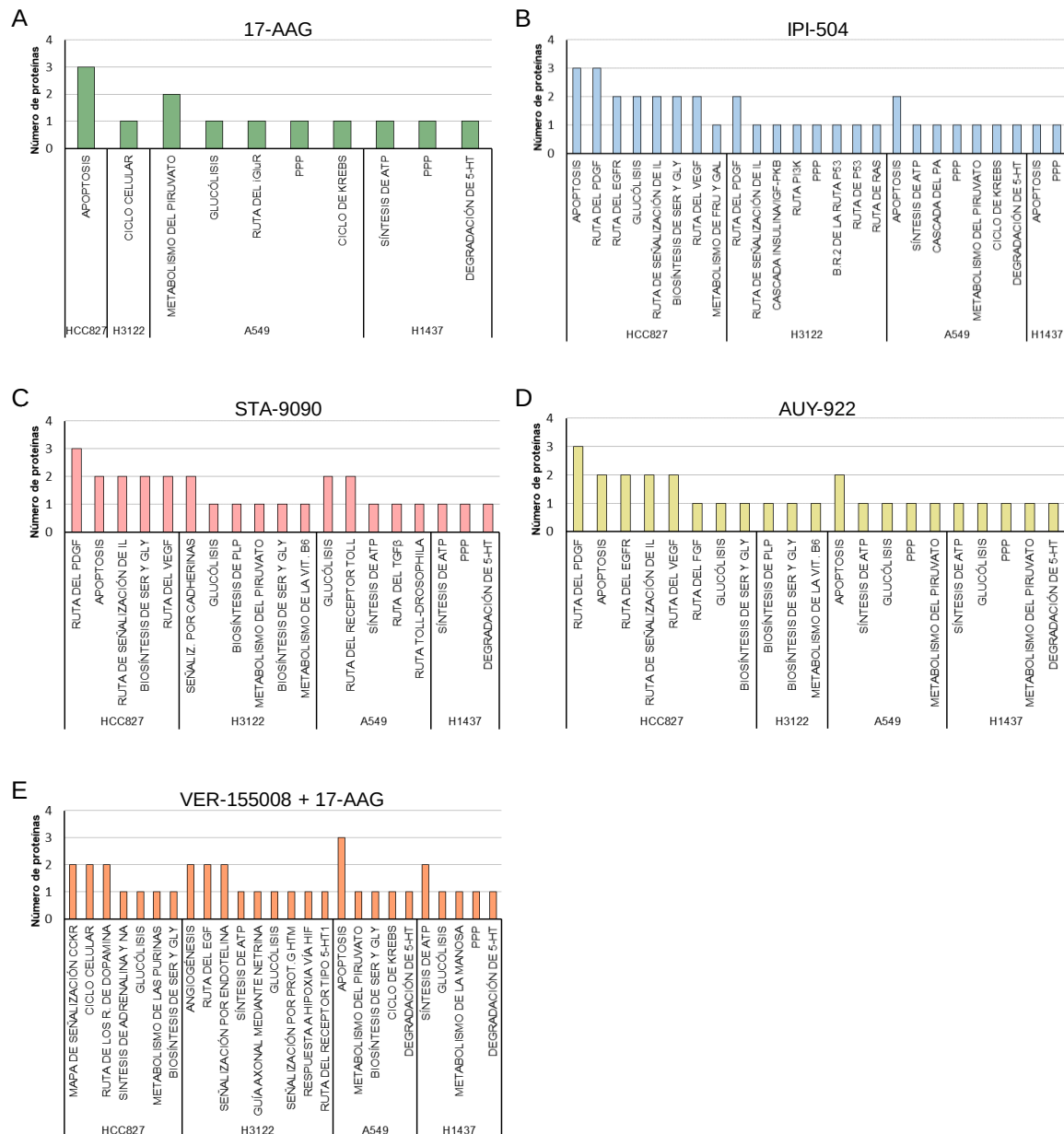


Figura 17. Rutas canónicas, identificadas mediante PANTHER, asociadas a la inhibición de HSP90. Análisis funcional de las proteínas diferencialmente expresadas en respuesta a los inhibidores (A) 17-AAG, (B) IPI-504, (C) STA-9090, (D) AUY-922 y (E) VER-155008+17-AAG en las líneas celulares de adenocarcinoma de pulmón. El número de proteínas envueltas en cada ruta identificada es representado en el eje X. iGluR= receptor ionotrópico de glutamato; PPP= Ruta de las pentosas fosfato; 5-HT= 5-hidroxitriptamina; PDGF= factor de crecimiento derivado de plaquetas; EGFR= receptor de factor de crecimiento epidérmico; IL= interleuquinas; Ser y Gly= serina y glicina; VEGF= factor de crecimiento endotelial vascular; Fru y Gal= fructosa y galactosa; PI3K= fosfatidilinositol 3 quinasa; B.R.2 de la ruta P53= Bucle de retroalimentación 2 de la ruta de P53; PA= activador del plasminógeno; PLP= piridoxal-5-fosfato; TGFβ= Factor de Crecimiento Transformante β; FGF= factor de crecimiento fibroblástico; Ruta de los r. de dopamina= Ruta de los receptores de dopamina; NA= noradrenalina; EGF= factor de crecimiento epidérmico; Señalización por prot.G htm= señalización por proteína G heterotrímica.

1.5. Perfiles de expresión proteica y rutas de señalización asociadas con las diferentes familias de inhibidores de HSP90 en las líneas de adenocarcinoma de pulmón.

La comparación de las proteínas identificadas con cada uno de los inhibidores de HSP90, pertenecientes a la misma familia, se realizó mediante diagramas de Venn (Figura 18).

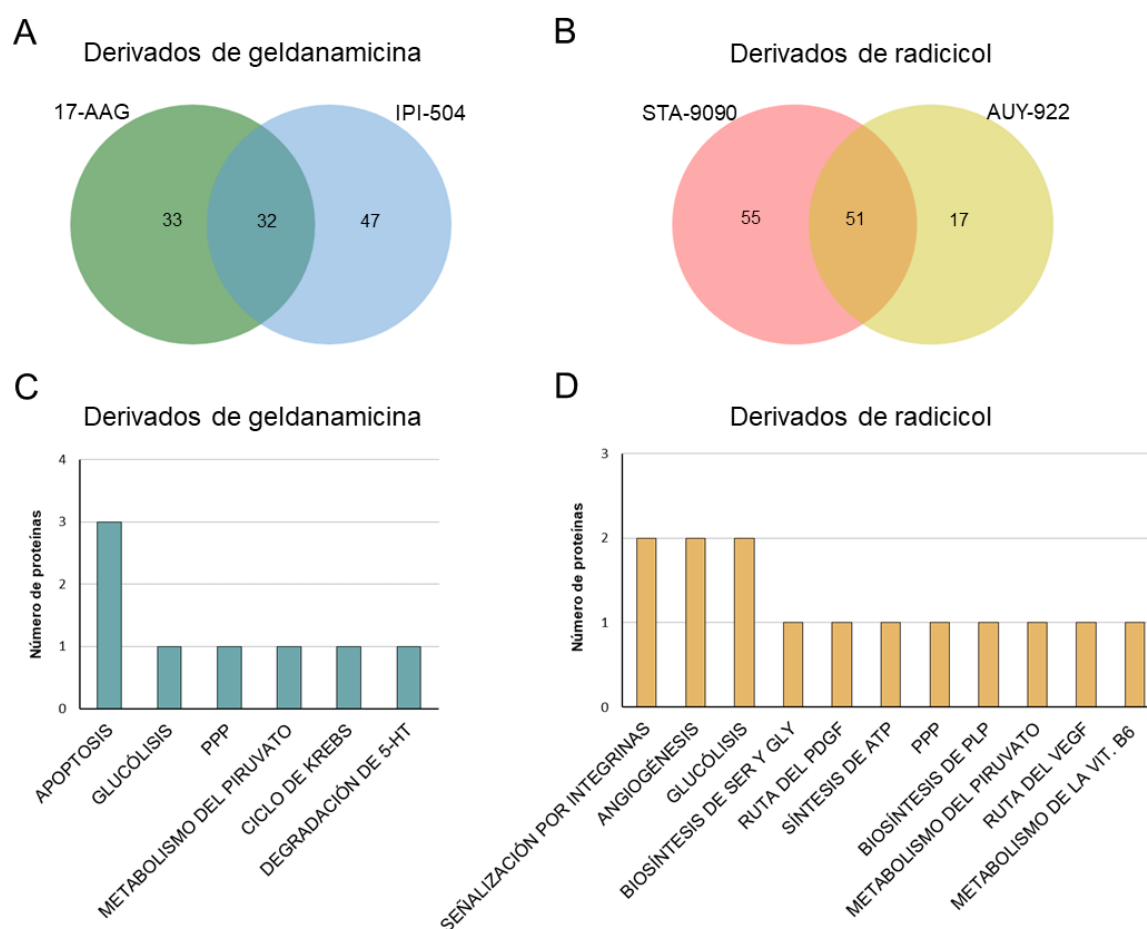


Figura 18. Estudio de la respuesta a los inhibidores de HSP90 agrupados por familia. Diagramas de Venn muestran las proteínas diferencialmente expresadas coincidentes entre los inhibidores de la misma familia así como las proteínas específicas tras el tratamiento con los distintos derivados de (A) geldanamicina o (B) radicicol. El análisis funcional de las proteínas comunes bajo los tratamientos con análogos de (C) geldanamicina o (D) radicicol, fueron llevados a cabo mediante PANTHER para determinar las rutas desreguladas bajo cada familia de inhibidor. Biosíntesis de Ser y Gly= Biosíntesis de serina y glicina; Ruta del PDGF (factor de crecimiento derivado de plaquetas); PPP= Ruta de las pentosas fosfato; Biosíntesis de PLP (piridoxal-5-fosfato); Ruta del VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular).

Resultados

Entre las proteínas desreguladas tras el tratamiento con derivados de geldanamicina, 32 proteínas (Tabla 15) fueron coincidentes en ambos inhibidores, mientras que 33 y 47 fueron específicas de 17-AAG e IPI-504, respectivamente (Figura 18A).

Tabla 15. Proteínas diferencialmente expresadas compartidas por los dos inhibidores de HSP90 derivados de geldanamicina.

Proteínas comunes a 17-AAG e IPI-504	
Nombre	Acceso UniProt
3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa tipo 2	Q99714
ADN ligasa 3	K7EQB6
AGR2	O95994
Aldehído deshidrogenasa mitocondrial, variante 2	Q53FB6
Anamorsina	H3BUG4
ATPasa transportadora de protones V0 subunidad α 1	K7EM24
Citrato sintasa	B3KTN4
Complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase 1 (HLA-A)	U5YBT9/B6E242
Enolasa	E2DRY6
Factor 2 de unión a secuencias de ADN rico en GC (C2ORF3 variante 2)	A4UHQ9
Factor de elongación 2	P13639
Factor intermediario transcripcional 1 β	M0R0K9
Fenilalanina ARNt ligasa subunidad β	Q9NSD9
Fosfolipasa A2- γ independiente de calcio	C9JAX4
HCG1771495, isoforma CRA_b	B2ZWH0
HSC71	E9PN89
HSP70 (variante 1A)	Q59EJ3
HSP70 (variante 1A/1B)	P08107/E7EP94
HSP90 α	Q2VPJ6
Inhibidor 1 de la señalización por quinasa SRC	Q9C0H9
MLH1	A8W2J9
Proteína 2G4 asociada a proliferación	Q9UQ80
Proteína adaptadora AP180	E5RK51
Proteína alternativa a EML5	L8EBH5
Proteína FAM210B	H0Y456
RRP12 (homólogo de la proteína 12 de procesamiento de ARN ribosómico)	F5H456
Serina/treonina fosfatasa 2A, isoforma γ subunidad regulatoria 56 kDa	H0YK25
SUMO3	A8MUA9
Transportador mitocondrial de tiamina pirofosfato	J3KTLO
Transcetolasa	B3KSI4
UDP-glucosa 6 deshidrogenasa	O60701
Vilina, variante 1	Q53F91

De las 32 proteínas comunes, 24 fueron sobreexpresadas bajo ambos tratamientos. Entre ellas podemos destacar HSP70, citrato sintasa, AGR2 (homólogo 2 de la proteína de gradiente anterior), MLH1 (homólogo 1 de MutL), enolasa o SUMO3 (proteína 3 modificadora de pequeño tamaño tipo ubiquitina). Solo cuatro proteínas, ATPasa transportadora de protones V0 subunidad α 1, anamorsina, fosfolipasa A2- γ independiente de calcio y 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa tipo 2 fueron infraexpresadas. Finalmente HSC71, MHC-1, HSP90 α y transcetolasa presentaron diferentes cambios de expresión dependiendo del inhibidor empleado.

El tratamiento con los derivados de radicicol dio lugar a la desregulación de un número relevante de proteínas. 55 de estas fueron únicamente alteradas tras el tratamiento con STA-9090, 17 fueron exclusivas del inhibidor AUY-922 (Figura 18B) y 51 proteínas fueron diferencialmente expresadas bajo ambos análogos de radicicol (Tabla 16). Entre las proteínas comunes 30 fueron sobreexpresadas bajo ambos tratamientos, destacando por la magnitud de los cambios de expresión, HSP70, AGR2, enolasa, radixina, vinculina o transcetolasa. Por otro lado, entre las 18 proteínas infraexpresadas se identificaron de nuevo la ATPasa transportadora de protones V0 subunidad α 1, fosfolipasa A2- γ independiente de calcio y 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa tipo 2, además de otras como HSC71, EIF3SI y SUMO3. Solo cuatro proteínas: MHC-I, HSP90 α , piruvato quinasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, mostraron una expresión diferencial, sobreexpresión o infraexpresión, según el análogo de radicicol empleado.

Tabla 16. Proteínas diferencialmente expresadas compartidas por los dos inhibidores de HSP90 derivados de radicicol.

Proteínas comunes a STA-9090 y AUY-922	
Nombre	Acceso UniProt
3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa tipo 2	Q99714
Acil-coenzima A tioesterasa 8	E9PJN0
Adenosina desaminasa específica de ARN, isoforma CRA_b	D3DV75
ADN ligasa 3	K7EQB6
AGR2	O95994
Aldehído deshidrogenasa mitocondrial, variante 2	Q53FB6
ATP sintasa, subunidad β	V9HW31
ATPasa transportadora de protones V0 subunidad α 1	K7EM24
B-Raf	Q9NY11
CCDC90B (proteína 90B que contiene el dominio helicoide enrollado)	J3KN19
Complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase 1	U5YBT9/B6E242

Resultados

E3 ubiquitina ligasa ZNRF2	H3BRR5
Enolasa	E2DRY6/P06733
Factor 2 de unión a secuencias de ADN rico en GC (C2ORF3 variante 2)	A4UHQ9
Factor de elongación 2	P13639
Factor de iniciación de la traducción eucariótico 3, subunidad E	B3KW56
Factor de iniciación de la traducción eucariótico 3, subunidad I	Q5U0F4
Fenilalanina ARNt ligasa subunidad β	Q9NSD9
Fosfolipasa A2- γ independiente de calcio	C9JAX4
Fosfoserina aminotransferasa	Q9Y617
Glucocinasa	L0HBA3
Glucosa-6-fostato deshidrogenasa	P11413/A8K8D9
HCG1771495, isoforma CRA_b	B2ZWH0
HCG2022736, isoforma CRA_a	D3DN77
HSC71	Q53GZ6
HSP70 (variante 1A)	Q59EJ3
HSP70 (variante 1A/1B)	P08107/E7EP94
HSP90 α	Q2VPJ6
Marco abierto de lectura en el gen BRE	Q96P08
MLH1	A8W2J9
NAD(P)H deshidrogenasa [quinona] 1	B4DLR8
Piruvato quinasa PKM	P14618
Poli [ADP-ribosa] polimerasa 2	Q9UGN5
Proteína alternativa a EML5	L8EBH5
Proteína alternativa a FGF1	L8ECL8
Proteína alternativa a ILF3	L8E9J1
Proteína de fusión TTL/TEL, TTL-B2	Q8NEU1
Proteína de fusión YWHAE/FAM22A	G9K388
Proteína FAM210B	H0Y456
Proteína LIM 1 de unión a filamina	Q5VVD3
Proteína Zyg-11, homólogo B	A8DPD7
Radixina	B0YJ88/Q6PKD3
Serina proteasa 1	Q53ZX7
Serina/treonina fosfatasa 2A, isoforma γ subunidad reguladora de 56 kDa	H0YK25
Serpina H1	P50454
S-formilglutamin hidrolasa	P10768
SUMO3	P55854
Transcetolasa	B3KSI4
Vilina, variante 1	Q53F91
Vinculina	Q5JQ13
Vinexina	E5RIA0

Una vez identificados los perfiles proteicos relacionados con cada familia de inhibidores de HSP90, se asociaron dichas proteínas con las rutas en las cuales podrían

estar implicadas. Las proteínas compartidas entre los derivados de geldanamicina fueron relacionadas con seis rutas, mientras que las proteínas detectadas tras el tratamiento con los derivados de radicicol participaron en once. Apoptosis, ciclo de Krebs y degradación de 5-HT, fueron las rutas afectadas exclusivamente por los derivados de geldanamicina (Figura 18C). Las proteínas diferencialmente expresadas relacionadas con estas rutas fueron HSP70 y HSC71 (apoptosis), citrato sintasa (ciclo de Krebs) y aldehído deshidrogenasa (degradación de 5-HT). En cambio, las rutas específicas para los derivados de radicicol fueron la señalización por integrinas, angiogénesis, biosíntesis de serina y glicina, ruta del PDGF, síntesis de ATP, biosíntesis de piridoxal-5-fosfato (PLP), ruta del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y el metabolismo de la vitamina B6 (Figura 18D). En este caso las proteínas relacionadas con las rutas enriquecidas fueron B-Raf y vinculina (ruta de señalización por integrinas), B-Raf y FGF1 (angiogénesis), B-Raf (rutas del PDGF y de VEGF), ATP sintasa (síntesis de ATP) y fosfoserina aminotransferasa (biosíntesis de serina y glicina, síntesis de PLP y metabolismo de la vitamina B6).

Solo tres rutas de señalización, PPP, glucólisis y el metabolismo de piruvato, fueron detectados en ambas familias de inhibidores de HSP90. Transcetolasa fue la proteína cuya desregulación estuvo envuelta en el enriquecimiento de PPP. Enolasa fue la proteína común relacionada con la desregulación de la glucólisis, aunque también se detectó la expresión alterada de la piruvato quinasa con la familia de derivados de radicicol. Finalmente, el metabolismo del piruvato se relacionó con la citrato sintasa en los derivados de geldanamicina y con la piruvato quinasa en los derivados de radicicol.

1.6. Validación de la expresión diferencial de las proteínas envueltas en la respuesta a los inhibidores de HSP90 en las líneas de adenocarcinoma de pulmón.

Considerando los resultados obtenidos de los análisis de los geles 2-DE y teniendo en cuenta los niveles de expresión de cada proteína así como los cambios tras la inhibición con HSP90 se seleccionaron, dada su relevancia, las proteínas EIF3SI y citrato sintasa para el proceso de validación.

En primera instancia la validación fue realizada mediante la técnica de Western Blot. EIF3SI fue la proteína más infraexpresada, tras el tratamiento con la mayoría de inhibidores, en la línea celular H3122. La infraexpresión de este importante factor de iniciación de la traducción fue también detectada en HCC827, bajo el inhibidor 17-AAG. La expresión

Resultados

proteica de EIF3SI y el correspondiente control interno de las líneas celulares estudiadas son mostrados en la Figura 19A y 19B.

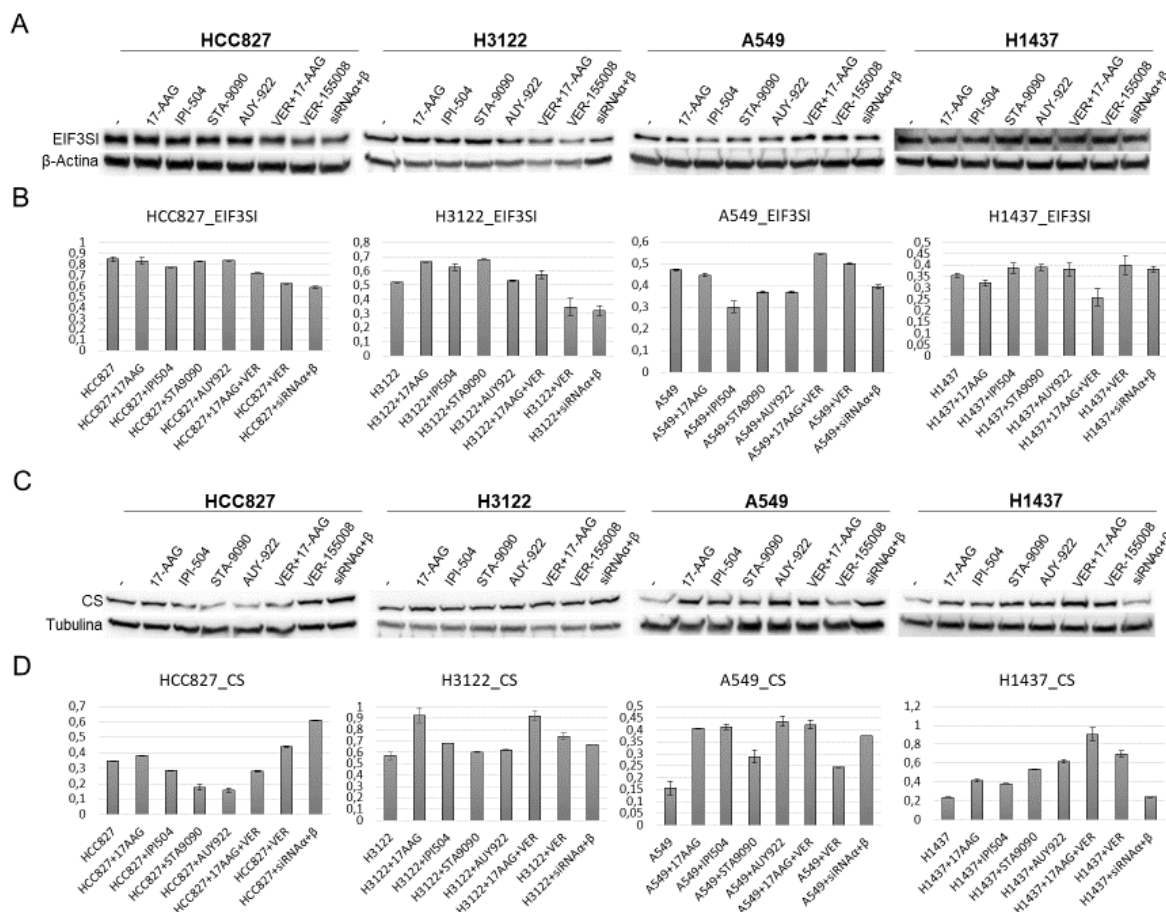


Figura 19. Validación mediante Western Blot de las proteínas identificadas, en los análisis de 2-DE y espectrometría de masas, como desreguladas tras la inhibición de HSP90. Lisados proteicos de las líneas celulares HCC827, H3122, A549 y H1437 sin tratar (-) o inhibidas con 17-AAG, IPI-504, STA-9090, AUY-922, VER-155008+17AAG y VER-155008 así como el silenciamiento genético de HSP90 (siRNA de HSP90α+β) fueron empleados en el experimento de inmunodetección de las proteínas de interés. Se muestra el nivel de expresión proteica de (A) la subunidad I del factor de iniciación de la traducción eucariótico (EIF3SI) y de (C) la citrato sintasa (CS) tras la inhibición de HSP90, así como el correspondiente control de carga. Asimismo se presenta la media y desviación estándar de los resultados obtenidos por densitometría de los diferentes Western Blots de (B) EIF3SI y (D) CS. Los tratamientos con los inhibidores, utilizando la concentración de la correspondiente IC₈₀, tuvieron una duración de 24 horas. Los ensayos fueron realizados por triplicado y la imagen se corresponde con una de las réplicas.

La tendencia en el cambio de expresión fue observado en las líneas H3122 y HCC827 con mayor claridad en el control positivo, silenciamiento genético de HSP90α y HSP90β, en comparación a la inhibición farmacológica de HSP90. Asimismo estas líneas celulares presentaron una marcada degradación de EIF3SI tras la condición más extrema,

la inhibición combinada de HSP70 y HSP90 (VER-155008+17-AAG). Por otra parte, las restantes líneas celulares presentaron una expresión disminuida, aunque no tan marcada, tras el silenciamiento génico en A549, así como bajo la inhibición combinada de HSP90 y HSP70 en H1437.

Por otra lado, se llevó a cabo la validación de otra proteína relevante, la citrato sintasa (CS) (Figura 19B y 19C). Esta proteína es una enzima clave en el ciclo de Krebs cuya regulación se relaciona con la síntesis de ATP y otras rutas metabólicas como la glucólisis. Todas estas rutas fueron, según los análisis de enriquecimiento, detectadas como desreguladas tras la inhibición de HSP90. Se observó como el mayor incremento de expresión de esta proteína, tras los tratamientos, se producía en la línea A549 (KRAS m+). Estos resultados confirmaron aquellos obtenidos mediante 2-DE, donde fueron detectados cambios de expresión de aproximadamente 7 veces en la inhibición con 17-AAG, IPI-504 y VER-155008+17-AAG con respecto al control sin tratar. Además debe ser puntualizado que la línea HCC827 (EGFR m+) fue la única donde se detectó una disminución en la expresión de esta proteína tras la inhibición de HSP90.

Posteriormente y sirviéndonos de la técnica proteómica de alto rendimiento iTRAQ demostramos la degradación de EIF3SI tras inhibición de HSP90 en la línea H3122 (ALK t+) (Figura 20A). De igual modo validamos de manera independiente la sobreexpresión de citrato sintasa, en la línea A549, bajo los inhibidores de HSP90 aunque no ocurrió lo mismo para la inhibición combinada (Figura 20B).

Finalmente, comprobamos la correcta inhibición de HSP90 y desarrollo experimental de ambos ensayos proteómicos a través de la detección de la sobreexpresión de HSP70 tras los distintos tratamientos (Figura 20C).

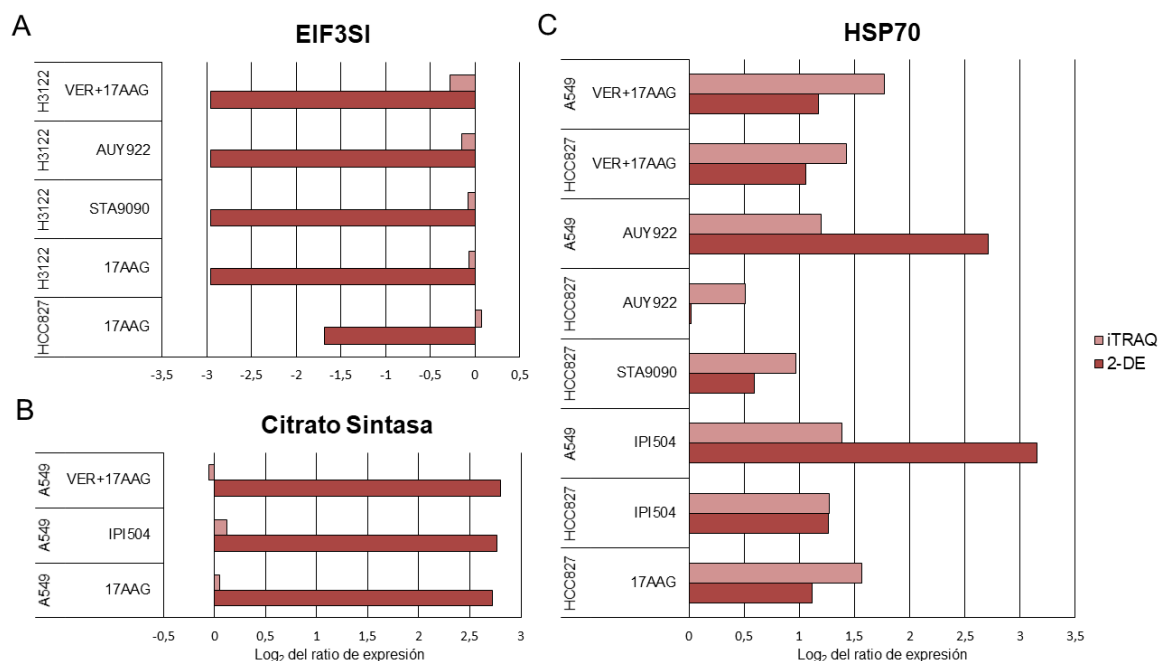


Figura 20. Validación de la tendencia en la variación de expresión de las proteínas de interés tras la inhibición de HSP90. Comprobación mediante la técnica proteómica iTRAQ del aumento o disminución de la expresión, previamente detectada por 2-DE, del (A) factor de iniciación de la traducción eucariótico, subunidad I (EIF3SI) y (B) citrato sintasa (CS) así como de la proteína control (C) HSP70. En el eje Y se muestran las líneas celulares y condiciones donde las correspondientes proteínas fueron identificadas mediante 2-DE y espectrometría de masas. En el eje X se muestra el log₂ del ratio de expresión, obtenido por 2-DE o iTRAQ, tras los respectivos tratamientos.

2. Análisis diferencial del proteoma tras la inhibición de HSP90 en diferentes subgrupos moleculares de adenocarcinoma de pulmón.

En este capítulo se aborda el segundo de los objetivos planteados en el proyecto de investigación. Debido a la heterogeneidad molecular presente en el adenocarcinoma de pulmón y teniendo en cuenta los resultados anteriores, donde se detectó una respuesta diferencial a la inhibición de HSP90 según la línea celular, se amplió el número de líneas celulares y condiciones de estudio con el propósito de analizar la respuesta en base al subtipo molecular de adenocarcinoma de pulmón.

2.1. Estudio de la expresión de HSP90 y proteínas relacionadas en distintos subtipos moleculares de adenocarcinoma de pulmón.

Siguiendo el patrón del primer objetivo, se seleccionó un panel de once líneas celulares de adenocarcinoma de pulmón (Tabla 7) con las alteraciones moleculares de mayor relevancia terapéutica: mutación en *EGFR*, mutación en *KRAS*, translocación EML4-ALK y triple negativas.

Se determinó la expresión a nivel proteico de HSP90 y otras proteínas relevantes para el estudio de su inhibición (Figura 21). La expresión proteica de HSP90 α fue diferencial dentro de cada subgrupo molecular encontrándose los niveles más bajos en H1650 dentro del grupo con mutación en EGFR, H2009 para el grupo con mutación en KRAS, H2228 en el grupo con translocación EML4-ALK, y Calu-3 entre las líneas triple negativas. No encontramos asociaciones entre la expresión de HSP90 β o HSP70 y los distintos subgrupos moleculares de estudio; sin embargo, dentro de cada subtipo las líneas que presentaban menor expresión de HSP90 α , a excepción de la línea con translocación EML4-ALK, mostraron mayor expresión de HSP90 β y HSP70.

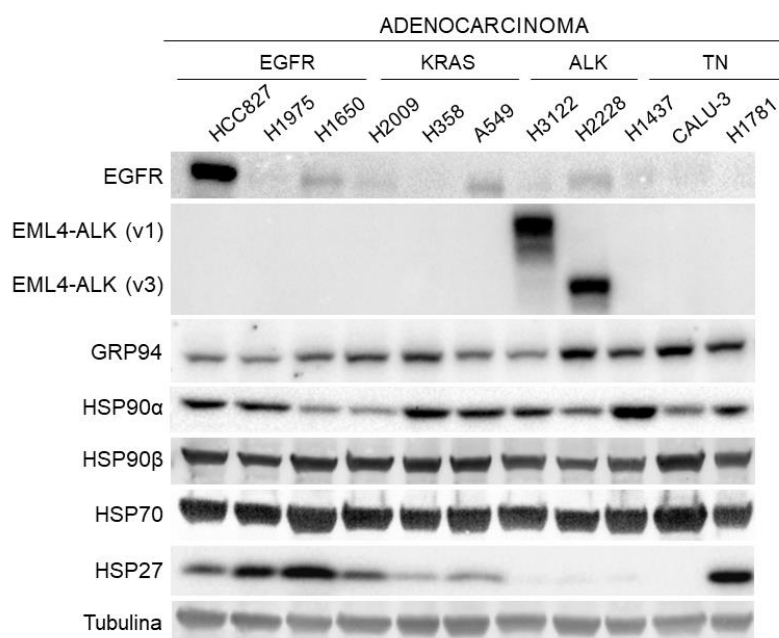


Figura 21. Caracterización del panel de líneas celulares de adenocarcinoma de pulmón empleadas en este objetivo. Estudio de la expresión proteica de HSP90, otras proteínas de choque térmico relacionadas y las proteínas clientes EGFR y EML4-ALK en las líneas celulares de estudio. EGFR = mutación en EGFR, KRAS = mutación en KRAS, ALK = portadora de la translocación EML4-ALK, TN = triple negativa (EGFR, KRAS y ALK silvestre). Cada experimento se realizó por triplicado. Los WB se corresponden con una imagen representativa de las réplicas.

Por su parte GRP94, presentó generalmente un patrón de expresión inverso a HSP90 α . Finalizando con las proteínas de choque térmico, HSP27 presentó una expresión diferencial de acuerdo al subgrupo molecular, identificándose los niveles más elevados de esta chaperona en las líneas con mutación en EGFR, niveles intermedios en las líneas con mutación en KRAS y una expresión indetectable en las líneas con translocación en ALK. Por su parte en el grupo de las líneas triple negativas encontramos una gran variación puesto que solo se detectó expresión, que además fue elevada, en la línea H1781.

Igualmente se estudió la expresión de las proteínas clientes de HSP90 tales como EGFR y EML4-ALK. Respecto a EGFR, se identificó la mayor expresión en la línea HCC827, con mutación en EGFR. Otras líneas con elevada expresión del receptor fueron H1650, con mutación en EGFR, las líneas H2009 y A549, con mutación en KRAS, y la línea H2228 con translocación EML4-ALK. El resto de líneas presentaron una baja expresión de EGFR. Por el contrario, la proteína de fusión EML4-ALK fue exclusivamente detectada en las líneas H3122 y H2228 portadoras de las variantes 1 y 3, respectivamente, de esta translocación.

2.2. Estudio del efecto de la inhibición de HSP90 en distintos subgrupos moleculares de adenocarcinoma de pulmón.

El estudio se inició con el análisis de la sensibilidad a diferentes inhibidores de HSP90 (17-AAG, IPI-504, STA-9090 y AUY-922) y HSP70 (VER-155008) a través de la determinación de sus respectivas concentraciones IC₅₀ (Tabla 17).

Tabla 17. Valores IC₅₀ de los diferentes inhibidores de HSP90 y HSP70 en el panel de líneas celulares de adenocarcinoma de pulmón.

Línea Celular	Inhibidores de HPS90				Inhibidor de HSP70	
	IC ₅₀ 17-AAG nM	IC ₅₀ IPI-504 nM	IC ₅₀ STA-9090 nM	IC ₅₀ AUY-922 nM	IC ₅₀ VER-155008 μM	Alteración Molecular
HCC827	26,255	17,145	5,138	4,167	2,081	Mutación en EGFR
H1975	1,258	12,750	4,739	2,595	4,580	Mutación en EGFR
H1650	6,554	3,764	5,659	1,472	5,434	Mutación en EGFR
H3122	26,165	28,371	7,991	9,110	33,898	Translocación EML4-ALK
H2228	10,888	46,340	4,131	4,488	13,124	Translocación EML4-ALK
H2009	43,198	33,833	4,659	2,477	3,405	Mutación en KRAS
H358	13,066	4,662	7,740	8,105	14,611	Mutación en KRAS
A549	16,296	19,492	6,310	30,733	24,487	Mutación en KRAS
H1437	3,708	3,473	6,794	2,814	24,811	EGFR, ALK y KRAS wt
CALU-3	87,733	43,295	18,445	1740,91	30,193	EGFR, ALK y KRAS wt
H1781	12,345	30,975	9,954	23,787	25,660	EGFR, ALK y KRAS wt

nM= nanomolar; μM= micromolar; wt= silvestre

Al igual que observamos en los resultados obtenidos en los ensayos del objetivo 1, en el que evaluamos la respuesta según la familia de inhibidores de HSP90, las líneas analizadas presentaron los valores más bajos de IC₅₀ frente a STA-9090 o AUY-922 (análogos de radicicol) y los valores más elevados frente a 17-AAG o IPI-504 (análogos de geldanamicina). Diferenciando por subgrupos moleculares, las líneas con mutación en EGFR fueron las más sensibles a los inhibidores de HSP90 (poco diferenciadas de las líneas EML4-ALK en relación a los análogos de radicicol), mientras que las líneas triple negativas fueron las más resistentes a ambas familias, siendo más notable en la línea Calu-3. De nuevo, todas las líneas de adenocarcinoma de pulmón estudiadas presentaron mayor sensibilidad frente a los inhibidores de HSP90 con respecto a los de HSP70. Centrándonos

Resultados

en la inhibición de HSP70, la mayor sensibilidad, y por tanto los valores más bajos de IC_{50} , se observó en el grupo de líneas con mutación en EGFR. Por el contrario, la resistencia más marcada se detectó en las líneas triple negativas.

A continuación, se procedió a la evaluación de la respuesta de las líneas de adenocarcinoma de pulmón frente a los inhibidores de HSP90 en su concentración IC_{80} . Para tal fin se analizaron los niveles proteicos de la propia chaperona HSP90 y sus clientes EGFR y EML4-ALK así como HSP70 (Figura 11 y Figura 22). Al igual que observamos en los resultados obtenidos en los ensayos del objetivo 1, se identificó una inducción de expresión compensatoria de HSP70 y HSP90, certificando una correcta inhibición de esta última chaperona. Respecto al efecto sobre sus proteínas clientes, EGFR sufrió una rápida y mayor degradación en las líneas con mutación en EGFR que presentaban mayor nivel de este receptor: HCC827 (Figura 11A) y H1650 (Figura 22B).

En paralelo también se detectó una degradación menos acusada de EGFR en líneas que aun presentando expresión del receptor no eran oncogénicamente dependientes del mismo, tales como A549 (Figura 11C), H2228 (Figura 22C), H2009 (Figura 22D), H358 (Figura 22E) y H1781 (Figura 22G). Centrándonos en EML4-ALK, esta proteína fue degradada tras la inhibición de HSP90 en ambas líneas portadoras de la translocación. Como se describió anteriormente, en la línea H3122 (Figura 11B) con la variante 1 de la translocación, esta proteína de fusión desapareció por completo desde el inicio del tratamiento con cualquiera de los inhibidores. Por su parte, la línea H2228 (Figura 22C) portadora de la variante 3 de la translocación, mostró una degradación menos acusada. Esta línea presentó al fin del tratamiento trazas de la proteína de fusión, especialmente bajo los análogos de geldanamicina a los que era menos sensible. Finalmente, en las líneas triple negativas que expresaban CDK4 se pudo confirmar la óptima inhibición de HSP90 a través de la degradación de esta proteína cliente de HSP90 (Figura 22F y Figura 22G).

A continuación se estudió la eficacia de la inhibición combinada de HSP90 y HSP70 a través del tratamiento con 17-AAG y VER-155008, a sus correspondientes IC_{50} o IC_{80} , durante 24h en la línea HCC827 (Figura 22H). Mediante el análisis de expresión de EGFR, HSP90 y HSP70 se verificó la eficacia de la doble inhibición, siendo notable la menor expresión compensatoria de ambas chaperonas.

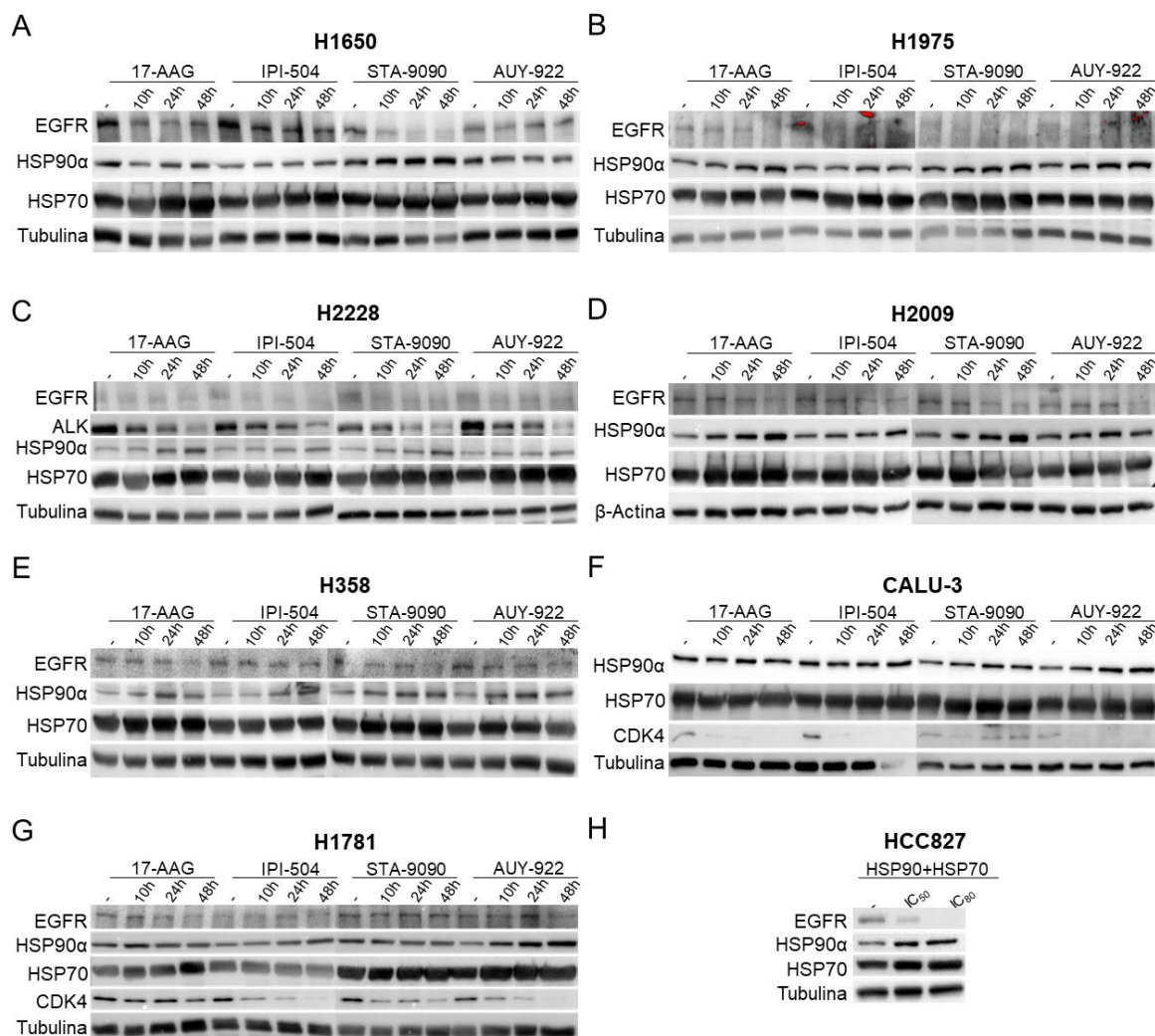


Figura 22. Evaluación de la inhibición de HSP90 en las líneas de adenocarcinoma de pulmón. (A) H1650, (B) H1975, (C) H2228, (D) H2009, (E) H358, (F) Calu-3 y (G) H1781 fueron sometidas a la IC₈₀ de 17-AAG, IPI-504, STA-9090 y AUY-922 durante 10, 24 o 48 horas antes de analizar mediante Western Blot la expresión de HSP90α, HSP70 y las correspondientes proteínas clientes EGFR, EML4-ALK o CDK4. Estudio de la inhibición combinada de (H) HSP90 y HSP70 en la línea HCC827, empleando la concentración IC₅₀ o IC₈₀, de los inhibidores 17-AAG y VER-155008, para analizar posteriormente el nivel de expresión proteica de HSP90α, HSP70 y la proteína cliente EGFR. Cada experimento se realizó por triplicado. Los Western Blots se corresponden con una imagen representativa de las réplicas. - = sin tratar con inhibidor; h= horas.

2.3. Silenciamiento de HSP90 en las líneas de adenocarcinoma de pulmón.

Con objeto de definir la respuesta específica al bloqueo de HSP90 y detectar los efectos indeterminados de los inhibidores farmacológicos, se silenció la expresión de esta chaperona en el panel de líneas celulares representantes de los distintos subgrupos moleculares de adenocarcinoma de pulmón. Debido a la relevancia de HSP90 en la viabilidad celular, la reducción de la mitad de la expresión de HSP90, se ha considerado competente para su uso como control positivo de la inhibición de esta chaperona. Para tal fin se silenciaron de modo independiente la forma constitutiva (β) e inducible (α) de HSP90 (Figura 23).

La línea HCC827 fue la empleada para poner a punto las condiciones de silenciamiento, evaluándose la disminución de la expresión de HSP90 α (Figura 23A), HSP90 β (Figura 23B) así como la depleción conjunta (Figura 23C) tras el tratamiento con diferentes concentraciones de 3 ARNs de interferencias (siRNAs) durante 48 o 72 horas. El tratamiento con 30 pmoles de los siRNAs más efectivos (α_1 y β_3) durante 48 horas fueron las condiciones exitosamente empleadas en las restantes líneas con mutación en EGFR H1975 (Figura 23D) y H1650 (Figura 23E), en KRAS H2009 (Figura 23F) y A549 (Figura 23G) y en las triple negativas Calu-3 (Figura 23H) y H1781 (Figura 23I). En la línea H2228 (ALK t+) y H358 (KRAS m+) se obtuvo un mejor silenciamiento de HSP90 α con el siRNA_HSP90 α_2 (Figura 23J) y siRNA_HSP90 α_3 (Figura 23L) manteniéndose el siRNA_HSP90 β_3 para el silenciamiento de HSP90 β (Figura 23K y 23M). Finalmente en la línea EML4-ALK H3122 (Figura 23N) y en la triple negativa H1437 (Figura 23Ñ) debieron de emplearse otros siRNAs para silenciar HSP90.

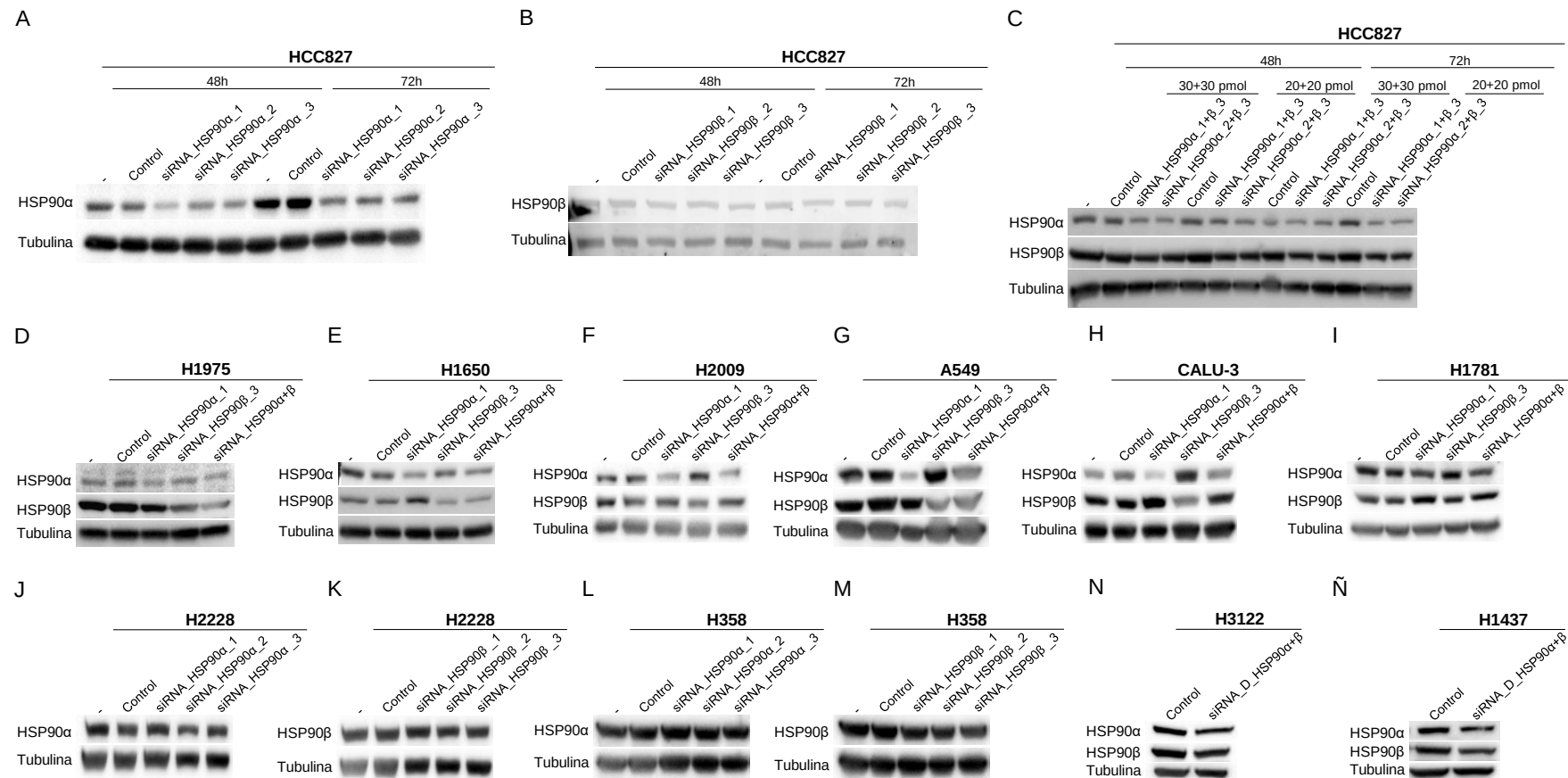


Figura 23. Efectividad del silenciamiento de HSP90 en el panel de líneas celulares de adenocarcinoma de pulmón. Análisis por Western Blot de la validez en el silenciamiento de 3 siRNAs de (A) HSP90α y 3 de (B) HSP90β, de la casa comercial Origene, en la línea HCC827. En esta misma línea celular se seleccionó la incubación durante 48h con 30 pmol de siRNA_HSP90α_1 y siRNA_HSP90β_3 como condiciones óptimas para el (C) silenciamiento conjunto de HSP90. Estudio de la expresión de HSP90α y HSP90β, tras el uso de las condiciones establecidas, en las líneas (D) H1975, (E) H1650, (F) H2009, (G) A549, (H) Calu-3 y (I) H1781. Selección de las condiciones para el silenciamiento óptimo de HSP90α y HSP90β en (J, K) H2228 y (L, M) H358. Verificación de la reducción proteica de HSP90α y HSP90β, tras el uso de RNAs de interferencia de la casa comercial Dharmacon, en las líneas celulares (N) H3122 y (Ñ) H1437. -= Sin transfectar; Control= ARN de interferencia inespecífico; siRNA_HSP90α= ARN de interferencia contra HSP90α; siRNA_HSP90β= ARN de interferencia contra HSP90β.

2.4. Detección proteómica de las proteínas diferencialmente expresadas tras los tratamientos de estudio en las líneas de adenocarcinoma de pulmón.

La técnica proteómica de alto rendimiento iTRAQ combinada con los análisis de espectrometría de masas fue usada para identificar las proteínas con niveles alterados de expresión, tras el tratamiento con los inhibidores de HSP90, HSP70, el tratamiento combinado o el silenciamiento génico de HSP90, en el panel celular de adenocarcinoma de pulmón. Se identificaron cambios en la expresión en una media de 5248 proteínas por línea celular, siendo H2228 y HCC827 las líneas celulares donde se detectaron un mayor y menor número de proteínas alteradas, respectivamente (Figura 24A).

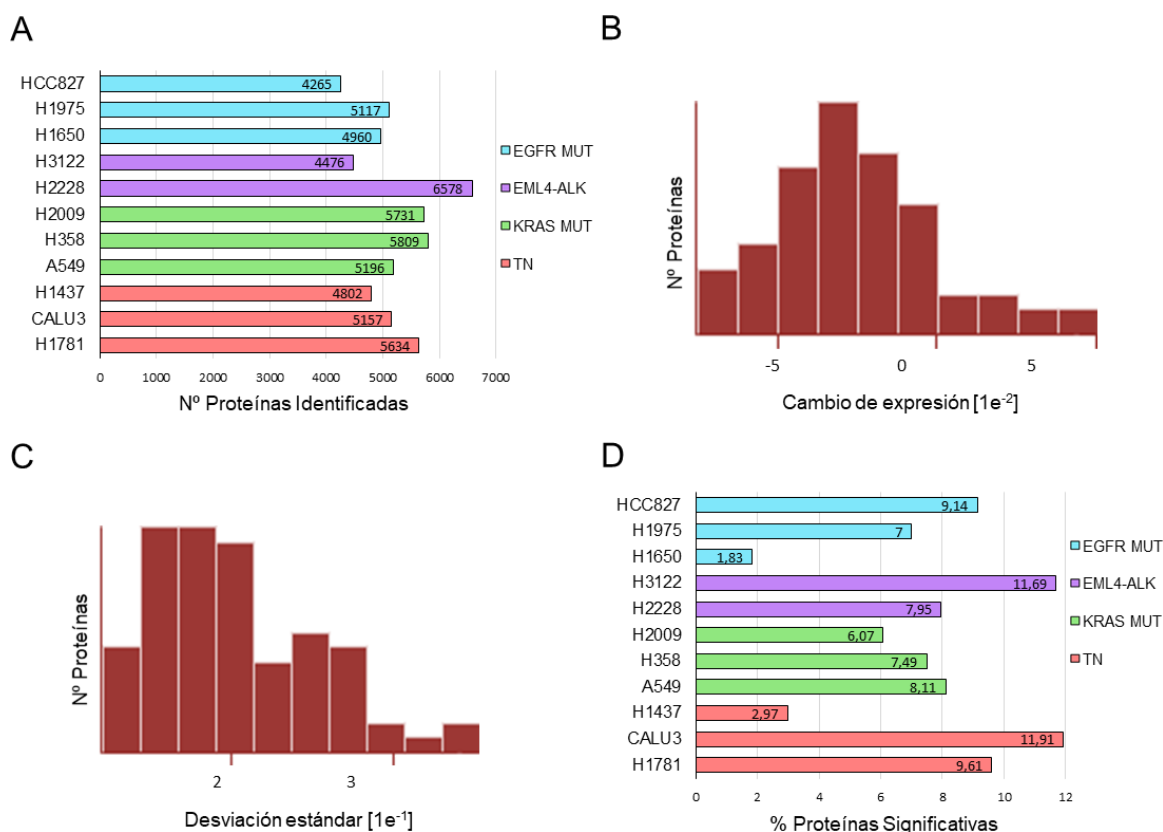


Figura 24. Proteínas diferencialmente expresadas identificadas por iTRAQ en las líneas de adenocarcinoma de pulmón. (A) Comparativa de las proteínas identificadas en cada una de las líneas celulares de estudio, las cuales están representadas en la coordenada vertical. Representación de la totalidad de proteínas identificadas en el estudio agrupadas según (B) el cambio de expresión y (C) el grado de desviación estándar de las mismas. (D) Porcentaje medio de las proteínas diferencialmente expresadas de manera significativa en las líneas celulares dispuestas en el eje Y.

Combinando los resultados obtenidos se detectaron un total de 8953 proteínas diferencialmente expresadas en el panel de líneas celulares de estudio. Entre ellas se identificó un mayor número de proteínas infraexpresadas, siendo esta diferencia acusada incluso en los ratios de expresión más extremos (Figura 24B). Además, las proteínas identificadas presentaban una desviación estándar cercana a cero y por tanto menor dispersión de los datos (Figura 24C).

De acuerdo con el p-valor, calculado a partir de los péptidos únicos y el ratio de expresión, se seleccionaron aquellas proteínas diferencialmente expresadas de manera significativa tras los tratamientos. Calu-3 y H3122 fueron las líneas de estudio con mayor porcentaje de proteínas significativas, mientras que H1650 y H1437 presentaron el menor número de proteínas con diferencias significativas (Figura 24D). Puesto que estas dos últimas líneas celulares presentaron un conjunto de valores distantes de las restantes líneas de estudio, probablemente debido a errores experimentales, se consideraron aberrantes y fueron excluidas de los siguientes ensayos de este objetivo.

Centrándonos en la fracción de proteínas significativas (Tabla 18), se observó que la mayoría de líneas y condiciones de estudio presentaron el mismo patrón de expresión con un mayor número de proteínas infraexpresadas. Sin embargo hubo excepciones donde el número de proteínas sobreexpresadas superaban al de infraexpresadas, siendo H3122 como línea celular y el silenciamiento génico como condición, los casos en los que más frecuentemente se repitió este patrón. Por el contrario en las líneas H1650, H1975, H2228 y H1781, al igual que bajo el tratamiento IPI-504, el número de proteínas sobreexpresadas nunca fue mayor al de infraexpresadas.

Entre los 4 inhibidores de HSP90, 17-AAG indujo cambios de expresión en el mayor número de proteínas y STA-9090 en el menor. Diferenciando por familia, encontramos más proteínas desreguladas bajo los análogos de geldanamicina 17-AAG e IPI-504. Esto tuvo lugar debido a la gran cantidad de proteínas infraexpresadas encontradas tras el tratamiento con estos dos inhibidores. Por el contrario, en los análogos de radicicol se detectó un mayor número de proteínas sobreexpresadas. Teniendo en cuenta el total de proteínas significativas, encontramos 6 veces más proteínas desreguladas tras el uso de ARNs de interferencia que bajo los inhibidores de HSP90. Solo con el inhibidor 17-AAG se identificó un número mayor de proteínas infraexpresadas que con el silenciamiento génico.

Tabla 18. Número de proteínas con cambios significativos de expresión tras el tratamiento con los inhibidores de HSP90 (17-AAG, IPI-504, STA-9090, AUY-922), el inhibidor de HSP70 (VER-155008), la inhibición combinada de HSP70 y HSP90 (VER-155008 + 17-AAG) o el silenciamiento génico de HSP90 identificadas en el panel de líneas de adenocarcinoma de pulmón.

Tratamiento			Cambio de Expresión	EGFR m+			ALK t+		KRAS m+			TN		
				HCC827	H1975	H1650	H3122	H2228	H2009	H358	A549	H1437	CALU3	H1781
Inhibición	HSP90	17-AAG	+	96	133	29	142	122	126	69	165	31	172	89
			-	238	170	109	389	385	269	337	202	28	438	445
		IPI-504	+	107	169	13	168	181	106	103	194	13	195	120
			-	154	301	40	287	370	258	227	204	16	391	473
		STA-9090	+	94	143	7	167	135	78	188	70	22	288	58
			-	164	230	65	119	147	177	149	113	23	276	244
		AUY-922	+	140	128	31	269	142	79	116	189	56	197	138
			-	167	159	118	202	199	146	161	182	23	483	318
	HSP70	VER-155008	+	280	81	11	342	275	115	108	135	67	190	214
			-	131	313	34	458	384	294	529	477	208	420	542
HSP70 + HSP90	VER-155008 + 17-AAG	+	309	78	13	278	240	116	196	186	78	219	228	
		-	134	198	26	211	343	295	326	363	126	443	429	
Silenciamiento génico HSP90		siRNA HSP90α+β	+	471	134	69	321	304	269	249	219	92	316	198
			-	243	272	69	309	434	108	289	252	217	270	294

EGFR m+= mutación en EGFR ; ALK t+= translocación EML4-ALK; KRAS m+= mutación en KRAS; TN= triple negativa (EGFR, ALK y KRAS silvestre); += sobreexpresión; -= infraexpresión

Por otro lado, tras comparar la inhibición de HSP70 con la inhibición conjunta de HSP70 y HSP90 se encontraron más proteínas diferencialmente expresadas en la monoterapia, debido principalmente a la mayor detección de proteínas infraexpresadas. Por último, cabe destacar que en ambas condiciones (inhibición de HSP70 e inhibición combinada) las proteínas infraexpresadas y sobreexpresadas superaron en número a las detectadas tras el tratamiento con los diferentes inhibidores de HSP90. La única excepción fue nuevamente el caso de 17-AAG, con un mayor número de proteínas infraexpresadas que la inhibición combinada.

2.5. Perfil proteómico de los efectos de la inhibición de HSP90 en los distintos subtipos moleculares de adenocarcinoma de pulmón.

Con el fin de determinar el perfil proteómico asociado con la inhibición de HSP90 se seleccionaron, a través del software PERSEUS, las proteínas que presentaron cambios significativos de expresión tras la inhibición en las líneas celulares agrupadas bajo la misma alteración molecular (mutación en EGFR, translocación en ALK, mutación en KRAS o triple negativas) (Tabla 19). Los distintos subtipos moleculares difirieron en el número de proteínas desreguladas detectadas, siendo el grupo de líneas celulares con mutación en KRAS donde se encontró el mayor número de ellas con diferencias significativas, y el grupo con la translocación en ALK donde se identificó el menor número.

Tabla 19. Determinación proteómica de la inhibición de HSP90 en los diferentes subtipos moleculares de adenocarcinoma de pulmón.

ALTERACIÓN MOLECULAR	PROTEÍNAS SIGNIFICATIVAS	PROTEÍNAS SIGNIFICATIVAS Y SILENCIAMIENTO
EGFR m+	332	246 (74%)
ALK t+	57	34 (60%)
KRAS m+	1696	1157 (68%)
TN	1288	866 (67%)

EGFR m+= mutación en EGFR ; ALK t+= translocación EML4-ALK; KRAS m+= mutación en KRAS; TN= triple negativa (EGFR, ALK y KRAS silvestre)

Tras representar las proteínas diferencialmente expresadas, conforme a su cambio de expresión y correspondiente p-valor, en cada subtipo molecular de adenocarcinoma de

Resultados

pulmón se observó que todos seguían el mismo patrón de expresión tras la inhibición de HSP90 puesto que el número de proteínas infraexpresadas aproximadamente triplicaba el número de sobreexpresadas en todos los subtipos moleculares estudiados (Figura 25).

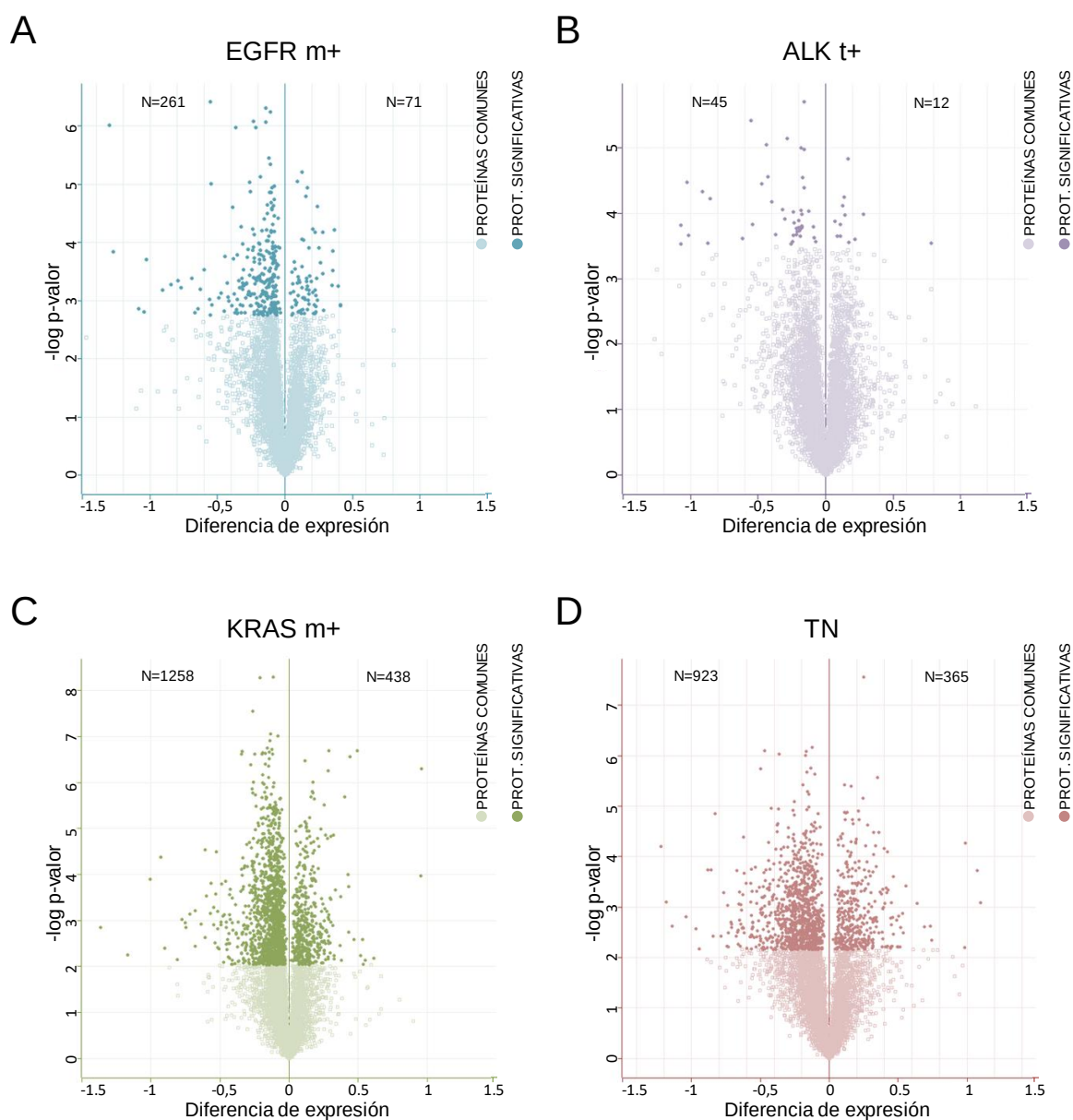


Figura 25. Representación de las proteínas significativas tras la inhibición de HSP90 en los distintos subtipos moleculares de adenocarcinoma de pulmón. Gráfico volcano de las proteínas diferencialmente expresadas, tras la inhibición de HSP90, y su correspondiente p-valor en el conjunto de líneas (A) con mutación en EGFR, (B) translocación EML4-ALK, (C) mutación en KRAS y (D) triple negativas. El eje X corresponde con el cambio de expresión de las proteínas sobreexpresadas (valores positivos) e infraexpresadas (valores negativos). El eje Y representa el p-valor del correspondiente cambio de expresión.

Una vez identificadas las proteínas con diferencias significativas, fueron seleccionadas aquellas desreguladas en los ensayos de silenciamiento de HSP90. De este modo, se garantizaba el efecto real de la inhibición de HSP90 (Tabla 19). Por este motivo, el número de proteínas significativas disminuyó aproximadamente un 30% en todos los grupos moleculares de adenocarcinoma de pulmón. Además, esta proporción se mantuvo tanto en las proteínas infraexpresadas como sobreexpresadas.

En la Figura 26 se representan las proteínas desreguladas significativamente y específicas de la inhibición de HSP90 en los diferentes subtipos moleculares de adenocarcinoma de pulmón.

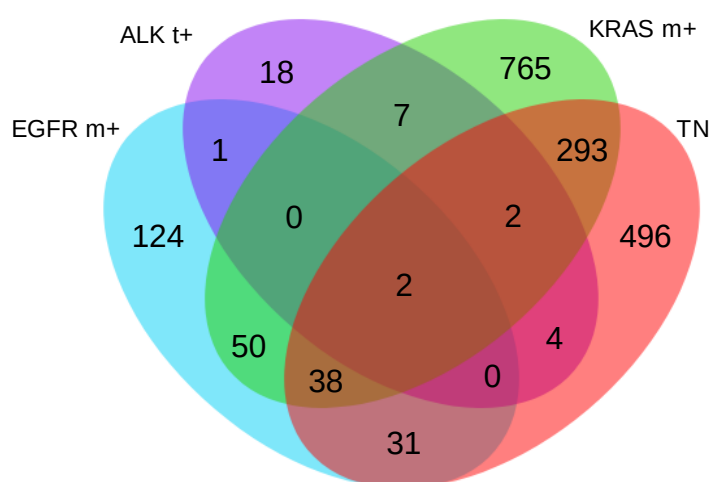


Figura 26. Diagrama de Venn mostrando las proteínas desreguladas significativamente y de manera específica tras la inhibición de HSP90 en los distintos subgrupos moleculares de adenocarcinoma de pulmón. EGFR m+= grupo de líneas celulares con mutación en EGFR, ALK t+= grupo de líneas celulares con translocación EML4-ALK, KRAS m+= grupo de líneas celulares con mutación en KRAS, TN= grupo de líneas celulares triple negativas.

Solo ADI1 (acireductona dioxigenasa 1) y RRP1 (proteína 1 de procesamiento de ARN ribosómico) se encontraban desreguladas tras la inhibición de HSP90 en todos los subtipos moleculares de adenocarcinoma de pulmón estudiados. Además, la alteración de la expresión fue consistente, encontrándose ADI1 sobreexpresada y RRP1 infraexpresada en todos los subgrupos de estudio. Igualmente el número de proteínas coincidentes entre las combinaciones restantes fue bajo, sobre todo cuando uno de los subtipos moleculares a comparar era la translocación EML4-ALK, debido principalmente al bajo número de proteínas significativamente desreguladas en este grupo molecular. El porcentaje de proteínas únicas por subtipo de alteración molecular fue aproximadamente del 50% en todos los subgrupos estudiados, solo discretamente más alto (65%) en el grupo con mutación en KRAS puesto que presentaba un mayor número de proteínas significativas.

2.6. Clasificación funcional de las proteínas desreguladas significativa y específicamente tras la inhibición de HSP90 en los distintos subtipos de adenocarcinoma de pulmón.

Se determinaron las rutas y procesos biológicos asociados con las proteínas desreguladas de manera específica y significativa tras la inhibición de HSP90 en cada subgrupo molecular de adenocarcinoma de pulmón (Tabla 20).

Tabla 20. Anotación funcional de la inhibición de HSP90 en los diferentes subtipos moleculares de adenocarcinoma de pulmón.

ALTERACIÓN MOLECULAR	PROTEÍNAS SIGNIFICATIVAS Y SILENCIAMIENTO	Nº RUTAS ASOCIADAS	Nº PROCESOS BIOLÓGICOS ASOCIADOS
EGFR m+	246	7	48
ALK t+	34	10	15
KRAS m+	1157	21	93
TN	866	12	88

EGFR m+= mutación en EGFR ; ALK t+= translocación EML4-ALK; KRAS m+= mutación en KRAS; TN= triple negativa (EGFR, ALK y KRAS silvestre)

Centrándonos en las rutas alteradas tras la inhibición de HSP90 (Tabla 21), el mayor número se encontró en el grupo de líneas celulares con mutación en KRAS, lo cual era esperable debido a que este subtipo molecular fue el que presentó mayor número de proteínas diferencialmente expresadas. Sin embargo a pesar de que el grupo con menos proteínas desreguladas fue de las líneas con translocación EML4-ALK, el número de rutas enriquecidas fue similar al del grupo de líneas triple negativas y mayor al grupo de líneas con mutación en EGFR, los cuales presentaban respectivamente 25 y 7 veces más proteínas desreguladas. Estos datos sugerían que el pequeño grupo de proteínas desreguladas en el subtipo ALK t+ pueden estar implicadas en un elevado número de rutas biológicas relacionadas con la inhibición de HSP90.

Tabla 21. Rutas biológicas relacionadas con las proteínas diferencialmente expresadas tras la inhibición de HSP90 en los diferentes subtipos moleculares de adenocarcinoma de pulmón.

EGFR m+	ALK t+	KRAS m+	TN
Apoptosis	Apoptosis	Apoptosis	Apoptosis
Biosíntesis de arginina	Biosíntesis de arginina	Biosíntesis de colesterol	Biosíntesis de coenzima-A
Biosíntesis de asparagina y aspartato	Biosíntesis de formiltetrahydroformato	Biosíntesis de purina	Biosíntesis de prolina
Biosíntesis de serina y glicina	Conversión de succinato a propionato	Biosíntesis de ribonucleótidos de pirimidina	Enfermedad de Huntington
Ciclo del metilcitrato	Ruta de señalización del EGFR	Biosíntesis del hemo	Metabolismo de pirimidinas
Enfermedad de Huntington	Ruta de señalización del FGF	Cascada insulina/IGF-PKB	Replicación de ADN
Ruta de p53	Ruta de señalización del PDGF	Ciclo celular	Ruta de la ubiquitina proteosoma
	Ruta de señalización del AR- α	Enfermedad de Huntington	Ruta de las pentosas fosfato
	Ruta del GnRHR	Enfermedad de Parkinson	Ruta de señalización por IL
	Ruta del metilmalonil	Guía axonal mediada por semaforinas	Ruta de señalización del PDGF
		Mapa de señalización CCKR	Ruta de señalización por endotelina
		Recuperación de ribonucleótidos de pirimidina	Ruta del GnRHR
		Regulación del citoesqueleto por Rho GTPasas	
		Replicación de ADN	
		Ruta de la ubiquitina proteosoma	
		Ruta de p53 por privación de glucosa	
		Ruta de señalización del EGFR	
		Ruta de señalización del FGF	
		Ruta de señalización del VEGF	
		Ruta de señalización por cadherinas	
		Ruta de señalización por integrinas	

EGFR m+= mutación en EGFR ; ALK t+= translocación EML4-ALK; KRAS m+= mutación en KRAS; TN= triple negativa (EGFR, ALK y KRAS silvestre); EGFR= receptor del factor de crecimiento epidérmico; FGF= factor de crecimiento fibroblástico; PDGF= factor de crecimiento derivado de plaquetas; AR- α = adrenoreceptor alfa; GnRHR= receptor de la hormona liberadora de gonadotropina; CCKR= receptor de colecistoquinina, VEGF= factor de crecimiento endotelial vascular; IL= interleuquinas

Resultados

A continuación, se clasificaron las rutas enriquecidas debido a las proteínas diferencialmente expresadas tras la inhibición de HSP90 en cada subtipo molecular de adenocarcinoma de pulmón (Figura 27 y Tabla 22).

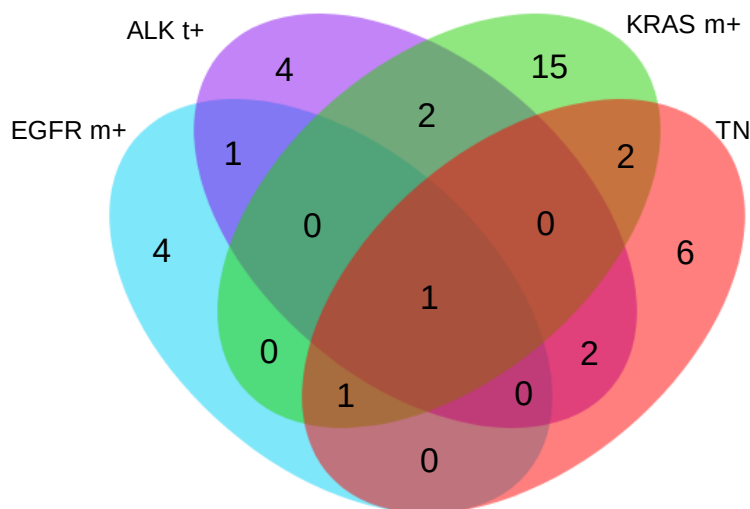


Figura 27. Distribución de las rutas alteradas tras la inhibición de HSP90 en los distintos subgrupos moleculares de adenocarcinoma de pulmón. EGFR m+= grupo de líneas celulares con mutación en EGFR, ALK t+= grupo de líneas celulares con translocación EML4-ALK, KRAS m+= grupo de líneas celulares con mutación en KRAS, TN= grupo de líneas celulares triple negativas.

Solo una ruta, apoptosis, fue común a la inhibición de HSP90 en todos los subgrupos moleculares de estudio, mostrando que los inhibidores influyen sobre la muerte celular independientemente de la alteración molecular del adenocarcinoma de pulmón. Los grupos moleculares de las líneas con mutación en EGFR y translocación EML4-ALK compartieron enriquecimiento en la vía de biosíntesis de arginina. La alteración en las rutas de señalización de EGFR y FGF, relacionadas con el crecimiento celular, fueron comunes a los grupos ALK t+ y KRAS m+, mientras que los grupos ALK t+ y TN compartieron el enriquecimiento en la ruta de señalización de PDGF y la de GnRHR. Finalmente la replicación del ADN y la ruta de la ubiquitina-proteosoma fueron compartidas entre los grupos KRAS m+ y TN. Puesto que la ubiquitinación y degradación en el proteosoma son pasos imprescindibles en la respuesta a la inhibición de HSP90, esta alteración pudo ser resultado de una reacción diferencial en los grupos con mutación en KRAS y triple negativo, con respecto a los otros subtipos moleculares estudiados de adenocarcinoma de pulmón. También cabe señalar que en el subgrupo molecular con mutación en KRAS se detectó el mayor número de rutas únicas desreguladas y el menor número en el subgrupo con la translocación EML4-ALK.

Tabla 22. Proteínas asociadas a las rutas enriquecidas bajo la inhibición de HSP90 de manera común en los diferentes subtipos moleculares de adenocarcinoma de pulmón.

Apoptosis	Alt. Molecular	p-valor	ID UniProt	B.Arg	Alt. Molecular	p-valor	ID UniProt	Ruta de señalización del PDGF	Alt. Molecular	p-valor	ID UniProt	Replicación de ADN	Alt. Molecular	p-valor	ID UniProt				
	ALK t+	4.14E-05	Q99683		EGFR m+	1.36E-02	ALK t+		1.12E-02	P00966	TN		7.74E-03	ALK t+	2.27E-02	P32519	KRAS m+	1.97E-04	P28340
			P0DMV8				P00966		P17252	P09884									
			Q14249				P27708		O95163	P49642									
			P17252				Q99683		P27361	Q9H0D6									
			P99999				P60510		P20936	P35249									
			P04637				P17252		Q9Y3M8	P49005									
	EGFR m+	1.36E-02	Q14790		KRAS m+	3.66E-02	P31947		TN	7.74E-03	P52630		KRAS m+	6.50E-03	P35250				
			P45985				P41743				O15111				P40937				
			P11142				P63000				P32519				P28340				
			P05198				Q8TF05				P42345				P09884				
			P18846				P31946				P31751				P49642				
			Q13490				P27348				P49841				P11387				
			P0DMV8				Q04917				Q14573				P49005				
			P54652				P61586				P49137								
			O15111				P29353				P40763								
			O95817				P31751				Q99683								
			P17066				O00443				P25208								
			Q95819				P60510				P0DMV8								
	KRAS m+	7.27E-03	P31751		ALK t+	1.36E-03	Q99683		TN	7.23E-03	P17252		KRAS m+	9.96E-04	P55036				
			P19525				P60510				Q08209				Q96J02				
			P11142				P17252				P27361				P51665				
			Q00653				P31947				P25208				O00303				
			P11021				P41743				Q9BQE3				O95352				
			P27361				P63000				P00533				P43686				
			P99999				P31946				P0DMV8				P22314				
			P55210				P00533				Q9BY44				P62837				
			P0DMV8				P27348				P04150				Q7Z3V4				
			O15111				Q9BZL6				O15264				P68036				
			Q9Y4K4				Q04917				P11166				Q13564				
			O95817				P61586				Q9Y4K4								
	TN	1.16E-02	P17066		KRAS m+	3.92E-02	P29353		TN	7.23E-03	O95819		TN	2.57E-02					
			O95819				P31751				P49841								
			P31751				O00443				Q14573								
			Q16611				P60510				P54619								
											P47712								
											P40763								
											P17275								

Resultados

Por último, con el fin de obtener una visión funcional global, de las proteínas alteradas significativamente tras la inhibición de HSP90, se identificaron los procesos biológicos asociados a estas proteínas en los diferentes subgrupos moleculares de adenocarcinoma de pulmón (Figura 28).

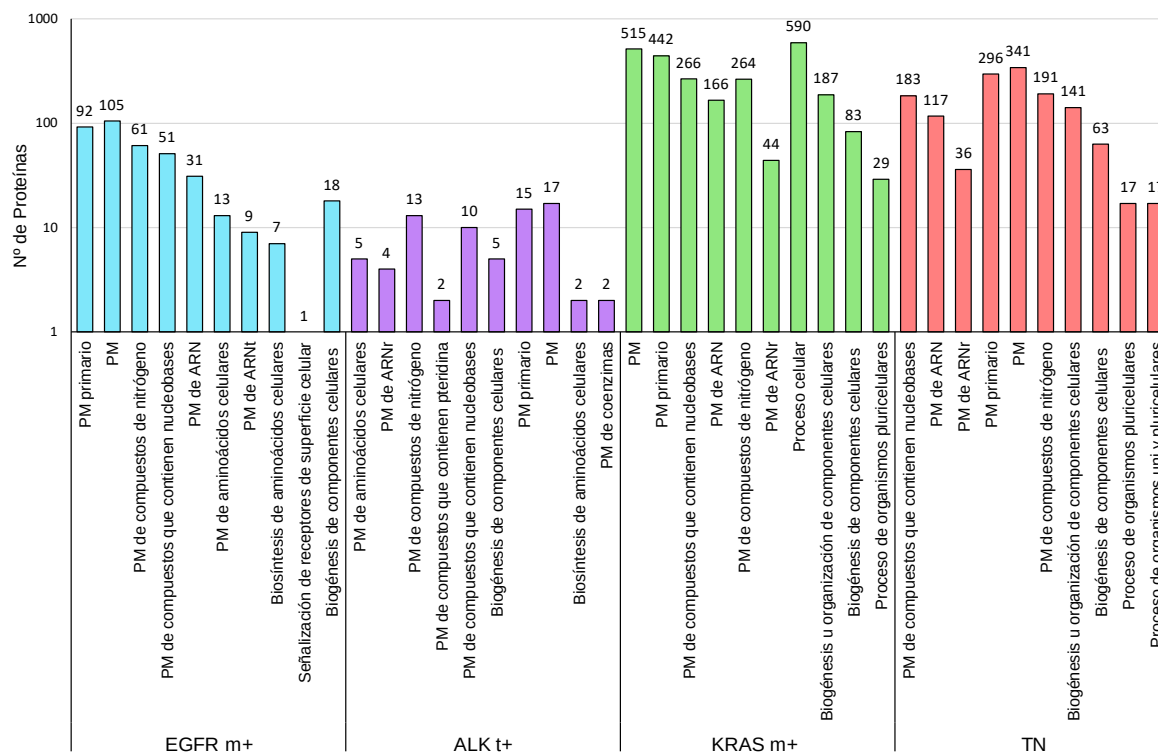


Figura 28. Enumeración de los procesos biológicos más relevantes relacionados con las proteínas desreguladas en los distintos subtipos moleculares de adenocarcinoma de pulmón. Se seleccionaron los 10 procesos biológicos con mayor significancia y por tanto mayor p-valor. El número de proteínas envueltas en cada ruta identificada es representado en el eje X. PM= proceso metabólico, ARNt= ARN de transferencia, ARNr= ARN ribosómico, EGFR m+= grupo de líneas celulares con mutación en EGFR, ALK t+= grupo de líneas celulares con translocación EML4-ALK, KRAS m+= grupo de líneas celulares con mutación en KRAS, TN= grupo de líneas celulares triple negativas.

Entre los diez procesos biológicos más significativos que se encontraron compartidos por todos los subtipos moleculares estudiados se incluyeron la biogénesis de componentes celulares y diferentes procesos metabólicos (generales, primarios y aquellos relacionados con compuestos de nitrógeno y con compuestos que contienen nucleobases). También se detectaron de manera recurrente procesos metabólicos relacionados con el ARN en general en los subgrupos con mutación en EGFR, mutación en KRAS y triple negativo y en concreto de ARN ribosómico en los subgrupos con translocación EML4-ALK, mutación en KRAS y triple negativo, y de ARN de transferencia en el subgrupo con mutación en EGFR.

Los subtipos moleculares con mutación en EGFR y translocación EML4-ALK compartieron la alteración del metabolismo y biosíntesis de aminoácidos. Por su parte, los subtipos moleculares con mutación en KRAS y triple negativo presentaron asociación de sus proteínas desreguladas con los procesos de organismos pluricelulares y la biogénesis u organización de componentes celulares.

Finalmente como procesos biológicos únicos y más significativos para el grupo con mutación en EGFR, además del ya mencionado proceso metabólico del ARN de transferencia, se encontró la señalización de receptores de superficie celular. En lo que respecta al grupo con translocación EML4-ALK, fueron los procesos metabólicos que involucran coenzimas y compuestos que contienen pteridina aquellos identificados como únicos. Estos procesos están relacionados entre sí puesto que diferentes coenzimas importantes, como el ácido fólico, contienen pteridina. En el grupo con mutación en KRAS los procesos celulares en general, y en el grupo de líneas triple negativas los procesos de organismos uni y pluricelulares, fueron los procesos biológicos únicos desregulados.

3. Búsqueda de potenciales biomarcadores predictivos de la eficacia de la inhibición de HSP90 en el adenocarcinoma de pulmón.

Este apartado se focaliza en el último de los objetivos planteados. Con el fin de maximizar la eficacia de los inhibidores de HPS90 en el adenocarcinoma de pulmón, se llevó a cabo la búsqueda de proteínas y rutas oncológicas potencialmente predictivas de la respuesta al tratamiento.

3.1. Correlación de las proteínas identificadas con la respuesta a la inhibición de HSP90 en las líneas de adenocarcinoma de pulmón.

Con el propósito de identificar aquellas proteínas con un posible papel predictivo de la respuesta a los diferentes inhibidores de HSP90, se analizó la correlación entre la IC₅₀ y abundancia de las proteínas celulares (Tabla 23).

Tabla 23. Proteínas relacionadas con la sensibilidad y resistencia a los diferentes inhibidores de HSP90 en el panel de líneas celulares de adenocarcinoma de pulmón.

Tratamiento	Respuesta	Proteínas relacionadas con la respuesta			
		Detectadas	Significativas	p +	p -
17-AAG	SENSIBILIDAD	3724	27	23	4
	RESISTENCIA	3607	173	170	3
IPI-504	SENSIBILIDAD	3898	1755	1755	0
	RESISTENCIA	4395	1858	1858	0
STA-9090	SENSIBILIDAD	4497	54	7	47
	RESISTENCIA	3704	24	13	11
AUY-922	SENSIBILIDAD	4149	1383	1383	0
	RESISTENCIA	3934	1329	1328	1

p+= proteínas con correlación directa; p-= proteínas con correlación inversa

El número de proteínas detectadas, relacionadas con una mayor sensibilidad o resistencia, oscilaron en el mismo rango entre los diferentes inhibidores de HSP90. Del mismo modo, para cada inhibidor estudiado no se encontraron diferencias significativas entre las proteínas relacionadas con una mayor sensibilidad o resistencia. Sin embargo, el porcentaje de proteínas con una correlación significativa y por tanto una asociación directa o indirecta con la respuesta al tratamiento fue variable. En concreto, el mayor número de proteínas significativas se encontró en respuesta al inhibidor IPI-504 y el menor número se detectó en respuesta a STA-9090. Es destacable que en los inhibidores análogos de geldanamicina (17-AAG e IPI-504) se encontró un mayor número de proteínas significativamente asociadas con resistencia mientras que en los análogos de radicicol (STA-9090 y AUY-922) se encontraron más proteínas asociadas con sensibilidad.

3.2. Identificación de potenciales biomarcadores predictivos de la respuesta a la inhibición de HSP90 en el adenocarcinoma de pulmón.

Para detectar proteínas candidatas a biomarcadores de respuesta se buscaron aquellas proteínas comunes, entre las significativamente relacionadas con la sensibilidad o resistencia, a los diferentes inhibidores de HSP90 (Figura 29).

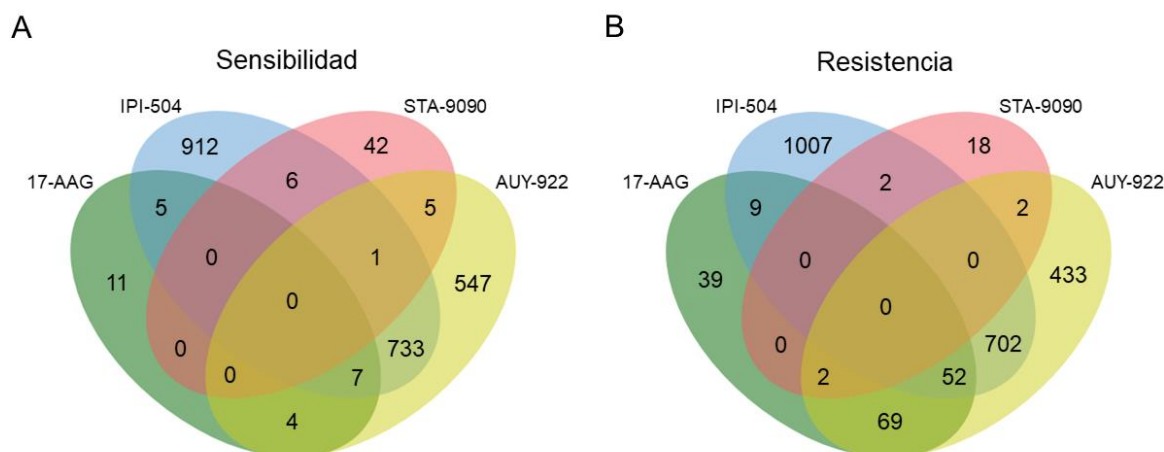


Figura 29. Clasificación de las proteínas conforme a la respuesta a la inhibición de HSP90. Diagramas de Venn de las proteínas significativamente relacionadas con (A) sensibilidad o (B) resistencia a los inhibidores de HSP90 en el panel de líneas celulares de adenocarcinoma de pulmón.

No se encontró ninguna proteína asociada con sensibilidad o resistencia común a todos los inhibidores de HSP90 estudiados. Centrándonos en sensibilidad, siete proteínas fueron correlacionadas con una respuesta apropiada a tres (17-AAG, IPI-504 y AUY-922) de los cuatro inhibidores estudiados. Estas proteínas fueron: lactato deshidrogenasa B (LDHB), adenilato quinasa 2 (AK2), ubiquitina dobladora modificadora-1 (UFM1), proteína ribosomal mitocondrial S23 (MRPS23), el dedo de zinc AN1 (ZFAND1), proteína 1 accesorio de anclaje a glicosilfosfatidilinositol (GPAA1) y proteína 1 de unión al tracto de polipirimidina (PTBP1). Aunque no se detectaron redes de interacción entre ellas, si fueron relacionadas con el enriquecimiento en la biosíntesis de novo de purina. Respecto a las familias de inhibidores de HSP90 (Figura 30), para los análogos de geldanamicina se detectaron 12 proteínas que correlacionan significativamente con la respuesta al tratamiento. Estas incluyeron además de las 7 comunes descritas anteriormente, el componente X de la piruvato deshidrogenasa mitocondrial (PDHX), la subunidad α de la proteína G(k) de unión a nucleótidos de guanina (GNAI3), la proteína 3 de unión al tracto de polipirimidina (PTBP3), DLGAP5 (proteína 5 asociada a discos grandes); y la subunidad δ de la ATP sintetasa mitocondrial (ATP5D) (Figura 30A). Estas proteínas se relacionaron con distintas rutas entre las que destacaron de nuevo la biosíntesis de novo de purina, asociado con las únicas proteínas que interaccionaron entre ellas (AK2, ATP5D y PDHX), y la ruta de señalización por PI3 quinasa (Figura 30C).

Resultados

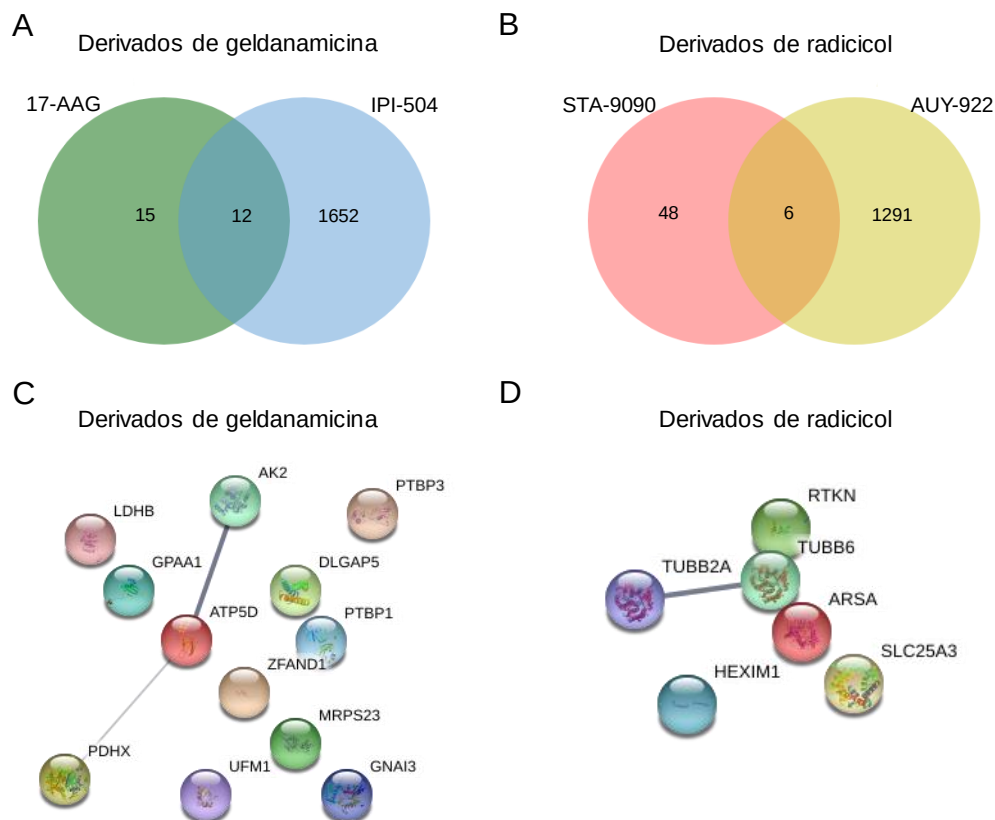


Figura 30. Estudio de las proteínas asociadas con la sensibilidad, de acuerdo a la familia de inhibidores de HSP90, en el panel de líneas de adenocarcinoma de pulmón. Proteínas comunes relacionadas con la sensibilidad a los análogos de (A) geldanamicina y (B) radicicol. Red de interacción de las proteínas asociadas con la sensibilidad frente a los inhibidores (C) 17-AAG e IPI-504 (análogos de geldanamicina) y frente a (D) STA-9090 y AUY-922 (análogos de radicicol). El grosor de la línea indica la fuerza con la que se avala cada interacción.

En los análogos de radicicol, se identificaron 6 proteínas asociadas con sensibilidad: rotequina (RTKN), la proteína transportadora de fosfato (SLC25A3), la proteína HEXIM1, arilsulfatasa A (ARSA), β -tubulina 2A (TUBB2A) y β -tubulina 6 (TUBB6) (Figura 30B). Estas proteínas se relacionaron con la ruta de la regulación del citoesqueleto por Rho GTPasas, vinculada a las dos tubulinas, y con los procesos biológicos de regulación del ciclo celular, regulación de la transcripción por la ARN polimerasa II y regulación de la actividad quinasa serina/treonina, vinculados principalmente a la proteína HEXIM1 (Figura 30D).

Con respecto a la resistencia tampoco se han identificado proteínas comunes a todos los inhibidores de HSP90, aunque de nuevo se hallaron para tres de los 4 inhibidores analizados. En concreto se identificaron la proteína transportadora de fosfato mitocondrial (SLC25A3) y la subunidad 2 de la decaprenil difosfato sintasa (PDSS2) como comunes a 17-AAG, STA-9090 y AUY-922. Estas proteínas estuvieron además relacionadas con el

proceso biológico de transporte transmembrana de aniones. Por otra parte se encontraron 52 proteínas relacionadas significativamente con la resistencia a 17-AAG, IPI-504 y AUY-922 (Figura 31). Entre ellas muestran un gran número de interacciones proteicas así como su implicación en la ruta de señalización Wnt (SMARCC1, SMARCC2 y SMARCA5) y en la replicación de ADN (TOP1).

Sesenta y una proteínas correlacionaron significativamente con la resistencia a los análogos de geldanamicina y 4 a los análogos de radicicol. La resistencia a los análogos de geldanamicina se relacionó de nuevo con la replicación del ADN puesto que las proteínas fueron las mismas que las compartidas por 17-AAG, IPI-504 y AUY-922 con la adición de 9 proteínas (AGK (acilglicerol quinasa), HDGFRP3 (proteína 3 relacionada con el factor de crecimiento derivado del hepatoma), TAF4 (subunidad 4 del factor de transcripción TFIID), EHD4 (proteína 4 con dominio EH), FNBP1L (proteína 1 de unión a formina), HDHD3 (proteína 3 que contiene el dominio haloácido dehalogenasa hidrolasa), IDH2 (isocitrato deshidrogenasa dependiente de NADP+), RRAGA (proteína A de unión a GTP homóloga de Ras) y HMGCS1 (hidroximetilglutaril-CoA sintasa)). El conjunto de las 61 proteínas se relacionaron con los procesos biológicos de regulación de la transcripción por ARN polimerasa II, la remodelación de la cromatina, el ensamblaje de snRNP del espliceosoma, la regulación de la secreción de citoquinas, autofagia y la señalización NIK/NF- κ B. Con respecto a las proteínas relacionadas con la resistencia a los análogos de radicicol se identificaron de nuevo las proteínas PDSS2 y SLC25A3 (que fueron comunes a 17-AAG, STA-9090 y AUY-922) junto con la proteína HEXIM1 y arilsulfatasa A (ARSA). Estas proteínas no mostraron enriquecimiento en ninguna ruta, pero si se relacionaron con procesos biológicos entre los que destacamos la regulación del ciclo celular, de la actividad quinasa serina/treonina y de la regulación de la transcripción por ARN polimerasa II. Esta última había sido previamente identificada en la resistencia a los análogos de geldanamicina.

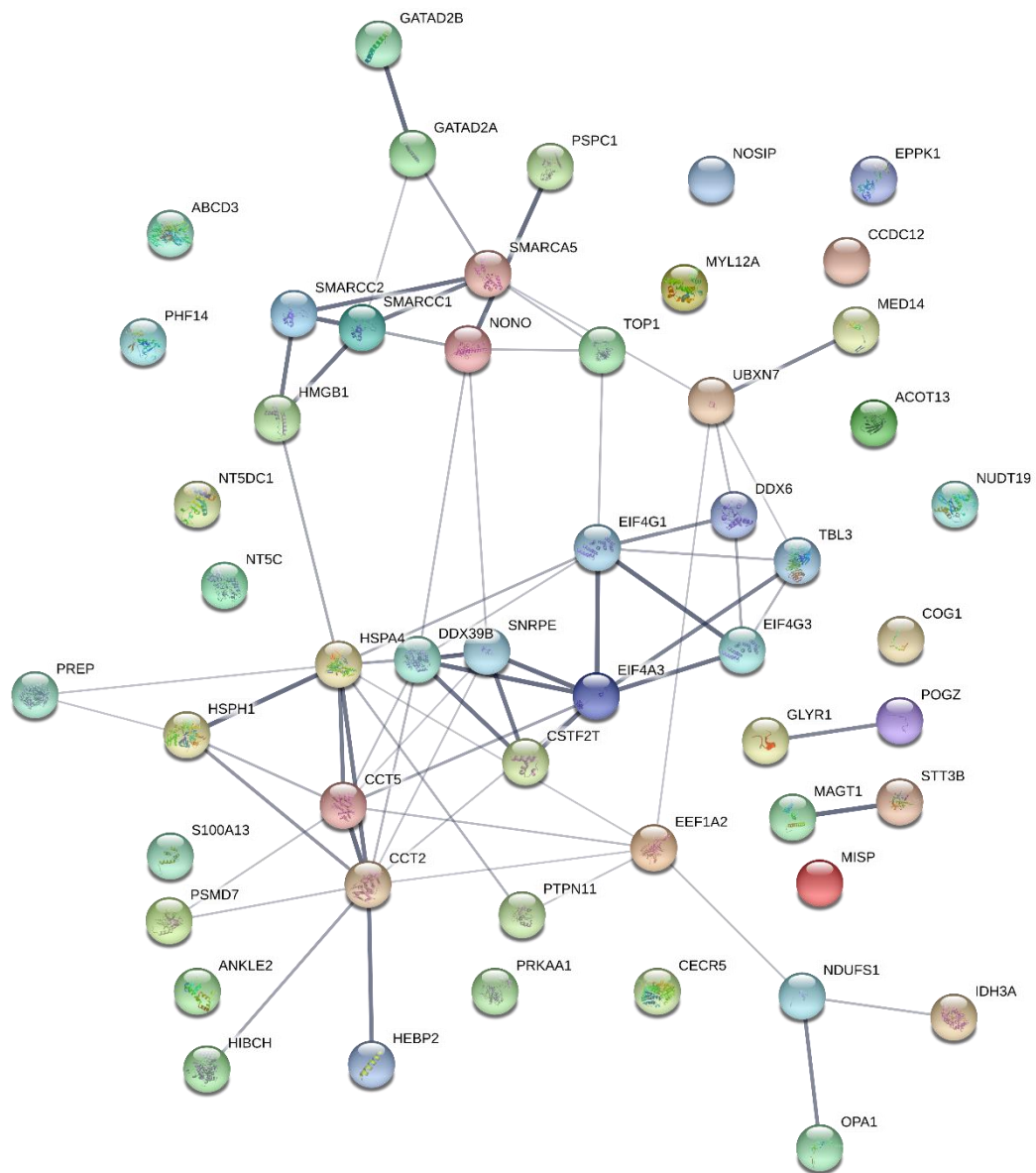


Figura 31. Interactoma de las 52 proteínas relacionados con la resistencia a 17-AAG, IPI-504 y AUY-922. El grosor de la línea indica la fuerza con la que se avala cada interacción.

3.3. Análisis funcional de las proteínas relacionadas con sensibilidad y resistencia a los inhibidores de HSP90.

Con el fin de identificar las rutas asociadas con la susceptibilidad a la inhibición de HSP90, se realizó la anotación funcional de las proteínas correlacionadas significativamente con sensibilidad y resistencia a los inhibidores estudiados (Tabla 24). Un total de 58 rutas fueron identificadas, de las cuales 6 se detectaron exclusivamente asociadas a proteínas correlacionadas con sensibilidad y 10 a proteínas correlacionadas con resistencia.

Tabla 24. Rutas asociadas con la susceptibilidad o resistencia a la inhibición de HSP90 en el panel de líneas celulares de adenocarcinoma de pulmón.

Sensibilidad	Resistencia
Biosíntesis de arginina	Biosíntesis de adrenalina y noradrenalina
Ruta del GnRHR	Biosíntesis de coenzima-A
Ruta opioide de la proencefalina	Coagulación de la sangre
Ruta opioide de la proopiomelanocortina	Degradación de ornitina
Señalización cannabinoide endógeno	Metabolismo de purinas
Señalización del receptor II GABA-B	Regulación general de la transcripción
	Ruta amiloide secretasa
	Ruta de p53 por privación de glucosa
	Ruta de señalización del receptor Toll
	Síntesis de vasopresina
GnRHR= receptor de la hormona liberadora de gonadotropina	

Entre los potenciales mecanismos de resistencia a la inhibición de HSP90, se destaca la ruta de p53 por privación de glucosa que además fue identificada como alterada tras la inhibición de HSP90 en el subgrupo molecular con mutación en KRAS. Por otra parte, entre las posibles rutas predictivas de la eficacia de la inhibición de HSP90 destacamos la biosíntesis de arginina. Esta ruta fue previamente identificada como alterada tras la inhibición de HSP90 en los subgrupos moleculares con mutación en EGFR y translocación EML4-ALK.

Discusión

En el presente trabajo de tesis doctoral se estudia, mediante el uso de diferentes técnicas proteómicas, diversos aspectos de la inhibición de HSP90 en el adenocarcinoma de pulmón. Estos ensayos nos han permitido evaluar la respuesta, dependiente del contexto molecular, a diferentes inhibidores de HSP90, así como identificar proteínas susceptibles de ser empleadas como biomarcadores pronósticos y predictivos de la inhibición de esta chaperona en el adenocarcinoma de pulmón. En su conjunto, los resultados aquí presentados, pretenden optimizar el uso de HSP90 como diana terapéutica en esta enfermedad.

Como primera aproximación al estudio se valoró la eficacia inhibitoria de cinco inhibidores de HSPs, 17-AAG, IPI-504, STA-9090, AUY-922 y VER-155008, en un panel de líneas celulares de adenocarcinoma de pulmón previamente caracterizadas. Todas las líneas celulares fueron más sensibles a los inhibidores de HSP90 que al inhibidor de HSP70 empleado (VER-155008). Estos datos están en consonancia con los de otros grupos que mostraron un valor de IC_{50} más elevado para este último inhibidor en comparación con los inhibidores de HSP90 [251], así como un menor poder inhibitorio de VER-155008 frente a inhibidores de HSP90 [252]. Centrándonos en los inhibidores de HSP90, nuestros resultados muestran como todas las líneas celulares de estudio fueron más sensibles a los análogos de radicicol (STA-9090 y AUY-922) que a los análogos de geldanamicina (17-AAG e IPI-504). Puesto que los análogos de radicicol son inhibidores de segunda generación y presentan una menor toxicidad off-target [253], era esperable su mayor eficacia.

En cáncer de pulmón los mejores resultados, tras la inhibición de HSP90, se han obtenido con análogos de radicicol y por ello son la única clase de estos inhibidores con ensayos en activo (NCT02503709, NCT02535338) en este tipo tumoral. Por su parte, las líneas celulares con mutación en el receptor EGFR o la translocación EML4-ALK fueron las más sensibles a los inhibidores de HSP90, siendo esta sensibilidad aún más acusada con los derivados de radicicol. En concordancia con estas observaciones, constatamos una fuerte y rápida degradación de los receptores EGFR y EML4-ALK en las líneas celulares con dependencia oncogénica de estos genes con aberraciones. Estos resultados muestran como la efectividad de estos inhibidores está directamente relacionada con la adición oncogénica de la línea celular a HSP90, siendo ejemplos paradigmáticos las líneas con translocación EML4-ALK y en concreto aquellas portadoras de la variante 1, demostrado a través de la rápida y completa degradación del receptor en la línea H3122. Esto puede ser debido a la posesión de una estructura proteica extremadamente inestable y por tanto más

dependiente de HSP90, tal y como ha sido descrito por Richards y colaboradores [254]. Como cabría esperar, los resultados más prometedores en ensayos clínicos de diferentes inhibidores de HSP90 se han obtenido en los subgrupos de pacientes portadores de la translocación EML4-ALK [200, 208]. Sin embargo, a pesar de encontrar una respuesta más acusada en las líneas con mutación en EGFR y translocación EML4-ALK, todas las líneas celulares de estudio presentaron expresión compensatoria de HSP70. Estos resultados confirman la correcta inhibición de HSP90 en nuestro panel de estudio, puesto que hasta el momento la expresión aumentada de HSP70 es el único biomarcador reconocido para monitorizar la respuesta a esta inhibición [250].

Una vez confirmada la correcta inhibición de HSP90 empleamos técnicas de electroforesis 2D, acopladas a espectrometría de masas, para analizar los cambios que tienen lugar en el proteoma de las líneas celulares de adenocarcinoma de pulmón en respuesta a los diferentes inhibidores de HSP90. Para cada línea celular estudiada, identificamos indudables alteraciones en los perfiles proteicos de las líneas tratadas en comparación a las no tratadas. Estas diferencias fueron notables tanto con los inhibidores de HSP90 empleados individualmente como tras la combinación con un inhibidor de HSP70. Las respuestas siempre fueron más acusadas con los tratamientos con derivados de radicicol, también causantes de una mayor desregulación proteómica en las líneas celulares en estudio.

Tal y como era esperable, las líneas celulares de adenocarcinoma de pulmón exhibieron, tras el tratamiento con los inhibidores de HSP90, notables cambios en la homeostasis de las HSPs los cuales llevaron a la desregulación de HSP70, HSP90, HSP60, HSC71, HSPA6 y la HSP70 mitocondrial (mitHSP70). Había sido previamente descrito que el tratamiento con inhibidores de HSP90 resulta, generalmente, en la inducción de la HSR y la consiguiente sobreexpresión de HSP70, mediada por HSF1 [255]. Por ello, la regulación al alza de HSP70 ha sido siempre relacionada con la confirmación de la inhibición de HSP90 [256]. Además de HSP70, la sobreexpresión de HSP90 ocurre tras su inhibición, debido tanto a la propia HSR como a la disociación de HSF1 de HSP90 [257]. De tal forma, en nuestro estudio hemos identificado esta respuesta compensatoria para cada inhibidor de HSP90 empleado así como para la combinación de inhibidores de HSP90 y HSP70. Continuando con las HSPs, encontramos la chaperona mitocondrial HSP60 desregulada en las líneas celulares HCC827 (EGFR m+) y H3122 (ALK t+) en respuesta a la inhibición de HSP90. Se ha descrito previamente el papel citoprotector de HSP60 en el proceso apoptótico [258, 259], y en concordancia una baja expresión de esta chaperona ha sido

propuesta como factor pronóstico favorable de supervivencia libre de enfermedad en cáncer de pulmón [260, 261]. De acuerdo con ello, esta proteína podría estar relacionada con la eficacia de estos inhibidores en la línea HCC827, donde se detectó infraexpresada tras los tratamientos con STA-9090 y 17-AAG+VER-155008. Sin embargo, HSP60 fue sobreexpresada en la línea H3122 en respuesta al inhibidor STA-9090. Este efecto en sentido opuesto puede indicar que, tal y como describiremos posteriormente, la HSR pudiera no ser tan relevante en esta como en otras líneas celulares. En paralelo se ha descrito que en células cancerosas la chaperona HSC71 se encuentra regulada a la alza promoviendo la proliferación celular [262]. Este comportamiento podría estar relacionado con una respuesta efectiva en la línea HCC827 (EGFR m+) donde se identificó la infraexpresión de HSC71 tras el tratamiento con los derivados de geldanamicina y radicicol. Por el contrario, la expresión de esta chaperona fue incrementada en respuesta a STA-9090 en la línea H3122 (ALK t+) así como en la H1437 (TN) tras el tratamiento con IPI-504. Sin embargo, este resultado aparentemente contradictorio estaría en consistencia con otros estudios, en diferentes tipos tumorales, donde se muestra el papel regulatorio de HSC71 en la HSR y homeostasis [249].

Otro miembro de la familia HSP70 identificado en nuestros experimentos fue la proteína HSPA6 inducible por estrés. Esta chaperona, que en condiciones normales es mínimamente expresada [263], fue inicialmente relacionada con supervivencia celular en respuesta a diferentes tipos de estrés extracelulares [264]. Sin embargo, su expresión ha sido recientemente correlacionada con la inhibición de la proliferación, migración e invasión, y responsable del efecto antitumoral de un nuevo tratamiento en cáncer de vejiga [265]. Estos resultados apoyan que su sobreexpresión, detectada en las líneas celulares H3122 y A549 tras la combinación inhibitoria de HSP90 y HSP70, podría estar relacionada con una conveniente respuesta al tratamiento. Finalizando con la familia HSP70, ha sido demostrado que mitHSP70, también conocido como mortalina, promueve y contribuye al proceso de carcinogénesis por distintas vías. Entre ellas destaca la unión e inactivación de la proteína supresora de tumores p53, que juega un papel clave en rutas anti-apoptóticas, en la regulación de la ruta RAS/RAF/MEK y en la activación de la señalización de la transición epitelio-mesénquima [266, 267]. La mortalina está enriquecida en muchos tipos de cáncer y su sobreexpresión ha sido sugerida como indicador de peor evolución en cáncer de pulmón [268]. Sin embargo, además de la expresión existen otros factores relacionados con la mortalina que deben ser considerados. En las células tumorales la mortalina responde a estrés, incluyendo químicos, y secuestra p53 en el citoplasma evitando la

apoptosis [269]. En base a esto, y puesto que la muerte celular inducida por la inhibición de HSP90 depende parcialmente de la ruta p53 [198], el estado mutacional del supresor de tumores podría ser responsable de una expresión diferencial de esta chaperona tras el tratamiento en diferentes líneas celulares. Debe ser tenido en cuenta que tanto p53 silvestre como mutado, así como Akt, cuya acción suprime la actividad de p53, han sido descritos como clientes de HSP90; por ello, la inhibición de esta chaperona conduciría a la activación de p53 silvestre o la regulación a la baja del mutante p53 [270, 271]. En concordancia con ello, tanto la degradación de mortalina tras la translocación nuclear de p53 silvestre en la línea con mutación en EGFR [272] como la acumulación de mortalina tras la ruptura del complejo HSP90-p53 mutada en la línea con translocación EML4-ALK [273] podrían estar conduciendo a una eficaz respuesta a los inhibidores 17-AAG y STA-9090, respectivamente. Además, el diferente estado mutacional de p53 podría estar relacionado con una mayor HSR en la línea celular H3122 (ALK t+) que en la línea HCC827 (EGFR m+), como se pudo observar con el incremento en la expresión de HSP90 α , HSP60 y HSC71, lo cual podría modular la respuesta a la inhibición [274]. En base a ello, en células de adenocarcinoma de pulmón con p53 mutado, tales como H3122, la sensibilidad a la inhibición de HSP90 podría ser incrementada a través de la restauración de la forma silvestre de p53.

Otros potenciales biomarcadores de respuesta a la inhibición de HSP90, detectados en esta primera aproximación, fueron EIF3SI, Rab-37, MLH1, AGR2, transcetolasa o citrato sintasa. La desregulación de EIF3, complejo multiproteico con un papel clave en la iniciación y finalización de la traducción así como en el reciclaje del ribosoma [275], ha sido correlacionada con el inicio y progresión del proceso tumoral [276-278]. Concretamente, la subunidad I del complejo EIF3 (EIF3SI) se ha encontrado sobreexpresada en diferentes tipos tumorales entre los que se incluyen adenocarcinoma y adenoma de colon, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, carcinoma hepatocelular, cáncer de mama, cáncer cervical y melanoma metastásico [279-283]. La sobreexpresión de EIF3SI conduce a un fenotipo celular maligno [284, 285] y podría promover angiogénesis tumoral [286, 287]. Por ello, la infraexpresión de EIF3SI observada en las líneas celulares HCC827 y H3122 tras el tratamiento con inhibidores de HSP90 nos conduce a hipotetizar cambios en esta proteína como efector de la respuesta en el adenocarcinoma de pulmón. Por otro lado, Rab-37 es una pequeña Rab-GTPasa que regula tanto rutas endocíticas y exocíticas como rutas de transducción de señal envueltas en proliferación celular, migración, nutrición, inmunidad innata y fragmentación de compartimentos [288-290]. En cáncer de pulmón,

una baja expresión de su ARNm ha sido asociada con el desarrollo de metástasis [291]. De acuerdo con ello, se ha demostrado que Rab-37 inhibe el proceso metastásico en cáncer de pulmón, mediante la exocitosis de TIMP1 (inhibidor tisular de la metaloproteinasa-1), el cual inactiva MMP9 (metaloproteinasa de la matriz extracelular-9) suprimiendo la señalización de la invasión celular [292, 293]. Sin embargo, MMP9 es cliente de HSP90 por lo que podría degradarse en respuesta a la inhibición de HSP90 e independientemente de Rab-37. Por esta razón, la expresión de esta GTPasa en respuesta a la inhibición de HSP90, puede estar difiriendo en las diferentes líneas estudiadas. Sin embargo, a pesar de que MMP9 no fue detectada en este estudio, podría ser considerada en futuros experimentos para la validación de su uso como posible indicador de la respuesta a la inhibición de HSP90.

Desde otro punto de vista, en el perfil proteico de respuesta a cada familia de inhibidores de HSP90 encontramos que aproximadamente el 50% de las proteínas diferencialmente expresadas fueron comunes en inhibidores de la misma familia. Además de proteínas como HSP70 y HSP90 α , anteriormente mencionadas, otras proteínas relevantes como MLH1 y AGR2 fueron detectadas en las dos familias de inhibidores de HSP90 estudiadas. MLH1 es uno de los miembros más importantes del sistema de reparación de los errores de emparejamiento del ADN [294]. Por tanto, su regulación a la baja se ha relacionado con progresión del tumor y resistencia a quimioterápicos en diferentes tipos tumorales, entre los que se encuentra el cáncer de pulmón [295-299]. En nuestro estudio, la línea celular HCC827, con mutación en EGFR, mostró una expresión incrementada de MLH1 tras el tratamiento con todos los inhibidores de HSP90. En base a ello sugerimos que, en este contexto, la inhibición podría estar restaurando la expresión de este supresor de tumores y en consecuencia podría promover la sensibilización de tumores resistentes a otras terapias. Por otra parte, AGR2 pertenece a la familia de proteínas disulfuro isomerasas (PDI) y actúa como chaperona en periodos de estrés fisiológico [300]. Esta proteína fue inicialmente considerada como oncogén, dada su elevada expresión en algunos tipos de cáncer y su posible implicación en la activación de rutas de supervivencia y metástasis [301]. Sin embargo, esta teoría ha sido reconsiderada debido a la probada infraexpresión de AGR2 en un amplio número de tumores [302-305]. En este sentido, una reciente publicación de Alves y colaboradores relacionó una mayor agresividad tumoral y peor supervivencia libre de progresión con una regulación a la baja de AGR2, p21 y ciclina D1 en presencia de p53 mutado en cáncer de ovario [306]. Estos últimos hallazgos estarían en concordancia con nuestro estudio donde AGR2 se encontró sobreexpresada en la línea

celular H3122, en respuesta a todos los tratamientos con inhibidores de HSP90. Globalmente estos datos pudieran indicar a AGR2 como posible biomarcador de la inhibición de HSP90 en tumores con la translocación EML4-ALK y p53 mutado.

Los análisis de anotación funcional realizados en nuestro estudio mostraron que las proteínas diferencialmente expresadas estuvieron involucradas en 40 rutas diferentes. Seis de estas rutas (apoptosis, glucólisis, PPP, metabolismo del piruvato, degradación de 5-HT y síntesis de ATP) fueron compartidas entre todos los inhibidores estudiados. Estos resultados demuestran la fuerte intervención de la inhibición de HSP90 sobre el metabolismo. Entre las rutas comunes resaltamos la PPP puesto que una de sus enzimas clave, la transcetolasa, se encontró desregulada tras el tratamiento con todos los inhibidores empleados. Concretamente, esta enzima cuya expresión se ha involucrado en el crecimiento tumoral [307], se detectó infraexpresada en la línea H3122 (ALK t+) tras la inhibición con IPI-504. Por otra parte, y puesto que uno de los sellos distintivos del metabolismo en el cáncer de pulmón es la hiperactividad de glucólisis independiente de la disponibilidad de oxígeno [308, 309], no es de extrañar que una de las rutas comunes alteradas tras la inhibición de HSP90 fuera la glucólisis. En nuestro ensayo se detectó una expresión desregulada de diferentes proteínas relacionadas con esta ruta metabólica, en concreto de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, piruvato quinasa, aldolasa, enolasa y gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, bajo los diferentes inhibidores de HSP90. En base a esto, proponemos el estudio de la glucólisis en general y de estas enzimas en particular para ahondar en su posible implicación en la respuesta a la inhibición de HSP90 en el adenocarcinoma de pulmón.

El estudio de la expresión proteica en respuesta al tratamiento con una familia específica de inhibidor, llevó a la identificación de seis rutas desreguladas tras el tratamiento con derivados de geldanamicina y once rutas tras el tratamiento con derivados de radicicol. Solo tres de estas rutas (glucólisis, PPP y metabolismo del piruvato) fueron compartidas entre familias, confirmando nuestros resultados previos sobre la importancia del metabolismo en la inhibición de HSP90. Por otra parte, entre las tres rutas desreguladas con geldanamicina, destacamos el ciclo de Krebs. Nuestros resultados muestran como la citrato sintasa, enzima clave en esta ruta, fue sobreexpresada en las líneas celulares con mutación en KRAS y triple negativa tras la inhibición con 17-AAG e IPI-504. Este aumento de expresión de la citrato sintasa tras el tratamiento con los análogos de geldanamicina, nos lleva a elucubrar sobre su implicación en un posible mecanismo de resistencia, puesto que en otras patologías, como el cáncer de ovario, la sobreexpresión de esta proteína tras

quimioterapia fue asociada con protección de la apoptosis [310, 311]. En lo que respecta a las 11 rutas específicas detectadas tras los tratamientos con derivados de radicicol, la biosíntesis de serina y glicina fue de las más notables, puesto que esta ruta metabólica además de llevar a cabo la producción de aminoácidos, purinas y pirimidinas, está conectada con la producción de NADH necesaria para mantener el balance redox [312]. La sobreexpresión de la síntesis de serina y glicina ha sido por tanto asociada con diferentes tipos tumorales [313, 314], incluyendo cáncer de pulmón donde la expresión de la enzima SHMT1 (serina hidroximetil transferasa 1) ha sido correlacionada con un buen pronóstico y la expresión de SHMT2 (serina hidroximetil transferasa 2) con un mal pronóstico [315]. En nuestros experimentos detectamos SHMT2 infraexpresada tras el tratamiento con STA-9090 en la línea con mutación en EGFR. Por ello proponemos el estudio de SHMT2 como posible indicador de la eficacia del tratamiento.

La respuesta a la inhibición de HSP90 difirió, no solo en base al inhibidor de HSP90 empleado, sino también conforme a las características moleculares intrínsecas de cada línea celular. Por ello, se procedió a estudiar dicha respuesta de acuerdo con los subtipos moleculares clínicamente más relevantes en el adenocarcinoma de pulmón. Para tal fin, además de ampliar las líneas y condiciones de estudio, se empleó la técnica proteómica de alto rendimiento iTRAQ acoplada a espectrometría de masas. Tras la inhibición de HSP90, las proteínas clientes de HSP90 se disocian de esta chaperona y son degradadas vía proteosoma [175, 176]. En concordancia con ello, en nuestros experimentos se detectó globalmente un mayor número de proteínas infraexpresadas. Asimismo, centrándonos en la fracción de proteínas desreguladas de modo significativo, en la mayoría de condiciones y líneas celulares de estudio se mantuvo esta relación con un mayor número de proteínas infraexpresadas. Sin embargo, el amplio interactoma de HSP90 no solo incluye sus proteínas clientes, sino también muchas proteínas que se encuentran sobreexpresadas tras su inhibición, siendo en muchos casos este número similar al de proteínas infraexpresadas [316]. Nosotros identificamos que tras silenciar HSP90, nuestro control positivo, en un amplio número de líneas celulares provocó un incremento en el número de proteínas sobreexpresadas con respecto a las infraexpresadas. En la línea celular H3122 (ALK t+), representante del subtipo molecular con mejor respuesta en la práctica clínica, fue donde encontramos este aumento de proteínas sobreexpresadas bajo más condiciones terapéuticas, concretamente bajo los inhibidores de radicicol, la combinación inhibitoria de HSP90 y HSP70 así como tras el silenciamiento génico. Este incremento de proteínas sobreexpresadas es concordante con datos experimentales de diferentes autores [317,

318] que correlacionan la eficacia de la inhibición de HSP90 con el aumento en la expresión de determinadas proteínas. Siguiendo esta línea de estudio, encontramos un mayor número de proteínas desreguladas bajo los análogos de geldanamicina que bajo los análogos de radicicol. Esto es debido a la elevada cantidad de proteínas infraexpresadas, principalmente tras el tratamiento con 17-AAG, que superaron en número incluso a la condición control. Este fenómeno podría subyacer a los efectos colaterales e indeseados de 17-AAG. De hecho la elevada toxicidad del fármaco llevó a la suspensión de su desarrollo clínico [163, 253].

El siguiente paso fue identificar las proteínas diferencialmente expresadas significativa y específicamente tras la inhibición de HSP90, en los distintos subtipos moleculares de adenocarcinoma de pulmón. De las 1831 proteínas identificadas, solo dos, ADI1 y RRP1, fueron comúnmente desreguladas en todos los subgrupos estudiados. Este bajo porcentaje sugiere que la respuesta a la inhibición de HSP90 es, a nivel proteico, sumamente dependiente del contexto molecular. Ambas proteínas comunes pudieran ser relevantes debido a su potencial uso en la monitorización de la respuesta a los inhibidores de HSP90 aquí estudiados. En el caso de ADI1, fue descrita por primera vez en 2004 por Uekita y colaboradores [319] como un miembro de una superfamilia proteica extremadamente diversa funcionalmente, las cupinas [320]. Esta proteína es una acireductona-dioxigenasa que forma parte de la ruta de recuperación de la metionina y requiere Fe^{2+} o Ni^{2+} como cofactores para ejecutar sus diferentes reacciones en la ruta [321]. Sin embargo, la primera función identificada de esta proteína fue la unión e inhibición de MT1-MMP (metaloproteinasa de la matriz extracelular asociada a la membrana, tipo 1), una proteína oncogénica implicada en la invasión y progresión tumoral [319, 322, 323]. En base a esto, y debido a la reducida expresión de ADI1 en diferentes tipos tumorales, esta proteína ha sido propuesta como un posible supresor de tumores en varios tipos de cáncer [319, 322, 324, 325]. No obstante, se han descrito otros mecanismos por los cuales ADI1 podría funcionar como supresor de tumores. Concretamente la sobreexpresión de ADI1 se correlaciona con una mayor tasa de apoptosis, lo cual podría ser consecuencia del incremento en los metabolitos producidos por esta enzima en la ruta de recuperación de la metionina [324, 325]. Independientemente del modo de acción está demostrado su papel como supresor de tumores, haciendo del aumento de expresión de ADI1, detectado tras la inhibición de HSP90 en todos los subtipos moleculares de adenocarcinoma de pulmón, un potencial indicador de una respuesta adecuada.

RRP1 ha sido descrito como un factor clave en la biogénesis del ribosoma [326]. Hasta la fecha se ha demostrado su participación tanto en la rotura del transcrito precursor de ARN ribosomal 47S en pre-40S y pre-60S [327], como en la separación física de ambos precursores [328] que darán lugar, respectivamente, a las subunidades pequeña y grande del ribosoma. Puesto que, en las células humanas, ambos procesos son esenciales para su biogénesis, la degradación de RRP1 detectada en nuestros experimentos, amenaza la síntesis de proteínas afectando directamente a la viabilidad celular. Por tanto, la infraexpresión de esta proteína podría ser considerada como un indicativo de correcta inhibición de HSP90, independiente del subtipo molecular de adenocarcinoma de pulmón.

De acuerdo con los resultados obtenidos a través de la anotación funcional, de las proteínas asociadas a cada subtipo molecular de adenocarcinoma de pulmón, se observó que las rutas desreguladas tras la inhibición de HSP90 estuvieron principalmente relacionadas con la síntesis de aminoácidos en el grupo de líneas con mutación EGFR y con rutas de señalización celular, principalmente aquellas que incluyeran interleuquinas o endotelinas, en el grupo de triple negativas. Por su parte, en las líneas celulares con translocación EML4-ALK fueron destacables las rutas relacionadas con factores de crecimiento celular, al igual que para el grupo con mutación en KRAS, donde además sobresalieron aquellas relacionadas con la síntesis de nucleótidos. La única ruta comúnmente alterada en todos los subgrupos moleculares estudiados, tras la inhibición de HSP90, fue la de la apoptosis. Estos resultados estarían en concordancia con los obtenidos mediante 2-DE donde una de las seis rutas comunes, tras el tratamiento con los diferentes inhibidores de HSP90 estudiados, fue la apoptosis. En base a ello, y puesto que la deficiente actividad de HSP90 induce la apoptosis en cáncer de pulmón [193, 199], nuestros resultados demostrarían como este proceso de muerte celular es un evento clave durante la inhibición farmacológica de HSP90 en el adenocarcinoma de pulmón, independientemente del subtipo molecular y del inhibidor empleado.

La desregulación de la biosíntesis de arginina se identificó en los subgrupos de líneas con mutación en EGFR y translocación en ALK. La arginina es un aminoácido semi-esencial que se torna imprescindible en el crecimiento tumoral, debido principalmente a la elevada demanda energética necesaria para mantener la intensa proliferación [329]. Además, este aminoácido es considerado multifuncional debido a que los compuestos sintetizados a partir del mismo, como la ornitina, agmatina, guanidinoacetato, urea y óxido nítrico (NO), participan en una amplia gama de eventos celulares y metabólicos [330, 331]. Las enzimas metabolizadoras de arginina se encuentran ausentes o disminuidas en muchos

tipos de cánceres [332]. En concreto la arginosuccinato sintasa 1 (ASS1) es deficiente en diferentes tipos tumorales como melanoma, carcinoma hepatocelular y carcinoma de próstata [333, 334]. Sin embargo, ASS1 se encuentra sobreexpresada en otros tipos de cáncer como pulmón, colon, gástrico y de ovario [335]. Es posible que los altos niveles de ASS1 apoyen la proliferación y agresividad tumoral, a través del incremento de arginina que se traduciría en un aumento en la producción de NO [336]. Ha sido descrito que el NO puede afectar diferencialmente a la proliferación y viabilidad celular según la concentración del mismo. De tal modo, aceleraría la progresión tumoral a bajas concentraciones estimulando la proliferación de las células cancerígenas, ejerciendo, sin embargo, un efecto citotóxico a alta concentraciones debido a la inducción de daño en el ADN así como mutaciones génicas seguidas de apoptosis [337]. En base a ello, elevar *in extremis* los niveles de NO a través de donantes ha sido empleado como estrategia terapéutica reduciendo directamente la progresión tumoral e indirectamente incrementando el flujo sanguíneo tumoral mejorando la administración de la terapia citotóxica al tejido tumoral [338, 339]. Concretamente, en cáncer de pulmón no microcítico se ha demostrado el potencial del gliceril-trinitrato, donante de NO, como agente quimio-sensibilizante [340]. Además, en un ensayo clínico en fase II de RRx-001, se demostró como el pretratamiento con este donante de NO sensibilizó a pacientes con cáncer de pulmón refractario al quimioterápico carboplatino [341]. Estos resultados estarían en concordancia con aquellos detectados en nuestro grupo de líneas celulares con translocación EML4-ALK donde, tras la inhibición de HSP90, se produjo el aumento de ASS1. Este fenómeno podría estar induciendo citotoxicidad, a través del exceso de NO, en este subtipo molecular además de capacitar una posible terapia combinada. Sin embargo, en el grupo de líneas con mutación en EGFR se detectó una infraexpresión de ASS1 tras el tratamiento con los inhibidores de HSP90. Diferentes tipos tumorales muestran una variabilidad en la expresión de esta enzima, que hacen las células cancerígenas dependientes o independientes de arginina exógena [334]. En los casos de dependencia, la privación de arginina ha sido confirmada como una excelente estrategia terapéutica [342, 343]. Sin embargo, estos tumores suelen desarrollar resistencia a los agentes inductores de la privación y uno de los mecanismos principales para lograr este fenómeno es el uso del aspartato citosólico que no ha sido utilizado por ASS1 para la síntesis de arginina. Concretamente, el aspartato citosólico es empleado por el complejo enzimático CAD, constituido por carbamilsintasa, aspartato transcarbamilasa y dihidroorotasa, para la síntesis de nucleótidos de pirimidina y promoción de la proliferación celular [344]. Sin embargo, en los resultados obtenidos en nuestras líneas con mutación en EGFR tras la inhibición de HSP90 encontramos, además

de la infraexpresión de ASS1, la reducción de CAD. Esta doble disminución proteica podría estar impidiendo o al menos debilitando el mecanismo proliferativo, previamente descrito, propio de células ASS1 deficiente. En conjunto estos resultados apoyan la desregulación de la síntesis de arginina tras la inhibición de HSP90, en el adenocarcinoma de pulmón con mutación en EGFR o translocación EML4-ALK, como un mecanismo clave con potencial para bloquear la proliferación celular en estos subtipos moleculares, el cual debería ser estudiado en profundidad. Además es destacable que entre los diez procesos biológicos más significativos en cada subtipo molecular de estudio, el metabolismo y biosíntesis de aminoácidos fue el único proceso biológico común en las líneas celulares con mutación en EGFR y translocación EML4-ALK.

Por otra parte, la ruta de la ubiquitina-proteosoma y la de replicación del ADN, fueron alteradas en los subtipos moleculares con mutación en KRAS y triple negativo del adenocarcinoma de pulmón tras la inhibición de HSP90. Puesto que la ubiquitinación y degradación en el proteosoma son pasos imprescindibles en la respuesta a la inhibición de HSP90 [175, 176], nos centramos en la desregulación de diferentes enzimas esenciales de esta ruta. En concreto destacamos la expresión diferencial de las proteínas ITCH (E3 ubiquitín-ligasa homólogo de Itchy) y UBE2L3 (enzima E2 L3 conjugadora de ubiquitina) entre los diferentes subtipos moleculares de adenocarcinoma de pulmón. La E3 ubiquitín-ligasa ITCH inhibe indirectamente la ruta de señalización Wnt/ β -catenina [345]. La activación aberrante de esta vía es crucial en la iniciación, progresión y metástasis del cáncer de pulmón [346, 347]. Por ello, se ha confirmado como el incremento en la expresión de ITCH, normalmente infraexpresado en el cáncer de pulmón, regula la proliferación celular del mismo inhibiendo la activación de la ruta Wnt/ β -catenina [348]. ITCH pertenece al grupo de proteínas cuyo cambio de expresión tras el tratamiento con los inhibidores de HSP90 desregulan la ruta de la ubiquitina-proteosoma en el subgrupo molecular de líneas celulares con mutación en KRAS. Esta proteína se encontró infraexpresada en este subgrupo así como en el triple negativo, mientras se detectó sobreexpresada bajo la mayoría de condiciones en los subtipos moleculares con mutación en EGFR y translocación EML4-ALK. Por tanto, sugerimos que esta E3 ubiquitín-ligasa podría estar implicada en la respuesta diferencial tras la inhibición de HSP90, siendo esta más efectiva en los subgrupos moleculares (EGFR m+ y ALK t+) donde ITCH aumentó su expresión. Por su parte UBE2L3 forma parte de las proteínas involucradas en la desregulación de la ruta de la ubiquitina-proteosoma en el subgrupo molecular de líneas triple negativas, aunque cambios en su expresión fueron detectados en todos los

subgrupos moleculares aquí estudiados. Es conocido el papel de la ubiquitinación en cáncer, controlando mediante proteólisis la estabilidad de proteínas supresoras de tumores así como el producto de diferentes oncogenes [349, 350]. En concreto, UBE2L3 ha sido relacionada con la estabilidad de la proteína 1 de unión al supresor de tumores p53, c-FOS o el precursor de NF- κ B p105, demostrando la relación entre esta enzima y la carcinogénesis [351, 352]. En concordancia con ello, UBE2L3 ha sido detectada sobreexpresada en diferentes tejidos y líneas celulares de CPNM y su nivel de expresión ha sido directamente relacionado con el estadio TNM de los pacientes. Además, se ha descrito su papel regulatorio del crecimiento celular, a través de la ubiquitinación y posterior degradación del supresor de crecimiento p27Kip1. En base a todo lo anteriormente descrito, UBE2L3 ha sido propuesta como una potencial diana terapéutica en CPNM [353]. En nuestros resultados, esta enzima se encontró sobreexpresada en los subgrupos moleculares triple negativo y con mutación en KRAS, donde se detectó una evidente desregulación de la vía de la ubiquitina-proteosoma. Por el contrario, esta enzima se encontró significativamente infraexpresada en los subtipos moleculares con mutación en EGFR y translocación EML4-ALK, hecho que podría estar relacionado con una respuesta más eficaz. Globalmente, estos datos indican que la sobreexpresión de UBE2L3 y/o la infraexpresión de ITCH podrían estar favoreciendo la proliferación celular en los subgrupos de adenocarcinoma de pulmón con mutación en KRAS y triple negativo, dificultando en estos contextos el potencial antitumoral de los inhibidores de HSP90.

A continuación se identificaron las proteínas correlacionadas con la respuesta a la inhibición de HSP90 y por tanto con potencial de ser predictivas de la eficacia de estos inhibidores en pacientes con adenocarcinoma de pulmón. Según los resultados mostrados, los inhibidores de HSP90 STA-9090 y AUY-922 mostraron más proteínas correlacionadas significativamente con sensibilidad que con resistencia, ocurriendo lo contrario para los inhibidores 17-AAG e IPI-504. Estos datos podrían indicar, en las líneas celulares de estudio y por ende en los pacientes con adenocarcinoma de pulmón, una mayor predisposición a la efectividad del tratamiento con los inhibidores de HSP90 análogos de radicicol.

En los experimentos con los derivados de geldanamicina encontramos 12 proteínas comúnmente relacionadas con sensibilidad. Entre ellas destacamos la LDHB, una de las isoenzimas de la lactato deshidrogenasa humana (LDH). LDH es la enzima metabólica primaria que convierte el piruvato en lactato y viceversa. Ambas isoenzimas de LDH se encuentran desreguladas en células cancerígenas donde además está involucrada en la regulación del intercambio de nutrientes entre tumor y estroma [354]. Existen datos

opuestos sobre LDHB como biomarcador de prognosis o respuesta a quimioterapia. Por una parte, ha sido descrito el poder de esta enzima metabólica en la predicción a resistencia a quimioterápicos en cáncer colorrectal [355]. Sin embargo, existen otros estudios como el de Dennison y colaboradores que demuestran que una elevada expresión de LDHB se relaciona con una mejor respuesta a quimioterapia adyuvante en cáncer de mama [356]. A su vez, ha sido descrita la elevada expresión de esta enzima en líneas celulares y pacientes de adenocarcinoma de pulmón que presentan amplificación y mutación en KRAS [357]. En base a ello, en el ensayo clínico GALAXY-1, donde se evaluaba la eficacia del inhibidor de HSP90 STA-9090 en combinación con docetaxel, en pacientes con CPNM, los dos grupos de estudio lo conformaban por una parte pacientes con un nivel elevado de LDH y por otra pacientes con mutación en KRAS. Cabe destacar que en el grupo de pacientes con elevada LDH se observó, tras la terapia combinada, una prolongación de la supervivencia global así como una tendencia positiva en la supervivencia libre de progresión [190]. Estos resultados son promisorios a pesar de que el estudio no discernió entre las isoformas A y B de esta enzima metabólica. Por todo ello, LDHB pudiera poseer un papel predictivo de la eficacia a los inhibidores de HSP90, que no debería quedar exento de ser estudiado en futuras investigaciones y ensayos clínicos. Otra de las proteínas destacables en este grupo fue GNAI3, la cual está además envuelta en la señalización de la vía de PI3K. Estos resultados estarían en concordancia con el análisis del desarrollo de la respuesta realizado por electroforesis bidimensional, donde la señalización por PI3K se detectó desregulada tras la inhibición con IPI-504 en la línea celular H3122 (ALK t+), una de las más sensibles. Además, la subunidad catalítica alfa (PIK3CA) se detectó infraexpresada, consecuencia del tratamiento con análogos de geldanamicina, en aquellas líneas en las que fue identificada mediante iTRAQ. Ha sido demostrado el papel clave de HSP90 en la regulación del crecimiento tumoral a través de la ruta PI3K/AKT [198], asociado principalmente a la degradación de su cliente AKT [358]. Sin embargo, recientes resultados de nuevos inhibidores de HSP90 proponen PI3K como elemento clave en la respuesta, sugiriendo incluso la doble inhibición como terapia óptima [359]. Estos hallazgos aportan consistencia a nuestros resultados proponiendo la señalización de PI3K como un evento fundamental en la predicción de la eficacia de la inhibición de HSP90 en el adenocarcinoma de pulmón.

Entre las 61 proteínas relacionadas con la resistencia a los inhibidores de HSP90 análogos de geldanamicina, destacamos la proteína TOP1. Esta enzima regula la topología del ADN durante la replicación y transcripción; por ello su expresión es más elevada, en

comparación con tejido sano, en distintos tipos tumorales entre los que se incluye el cáncer de pulmón [360]. La baja expresión de esta enzima se ha propuesto como un buen factor pronóstico relacionado con una mayor supervivencia global en pacientes, previamente operados, con CPNM [361]. Estos datos estarían en consonancia con los obtenidos en este trabajo donde los niveles de expresión de TOP1, y la ruta de replicación de ADN en la que está involucrada, se correlacionan positivamente con la resistencia a los análogos de geldanamicina. Es destacable que la replicación de ADN fue una de las rutas relacionadas con la respuesta a los inhibidores de HSP90 en los subgrupos moleculares de CPNM con mutación en KRAS y triple negativo. Por ello, y puesto que diferentes inhibidores de TOP1 son usados clínicamente para el tratamiento de CPM, cáncer de ovario y cervical [362], la doble inhibición con inhibidores de HSP90 análogos de geldanamicina e inhibidores de TOP1, podría ser una estrategia terapéutica a testar en subtipos de adenocarcinoma de pulmón con elevada expresión de TOP1. Otra ruta biológica correlacionada con la resistencia a los análogos de geldanamicina fue la ruta de señalización Wnt. Tal y como mencionamos anteriormente, está implicada en la iniciación, progresión y metástasis del CPNM [346, 347], y según nuestros resultados está correlacionada con la respuesta a la inhibición de HSP90 en los subtipos moleculares con mutación en KRAS y triple negativo. En base a ello, el bloqueo de esta ruta de señalización, junto con la inhibición de HSP90 a través de 17-AAG o IPI-504, podría ser una aproximación lógica para eludir la resistencia a estos inhibidores en pacientes con adenocarcinoma de pulmón triple negativo o con mutación en KRAS. Debemos señalar que la señalización Wnt está implicada en la resistencia debido a la correlación entre la abundancia de las proteínas SMARCC1, SMARCC2, SMARCA5 con la falta de respuesta a los análogos de geldanamicina. Entre ellas destaca la proteína remodeladora de cromatina SMARCC1, descrita como posible biomarcador de la eficacia a un tratamiento anticancerígeno. Concretamente, una baja expresión de esta proteína se asoció con resistencia a gemcitabina en cáncer pancreático [363]. Además, esta proteína ha sido relacionada con HSP90 puesto que ha sido descrita la disminución de su expresión en respuesta a inhibidores de esta chaperona en cáncer de vejiga [316]. Con respecto a SMARCC2 componente, al igual que SMARCC1, del complejo remodelador de cromatina SWI/SNF existe información limitada. Siendo solo destacable la descripción de un aumento en su expresión génica, en comparación con tejido no tumoral, detectado en CPNM epidermoide [364]. Finalmente, con respecto al otro miembro de la familia SWI/SNF cuya abundancia se correlaciona con resistencia a geldanamicina, SMARCA5, se ha descrito la relación entre su sobreexpresión y proliferación en cáncer gástrico y de mamá [365, 366]. Además es destacable que esta proteína forma, junto con

BAZ1B, un complejo remodelador de cromatina que facilita el acceso de TOP1 a la horquilla de replicación. La sobreexpresión de BAZ1B, y por ende la de SMARCA5, facilitaría la función de TOP1 durante la replicación del ADN afectando a la respuesta de las células cancerígenas a inhibidores de TOP1 u otros tratamientos que afecten sobre la replicación [367]. Estos datos apoyarían nuestros resultados respaldando el papel de SMARCA5 en la resistencia a los inhibidores de HSP90. Por todo ello consideramos relevante profundizar en el estudio de los tres miembros identificados del complejo SWI/SNF (SMARCC1, SMARCC2 y SMARCA5), junto con TOP1, como posibles biomarcadores predictivos de resistencia a los inhibidores análogos de geldanamicina en el adenocarcinoma de pulmón.

En cuanto a los inhibidores análogos de radicicol, la sensibilidad a la inhibición de HSP90 ha sido asociada con la abundancia de rotequina. No existe mucho conocimiento acerca de las funciones de esta proteína efectora de Rho-GTPasa [368], sin embargo su sobreexpresión ha sido asociada con varios tipos de cáncer incluyendo de vejiga [369], mama [370], gástrico [371] y carcinoma hepatocelular [372], entre otros. Recientemente, la sobreexpresión de rotequina también ha sido propuesta en cáncer de pulmón como potencial factor oncogénico favoreciendo el crecimiento y proliferación celular [373]. Esta proteína interactúa directamente con las proteínas Rho GTPasa e interfiere con la conversión a su forma inactiva [374]. Es destacable que, entre otros cometidos, estas proteínas son reguladores clave del citoesqueleto en múltiples funciones celulares como migración, adhesión y citocinesis [375]. Nosotros identificamos la regulación del citoesqueleto por Rho GTPasa, como única ruta asociada a la sensibilidad a los análogos de radicicol en el adenocarcinoma de pulmón. Estos datos estarían alineados con los resultados publicados por Memmel y colaboradores donde se muestra como el análogo de radicicol AUY-922 ejerce un fuerte efecto anti-migratorio en células tumorales debido principalmente a la reorganización del citoesqueleto, cuyas proteínas son clientes de HSP90 [376]. Por otro lado, en nuestros resultados también destacó la asociación de PDSS2 con la resistencia a esta familia de inhibidores. PDSS2 es esencial para la actividad de la enzima decaprenil difosfato sintasa, la cual posee un papel crítico en la biosíntesis de la coenzima Q10 (CoQ10) [377]. CoQ10 es la forma predominante de ubiquinona endógena y por ello esencial para el transporte de electrones en la cadena respiratoria mitocondrial así como para la defensa antioxidante [378]. PDSS2 suele encontrarse deficiente en distintos tipos tumorales [379, 380], entre los que se incluye el cáncer de pulmón no microcítico [381]. Por ello, ha sido propuesta como supresor de tumores [379, 381] sin embargo su papel en el desarrollo tumoral, diferenciación y prognosis no ha sido

establecido. Además, en el último estudio relacionado con esta enzima en cáncer de pulmón no microcítico la inhibición de la expresión de PDSS2, en la línea celular H1299, no provocó cambios en el crecimiento celular ni en la formación de colonias [382] poniendo en controversia su función como supresor de tumores. Otros autores han sugerido la asociación entre la síntesis de CoQ10 y la disminución de la eficacia de diferentes agentes quimioterápicos en células cancerígenas, debido al poder antioxidante de la coenzima [383]. Todos estos datos estarían en concordancia con nuestros resultados donde la abundancia de PDSS2, y por tanto de CoQ10, ha correlacionado significativamente con la resistencia a los análogos de radicicol en líneas celulares de adenocarcinoma de pulmón.

Finalmente, se llevó a cabo la anotación funcional de todas las proteínas cuya abundancia a nivel basal relacionaban con sensibilidad o resistencia a los inhibidores de HSP90. Entre las rutas correlacionadas con la resistencia a la inhibición, destacamos la de p53 por privación de glucosa. Las proteínas identificadas como responsables de la desregulación de esta ruta fueron: IGBP1 (proteína 1 de unión a inmunoglobulina), AKT1 (proteína quinasa de serina treonina RAC-beta), AKT2 (proteína quinasa de serina treonina RAC-alfa), PRKAA1 (subunidad catalítica alfa-1 de la proteína quinasa AMP-activada) y mTOR (proteína quinasa de serina treonina mTOR). Es subrayable que esta ruta fue anteriormente asociada, en el estudio de la inhibición de HSP90 según el contexto molecular, con la respuesta a los inhibidores en las líneas celulares con mutación en KRAS, representativas de los pacientes que hasta el momento han presentado la respuesta clínica más limitada. Por todo ello, sugerimos la importancia de ahondar en el estudio de las proteínas implicadas en la ruta de p53 por privación de glucosa, dado su posible papel predictor de la respuesta a la inhibición de HSP90 en el adenocarcinoma de pulmón. Por otro lado, entre las rutas correlacionadas con la sensibilidad a los inhibidores de HSP90 destacamos la biosíntesis de arginina. Resaltamos esta ruta puesto que, de manera independiente, la identificamos en nuestros anteriores ensayos como esencial para el desarrollo de la respuesta ante los inhibidores de HSP90 en los subgrupos moleculares con mutación en EGFR y translocación EML4-ALK, representantes de los pacientes con adenocarcinoma de pulmón con una mejor respuesta clínica a la inhibición. En base a ello y debido al indispensable papel de este aminoácido en la proliferación celular [329], destacamos el potencial de ASS1, enzima responsable de la síntesis de arginina [336], identificada en nuestros análisis como posible predictor de la sensibilidad a la inhibición de HSP90 en el adenocarcinoma de pulmón.

En resumen, diferentes metodologías proteómicas fueron empleadas para evaluar la inhibición de HSP90 en el adenocarcinoma de pulmón, con el fin de identificar proteínas susceptibles de ser usadas como biomarcadores para predecir o monitorizar la respuesta, además de aumentar los conocimientos acerca del mecanismo de acción de los inhibidores en este tipo tumoral. A través de la aproximación proteómica de electroforesis bidimensional emparejada a espectrometría de masas, se identificaron perfiles proteómicos diferenciales en respuesta a distintos inhibidores de HSP90 en líneas celulares de adenocarcinoma de pulmón. Los resultados hallados aportan evidencias de las diferencias en el modo de acción de los inhibidores, principalmente dependiente de la familia empleada, así como una firma proteica común a la inhibición de HSP90 en la que destacan las proteínas HSC71, EIF3SI, transcetolasa, Rab-37, citrato sintasa, AGR2 o MLH1. Sin embargo y debido a la variabilidad, relacionada con el contexto molecular, hallada en la respuesta de las líneas celulares de estudio, se aumentó el número de líneas empleadas y, a través de la aplicación de la tecnología iTRAQ, se identificaron perfiles proteómicos característicos de la inhibición de HSP90 en los diferentes subgrupos moleculares de adenocarcinoma de pulmón. Los datos obtenidos proporcionaron información acerca de los mecanismos de acción de los inhibidores de HSP90, los cuales diferían en base al contexto molecular de la línea celular empleada. Además, estos resultados potenciaron la identificación de posibles dianas terapéuticas susceptibles de ser usadas en combinación con la inhibición de HSP90. Finalmente, los datos de abundancia proteica previa al tratamiento con los inhibidores de HSP90, obtenidos de nuevo con la metodología iTRAQ, permitió la búsqueda de proteínas susceptibles de ser consideradas como potenciales biomarcadores predictivos de sensibilidad o resistencia a la inhibición en las líneas celulares de estudio. La anotación funcional del conjunto de proteínas alteradas tras la inhibición sugiere la importancia de la apoptosis y determinadas rutas metabólicas en la eficacia de la respuesta a los inhibidores de HSP90 en el adenocarcinoma pulmonar.

En base a todo lo anteriormente descrito y teniendo en cuenta las limitaciones del estudio realizado, basado exclusivamente en datos obtenidos *in vitro*, el estudio y validación *in vivo* de los potenciales biomarcadores y mecanismos de respuesta a la inhibición de HSP90 en el adenocarcinoma de pulmón aquí propuestos, son requeridas para fundamentar la importancia de los mismos. Esta limitación viene dada por la carencia de muestras de pacientes sometidos a tratamiento con inhibidores de HSP90, principalmente debido a la toxicidad presentada por los inhibidores testados clínicamente y a la escasez de respuesta al tratamiento por parte de los pacientes con adenocarcinoma de pulmón. Por

todo ello, el empleo de las proteínas sugeridas en la presente tesis doctoral como posibles biomarcadores predictivos de la respuesta a la inhibición de HSP90, contribuirían a la selección de pacientes potencialmente respondedores a este tratamiento. Asimismo, el tratamiento combinado de inhibidores de HSP90 con agentes activadores o bloqueantes de proteínas o rutas biológicas propuestas como relevantes en la respuesta, podrían disminuir la dosis farmacológica y por ende la toxicidad a la que los pacientes se exponen. Además, las proteínas propuestas como potenciales biomarcadores de respuesta ayudarían a la monitorización de la reacción de los pacientes de adenocarcinoma de pulmón ante el tratamiento con inhibidores de HSP90. Por consiguiente, los datos aquí expuestos podrían ayudar a aumentar el beneficio de la inhibición de HSP90 como estrategia terapéutica en los pacientes con adenocarcinoma de pulmón.

Conclusiones

1. Las líneas celulares de adenocarcinoma de pulmón son más susceptibles a la inhibición de HSP90 que a la inhibición de HSP70. *In vitro*, los análogos de radicicol (STA-9090 y AUY-922) son los inhibidores de HSP90 más efectivos en el cese de la actividad de esta chaperona en el adenocarcinoma de pulmón.
2. La degradación de las proteínas clientes de HSP90, unida a la inducción de HSP70, atestiguan la correcta inhibición de HSP90 en las líneas celulares de adenocarcinoma de pulmón. Estos efectos son más acusados en las líneas celulares con mutación en EGFR o translocación EML4-ALK.
3. Los perfiles proteómicos identificados tras el tratamiento con diferentes inhibidores de HSP90, confluyen en una firma de 254 proteínas diferencialmente expresadas. Entre estas proteínas nueve están consistentemente involucradas en la respuesta, dada su coincidencia entre diferentes líneas celulares e inhibidores, destacando la expresión de EIF3SI y citrato sintasa como potenciales biomarcadores de la respuesta a la inhibición de HSP90.
4. La inhibición de HSP90, independientemente del inhibidor empleado, se relaciona con la apoptosis celular y la alteración de diversas rutas metabólicas. En concreto, los inhibidores análogos de radicicol desregulan la señalización por integrinas, la biosíntesis de piridoxal-5-fosfato y el metabolismo de la vitamina B6. Por su parte los inhibidores análogos de geldanamicina causan, en exclusiva, desregulación en el ciclo de Krebs.
5. Los efectos de la inhibición de HSP90 son dependientes de las características moleculares del adenocarcinoma de pulmón. Únicamente la variación en la expresión de dos proteínas, ADI1 y RRP1, fue significativa y común a todos los subgrupos moleculares estudiados, sugiriendo su potencial uso en la monitorización de la respuesta a la inhibición de HSP90 en el adenocarcinoma de pulmón.
6. El contexto molecular del adenocarcinoma de pulmón también afecta a la respuesta tras la inhibición de HSP90, a través de la desregulación de diferentes rutas biológicas. En los subgrupos moleculares triple negativo y con mutación en KRAS, la desregulación de la ubiquitina-proteosoma, esencial en la inhibición de HSP90, podría estar implicada en la respuesta subóptima a los inhibidores. Por el contrario,

Conclusiones

la ruta de biosíntesis de arginina, parece ser sustancial para la correcta respuesta a los inhibidores en los subgrupos con mutación en EGFR o translocación EML4-ALK. Además, esta ruta estaría relacionada con la sensibilidad a la inhibición de HSP90 en el adenocarcinoma de pulmón.

7. La desregulación de la ruta de p53 por privación de glucosa es una de las rutas biológicas asociadas con la resistencia a los inhibidores de HSP90. Esta ruta se relacionó asimismo con la respuesta de las líneas celulares con mutación en KRAS, representantes de los pacientes con la respuesta clínica más limitada a estos inhibidores. Por ello, el estudio y regulación de esta ruta podría ser relevante al objeto de optimizar la inhibición de HSP90 en el adenocarcinoma de pulmón.
8. La abundancia basal de las proteínas LDHB y rotequina correlaciona, respectivamente, con la sensibilidad a los análogos de geldanamicina y radicicol, mientras que la de TOP1 y PDSS2 se asocian con la resistencia a los mismos. Dado su potencial como biomarcadores predictivos, la determinación de la expresión de estas proteínas debería ser considerada en la selección de pacientes con adenocarcinoma de pulmón que podrían beneficiarse de la terapia inhibitoria de HSP90, tras su apropiada validación en series clínicas.

Bibliografía

1. Mathers, C.D. and D. Loncar, Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. *PLoS Med*, 2006. 3(11): p. e442.
2. Bray, F., et al., Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*, 2018. 68(6): p. 394-424.
3. Pallis, A.G. and K.N. Syrigos, Lung cancer in never smokers: disease characteristics and risk factors. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2013. 88(3): p. 494-503.
4. Quaderi, S.A. and J.R. Hurst, The unmet global burden of COPD. *Glob Health Epidemiol Genom*, 2018. 3: p. e4.
5. Rabe, K.F. and H. Watz, Chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet*, 2017. 389(10082): p. 1931-1940.
6. Lopez-Campos, J.L., W. Tan, and J.B. Soriano, Global burden of COPD. *Respirology*, 2016. 21(1): p. 14-23.
7. Barreiro, E., et al., Relationships between chronic obstructive pulmonary disease and lung cancer: biological insights. *J Thorac Dis*, 2016. 8(10): p. E1122-e1135.
8. Kanwal, M., X.J. Ding, and Y. Cao, Familial risk for lung cancer. *Oncol Lett*, 2017. 13(2): p. 535-542.
9. Akhtar, N. and J.G. Bansal, Risk factors of Lung Cancer in nonsmoker. *Curr Probl Cancer*, 2017. 41(5): p. 328-339.
10. Herbst, R.S., J.V. Heymach, and S.M. Lippman, Lung cancer. *N Engl J Med*, 2008. 359(13): p. 1367-1380.
11. UyBico, S.J., et al., Lung cancer staging essentials: the new TNM staging system and potential imaging pitfalls. *Radiographics*, 2010. 30(5): p. 1163-1181.
12. Goldstraw, P., et al., The IASLC Lung Cancer Staging Project: Proposals for Revision of the TNM Stage Groupings in the Forthcoming (Eighth) Edition of the TNM Classification for Lung Cancer. *J Thorac Oncol*, 2016. 11(1): p. 39-51.
13. Lim, W., et al., The 8(th) lung cancer TNM classification and clinical staging system: review of the changes and clinical implications. *Quant Imaging Med Surg*, 2018. 8(7): p. 709-718.
14. Sugimura, H. and P. Yang, Long-term survivorship in lung cancer: a review. *Chest*, 2006. 129(4): p. 1088-1097.
15. Siegel, R.L., K.D. Miller, and A. Jemal, Cancer statistics, 2019. *CA Cancer J Clin*, 2019. 69(1): p. 7-34.
16. Weinstein, I.B., Cancer. Addiction to oncogenes--the Achilles heel of cancer. *Science*, 2002. 297(5578): p. 63-64.
17. Pendharkar, D., B.V. Ausekar, and S. Gupta, Molecular biology of lung cancer-a review. *Indian J Surg Oncol*, 2013. 4(2): p. 120-124.
18. George, J., et al., Comprehensive genomic profiles of small cell lung cancer. *Nature*, 2015. 524(7563): p. 47-53.
19. Peifer, M., et al., Integrative genome analyses identify key somatic driver mutations of small-cell lung cancer. *Nat Genet*, 2012. 44(10): p. 1104-1110.
20. Network, C.G.A.R., Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma. *Nature*, 2014. 511(7511): p. 543-550.
21. Chalela, R., et al., Lung adenocarcinoma: from molecular basis to genome-guided therapy and immunotherapy. *J Thorac Dis*, 2017. 9(7): p. 2142-2158.

22. Tamborero, D., et al., Comprehensive identification of mutational cancer driver genes across 12 tumor types. *Sci Rep*, 2013. 3: p. 2650.
23. Gandara, D.R., et al., Squamous cell lung cancer: from tumor genomics to cancer therapeutics. *Clin Cancer Res*, 2015. 21(10): p. 2236-2243.
24. Network, C.G.A.R., Comprehensive genomic characterization of squamous cell lung cancers. *Nature*, 2012. 489(7417): p. 519-525.
25. Malchers, F., et al., Cell-autonomous and non-cell-autonomous mechanisms of transformation by amplified FGFR1 in lung cancer. *Cancer Discov*, 2014. 4(2): p. 246-257.
26. Hammerman, P.S., et al., Mutations in the DDR2 kinase gene identify a novel therapeutic target in squamous cell lung cancer. *Cancer Discov*, 2011. 1(1): p. 78-89.
27. Weinstein, I.B. and A. Joe, Oncogene addiction. *Cancer Res*, 2008. 68(9): p. 3077-3080.
28. Padma, V.V., An overview of targeted cancer therapy. *Biomedicine (Taipei)*, 2015. 5(4): p. 19.
29. Gallant, J.N. and C.M. Lovly, Established, emerging and elusive molecular targets in the treatment of lung cancer. *J Pathol*, 2018. 244(5): p. 565-577.
30. Cheng, L., et al., The landscape of EGFR pathways and personalized management of non-small-cell lung cancer. *Future Oncol*, 2011. 7(4): p. 519-541.
31. Normanno, N., et al., Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer. *Gene*, 2006. 366(1): p. 2-16.
32. Tsiambas, E., et al., EGFR gene deregulation mechanisms in lung adenocarcinoma: A molecular review. *Pathol Res Pract*, 2016. 212(8): p. 672-677.
33. Piotrowska, Z. and L.V. Sequist, Epidermal Growth Factor Receptor-Mutant Lung Cancer: New Drugs, New Resistance Mechanisms, and Future Treatment Options. *Cancer J*, 2015. 21(5): p. 371-377.
34. Soria, J.C., et al., EGFR-mutated oncogene-addicted non-small cell lung cancer: current trends and future prospects. *Cancer Treat Rev*, 2012. 38(5): p. 416-30.
35. Mok, T.S., et al., Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. *N Engl J Med*, 2009. 361(10): p. 947-957.
36. Maemondo, M., et al., Gefitinib or chemotherapy for non-small-cell lung cancer with mutated EGFR. *N Engl J Med*, 2010. 362(25): p. 2380-2388.
37. Mitsudomi, T., et al., Gefitinib versus cisplatin plus docetaxel in patients with non-small-cell lung cancer harbouring mutations of the epidermal growth factor receptor (WJTOG3405): an open label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol*, 2010. 11(2): p. 121-128.
38. Zhou, C., et al., Erlotinib versus chemotherapy as first-line treatment for patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (OPTIMAL, CTONG-0802): a multicentre, open-label, randomised, phase 3 study. *Lancet Oncol*, 2011. 12(8): p. 735-742.
39. Rosell, R., et al., Erlotinib versus standard chemotherapy as first-line treatment for European patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (EURTAC): a multicentre, open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol*, 2012. 13(3): p. 239-246.

40. Wu, Y.L., et al., First-line erlotinib versus gemcitabine/cisplatin in patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer: analyses from the phase III, randomized, open-label, ENSURE study. *Ann Oncol*, 2015. 26(9): p. 1883-1889.
41. Sequist, L.V., et al., Phase III study of afatinib or cisplatin plus pemetrexed in patients with metastatic lung adenocarcinoma with EGFR mutations. *J Clin Oncol*, 2013. 31(27): p. 3327-3334.
42. Wu, Y.L., et al., Afatinib versus cisplatin plus gemcitabine for first-line treatment of Asian patients with advanced non-small-cell lung cancer harbouring EGFR mutations (LUX-Lung 6): an open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol*, 2014. 15(2): p. 213-222.
43. Camidge, D.R., W. Pao, and L.V. Sequist, Acquired resistance to TKIs in solid tumours: learning from lung cancer. *Nat Rev Clin Oncol*, 2014. 11(8): p. 473-481.
44. Pao, W., et al., Acquired resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib is associated with a second mutation in the EGFR kinase domain. *PLoS Med*, 2005. 2(3): p. e73.
45. Arcila, M.E., et al., Rebiopsy of lung cancer patients with acquired resistance to EGFR inhibitors and enhanced detection of the T790M mutation using a locked nucleic acid-based assay. *Clin Cancer Res*, 2011. 17(5): p. 1169-1180.
46. Yu, H.A., et al., Analysis of tumor specimens at the time of acquired resistance to EGFR-TKI therapy in 155 patients with EGFR-mutant lung cancers. *Clin Cancer Res*, 2013. 19(8): p. 2240-2247.
47. Janne, P.A., et al., AZD9291 in EGFR inhibitor-resistant non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*, 2015. 372(18): p. 1689-1699.
48. Stinchcombe, T.E., AZD9291 in epidermal growth factor receptor inhibitor-resistant non-small-cell lung cancer. *Transl Lung Cancer Res*, 2016. 5(1): p. 92-94.
49. Eberlein, C.A., et al., Acquired Resistance to the Mutant-Selective EGFR Inhibitor AZD9291 Is Associated with Increased Dependence on RAS Signaling in Preclinical Models. *Cancer Res*, 2015. 75(12): p. 2489-2500.
50. Arcila, M.E., et al., EGFR exon 20 insertion mutations in lung adenocarcinomas: prevalence, molecular heterogeneity, and clinicopathologic characteristics. *Mol Cancer Ther*, 2013. 12(2): p. 220-229.
51. Yasuda, H., et al., Structural, biochemical, and clinical characterization of epidermal growth factor receptor (EGFR) exon 20 insertion mutations in lung cancer. *Sci Transl Med*, 2013. 5(216): p. 216ra177.
52. Hirano, T., et al., In vitro modeling to determine mutation specificity of EGFR tyrosine kinase inhibitors against clinically relevant EGFR mutants in non-small-cell lung cancer. *Oncotarget*, 2015. 6(36): p. 38789-38803.
53. Seto, T., et al., Erlotinib alone or with bevacizumab as first-line therapy in patients with advanced non-squamous non-small-cell lung cancer harbouring EGFR mutations (JO25567): an open-label, randomised, multicentre, phase 2 study. *Lancet Oncol*, 2014. 15(11): p. 1236-1244.
54. Gallant, J.N., et al., EGFR Kinase Domain Duplication (EGFR-KDD) Is a Novel Oncogenic Driver in Lung Cancer That Is Clinically Responsive to Afatinib. *Cancer Discov*, 2015. 5(11): p. 1155-1163.
55. Konduri, K., et al., EGFR Fusions as Novel Therapeutic Targets in Lung Cancer. *Cancer Discov*, 2016. 6(6): p. 601-611.

56. Soda, M., et al., Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature*, 2007. 448(7153): p. 561-566.
57. Roskoski, R., Anaplastic lymphoma kinase (ALK): structure, oncogenic activation, and pharmacological inhibition. *Pharmacol Res*, 2013. 68(1): p. 68-94.
58. Kerr, K.M. and F. López-Ríos, Precision medicine in NSCLC and pathology: how does ALK fit in the pathway? *Ann Oncol*, 2016. 27 Suppl 3: p. iii16-iii24.
59. Lin, J.J., et al., Impact of EML4-ALK Variant on Resistance Mechanisms and Clinical Outcomes in ALK-Positive Lung Cancer. *J Clin Oncol*, 2018. 36(12): p. 1199-1206.
60. Shaw, A.T., et al., Crizotinib versus chemotherapy in advanced ALK-positive lung cancer. *N Engl J Med*, 2013. 368(25): p. 2385-2394.
61. Solomon, B.J., et al., First-line crizotinib versus chemotherapy in ALK-positive lung cancer. *N Engl J Med*, 2014. 371(23): p. 2167-2177.
62. Solomon, B.J., et al., Final Overall Survival Analysis From a Study Comparing First-Line Crizotinib Versus Chemotherapy in ALK-Mutation-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol*, 2018. 36(22): p. 2251-2258.
63. Katayama, R., C.M. Lovly, and A.T. Shaw, Therapeutic targeting of anaplastic lymphoma kinase in lung cancer: a paradigm for precision cancer medicine. *Clin Cancer Res*, 2015. 21(10): p. 2227-2235.
64. Santarpia, M., et al., Spotlight on ceritinib in the treatment of ALK+ NSCLC: design, development and place in therapy. *Drug Des Devel Ther*, 2017. 11: p. 2047-2063.
65. Vavalà, T. and S. Novello, Alectinib in the treatment of ALK-positive non-small cell lung cancer: an update on its properties, efficacy, safety and place in therapy. *Ther Adv Med Oncol*, 2018. 10: p. 1758835918789364.
66. Kim, D.W., et al., Activity and safety of ceritinib in patients with ALK-rearranged non-small-cell lung cancer (ASCEND-1): updated results from the multicentre, open-label, phase 1 trial. *Lancet Oncol*, 2016. 17(4): p. 452-463.
67. Ou, S.H., et al., Alectinib in Crizotinib-Refractory ALK-Rearranged Non-Small-Cell Lung Cancer: A Phase II Global Study. *J Clin Oncol*, 2016. 34(7): p. 661-668.
68. Shaw, A.T., et al., Alectinib in ALK-positive, crizotinib-resistant, non-small-cell lung cancer: a single-group, multicentre, phase 2 trial. *Lancet Oncol*, 2016. 17(2): p. 234-242.
69. Shaw, A.T., et al., Ceritinib versus chemotherapy in patients with ALK-rearranged non-small-cell lung cancer previously given chemotherapy and crizotinib (ASCEND-5): a randomised, controlled, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol*, 2017. 18(7): p. 874-886.
70. Gainor, J.F., et al., Molecular Mechanisms of Resistance to First- and Second-Generation ALK Inhibitors in ALK-Rearranged Lung Cancer. *Cancer Discov*, 2016. 6(10): p. 1118-1133.
71. Spagnuolo, A., P. Maione, and C. Gridelli, Evolution in the treatment landscape of non-small cell lung cancer with ALK gene alterations: from the first- to third-generation of ALK inhibitors. *Expert Opin Emerg Drugs*, 2018: p. 1-11.
72. Shaw, A.T., et al., Lorlatinib in non-small-cell lung cancer with ALK or ROS1 rearrangement: an international, multicentre, open-label, single-arm first-in-man phase 1 trial. *Lancet Oncol*, 2017. 18(12): p. 1590-1599.
73. Taniguchi, H., et al., Amphiregulin triggered epidermal growth factor receptor activation confers in vivo crizotinib-resistance of EML4-ALK lung cancer and circumvention by epidermal growth factor receptor inhibitors. *Cancer Sci*, 2017. 108(1): p. 53-60.

74. Vaishnavi, A., et al., EGFR Mediates Responses to Small-Molecule Drugs Targeting Oncogenic Fusion Kinases. *Cancer Res*, 2017. 77(13): p. 3551-3563.
75. Rekhtman, N., et al., KRAS mutations are associated with solid growth pattern and tumor-infiltrating leukocytes in lung adenocarcinoma. *Mod Pathol*, 2013. 26(10): p. 1307-1319.
76. Lee, B., et al., Clinicopathologic characteristics of EGFR, KRAS, and ALK alterations in 6,595 lung cancers. *Oncotarget*, 2016. 7(17): p. 23874-23884.
77. Downward, J., Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nat Rev Cancer*, 2003. 3(1): p. 11-22.
78. Yu, H.A., et al., Prognostic impact of KRAS mutation subtypes in 677 patients with metastatic lung adenocarcinomas. *J Thorac Oncol*, 2015. 10(3): p. 431-437.
79. Shimizu, K., et al., Structure of the Ki-ras gene of the human lung carcinoma cell line Calu-1. *Nature*, 1983. 304(5926): p. 497-500.
80. Lito, P., et al., Allele-specific inhibitors inactivate mutant KRAS G12C by a trapping mechanism. *Science*, 2016. 351(6273): p. 604-608.
81. AMG 510 First to Inhibit "Undruggable" KRAS. *Cancer Discov*, 2019. 9(8): p. 988-989.
82. Bergethon, K., et al., ROS1 rearrangements define a unique molecular class of lung cancers. *J Clin Oncol*, 2012. 30(8): p. 863-870.
83. Shaw, A.T., et al., Crizotinib in ROS1-rearranged non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*, 2014. 371(21): p. 1963-1971.
84. Mazières, J., et al., Crizotinib therapy for advanced lung adenocarcinoma and a ROS1 rearrangement: results from the EUROS1 cohort. *J Clin Oncol*, 2015. 33(9): p. 992-999.
85. Kato, Y., et al., Combined effect of cabozantinib and gefitinib in crizotinib-resistant lung tumors harboring ROS1 fusions. *Cancer Sci*, 2018. 109(10): p. 3149-3158.
86. Akamine, T., et al., Lorlatinib for the treatment of patients with non-small cell lung cancer. *Drugs Today (Barc)*, 2019. 55(2): p. 107-116.
87. Patil, T., et al., Targeted therapies for ROS1-rearranged non-small cell lung cancer. *Drugs Today (Barc)*, 2019. 55(10): p. 641-652.
88. Nguyen-Ngoc, T., et al., BRAF Alterations as Therapeutic Targets in Non-Small-Cell Lung Cancer. *J Thorac Oncol*, 2015. 10(10): p. 1396-1403.
89. Hauschild, A., et al., Dabrafenib in BRAF-mutated metastatic melanoma: a multicentre, open-label, phase 3 randomised controlled trial. *Lancet*, 2012. 380(9839): p. 358-365.
90. Chapman, P.B., et al., Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *N Engl J Med*, 2011. 364(26): p. 2507-2516.
91. Planchard, D., et al., Dabrafenib in patients with BRAF(V600E)-positive advanced non-small-cell lung cancer: a single-arm, multicentre, open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol*, 2016. 17(5): p. 642-650.
92. Planchard, D., et al., Dabrafenib plus trametinib in patients with previously untreated BRAF. *Lancet Oncol*, 2017. 18(10): p. 1307-1316.
93. Abravanel, D.L., et al., An Acquired NRAS Q61K Mutation in BRAF V600E-Mutant Lung Adenocarcinoma Resistant to Dabrafenib Plus Trametinib. *J Thorac Oncol*, 2018. 13(8): p. e131-e133.

94. Tong, J.H., et al., MET Amplification and Exon 14 Splice Site Mutation Define Unique Molecular Subgroups of Non-Small Cell Lung Carcinoma with Poor Prognosis. *Clin Cancer Res*, 2016. 22(12): p. 3048-3056.
95. Frampton, G.M., et al., Activation of MET via diverse exon 14 splicing alterations occurs in multiple tumor types and confers clinical sensitivity to MET inhibitors. *Cancer Discov*, 2015. 5(8): p. 850-859.
96. Landi, L., et al., Targeting c-MET in the battle against advanced nonsmall-cell lung cancer. *Curr Opin Oncol*, 2013. 25(2): p. 130-136.
97. Robinson, K.W. and A.B. Sandler, The role of MET receptor tyrosine kinase in non-small cell lung cancer and clinical development of targeted anti-MET agents. *Oncologist*, 2013. 18(2): p. 115-122.
98. Kawakami, H., et al., Targeting MET Amplification as a New Oncogenic Driver. *Cancers (Basel)*, 2014. 6(3): p. 1540-1552.
99. Drilon, A., et al., Targeting MET in Lung Cancer: Will Expectations Finally Be MET? *J Thorac Oncol*, 2017. 12(1): p. 15-26.
100. Paik, P.K., et al., Response to MET inhibitors in patients with stage IV lung adenocarcinomas harboring MET mutations causing exon 14 skipping. *Cancer Discov*, 2015. 5(8): p. 842-849.
101. Shea, M., M.S. Huberman, and D.B. Costa, Lazarus-Type Response to Crizotinib in a Patient with Poor Performance Status and Advanced MET Exon 14 Skipping Mutation-Positive Lung Adenocarcinoma. *J Thorac Oncol*, 2016. 11(7): p. e81-82.
102. Bahcall, M., et al., Acquired METD1228V Mutation and Resistance to MET Inhibition in Lung Cancer. *Cancer Discov*, 2016. 6(12): p. 1334-1341.
103. Michels, S., et al., Clinicopathological Characteristics of RET Rearranged Lung Cancer in European Patients. *J Thorac Oncol*, 2016. 11(1): p. 122-127.
104. Drilon, A., et al., Cabozantinib in patients with advanced RET-rearranged non-small-cell lung cancer: an open-label, single-centre, phase 2, single-arm trial. *Lancet Oncol*, 2016. 17(12): p. 1653-1660.
105. Cabanillas, M.E. and M.A. Habra, Lenvatinib: Role in thyroid cancer and other solid tumors. *Cancer Treat Rev*, 2016. 42: p. 47-55.
106. Lee, S.H., et al., Vandetanib in pretreated patients with advanced non-small cell lung cancer-harboring RET rearrangement: a phase II clinical trial. *Ann Oncol*, 2017. 28(2): p. 292-297.
107. Subbiah, V., et al., Selective RET kinase inhibition for patients with RET-altered cancers. *Ann Oncol*, 2018. 29(8): p. 1869-1876.
108. Subbiah, V., et al., Precision Targeted Therapy with BLU-667 for RET-Driven Cancers. *Cancer Discov*, 2018. 8(7): p. 836-849.
109. Graus-Porta, D., et al., ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signaling. *Embo j*, 1997. 16(7): p. 1647-1655.
110. Ricciardi, G.R., et al., NSCLC and HER2: between lights and shadows. *J Thorac Oncol*, 2014. 9(12): p. 1750-1762.
111. Li, B.T., et al., HER2 Amplification and HER2 Mutation Are Distinct Molecular Targets in Lung Cancers. *J Thorac Oncol*, 2016. 11(3): p. 414-419.
112. Mazieres, J., et al., Lung cancer that harbors an HER2 mutation: epidemiologic characteristics and therapeutic perspectives. *J Clin Oncol*, 2013. 31(16): p. 1997-2003.

113. Kris, M.G., et al., Targeting HER2 aberrations as actionable drivers in lung cancers: phase II trial of the pan-HER tyrosine kinase inhibitor dacomitinib in patients with HER2-mutant or amplified tumors. *Ann Oncol*, 2015. 26(7): p. 1421-1427.
114. Mazieres, J., et al., Lung cancer patients with HER2 mutations treated with chemotherapy and HER2-targeted drugs: results from the European EUHER2 cohort. *Ann Oncol*, 2016. 27(2): p. 281-286.
115. Kim, T.M., et al., Phase 1 Studies of Pozotinib, an Irreversible Pan-HER Tyrosine Kinase Inhibitor in Patients with Advanced Solid Tumors. *Cancer Res Treat*, 2018. 50(3): p. 835-842.
116. Koga, T., et al., Activity of a novel HER2 inhibitor, pozotinib, for HER2 exon 20 mutations in lung cancer and mechanism of acquired resistance: An in vitro study. *Lung Cancer*, 2018. 126: p. 72-79.
117. Somasundaram, A. and T.F. Burns, The next generation of immunotherapy: keeping lung cancer in check. *J Hematol Oncol*, 2017. 10(1): p. 87.
118. Borghaei, H., et al., Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Nonsquamous Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*, 2015. 373(17): p. 1627-1639.
119. Herbst, R.S., et al., Pembrolizumab versus docetaxel for previously treated, PD-L1-positive, advanced non-small-cell lung cancer (KEYNOTE-010): a randomised controlled trial. *Lancet*, 2016. 387(10027): p. 1540-1550.
120. Rittmeyer, A., et al., Atezolizumab versus docetaxel in patients with previously treated non-small-cell lung cancer (OAK): a phase 3, open-label, multicentre randomised controlled trial. *Lancet*, 2017. 389(10066): p. 255-265.
121. Gainor, J.F., et al., EGFR Mutations and ALK Rearrangements Are Associated with Low Response Rates to PD-1 Pathway Blockade in Non-Small Cell Lung Cancer: A Retrospective Analysis. *Clin Cancer Res*, 2016. 22(18): p. 4585-4593.
122. Lisberg, A., et al., A Phase II Study of Pembrolizumab in EGFR-Mutant, PD-L1+, Tyrosine Kinase Inhibitor Naïve Patients With Advanced NSCLC. *J Thorac Oncol*, 2018. 13(8): p. 1138-1145.
123. Ritossa, F., A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia*, 1962. 18 (12): p. 571-573.
124. Macario, A.J. and E. Conway de Macario, Molecular chaperones: multiple functions, pathologies, and potential applications. *Front Biosci*, 2007. 12: p. 2588-2600.
125. Jegu, G., et al., Targeting heat shock proteins in cancer. *Cancer Lett*, 2013. 332(2): p. 275-285.
126. Kampinga, H.H., et al., Guidelines for the nomenclature of the human heat shock proteins. *Cell Stress Chaperones*, 2009. 14(1): p. 105-111.
127. Stephanou, A. and D.S. Latchman, Transcriptional modulation of heat-shock protein gene expression. *Biochem Res Int*, 2011. 2011: p. 238601.
128. Dai, C., The heat-shock, or HSF1-mediated proteotoxic stress, response in cancer: from proteomic stability to oncogenesis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2018. 373(1738): p. 20160525.
129. Barna, J., P. Csermely, and T. Vellai, Roles of heat shock factor 1 beyond the heat shock response. *Cell Mol Life Sci*, 2018. 75(16): p. 2897-2916.
130. De Maio, A., Heat shock proteins: facts, thoughts, and dreams. *Shock*, 1999. 11(1): p. 1-12.

131. Calderwood, S.K., Heat shock proteins and cancer: intracellular chaperones or extracellular signalling ligands? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2018. 373(1738): p. 20160524.
132. Chatterjee, S. and T.F. Burns, Targeting Heat Shock Proteins in Cancer: A Promising Therapeutic Approach. *Int J Mol Sci*, 2017. 18(9): p. 1978.
133. Lindquist, S., The heat-shock response. *Annu Rev Biochem*, 1986. 55: p. 1151-1191.
134. Vahid, S., D. Thaper, and A. Zoubeydi, Chaperoning the Cancer: The Proteostatic Functions of the Heat Shock Proteins in Cancer. *Recent Pat Anticancer Drug Discov*, 2017. 12(1): p. 35-47.
135. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 2011. 144(5): p. 646-674.
136. Calderwood, S.K. and J. Gong, Heat Shock Proteins Promote Cancer: It's a Protection Racket. *Trends Biochem Sci*, 2016. 41(4): p. 311-323.
137. Arrigo, A.P. and B. Gibert, HspB1, HspB5 and HspB4 in Human Cancers: Potent Oncogenic Role of Some of Their Client Proteins. *Cancers (Basel)*, 2014. 6(1): p. 333-365.
138. Murphy, M.E., The HSP70 family and cancer. *Carcinogenesis*, 2013. 34(6): p. 1181-1188.
139. Shi, Y., et al., Plasma levels of heat shock protein 90 alpha associated with lung cancer development and treatment responses. *Clin Cancer Res*, 2014. 20(23): p. 6016-6022.
140. Zhang, S., et al., Heat shock protein 27 promotes cell proliferation through activator protein-1 in lung cancer. *Oncol Lett*, 2015. 9(6): p. 2572-2576.
141. Landriscina, M., et al., Heat shock proteins, cell survival and drug resistance: the mitochondrial chaperone TRAP1, a potential novel target for ovarian cancer therapy. *Gynecol Oncol*, 2010. 117(2): p. 177-182.
142. Khalil, A.A., et al., Heat shock proteins in oncology: diagnostic biomarkers or therapeutic targets? *Biochim Biophys Acta*, 2011. 1816(2): p. 89-104.
143. Wu, J., et al., Heat Shock Proteins and Cancer. *Trends Pharmacol Sci*, 2017. 38(3): p. 226-256.
144. Wang, X., et al., HSP27, 70 and 90, anti-apoptotic proteins, in clinical cancer therapy (Review). *Int J Oncol*, 2014. 45(1): p. 18-30.
145. Hoter, A., M.E. El-Sabban, and H.Y. Naim, The HSP90 Family: Structure, Regulation, Function, and Implications in Health and Disease. *Int J Mol Sci*, 2018. 19(9): p. 2560.
146. Calderwood, S.K., J. Gong, and A. Murshid, Extracellular HSPs: The Complicated Roles of Extracellular HSPs in Immunity. *Front Immunol*, 2016. 7: p. 159.
147. Tatokoro, M., et al., Heat shock protein 90 targeting therapy: state of the art and future perspective. *Excli j*, 2015. 14: p. 48-58.
148. Ali, M.M., et al., Crystal structure of an Hsp90-nucleotide-p23/Sba1 closed chaperone complex. *Nature*, 2006. 440(7087): p. 1013-1017.
149. Whitesell, L. and S.L. Lindquist, HSP90 and the chaperoning of cancer. *Nat Rev Cancer*, 2005. 5(10): p. 761-772.
150. Schopf, F.H., M.M. Biebl, and J. Buchner, The HSP90 chaperone machinery. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2017. 18(6): p. 345-360.

151. Prodromou, C., Regulatory Mechanisms of Hsp90. *Biochem Mol Biol J*, 2017. 3(1): p. 2.
152. Picard, D., et al., Reduced levels of hsp90 compromise steroid receptor action in vivo. *Nature*, 1990. 348(6297): p. 166-168.
153. Garg, G., A. Khandelwal, and B.S. Blagg, Anticancer Inhibitors of Hsp90 Function: Beyond the Usual Suspects. *Adv Cancer Res*, 2016. 129: p. 51-88.
154. Echeverria, P.C., et al., An interaction network predicted from public data as a discovery tool: application to the Hsp90 molecular chaperone machine. *PLoS One*, 2011. 6(10): p. e26044.
155. Xu, W., et al., Surface charge and hydrophobicity determine ErbB2 binding to the Hsp90 chaperone complex. *Nat Struct Mol Biol*, 2005. 12(2): p. 120-126.
156. Workman, P., et al., Drugging the cancer chaperone HSP90: combinatorial therapeutic exploitation of oncogene addiction and tumor stress. *Ann N Y Acad Sci*, 2007. 1113: p. 202-216.
157. Radli, M. and S.G.D. Rudiger, Dancing with the Diva: Hsp90-Client Interactions. *J Mol Biol*, 2018. 430(18 Pt B): p. 3029-3040.
158. Luo, W., et al., Heat shock protein 90 in neurodegenerative diseases. *Mol Neurodegener*, 2010. 5: p. 24.
159. Geller, R., S. Tagawa, and J. Frydman, Broad action of Hsp90 as a host chaperone required for viral replication. *Biochim Biophys Acta*, 2012. 1823(3): p. 698-706.
160. Vartholomaïou, E., P.C. Echeverria, and D. Picard, Unusual Suspects in the Twilight Zone Between the Hsp90 Interactome and Carcinogenesis. *Adv Cancer Res*, 2016. 129: p. 1-30.
161. Grbovic, O.M., et al., V600E B-Raf requires the Hsp90 chaperone for stability and is degraded in response to Hsp90 inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. 103(1): p. 57-62.
162. Shimamura, T., et al., Epidermal growth factor receptors harboring kinase domain mutations associate with the heat shock protein 90 chaperone and are destabilized following exposure to geldanamycins. *Cancer Res*, 2005. 65(14): p. 6401-6408.
163. Neckers, L. and P. Workman, Hsp90 molecular chaperone inhibitors: are we there yet? *Clin Cancer Res*, 2012. 18(1): p. 64-76.
164. Ciocca, D.R., A.P. Arrigo, and S.K. Calderwood, Heat shock proteins and heat shock factor 1 in carcinogenesis and tumor development: an update. *Arch Toxicol*, 2013. 87(1): p. 19-48.
165. Patel, K., et al., Heat shock protein 90 (HSP90) is overexpressed in p16-negative oropharyngeal squamous cell carcinoma, and its inhibition in vitro potentiates the effects of chemoradiation. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2014. 74(5): p. 1015-1022.
166. Kolosenko, I., D. Grandner, and K.P. Tamm, IL-6 activated JAK/STAT3 pathway and sensitivity to Hsp90 inhibitors in multiple myeloma. *Curr Med Chem*, 2014. 21(26): p. 3042-3047.
167. McCarthy, M.M., et al., HSP90 as a marker of progression in melanoma. *Ann Oncol*, 2008. 19(3): p. 590-594.
168. Huang, T., et al., Expression of Hsp90alpha and cyclin B1 were related to prognosis of esophageal squamous cell carcinoma and keratin pearl formation. *Int J Clin Exp Pathol*, 2014. 7(4): p. 1544-1552.

169. Tian, W.L., et al., High expression of heat shock protein 90 alpha and its significance in human acute leukemia cells. *Gene*, 2014. 542(2): p. 122-128.
170. Biaoxue, R., et al., Elevated Hsp90-beta contributes to differential diagnosis of pleural effusion caused by lung cancer and correlates with malignant biological behavior of lung cancer. *BMC Pulm Med*, 2018. 18(1): p. 188.
171. Butler, L.M., et al., Maximizing the Therapeutic Potential of HSP90 Inhibitors. *Mol Cancer Res*, 2015. 13(11): p. 1445-1451.
172. Chiosis, G. and L. Neckers, Tumor selectivity of Hsp90 inhibitors: the explanation remains elusive. *ACS Chem Biol*, 2006. 1(5): p. 279-284.
173. Kamal, A., et al., A high-affinity conformation of Hsp90 confers tumour selectivity on Hsp90 inhibitors. *Nature*, 2003. 425(6956): p. 407-410.
174. Prodromou, C., et al., Identification and structural characterization of the ATP/ADP-binding site in the Hsp90 molecular chaperone. *Cell*, 1997. 90(1): p. 65-75.
175. Xu, W., et al., Chaperone-dependent E3 ubiquitin ligase CHIP mediates a degradative pathway for c-ErbB2/Neu. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. 99(20): p. 12847-12852.
176. Ehrlich, E.S., et al., Regulation of Hsp90 client proteins by a Cullin5-RING E3 ubiquitin ligase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. 106(48): p. 20330-20335.
177. Roe, S.M., et al., Structural basis for inhibition of the Hsp90 molecular chaperone by the antitumor antibiotics radicicol and geldanamycin. *J Med Chem*, 1999. 42(2): p. 260-266.
178. Supko, J.G., et al., Preclinical pharmacologic evaluation of geldanamycin as an antitumor agent. *Cancer Chemother Pharmacol*, 1995. 36(4): p. 305-315.
179. Soga, S., et al., Development of radicicol analogues. *Curr Cancer Drug Targets*, 2003. 3(5): p. 359-369.
180. Georgakis, G.V., Y. Li, and A. Younes, The heat shock protein 90 inhibitor 17-AAG induces cell cycle arrest and apoptosis in mantle cell lymphoma cell lines by depleting cyclin D1, Akt, Bid and activating caspase 9. *Br J Haematol*, 2006. 135(1): p. 68-71.
181. Wagner, A.J., et al., 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. 19(21): p. 6020-6029.
182. Johnson, M.L., et al., Phase I/II Study of HSP90 Inhibitor AUY922 and Erlotinib for EGFR-Mutant Lung Cancer With Acquired Resistance to Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitors. *J Clin Oncol*, 2015. 33(15): p. 1666-1673.
183. Lee, D.H., et al., HSP90 inhibitor NVP-AUY922 enhances TRAIL-induced apoptosis by suppressing the JAK2-STAT3-Mcl-1 signal transduction pathway in colorectal cancer cells. *Cell Signal*, 2015. 27(2): p. 293-305.
184. Seggewiss-Bernhardt, R., et al., Phase 1/1B trial of the heat shock protein 90 inhibitor NVP-AUY922 as monotherapy or in combination with bortezomib in patients with relapsed or refractory multiple myeloma. *Cancer*, 2015. 121(13): p. 2185-2192.
185. Oki, Y., et al., Experience with HSP90 inhibitor AUY922 in patients with relapsed or refractory non-Hodgkin lymphoma, in *Haematologica*. 2015: p. e272-274.
186. Graham, B., et al., The heat shock protein 90 inhibitor, AT13387, displays a long duration of action in vitro and in vivo in non-small cell lung cancer. *Cancer Sci*, 2012. 103(3): p. 522-527.

187. Wagner, A.J., et al., Dose-escalation study of a second-generation non-ansamycin HSP90 inhibitor, onalespib (AT13387), in combination with imatinib in patients with metastatic gastrointestinal stromal tumour. *Eur J Cancer*, 2016. 61: p. 94-101.
188. Proia, D.A. and R.C. Bates, Ganetespib and HSP90: translating preclinical hypotheses into clinical promise. *Cancer Res*, 2014. 74(5): p. 1294-1300.
189. Socinski, M.A., et al., A multicenter phase II study of ganetespib monotherapy in patients with genotypically defined advanced non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*, 2013. 19(11): p. 3068-3077.
190. Ramalingam, S., et al., A randomized phase II study of ganetespib, a heat shock protein 90 inhibitor, in combination with docetaxel in second-line therapy of advanced non-small cell lung cancer (GALAXY-1). *Ann Oncol*, 2015. 26(8): p. 1741-1748.
191. Jhaveri, K., et al., Advances in the clinical development of heat shock protein 90 (Hsp90) inhibitors in cancers. *Biochim Biophys Acta*, 2012. 1823(3): p. 742-755.
192. Marcu, M.G., et al., The heat shock protein 90 antagonist novobiocin interacts with a previously unrecognized ATP-binding domain in the carboxyl terminus of the chaperone. *J Biol Chem*, 2000. 275(47): p. 37181-37186.
193. Senju, M., et al., Hsp90 inhibitors cause G2/M arrest associated with the reduction of Cdc25C and Cdc2 in lung cancer cell lines. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2006. 132(3): p. 150-158.
194. Acquaviva, J., et al., Targeting KRAS-mutant non-small cell lung cancer with the Hsp90 inhibitor ganetespib. *Mol Cancer Ther*, 2012. 11(12): p. 2633-2643.
195. Weng, S.H., et al., Inhibition of thymidine phosphorylase expression by using an HSP90 inhibitor potentiates the cytotoxic effect of cisplatin in non-small-cell lung cancer cells. *Biochem Pharmacol*, 2012. 84(1): p. 126-136.
196. Choi, Y.J., et al., AUY922 effectively overcomes MET- and AXL-mediated resistance to EGFR-TKI in lung cancer cells. *PLoS One*, 2015. 10(3): p. e0119832.
197. Park, K.S., et al., The HSP90 inhibitor, NVP-AUY922, sensitizes KRAS-mutant non-small cell lung cancer with intrinsic resistance to MEK inhibitor, trametinib. *Cancer Lett*, 2016. 372(1): p. 75-81.
198. Rong, B. and S. Yang, Molecular mechanism and targeted therapy of Hsp90 involved in lung cancer: New discoveries and developments (Review). *Int J Oncol*, 2018. 52(2): p. 321-336.
199. Pillai, R.N. and S.S. Ramalingam, Heat shock protein 90 inhibitors in non-small-cell lung cancer. *Curr Opin Oncol*, 2014. 26(2): p. 159-164.
200. Garcia-Carbonero, R., A. Carnero, and L. Paz-Ares, Inhibition of HSP90 molecular chaperones: moving into the clinic. *Lancet Oncol*, 2013. 14(9): p. e358-369.
201. Xu, W., et al., Sensitivity of epidermal growth factor receptor and ErbB2 exon 20 insertion mutants to Hsp90 inhibition. *Br J Cancer*, 2007. 97(6): p. 741-744.
202. Wang, S., et al., Cancer cells harboring MET gene amplification activate alternative signaling pathways to escape MET inhibition but remain sensitive to Hsp90 inhibitors. *Cell Cycle*, 2009. 8(13): p. 2050-2056.
203. da Rocha Dias, S., et al., Activated B-Raf is an Hsp90 client protein that is targeted by the anticancer drug 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin. *Cancer Res*, 2005. 65(23): p. 10686-10691.

204. Normant, E., et al., The Hsp90 inhibitor IPI-504 rapidly lowers EML4-ALK levels and induces tumor regression in ALK-driven NSCLC models. *Oncogene*, 2011. 30(22): p. 2581-2586.
205. Esfahani, K. and V. Cohen, HSP90 as a novel molecular target in non-small-cell lung cancer. *Lung Cancer (Auckl)*, 2016. 7: p. 11-17.
206. Gallegos Ruiz, M.I., et al., Integration of gene dosage and gene expression in non-small cell lung cancer, identification of HSP90 as potential target. *PLoS One*, 2008. 3(3): p. e0001722.
207. Liu, W., et al., Protein signature for non-small cell lung cancer prognosis. *Am J Cancer Res*, 2014. 4(3): p. 256-269.
208. Hendriks, L.E.L. and A.C. Dingemans, Heat shock protein antagonists in early stage clinical trials for NSCLC. *Expert Opin Investig Drugs*, 2017. 26(5): p. 541-550.
209. Proia, D.A., et al., Synergistic activity of the Hsp90 inhibitor ganetespib with taxanes in non-small cell lung cancer models. *Invest New Drugs*, 2012. 30(6): p. 2201-2209.
210. Wang, Y., et al., Hsp90 Inhibitor Ganetespib Sensitizes Non-Small Cell Lung Cancer to Radiation but Has Variable Effects with Chemoradiation. *Clin Cancer Res*, 2016. 22(23): p. 5876-5886.
211. Sang, J., et al., Targeted inhibition of the molecular chaperone Hsp90 overcomes ALK inhibitor resistance in non-small cell lung cancer. *Cancer Discov*, 2013. 3(4): p. 430-443.
212. Smith, D.L., et al., The HSP90 inhibitor ganetespib potentiates the antitumor activity of EGFR tyrosine kinase inhibition in mutant and wild-type non-small cell lung cancer. *Target Oncol*, 2015. 10(2): p. 235-245.
213. Sequist, L.V., et al., Activity of IPI-504, a novel heat-shock protein 90 inhibitor, in patients with molecularly defined non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*, 2010. 28(33): p. 4953-4960.
214. Sessa, C., et al., First-in-human phase I dose-escalation study of the HSP90 inhibitor AUY922 in patients with advanced solid tumors. *Clin Cancer Res*, 2013. 19(13): p. 3671-3680.
215. Felip, E., et al., Phase 2 Study of the HSP-90 Inhibitor AUY922 in Previously Treated and Molecularly Defined Patients with Advanced Non-Small Cell Lung Cancer. *J Thorac Oncol*, 2018. 13(4): p. 576-584.
216. Goldman, J.W., et al., A first in human, safety, pharmacokinetics, and clinical activity phase I study of once weekly administration of the Hsp90 inhibitor ganetespib (STA-9090) in patients with solid malignancies. *BMC Cancer*, 2013. 13: p. 152.
217. Shapiro, G.I., et al., First-in-human phase I dose escalation study of a second-generation non-ansamycin HSP90 inhibitor, AT13387, in patients with advanced solid tumors. *Clin Cancer Res*, 2015. 21(1): p. 87-97.
218. Do, K., et al., Phase I study of the heat shock protein 90 (Hsp90) inhibitor onalespib (AT13387) administered on a daily for 2 consecutive days per week dosing schedule in patients with advanced solid tumors. *Invest New Drugs*, 2015. 33(4): p. 921-930.
219. Isambert, N., et al., Debio0932, a second-generation oral heat shock protein (HSP) inhibitor, in patients with advanced cancer-results of a first-in-man dose-escalation study with a fixed-dose extension phase. *Ann Oncol*, 2015. 26(5): p. 1005-1011.

220. Ocak, S., P. Chaurand, and P.P. Massion, Mass spectrometry-based proteomic profiling of lung cancer. *Proc Am Thorac Soc*, 2009. 6(2): p. 159-170.
221. Aebersold, R. and D.R. Goodlett, Mass spectrometry in proteomics. *Chem Rev*, 2001. 101(2): p. 269-295.
222. Marrugal, A., et al., Proteomic-Based Approaches for the Study of Cytokines in Lung Cancer. *Dis Markers*, 2016. 2016: p. 2138627.
223. Honda, K., et al., Proteomic approaches to the discovery of cancer biomarkers for early detection and personalized medicine. *Jpn J Clin Oncol*, 2013. 43(2): p. 103-109.
224. O'Farrell, P.H., High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem*, 1975. 250(10): p. 4007-4021.
225. Meleady, P., Two-Dimensional Gel Electrophoresis and 2D-DIGE. *Methods Mol Biol*, 2018. 1664: p. 3-14.
226. Favicchio, R., et al., Strategies in functional proteomics: Unveiling the pathways to precision oncology. *Cancer Lett*, 2016. 382(1): p.86-94.
227. Pastor, M.D., et al., Proteomic biomarkers in lung cancer. *Clin Transl Oncol*, 2013. 15(9): p. 671-682.
228. Crutchfield, C.A., et al., Advances in mass spectrometry-based clinical biomarker discovery. *Clin Proteomics*, 2016. 13: p. 1.
229. Cho, W.C., Application of proteomics in non-small-cell lung cancer. *Expert Rev Proteomics*, 2016. 13(1): p. 1-4.
230. Cheung, C.H.Y. and H.F. Juan, Quantitative proteomics in lung cancer. *J Biomed Sci*, 2017. 24(1): p. 37.
231. Kang, S.M., et al., The Haptoglobin beta chain as a supportive biomarker for human lung cancers. *Mol Biosyst*, 2011. 7(4): p. 1167-1175.
232. Pastor, M.D., et al., Identification of proteomic signatures associated with lung cancer and COPD. *J Proteomics*, 2013. 89: p. 227-237.
233. Chou, H.C., et al., Identification of Up- and Down-Regulated Proteins in Pemetrexed-Resistant Human Lung Adenocarcinoma: Flavin Reductase and Calreticulin Play Key Roles in the Development of Pemetrexed-Associated Resistance. *J Proteome Res*, 2015. 14(11): p. 4907-4920.
234. Gao, H., et al., Identification of DJ-1 as a contributor to multidrug resistance in human small-cell lung cancer using proteomic analysis. *Int J Exp Pathol*, 2017. 98(2): p. 67-74.
235. Lu, J., et al., Comparative Proteomics of Chromium-Transformed Beas-2B Cells by 2D-DIGE and MALDI-TOF/TOF MS. *Biol Trace Elem Res*, 2018. 185(1): p. 78-88.
236. Li, W., et al., Quantitative proteomics analysis of mitochondrial proteins in lung adenocarcinomas and normal lung tissue using iTRAQ and tandem mass spectrometry. *Am J Transl Res*, 2017. 9(9): p. 3918-3934.
237. Yang, S., et al., Protein signatures of molecular pathways in non-small cell lung carcinoma (NSCLC): comparison of glycoproteomics and global proteomics. *Clin Proteomics*, 2017. 14: p. 31.
238. Li, F., et al., ITRAQ-Based Proteomics Analysis of Triptolide On Human A549 Lung Adenocarcinoma Cells. *Cell Physiol Biochem*, 2018. 45(3): p. 917-934.
239. Paul, D., et al., Global proteomic profiling identifies etoposide chemoresistance markers in non-small cell lung carcinoma. *J Proteomics*, 2016. 138: p. 95-105.

240. Hsu, C.H., et al., Identification and Characterization of Potential Biomarkers by Quantitative Tissue Proteomics of Primary Lung Adenocarcinoma. *Mol Cell Proteomics*, 2016. 15(7): p. 2396-2410.
241. Li, Y., et al., Aberrant Mucin5B expression in lung adenocarcinomas detected by iTRAQ labeling quantitative proteomics and immunohistochemistry. *Clin Proteomics*, 2013. 10(1): p. 15.
242. Voortman, J., et al., Prediction of outcome of non-small cell lung cancer patients treated with chemotherapy and bortezomib by time-course MALDI-TOF-MS serum peptide profiling. *Proteome Sci*, 2009. 7: p. 34.
243. Han, M., et al., Identification of candidate molecular markers predicting chemotherapy resistance in non-small cell lung cancer. *Clin Chem Lab Med*, 2010. 48(6): p. 863-867.
244. Shen, H., et al., Serum Protein Pattern Could Predict the Therapeutic Effect of First-Line Pemetrexed/Cisplatin Chemotherapy in Patients With Lung Adenocarcinoma. *World J Oncol*, 2015. 6(1): p. 292-296.
245. Weidenauer, L., et al., Proteomic interrogation of HSP90 and insights for medical research. *Expert Rev Proteomics*, 2017. 14(12): p. 1105-1117.
246. Voruganti, S., et al., Proteomic Profiling of Hsp90 Inhibitors. *Methods Mol Biol*, 2018. 1709: p. 139-162.
247. Zimmer, A., et al., Dynamic proteomics reveals bimodal protein dynamics of cancer cells in response to HSP90 inhibitor. *BMC Syst Biol*, 2017. 11(1): p. 33.
248. Walter, R., et al., HSP90 promotes Burkitt lymphoma cell survival by maintaining tonic B-cell receptor signaling. *Blood*, 2017. 129(5): p. 598-608.
249. Nguyen, E.V., et al., Identification of Novel Response and Predictive Biomarkers to Hsp90 Inhibitors Through Proteomic Profiling of Patient-derived Prostate Tumor Explants. *Mol Cell Proteomics*, 2018. 17(8): p. 1470-1486.
250. Yuno, A., et al., Clinical Evaluation and Biomarker Profiling of Hsp90 Inhibitors. *Methods Mol Biol*, 2018. 1709: p. 423-441.
251. Prince, T., et al., Dual targeting of HSP70 does not induce the heat shock response and synergistically reduces cell viability in muscle invasive bladder cancer. *Oncotarget*, 2018. 9(66): p. 32702-32717.
252. Na, B.H., T.X. Hoang, and J.Y. Kim, Hsp90 Inhibition Reduces TLR5 Surface Expression and NF-kappaB Activation in Human Myeloid Leukemia THP-1 Cells. *Biomed Res Int*, 2018. 2018: p. 4319369.
253. Chatterjee, S., et al., HSP90 inhibitors in lung cancer: promise still unfulfilled. *Clin Adv Hematol Oncol*, 2016. 14(5): p. 346-356.
254. Richards, M.W., et al., Crystal structure of EML1 reveals the basis for Hsp90 dependence of oncogenic EML4-ALK by disruption of an atypical beta-propeller domain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014. 111(14): p. 5195-5200.
255. Conde, R., et al., Modulation of Hsf1 activity by novobiocin and geldanamycin. *Biochem Cell Biol*, 2009. 87(6): p. 845-851.
256. Kudryavtsev, V.A., et al., Induction of Hsp70 in tumor cells treated with inhibitors of the Hsp90 activity: A predictive marker and promising target for radiosensitization. *PLoS One*, 2017. 12(3): p. e0173640.

257. Chen, Y., et al., Targeting HSF1 sensitizes cancer cells to HSP90 inhibition. *Oncotarget*, 2013. 4(6): p. 816-829.
258. Pace, A., et al., Hsp60, a novel target for antitumor therapy: structure-function features and prospective drugs design. *Curr Pharm Des*, 2013. 19(15): p. 2757-2764.
259. Nakamura, H. and H. Minegishi, HSP60 as a drug target. *Curr Pharm Des*, 2013. 19(3): p. 441-451.
260. Xu, X., et al., Heat shock protein-60 expression was significantly correlated with the prognosis of lung adenocarcinoma. *J Surg Oncol*, 2011. 104(6): p. 598-603.
261. Ağababaoğlu, İ., et al., Chaperonin (HSP60) and annexin-2 are candidate biomarkers for non-small cell lung carcinoma. *Medicine (Baltimore)*, 2017. 96(6): p. e5903.
262. José-Enériz, E.S., et al., BCR-ABL1-induced expression of HSPA8 promotes cell survival in chronic myeloid leukaemia. *Br J Haematol*, 2008. 142(4): p. 571-582.
263. Noonan, E.J., et al., Hsp70B' regulation and function. *Cell Stress Chaperones*, 2007. 12(3): p. 219-229.
264. Ramirez, V.P., et al., Basal and stress-inducible expression of HSPA6 in human keratinocytes is regulated by negative and positive promoter regions. *Cell Stress Chaperones*, 2015. 20(1): p. 95-107.
265. Shin, S.S., et al., HSPA6 augments garlic extract-induced inhibition of proliferation, migration, and invasion of bladder cancer EJ cells; Implication for cell cycle dysregulation, signaling pathway alteration, and transcription factor-associated MMP-9 regulation. *PLoS One*, 2017. 12(2): p. e0171860.
266. Na, Y., et al., Stress chaperone mortalin contributes to epithelial-mesenchymal transition and cancer metastasis. *Cancer Res*, 2016. 76(9): p. 2754-2765.
267. Yun, C.O., et al., Relevance of mortalin to cancer cell stemness and cancer therapy. *Sci Rep*, 2017. 7: p. 42016.
268. Sun, J., et al., Mortalin overexpression predicts poor prognosis in early stage of non-small cell lung cancer. *Tumour Biol*, 2017. 39(3): p. 1010428317695918.
269. Lu, W.J., et al., Mortalin-p53 interaction in cancer cells is stress dependent and constitutes a selective target for cancer therapy. *Cell Death Differ*, 2011. 18(6): p. 1046-1056.
270. Lin, K., et al., Hsp90 inhibition has opposing effects on wild-type and mutant p53 and induces p21 expression and cytotoxicity irrespective of p53/ATM status in chronic lymphocytic leukaemia cells. *Oncogene*, 2008. 27(17): p. 2445-2455.
271. Chai, K., et al., Heat shock protein 90 inhibitors augment endogenous wild-type p53 expression but down-regulate the adenovirally-induced expression by inhibiting a proteasome activity. *Oncotarget*, 2018. 9(40): p. 26130-26143.
272. Cai, Y., et al., The predictive value of ERCC1 and p53 for the effect of panobinostat and cisplatin combination treatment in NSCLC. *Oncotarget*, 2015. 6(22): p. 18997-19005.
273. Kriegs, M., et al., Radiosensitization of NSCLC cells by EGFR inhibition is the result of an enhanced p53-dependent G1 arrest. *Radiother Oncol*, 2015. 115(1): p. 120-127.
274. Lai, S.L., R.P. Perng, and J. Hwang, p53 gene status modulates the chemosensitivity of non-small cell lung cancer cells. *J Biomed Sci*, 2000. 7(1): p. 64-70.
275. Gomes-Duarte, A., et al., eIF3: a factor for human health and disease. *RNA Biol*, 2018. 15(1): p. 26-34.

276. Hershey, J.W., Regulation of protein synthesis and the role of eIF3 in cancer. *Braz J Med Biol Res*, 2010. 43(10): p. 920-930.
277. Spilka, R., et al., Eukaryotic translation initiation factors in cancer development and progression. *Cancer Lett*, 2013. 340(1): p. 9-21.
278. Hershey, J.W., The role of eIF3 and its individual subunits in cancer. *Biochim Biophys Acta*, 2015. 1849(7): p. 792-800.
279. Matsuda, S., et al., Molecular cloning and characterization of human MAWD, a novel protein containing WD-40 repeats frequently overexpressed in breast cancer. *Cancer Res*, 2000. 60(1): p. 13-17.
280. Huang, J.S., et al., Diverse cellular transformation capability of overexpressed genes in human hepatocellular carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004. 315(4): p. 950-8.
281. Ahlemann, M., et al., Carcinoma-associated eIF3i overexpression facilitates mTOR-dependent growth transformation. *Mol Carcinog*, 2006. 45(12): p. 957-967.
282. Wang, Y.W., et al., Overexpressed-eIF3i interacted and activated oncogenic Akt1 is a theranostic target in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 2013. 58(1): p. 239-250.
283. Qi, J., et al., EIF3i promotes colon oncogenesis by regulating COX-2 protein synthesis and beta-catenin activation. *Oncogene*, 2014. 33(32): p. 4156-4163.
284. Lei, Y.X., P. Joseph, and T.M. Ong, Antisense inhibition of translation initiation factor 3 reverses its oncogenic potential. *Teratog Carcinog Mutagen*, 2002. 22(6): p. 403-409.
285. Joseph, P., Y.X. Lei, and T.M. Ong, Up-regulation of expression of translation factors--a novel molecular mechanism for cadmium carcinogenesis. *Mol Cell Biochem*, 2004. 255(1-2): p. 93-101.
286. Yuan, Y., et al., The translation initiation factor eIF3i up-regulates vascular endothelial growth factor A, accelerates cell proliferation, and promotes angiogenesis in embryonic development and tumorigenesis. *J Biol Chem*, 2014. 289(41): p. 28310-28323.
287. Zhang, Y., et al., eIF3i activity is critical for endothelial cells in tumor induced angiogenesis through regulating VEGFR and ERK translation. *Oncotarget*, 2017. 8(12): p. 19968-19979.
288. Masuda, E.S., et al., Rab37 is a novel mast cell specific GTPase localized to secretory granules. *FEBS Lett*, 2000. 470(1): p. 61-64.
289. Zerial, M. and H. McBride, Rab proteins as membrane organizers. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2001. 2(2): p. 107-117.
290. Bucci, C. and M. Chiariello, Signal transduction gRABs attention. *Cell Signal*, 2006. 18(1): p. 1-8.
291. Wu, C.Y., et al., Frequent down-regulation of hRAB37 in metastatic tumor by genetic and epigenetic mechanisms in lung cancer. *Lung Cancer*, 2009. 63(3): p. 360-367.
292. Tzeng, H.T., et al., Phosphorylation of Rab37 by protein kinase C alpha inhibits the exocytosis function and metastasis suppression activity of Rab37. *Oncotarget*, 2017. 8(65): p. 108556-108570.
293. Tsai, C.H., et al., Small GTPase Rab37 targets tissue inhibitor of metalloproteinase 1 for exocytosis and thus suppresses tumour metastasis. *Nat Commun*, 2014. 5: p. 4804.

294. Bronner, C.E., et al., Mutation in the DNA mismatch repair gene homologue hMLH1 is associated with hereditary non-polyposis colon cancer. *Nature*, 1994. 368(6468): p. 258-261.
295. Lu, Y., et al., MutL homolog 1 expression in thyroid carcinoma and its clinical significance. *J Cancer Res Ther*, 2016. 12(Supplement): p. C281-C283.
296. Hu, H., et al., Aberrant methylation of mutL homolog 1 is associated with increased risk of non-small cell lung cancer. *J Clin Lab Anal*, 2018. 32(5): p. e22370.
297. Hua, J., S. Li, and C. Huang, Clinical significance of chromodomain helicase/ATPase DNA binding protein 1-like and human mutL homolog 1 gene expression in cholangiocarcinoma. *Oncol Lett*, 2018. 16(3): p. 2989-2994.
298. Shi, B., et al., Promoter methylation of human mutL homolog 1 and colorectal cancer risk: A meta-analysis. *J Cancer Res Ther*, 2018. 14(4): p. 851-855.
299. Hashimoto, T., et al., Predictive value of MLH1 and PD-L1 expression for prognosis and response to preoperative chemotherapy in gastric cancer. *Gastric Cancer*, 2019. 22(4): p. 785-792.
300. Zweitzig, D.R., et al., Physiological stress induces the metastasis marker AGR2 in breast cancer cells. *Mol Cell Biochem*, 2007. 306(1-2): p. 255-260.
301. Di Maro, G., et al., Anterior gradient protein 2 promotes survival, migration and invasion of papillary thyroid carcinoma cells. *Mol Cancer*, 2014. 13: p. 160.
302. Maresh, E.L., et al., Differential expression of anterior gradient gene AGR2 in prostate cancer. *BMC Cancer*, 2010. 10: p. 680.
303. Riener, M.O., et al., Loss of anterior gradient-2 expression is an independent prognostic factor in colorectal carcinomas. *Eur J Cancer*, 2014. 50(10): p. 1722-1730.
304. Kim, S.J., et al., Expression of anterior gradient 2 is decreased with the progression of human biliary tract cancer. *Tohoku J Exp Med*, 2014. 234(1): p. 83-88.
305. Willis, S., et al., Single Gene Prognostic Biomarkers in Ovarian Cancer: A Meta-Analysis. *PLoS One*, 2016. 11(2): p. e0149183.
306. Alves, M.R., et al., Downregulation of AGR2, p21, and cyclin D and alterations in p53 function were associated with tumor progression and chemotherapy resistance in epithelial ovarian carcinoma. *Cancer Med*, 2018. 7(7): p. 3188-3199.
307. Millares, L., et al., Tumor-associated metabolic and inflammatory responses in early stage non-small cell lung cancer: Local patterns and prognostic significance. *Lung Cancer*, 2018. 122: p. 124-130.
308. Li, X.B., J.D. Gu, and Q.H. Zhou, Review of aerobic glycolysis and its key enzymes - new targets for lung cancer therapy. *Thorac Cancer*, 2015. 6(1): p. 17-24.
309. Giatromanolaki, A., et al., Expression of enzymes related to glucose metabolism in non-small cell lung cancer and prognosis. *Exp Lung Res*, 2017. 43(4-5): p. 167-174.
310. Chen, L., et al., Citrate synthase expression affects tumor phenotype and drug resistance in human ovarian carcinoma. *PLoS One*, 2014. 9(12): p. e115708.
311. Anderson, N.M., et al., The emerging role and targetability of the TCA cycle in cancer metabolism. *Protein Cell*, 2018. 9(2): p. 216-237.
312. Pavlova, N.N. and C.B. Thompson, The Emerging Hallmarks of Cancer Metabolism. *Cell Metab*, 2016. 23(1): p. 27-47.
313. Amelio, I., et al., Serine and glycine metabolism in cancer. *Trends Biochem Sci*, 2014. 39(4): p. 191-198.

314. Jain, M., et al., Metabolite profiling identifies a key role for glycine in rapid cancer cell proliferation. *Science*, 2012. 336(6084): p. 1040-1044.
315. Antonov, A., et al., Bioinformatics analysis of the serine and glycine pathway in cancer cells. *Oncotarget*, 2014. 5(22): p. 11004-11013.
316. Li, Q.Q., et al., Proteomic analysis of proteome and histone post-translational modifications in heat shock protein 90 inhibition-mediated bladder cancer therapeutics. *Sci Rep*, 2017. 7(1): p. 201.
317. Mbofung, R.M., et al., HSP90 inhibition enhances cancer immunotherapy by upregulating interferon response genes. *Nat Commun*, 2017. 8(1): p. 451.
318. Chen, T.L., et al., Hsp90 inhibition increases SOCS3 transcript and regulates migration and cell death in chronic lymphocytic leukemia. *Oncotarget*, 2016. 7(19): p. 28684-28696.
319. Uekita, T., et al., Membrane-type 1 matrix metalloproteinase cytoplasmic tail-binding protein-1 is a new member of the Cupin superfamily. A possible multifunctional protein acting as an invasion suppressor down-regulated in tumors. *J Biol Chem*, 2004. 279(13): p. 12734-12743.
320. Dunwell, J.M., A. Purvis, and S. Khuri, Cupins: the most functionally diverse protein superfamily? *Phytochemistry*, 2004. 65(1): p. 7-17.
321. Deshpande, A.R., et al., Dual chemistry catalyzed by human acireductone dioxygenase. *Protein Eng Des Sel*, 2017. 30(3): p. 197-204.
322. Pratt, J., et al., Evidence of MTCBP-1 interaction with the cytoplasmic domain of MT1-MMP: Implications in the autophagy cell index of high-grade glioblastoma. *Mol Carcinog*, 2016. 55(2): p. 148-160.
323. Su, L., et al., Enolase-phosphatase 1 as a novel potential malignant glioma indicator promotes cell proliferation and migration. *Oncol Rep*, 2018. 40(4): p. 2233-2241.
324. Oram, S.W., et al., Expression and function of the human androgen-responsive gene ADI1 in prostate cancer. *Neoplasia*, 2007. 9(8): p. 643-651.
325. Chu, Y.D., et al., The methionine salvage pathway-involving ADI1 inhibits hepatoma growth by epigenetically altering genes expression via elevating S-adenosylmethionine. *Cell Death Dis*, 2019. 10(3): p. 240.
326. Savino, T.M., et al., The nucleolar antigen Nop52, the human homologue of the yeast ribosomal RNA processing RRP1, is recruited at late stages of nucleologenesis. *J Cell Sci*, 1999. 112 (Pt 12): p. 1889-1900.
327. Yoshikawa, H., et al., Human nucleolar protein Nop52 (RRP1/NNP-1) is involved in site 2 cleavage in internal transcribed spacer 1 of pre-rRNAs at early stages of ribosome biogenesis. *Nucleic Acids Res*, 2015. 43(11): p. 5524-5536.
328. Yoshikawa, H., et al., Splicing factor 2-associated protein p32 participates in ribosome biogenesis by regulating the binding of Nop52 and fibrillarin to preribosome particles. *Mol Cell Proteomics*, 2011. 10(8): p. M110.006148.
329. Jahani, M., F. Noroznezhad, and K. Mansouri, Arginine: Challenges and opportunities of this two-faced molecule in cancer therapy. *Biomed Pharmacother*, 2018. 102: p. 594-601.
330. Wu, G., et al., Arginine metabolism and nutrition in growth, health and disease. *Amino Acids*, 2009. 37(1): p. 153-168.

331. Lukey, M.J., W.P. Katt, and R.A. Cerione, Targeting amino acid metabolism for cancer therapy. *Drug Discov Today*, 2017. 22(5): p. 796-804.
332. Ohshima, K., et al., Argininosuccinate Synthase 1-Deficiency Enhances the Cell Sensitivity to Arginine through Decreased DEPTOR Expression in Endometrial Cancer. *Sci Rep*, 2017. 7: p. 45504.
333. Haines, R.J., L.C. Pendleton, and D.C. Eichler, Argininosuccinate synthase: at the center of arginine metabolism. *Int J Biochem Mol Biol*, 2011. 2(1): p. 8-23.
334. Qiu, F., J. Huang, and M. Sui, Targeting arginine metabolism pathway to treat arginine-dependent cancers. *Cancer Lett*, 2015. 364(1): p. 1-7.
335. Delage, B., et al., Arginine deprivation and argininosuccinate synthetase expression in the treatment of cancer. *Int J Cancer*, 2010. 126(12): p. 2762-2772.
336. Keshet, R. and A. Erez, Arginine and the metabolic regulation of nitric oxide synthesis in cancer. *Dis Model Mech*, 2018. 11(8): dmm033332.
337. Napoli, C., et al., Effects of nitric oxide on cell proliferation: novel insights. *J Am Coll Cardiol*, 2013. 62(2): p. 89-95.
338. Ning, S., et al., Novel nitric oxide generating compound glycidyl nitrate enhances the therapeutic efficacy of chemotherapy and radiotherapy. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014. 447(3): p. 537-542.
339. Bonavida, B. and H. Garban, Nitric oxide-mediated sensitization of resistant tumor cells to apoptosis by chemo-immunotherapeutics. *Redox Biol*, 2015. 6: p. 486-494.
340. Dingemans, A.M., et al., A randomized phase II study comparing paclitaxel-carboplatin-bevacizumab with or without nitroglycerin patches in patients with stage IV nonsquamous nonsmall-cell lung cancer: NVALT12 (NCT01171170)dagger. *Ann Oncol*, 2015. 26(11): p. 2286-2293.
341. Carter, C.A., et al., Partial response to carboplatin in an RRx-001 pretreated patient with EGFR-inhibitor-resistance and T790M-negative NSCLC, in *Respir Med Case Rep*. 2016: p. 62-65.
342. Phillips, M.M., M.T. Sheaff, and P.W. Szlosarek, Targeting arginine-dependent cancers with arginine-degrading enzymes: opportunities and challenges. *Cancer Res Treat*, 2013. 45(4): p. 251-262.
343. Patil, M.D., et al., Arginine dependence of tumor cells: targeting a chink in cancer's armor. *Oncogene*, 2016. 35(38): p. 4957-4972.
344. Rabinovich, S., et al., Diversion of aspartate in ASS1-deficient tumours fosters de novo pyrimidine synthesis. *Nature*, 2015. 527(7578): p. 379-383.
345. Wei, W., et al., The E3 ubiquitin ligase ITCH negatively regulates canonical Wnt signaling by targeting dishevelled protein. *Mol Cell Biol*, 2012. 32(19): p. 3903-3912.
346. Serman, L., et al., Epigenetic alterations of the Wnt signaling pathway in cancer: a mini review. *Bosn J Basic Med Sci*, 2014. 14(4): p. 191-194.
347. Chen, X., et al., Fibulin-5 inhibits Wnt/beta-catenin signaling in lung cancer. *Oncotarget*, 2015. 6(17): p. 15022-15034.
348. Wan, L., et al., Circular RNA-ITCH Suppresses Lung Cancer Proliferation via Inhibiting the Wnt/beta-Catenin Pathway. *Biomed Res Int*, 2016. 2016: p. 1579490.
349. Popovic, D., D. Vucic, and I. Dikic, Ubiquitination in disease pathogenesis and treatment. *Nat Med*, 2014. 20(11): p. 1242-1253.

350. Bassermann, F., R. Eichner, and M. Pagano, The ubiquitin proteasome system - implications for cell cycle control and the targeted treatment of cancer. *Biochim Biophys Acta*, 2014. 1843(1): p. 150-162.
351. Han, X., et al., UbcH7 regulates 53BP1 stability and DSB repair. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014. 111(49): p. 17456-17461.
352. Lewis, M.J., et al., UBE2L3 polymorphism amplifies NF-kappaB activation and promotes plasma cell development, linking linear ubiquitination to multiple autoimmune diseases. *Am J Hum Genet*, 2015. 96(2): p. 221-234.
353. Ma, X., et al., Ubiquitin conjugating enzyme E2 L3 promoted tumor growth of NSCLC through accelerating p27kip1 ubiquitination and degradation. *Oncotarget*, 2017. 8(48): p. 84193-84203.
354. Mishra, D. and D. Banerjee, Lactate Dehydrogenases as Metabolic Links between Tumor and Stroma in the Tumor Microenvironment. *Cancers (Basel)*, 2019. 11(6): p. 750.
355. Nagamine, A., et al., L-Lactate dehydrogenase B may be a predictive marker for sensitivity to anti-EGFR monoclonal antibodies in colorectal cancer cell lines. *Oncol Lett*, 2019. 17(5): p. 4710-4716.
356. Dennison, J.B., et al., Lactate dehydrogenase B: a metabolic marker of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Clin Cancer Res*, 2013. 19(13): p. 3703-3713.
357. McClelland, M.L., et al., Lactate dehydrogenase B is required for the growth of KRAS-dependent lung adenocarcinomas. *Clin Cancer Res*, 2013. 19(4): p. 773-784.
358. Lee, H.J., et al., Drug resistance via feedback activation of Stat3 in oncogene-addicted cancer cells. *Cancer Cell*, 2014. 26(2): p. 207-221.
359. Giulino-Roth, L., et al., Inhibition of Hsp90 Suppresses PI3K/AKT/mTOR Signaling and Has Antitumor Activity in Burkitt Lymphoma. *Mol Cancer Ther*, 2017. 16(9): p. 1779-1790.
360. Hou, G.X., et al., Mining expression and prognosis of topoisomerase isoforms in non-small-cell lung cancer by using Oncomine and Kaplan-Meier plotter. *PLoS One*, 2017. 12(3): p. e0174515.
361. Lu, B., et al., Topoisomerase I expression is associated with prognosis in postoperative non-small cell lung cancer patients. *Thorac Cancer*, 2016. 7(4): p. 486-494.
362. Riedlinger, T., et al., Chemotherapeutic Drugs Inhibiting Topoisomerase 1 Activity Impede Cytokine-Induced and NF-kappaB p65-Regulated Gene Expression. *Cancers (Basel)*, 2019. 11(6): p. 883.
363. Iwagami, Y., et al., miR-320c regulates gemcitabine-resistance in pancreatic cancer via SMARCC1. *Br J Cancer*, 2013. 109(2): p. 502-511.
364. Remmelink, M., et al., Identification by means of cDNA microarray analyses of gene expression modifications in squamous non-small cell lung cancers as compared to normal bronchial epithelial tissue. *Int J Oncol*, 2005. 26(1): p. 247-258.
365. Gigeek, C.O., et al., SMARCA5 methylation and expression in gastric cancer. *Cancer Invest*, 2011. 29(2): p. 162-166.
366. Jin, Q., et al., Overexpression of SMARCA5 correlates with cell proliferation and migration in breast cancer. *Tumour Biol*, 2015. 36(3): p. 1895-1902.
367. Ribeyre, C., et al., Nascent DNA Proteomics Reveals a Chromatin Remodeler Required for Topoisomerase I Loading at Replication Forks. *Cell Rep*, 2016. 15(2): p. 300-309.

368. Ito, H., R. Morishita, and K.I. Nagata, Functions of Rhotekin, an Effector of Rho GTPase, and Its Binding Partners in Mammals. *Int J Mol Sci*, 2018. 19(7): p. 2121.
369. Fan, J., et al., Association between clinical characteristics and expression abundance of RTKN gene in human bladder carcinoma tissues from Chinese patients. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2005. 131(3): p. 157-162.
370. Chen, M., A.R. Bresnick, and K.L. O'Connor, Coupling S100A4 to Rhotekin alters Rho signaling output in breast cancer cells. *Oncogene*, 2013. 32(32): p. 3754-3764.
371. Liu, C.A., et al., Overexpression of rho effector rhotekin confers increased survival in gastric adenocarcinoma. *J Biomed Sci*, 2004. 11(5): p. 661-670.
372. Zhou, J., et al., MicroRNA-152 inhibits tumor cell growth by directly targeting RTKN in hepatocellular carcinoma. *Oncol Rep*, 2017. 37(2): p. 1227-1234.
373. Zhang, W., Z. Liang, and J. Li, Inhibition of rhotekin exhibits antitumor effects in lung cancer cells. *Oncol Rep*, 2016. 35(5): p. 2529-2534.
374. Reid, T., et al., Rhotekin, a new putative target for Rho bearing homology to a serine/threonine kinase, PKN, and rhophilin in the rho-binding domain. *J Biol Chem*, 1996. 271(23): p. 13556-13560.
375. Bishop, A.L. and A. Hall, Rho GTPases and their effector proteins. *Biochem J*, 2000. 348 Pt 2: p. 241-255.
376. Memmel, S., et al., Migration pattern, actin cytoskeleton organization and response to PI3K-, mTOR-, and Hsp90-inhibition of glioblastoma cells with different invasive capacities. *Oncotarget*, 2017. 8(28): p. 45298-45310.
377. Lopez, L.C., et al., Leigh syndrome with nephropathy and CoQ10 deficiency due to decaprenyl diphosphate synthase subunit 2 (PDSS2) mutations. *Am J Hum Genet*, 2006. 79(6): p. 1125-1129.
378. Turunen, M., J. Olsson, and G. Dallner, Metabolism and function of coenzyme Q. *Biochim Biophys Acta*, 2004. 1660(1-2): p. 171-199.
379. Fung, J.M., et al., Identification and characterization of a novel melanoma tumor suppressor gene on human chromosome 6q21. *Clin Cancer Res*, 2009. 15(3): p. 797-803.
380. Chen, P., et al., Anticancer activity of PDSS2, prenyl diphosphate synthase, subunit 2, in gastric cancer tissue and the SGC7901 cell line. *Anticancer Drugs*, 2009. 20(2): p. 141-148.
381. Chen, P., et al., Decrease of PDSS2 expression, a novel tumor suppressor, in non-small cell lung cancer. *Cancer Epidemiol*, 2013. 37(2): p. 166-171.
382. Chen, P., et al., The tumor-suppressing activity of the prenyl diphosphate synthase subunit 2 gene in lung cancer cells. *Anticancer Drugs*, 2014. 25(7): p. 790-798.
383. Brea-Calvo, G., et al., Chemotherapy induces an increase in coenzyme Q10 levels in cancer cell lines. *Free Radic Biol Med*, 2006. 40(8): p. 1293-1302.

Anexo I

Tabla A1. Proteínas diferencialmente expresadas identificadas mediante 2-DE y espectrometría de masas tras el tratamiento con 17-AAG de la línea celular de adenocarcinoma de pulmón HCC827.

Nº Spot	Acceso UniProt	Descripción de la Proteína	Ratio promedio	Conteo Péptidos	Puntuación Proteica	PM (Da)	pI
7703	Q59EJ3	Heat shock 70kDa protein 1A variant	10,68	16	153	78017,9	5,97
401	E2DRY6	Enolase	10,06	6	48	36873,8	6,17
1203	H0YK25	Serine/threonine-protein phosphatase 2A 56 kDa regulatory subunit gamma isoform	8,03	3	32	8070	8,86
305	A8W2J9	MutL-like 1 protein	7,55	3	39	6583,2	7,93
7802	H0YK21	AN1-type zinc finger protein 6	7,51	4	27	19117,1	6,71
3402	Q53F91	Villin 1 variant	7,19	13	55	93122,9	5,93
1205	E5RK51	Clathrin coat assembly protein AP180	6,91	4	30	17140,7	9,79
4404	L8EBH5	Alternative protein EML5	6,43	4	34	7919	4,69
6608	A4UHQ9	C2ORF3 variant 2	5,44	4	27	28031,7	5,08
2405	J3KTL0	Mitochondrial thiamine pyrophosphate carrier	5,40	5	45	9345,8	8,74
2807	F2Z3I5	TBC1 domain family member 5	5,35	2	27	4489,2	6
2406	H0Y456	Protein FAM210B	5,12	3	31	5784,9	10,23
3806	Q6PKD3	RDX protein	4,11	4	46	40485,5	9,53
7408	B4DXP1	Neurofibromin truncated	3,84	5	43	23505,1	8,43
6704	Q6IMJ7	NOELIN1_V4	3,65	7	46	16095,1	9,33
6408	E9PQA3	Condensin-2 complex subunit D3	3,31	5	34	22086,3	4,74
5606	H0YII4	Protein DDI1 homolog 2	2,72	3	25	11248,8	4,99
3801	H0YCM9	Nuclear receptor-interacting protein 3	2,39	2	15	7374,9	5,21
2805	F5H456	RRP12-like protein	2,37	11	32	113991,7	8,91
7901	M0R0K9	Transcription intermediary factor 1-beta	2,18	5	57	49031,1	4,85
7701	P08107	Heat shock 70 kDa protein 1A/1B	2,17	21	434	70294,1	5,48
2705	D6R9A2	Protein RMD5 homolog B	2,12	2	17	7223,5	4,8
4603	I3L156	Protein FAM64A	2,02	8	46	31223,8	9,61
1812	Q16315	Steroid 18-hydroxylase	-2,02	2	22	3874,1	12
6507	Q9H3J2	Brain my034 protein	-2,03	4	35	9613,8	9,24

2808	P02545	Prelamin-A/C	-2,15	9	36	74379,8	6,57
1311	V9HW65	Annexin	-2,70	13	135	38779,9	7,57
7409	Q13347	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit I	-3,20	7	74	36877,8	5,38
9606	L8EAP7	Alternative protein SCARF1	-3,29	3	38	4888,5	10,05
7405	H3BUG4	Anamorsin	-5,50	4	48	20298,8	6,53
5308	C9JAX4	Calcium-independent phospholipase A2-gamma	-5,80	8	47	22287,7	9,99
7803	E9PN89	Heat shock cognate 71 kDa protein	-5,84	7	58	34854	6,99
9607	U5YBT9	MHC class I antigen	-5,89	4	41	8897,4	5,36
6606	P50990	T-complex protein 1 subunit theta	-5,92	4	58	60152,7	5,42
8805	B4DEF7	cDNA FLJ60062, highly similar to 78 kDa glucose-regulated protein	-5,93	8	85	30457,9	5,77
5605	P55854	Small ubiquitin-related modifier 3	-6,37	4	32	11686,8	5,32
6810	Q2VPJ6	HSP90AA1 protein	-8,20	19	268	68613,9	5,11
6813	Q8N1C8	HSPA9 protein	-10,14	20	298	74093,1	6,04

PM= peso molecular; Da= dalton, pI= punto isoeléctrico

168

Tabla A2. Proteínas diferencialmente expresadas identificadas mediante 2-DE y espectrometría de masas tras el tratamiento con 17-AAG de la línea celular de adenocarcinoma de pulmón H3122.

Nº Spot	Acceso UniProt	Descripción de la Proteína	Ratio promedio	Conteo Péptidos	Puntuación Proteica	PM (Da)	pI
9007	O95994	Anterior gradient protein 2 homolog	10,12	8	270	20023,6	9,03
5601	Q6RFR5	Zinc finger protein 40	6,20	5	34	22043,8	9,52
3001	A8MX94	Glutathione S-transferase P	1,57	6	229	19696,1	5,67
2101	H0YM70	Proteasome activator complex subunit 2	1,55	2	46	26165,7	5,67
8101	D6RHH4	Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like 1	-1,46	4	143	26138,2	9,3
8504	Q16851	UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase	-1,74	11	73	57075,8	8,16
2304	Q5U0F4	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit I	-7,76	6	32	36877,8	5,38

PM= peso molecular; Da= dalton, pI= punto isoeléctrico

Tabla A3. Proteínas diferencialmente expresadas identificadas mediante 2-DE y espectrometría de masas tras el tratamiento con 17-AAG de la línea celular de adenocarcinoma de pulmón A549.

Nº Spot	Acceso UniProt	Descripción de la Proteína	Ratio promedio	Conteo Péptidos	Puntuación Proteica	PM (Da)	pI
5305	B6E242	MHC class I antigen	8,38	5	36	21162,1	5,32
9404	P04083	Annexin A1	7,58	16	349	38918,1	6,57
4003	B2ZWH0	HCG1771495, isoform CRA_b	6,75	8	35	63630,9	9,33
8407	B3KTN4	Citrate synthase	6,59	6	57	47218	6,74
6810	A8MZI4	Ras-related protein Rab-37	6,48	5	29	21899,1	6,9
6811	M0QXX8	Charged multivesicular body protein 2a	6,46	7	43	6647,6	10,35
7705	B3KSI4	Transketolase	6,36	8	89	59571,5	7,57
6706	A8MUA9	SMT3 suppressor of mif two 3 homolog 3 (Yeast), isoform CRA_d	4,97	4	28	15649,9	10,47
8505	Q9UHA9	Glutamate receptor C	2,15	3	25	6870,6	9,46
4502	K7EM24	V-type proton ATPase 116 kDa subunit a isoform 1	-6,02	4	22	15540,8	4,75
8601	P14618	Pyruvate kinase PKM	-9,97	14	108	58470,2	7,96

PM= peso molecular; Da= dalton; pI= punto isoeléctrico

Tabla A4. Proteínas diferencialmente expresadas identificadas mediante 2-DE y espectrometría de masas tras el tratamiento con 17-AAG de la línea celular de adenocarcinoma de pulmón H1437.

Nº Spot	Acceso UniProt	Descripción de la Proteína	Ratio promedio	Conteo Péptidos	Puntuación Proteica	PM (Da)	pI
3505	Q53FB6	Mitochondrial aldehyde dehydrogenase 2 variant	7,76	7	55	56844,8	6,63
7708	B3KSI4	Transketolase	7,58	15	292	59571,5	7,57
6704	Q9NSD9	Phenylalanine--tRNA ligase beta subunit	6,88	7	50	55338,9	7,19
7801	K7EQB6	DNA ligase 3	6,61	5	31	21097,9	6,09
4902	Q5JQ13	Vinculin	6,52	13	63	87732,1	5,64
5804	P13639	Elongation factor 2	5,96	25	296	96246,3	6,41
7602	O60701	UDP-glucose 6-dehydrogenase	1,98	10	67	55673,5	6,73

2801	Q13268	Dehydrogenase/reductase SDR family member 2, mitochondrial	1,90	6	34	30306,9	9,21
5401	Q9UQ80	Proliferation-associated protein 2G4	1,86	11	147	44101,3	6,13
6902	Q9C0H9	SRC kinase-signaling inhibitor 1	1,83	17	49	130667,9	9,29
8008	I4AY87	Macrophage migration inhibitory factor	-2,22	3	55	12639,3	7,74
8103	Q99714	3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase type-2	-5,57	8	149	27134,2	7,66
7005	A8MZI4	Ras-related protein Rab-37	-7,68	3	13	21899,1	6,9

PM= peso molecular; Da= dalton; pI= punto isoeléctrico

Tabla A5. Proteínas diferencialmente expresadas identificadas mediante 2-DE y espectrometría de masas tras el tratamiento con IPI-504 de la línea celular de adenocarcinoma de pulmón HCC827.

Nº Spot	Acceso UniProt	Descripción de la Proteína	Ratio promedio	Conteo Péptidos	Puntuación Proteica	PM (Da)	pI
5309	Q5U077	L-lactate dehydrogenase	9,22	11	304	36900,2	5,71
401	E2DRY6	Enolase	8,35	6	48	36873,8	6,17
1203	H0YK25	Serine/threonine-protein phosphatase 2A 56 kDa regulatory subunit gamma isoform	7,50	3	32	8070	8,86
405	H3BQN4	Fructose-bisphosphate aldolase	7,10	12	397	39771,6	8,65
3402	Q53F91	Villin 1 variant	6,95	13	55	93122,9	5,93
305	A8W2J9	MutL-like 1 protein	6,90	3	39	6583,2	7,93
4404	L8EBH5	Alternative protein EML5	6,54	4	34	7919	4,69
2406	H0Y456	Protein FAM210B	6,42	3	31	5784,9	10,23
1814	B2R506	Transcription initiation factor IIA subunit 2	6,40	6	51	12611,5	7,74
1205	E5RK51	Clathrin coat assembly protein AP180	5,70	4	30	17140,7	9,79
212	Q9UGN5	Poly [ADP-ribose] polymerase 2	5,69	11	47	66733,8	9,02
3811	Q9NY11	B-Raf protein	5,66	2	27	4795,5	9,31
2405	J3KTL0	Mitochondrial thiamine pyrophosphate carrier	5,57	5	45	9345,8	8,74
6608	A4UHQ9	C2ORF3 variant 2	5,19	4	27	28031,7	5,08
5712	D3DN77	HCG2022736, isoform CRA_a	5,18	4	32	30806	5,62
704	Q9H875	PRKR-interacting protein 1	4,95	4	26	20983,9	9,78
3814	E5RIA0	Vinexin	3,68	4	38	10538,4	9,34

3807	A8DPD7	Protein zyg-11 homolog B	3,61	8	32	64270,3	6,42
7408	Q96P08	Upstream ORF	3,52	2	26	2400,2	5,91
7703	Q59EJ3	Heat shock 70kDa protein 1A variant	3,49	16	153	78017,9	5,97
6805	B3KW56	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit E	2,78	8	39	46814,5	6,05
8702	P13796	Plastin-2	2,77	9	69	70814,1	5,29
7901	M0R0K9	Transcription intermediary factor 1-beta	2,53	5	57	49031,1	4,85
7701	Q59EJ3	Heat shock 70 kDa protein 1A/1B	2,41	19	364	78017,9	5,97
2705	B0YJ88	Radixin	2,26	12	82	68635,4	6,03
2805	F5H456	RRP12-like protein	2,11	11	32	113991,7	8,91
1811	I3L3U9	Ribosomal L1 domain-containing protein 1	-2,04	3	17	33993,4	10,02
7409	H7C1P9	Titin	-2,44	10	34	109223,8	5,38
3817	J3KN19	Coiled-coil domain-containing protein 90B, mitochondrial	-2,57	6	38	18896,7	6,43
6405	H7BZC5	Exportin-1	-2,64	3	26	8723,4	6,93
1605	D6RGH5	Kelch-like protein 8	-3,06	3	24	8965,2	6,25
9306	G9K388	YWHAE/FAM22A fusion protein	-3,19	6	142	41540,1	4,86
4407	Q53YD7	EEF1G protein	-3,94	6	31	50429,3	6,25
6107	C9JP36	NADH dehydrogenase [ubiquinone] complex I, assembly factor 7	-5,48	3	19	16505,7	7,82
7405	H3BUG4	Anamorsin	-5,50	4	48	20298,8	6,53
9305	Q8TDN2	Potassium voltage-gated channel subfamily V member 2	-5,64	9	39	63160,6	6,08
9702	Q59FJ2	Ubiquilin 1 isoform 1 variant	-5,72	4	31	34683,6	5,16
5308	C9JAX4	Calcium-independent phospholipase A2-gamma	-5,80	8	47	22287,7	9,99
7803	E9PN89	Heat shock cognate 71 kDa protein	-5,84	7	58	34854	6,99
6810	Q2VPJ6	HSP90AA1 protein	-8,20	19	268	68613,9	5,11
8701	Q53GZ6	Heat shock 70kDa protein 8 isoform 1 variant	-8,56	13	227	71083,2	5,28
506	B4DLV4	Serine hydroxymethyltransferase	-8,58	6	37	45158,1	9,36

PM= peso molecular; Da= dalton; pI= punto isoeléctrico

Tabla A6. Proteínas diferencialmente expresadas identificadas mediante 2-DE y espectrometría de masas tras el tratamiento con IPI-504 de la línea celular de adenocarcinoma de pulmón H3122.

Nº Spot	Acceso UniProt	Descripción de la Proteína	Ratio promedio	Conteo Péptidos	Puntuación Proteica	PM (Da)	pI
9007	O95994	Anterior gradient protein 2 homolog	11,50	8	270	20023,6	9,03
2803	Q14247	Src substrate cortactin	7,80	23	337	61719,6	5,24
902	Q2VPJ6	HSP90AA1 protein	1,41	7	32	68613,9	5,11
8603	B3KSI4	Transketolase	-1,44	9	82	59571,5	7,57
104	H3BNV5	3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1	-1,94		25	3589,8	10,17

PM= peso molecular; Da= dalton; pI= punto isoeléctrico

Tabla A7. Proteínas diferencialmente expresadas identificadas mediante 2-DE y espectrometría de masas tras el tratamiento con IPI-504 de la línea celular de adenocarcinoma de pulmón A549.

Nº Spot	Acceso UniProt	Descripción de la Proteína	Ratio promedio	Conteo Péptidos	Puntuación Proteica	PM (Da)	pI
3705	E7EP94	Heat shock 70 kDa protein 1A/1B	8,88	15	263	60090	5,45
8506	B2RNT0	EBF2 protein	8,07	7	45	21079,5	6,9
3605	MOQYR6	Urokinase plasminogen activator surface receptor	7,74	4	24	26441	5,64
5305	B6E242	MHC class I antigen	7,26	5	36	21162,1	5,32
7604	V9HVV6	Epididymis luminal protein 9	7,10	6	61	55396,2	6,49
8406	Q6IPN6	Elongation factor 1-alpha	7,04	6	35	50433,3	9,1
8407	B3KTN4	Citrate synthase	6,80	6	57	47218	6,74
4003	B2ZWH0	HCG1771495, isoform CRA_b	6,36	8	35	63630,9	9,33
7705	B3KSI4	Transketolase	6,23	8	89	59571,5	7,57
6706	A8MUA9	SMT3 suppressor of mif two 3 homolog 3 (Yeast), isoform CRA_d	6,12	4	28	15649,9	10,47
4708	Q59EJ3	Heat shock 70kDa protein 1A variant	5,93	11	96	78017,9	5,97
2901	H3BRR5	E3 ubiquitin-protein ligase ZNRF2	-2,10	1	11	1308,5	4,63
5802	Q5VVD3	Filamin-binding LIM protein 1	-2,15	4	49	1863	9,99

4502	K7EM24	V-type proton ATPase 116 kDa subunit a isoform 1	-6,02	4	22	15540,8	4,75
3704	X1WI29	Laminin subunit beta-3	-6,52	1	20	17779,2	5,54
3803	Q5TGN6	SAM and SH3 domain-containing protein 1	-7,63	3	24	9862,6	4,34
1501	V9HW31	ATP synthase subunit beta	-9,61	8	88	56524,6	5,26

PM= peso molecular; Da= dalton, pI= punto isoeléctrico

Tabla A8. Proteínas diferencialmente expresadas identificadas mediante 2-DE y espectrometría de masas tras el tratamiento con IPI-504 de la línea celular de adenocarcinoma de pulmón H1437.

Nº Spot	Acceso UniProt	Descripción de la Proteína	Ratio promedio	Conteo Péptidos	Puntuación Proteica	PM (Da)	pI
7708	B3KSI4	Transketolase	9,25	15	292	59571,5	7,57
6704	Q9NSD9	Phenylalanine--tRNA ligase beta subunit	7,81	7	50	55338,9	7,19
7801	K7EQB6	DNA ligase 3	7,74	5	31	21097,9	6,09
3505	Q53FB6	Mitochondrial aldehyde dehydrogenase 2 variant	7,68	7	55	56844,8	6,63
6801	Q53ZX7	Protease serine 1	7,01	2	37	9222,8	9,24
5804	P13639	Elongation factor 2	6,64	25	296	96246,3	6,41
1203	E9PPH7	Glutamine-rich protein 2	2,85	3	26	12221,1	4,72
7602	O60701	UDP-glucose 6-dehydrogenase	2,62	10	67	55673,5	6,73
4507	P06733	Alpha-enolase	2,33	7	104	47481,4	7,01
6902	Q9C0H9	SRC kinase-signaling inhibitor 1	2,32	17	49	130667,9	9,29
1704	E9PKE3	Heat shock cognate 71 kDa protein	2,18	26	632	68991,3	5,37
602	D6RA86	Macrophage erythroblast attacher	2,17	5	41	11948,2	7,79
5401	Q9UQ80	Proliferation-associated protein 2G4	1,98	11	147	44101,3	6,13
5601	P23141	Liver carboxylesterase 1	1,96	18	241	62766,3	6,15
4705	P26038	Moesin	1,91	19	224	67891,8	6,08
9003	P07737	Profilin-1	1,89	8	240	15215,6	8,44
6104	Q6XPS3	Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate 3-phosphatase TPTE2	1,87	9	37	61472,1	8,8
5807	Q4G0J3	La-related protein 7	1,81	8	24	67142,5	9,57
8103	Q99714	3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase type-2	-5,57	8	149	27134,2	7,66

3802	D6RGC2	Zinc finger protein 721	-5,84	7	45	19179,4	9,15
8401	P12532	Creatine kinase U-type, mitochondrial	-8,12	14	187	47406,4	8,6

PM= peso molecular; Da= dalton; pI= punto isoeléctrico

Tabla A9. Proteínas diferencialmente expresadas identificadas mediante 2-DE y espectrometría de masas tras el tratamiento con STA-9090 de la línea celular de adenocarcinoma de pulmón HCC827.

Nº Spot	Acceso UniProt	Descripción de la Proteína	Ratio promedio	Conteo Péptidos	Puntuación Proteica	PM (Da)	pI
7703	Q59EJ3	Heat shock 70kDa protein 1A variant	8,80	16	153	78017,9	5,97
3402	Q53F91	Villin 1 variant	7,64	13	55	93122,9	5,93
305	A8W2J9	MutL-like 1 protein	7,13	3	39	6583,2	7,93
212	Q9UGN5	Poly [ADP-ribose] polymerase 2	6,85	11	47	66733,8	9,02
401	E2DRY6	Enolase	6,84	6	48	36873,8	6,17
9205	F8VVF8	Tetraspanin-31	6,82	2	19	8681,1	4,6
3811	Q9NY11	B-Raf protein	6,56	2	27	4795,5	9,31
1203	H0YK25	Serine/threonine-protein phosphatase 2A 56 kDa regulatory subunit gamma isoform	6,21	3	32	8070	8,86
4404	L8EBH5	Alternative protein EML5	6,07	4	34	7919	4,69
2406	H0Y456	Protein FAM210B	4,88	3	31	5784,9	10,23
3814	E5RIA0	Vinexin	4,88	4	38	10538,4	9,34
6608	A4UHQ9	C2ORF3 variant 2	4,40	4	27	28031,7	5,08
6805	B3KW56	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit E	4,20	8	39	46814,5	6,05
5712	D3DN77	HCG2022736, isoform CRA_a	3,65	4	32	30806	5,62
2705	B0YJ88	Radixin	3,35	12	82	68635,4	6,03
3806	Q6PKD3	RDX protein	3,26	4	46	40485,5	9,53
6505	K7ERC1	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 36	2,98	6	48	7300,1	9,44
8	O14818	Proteasome subunit alpha type-7	2,64	7	186	28040,7	8,6
7408	Q96P08	Upstream ORF	2,49	2	26	2400,2	5,91
7901	B3KM80	Nucleolin, isoform CRA_c	2,42	10	199	58576,3	4,57

7	H7C333	Protein NipSnap homolog 2	2,18	6	107	13825,8	5,93
6	P37802	Transgelin-2	2,08	9	219	22548,2	8,41
3801	E9PJN0	Acyl-coenzyme A thioesterase 8	2,07	6	43	25328,9	6,59
3807	A8DPD7	Protein zyg-11 homolog B	2,01	8	32	64270,3	6,42
7701	P08107	Heat shock 70 kDa protein 1A/1B	1,51	21	434	70294,1	5,48
5808	Q92974	Rho guanine nucleotide exchange factor 2	-2,03	16	46	112385,7	6,89
7714	P10809	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	-2,32	7	239	61187,4	5,7
506	B4DLV4	Serine hydroxymethyltransferase	-2,32	6	37	45158,1	9,36
9306	G9K388	YWHAE/FAM22A fusion protein	-2,85	6	142	41540,1	4,86
4407	Q53YD7	EEF1G protein	-3,08	6	31	50429,3	6,25
4409	F5H361	Membrane-associated phosphatidylinositol transfer protein 2	-3,34	2	19	1832	6,04
5801	L0HBA3	Glucokinase	-3,99	3	27	5880,1	5,78
9803	Q9Y4C1	Lysine-specific demethylase 3A	-4,26	16	65	149471,9	8,4
3805	C9JVU9	Rho GTPase-activating protein 23	-4,56	6	33	152766,2	9,28
5301	A8MY60	Leucine-rich repeat and IQ domain-containing protein 1	-4,88	4	27	18653,7	4,11
9305	Q8TDN2	Potassium voltage-gated channel subfamily V member 2	-5,64	9	39	63160,6	6,08
5308	C9JAX4	Calcium-independent phospholipase A2-gamma	-5,80	8	47	22287,7	9,99
9607	U5YBT9	MHC class I antigen	-5,89	4	41	8897,4	5,36
5605	P55854	Small ubiquitin-related modifier 3	-6,37	4	32	11686,8	5,32
4810	A8MZI4	Ras-related protein Rab-37	-6,43	1	4	21899,1	6,9
3817	J3KN19	Coiled-coil domain-containing protein 90B, mitochondrial	-7,48	6	38	18896,7	6,43
6810	Q2VPJ6	HSP90AA1 protein	-8,20	19	268	68613,9	5,11
8701	Q53GZ6	Heat shock 70kDa protein 8 isoform 1 variant	-8,56	13	227	71083,2	5,28

PM= peso molecular; Da= dalton; pI= punto isoeléctrico

Tabla A10. Proteínas diferencialmente expresadas identificadas mediante 2-DE y espectrometría de masas tras el tratamiento con STA-9090 de la línea celular de adenocarcinoma de pulmón H3122.

Nº Spot	Acceso UniProt	Descripción de la Proteína	Ratio promedio	Conteo Péptidos	Puntuación Proteica	PM (Da)	pI
9007	O95994	Anterior gradient protein 2 homolog	10,76	8	270	20023,6	9,03
3802	P13010	X-ray repair cross-complementing protein 5	2,11	12	44	83222,5	5,55
1606	P10809	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	1,67	23	355	61187,4	5,7
8210	Q9Y617	Phosphoserine aminotransferase	1,65	7	77	40796	7,56
902	Q2VPJ6	HSP90AA1 protein	1,64	7	32	68613,9	5,11
2702	E9PKE3	Heat shock cognate 71 kDa protein	1,60	27	548	68991,3	5,37
4301	Q860Y7	MHC class II antigen	1,58	4	27	10920,3	7,1
6306	F5H6T1	Actin-related protein 2	1,56	10	107	34728,9	5,3
2705	P38646	Stress-70 protein, mitochondrial	1,55	23	259	73919,9	5,87
2102	Q9P086	Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 11	1,48	3	27	13234,7	5,71
8602	P14618	Pyruvate kinase PKM	1,43	13	120	58470,2	7,96
4501	A6PVW9	Selenium-binding protein 1	1,43	9	66	57457,1	6,04
6208	F2Z3G2	85/88 kDa calcium-independent phospholipase A2	1,40	3	25	11215,7	9,6
6102	P10768	S-formylglutathione hydrolase	1,40	4	20	31955,7	6,54
8002	Q5VVD3	Filamin-binding LIM protein 1	-1,71	4	50	1863	9,99
5403	E7EU23	Rab GDP dissociation inhibitor beta	-1,94	12	164	51604,4	8,37
5104	P30040	Endoplasmic reticulum resident protein 29	-4,01	3	44	29032,2	6,77
2304	Q5U0F4	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit I	-7,76	6	32	36877,8	5,38

PM= peso molecular; Da= dalton; pI= punto isoeléctrico

Tabla A11. Proteínas diferencialmente expresadas identificadas mediante 2-DE y espectrometría de masas tras el tratamiento con STA-9090 de la línea celular de adenocarcinoma de pulmón A549.

Nº Spot	Acceso UniProt	Descripción de la Proteína	Ratio promedio	Conteo Péptidos	Puntuación Proteica	PM (Da)	pI
4602	Q5SYQ9	Retinal dehydrogenase 1	7,81	4	60	25583,1	5,95
4003	B2ZWH0	HCG1771495, isoform CRA_b	7,55	8	35	63630,9	9,33
8503	P06733	Alpha-enolase	7,51	7	39	47481,4	7,01
6808	H0YDL5	Ras-related protein Rab-2A	6,72	2	15	7756,9	8,98
6806	Q9UJZ6	Ezrin	5,73	1	24	19280,9	9,19
7601	P11413	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	2,43	19	186	59675,2	6,39
4801	Q9BYD2	39S ribosomal protein L9, mitochondrial	-2,16	10	48	30395,5	10,09
4103	D5FUG7	MHC class II antigen	-2,21	5	38	10914,3	6,14
5003	Q2TSD0	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	-2,23	8	44	36197,5	8,57
7401	P49411	Elongation factor Tu, mitochondrial	-2,44	8	76	49852,3	7,26
2901	H3BRR5	E3 ubiquitin-protein ligase ZNRF2	-2,72	1	11	1308,5	4,63
3004	C9J999	Kelch-like protein 10	-2,84	4	26	14110,9	6,28
8403	Q4G0W7	LRRC8C protein	-3,55	2	16	7384,6	5,56
4305	Q9UHD2	Serine/threonine-protein kinase TBK1	-4,13	13	44	84216	6,32
3501	H0YNM6	Sodium/nucleoside cotransporter 2	-5,29	7	42	22023,9	10,05
4802	Q5BKV1	MYH9 protein	-5,44	4	30	24988,7	7,63
4707	Q16315	Steroid 18-hydroxylase	-5,73	2	23	3874,1	12
7207	Q92890	Ubiquitin fusion degradation protein 1 homolog	-5,95	6	31	34763,4	6,27
4502	K7EM24	V-type proton ATPase 116 kDa subunit a isoform 1	-6,02	4	22	15540,8	4,75
7703	Q9UP08	CLN3 protein	-6,51	2	18	3083,3	7,82
3704	X1WI29	Laminin subunit beta-3	-6,52	1	20	17779,2	5,54
5004	F8VQR7	Cysteine and glycine-rich protein 2	-6,61	4	24	21633,1	8,77
4301	D6RDB1	Small integral membrane protein 14	-6,91	2	19	4474,1	5,37
7003	B0YJ06	tRNA (cytosine(38)-C(5))-methyltransferase	-6,99	1	19	13158,8	9,3
5903	H0YKK6	Proteasome activator complex subunit 1	-7,09	3	21	10569,5	8,86
4304	A8MZI4	Ras-related protein Rab-37	-7,19	5	31	21899,1	6,9

5201	J3KTA6	Oxysterol-binding protein-related protein 1	-7,61	2	20	5825	6,71
3803	Q5TGN6	SAM and SH3 domain-containing protein 1	-7,63	3	24	9862,6	4,34
9701	L8E9J1	Alternative protein ILF3	-7,72	5	41	11754,8	8,88
7502	B1AHM5	Fibulin-1	-7,74	3	31	3186,4	5,51
9603	M0R1G3	Zinc finger protein 708	-7,84	4	30	7731,9	9,79
7403	Q9NPA8	Transcription and mRNA export factor ENY2	-7,92	7	42	11635,4	9,39
9005	Q8NEU1	TTL/TEL fusion protein TTL-B2	-8,05	3	36	2745,4	4,94
9103	B4DLR8	NAD(P)H dehydrogenase [quinone] 1	-8,39	3	40	22835,9	8,5
9703	D3DV75	Adenosine deaminase, RNA-specific, isoform CRA_b	-8,64	6	22	99823,3	8,89
7205	O60218	Aldo-keto reductase family 1 member B10	-9,02	11	234	36224,9	7,67
9403	P50454	Serpin H1	-9,53	4	47	46525,2	8,75
1501	V9HW31	ATP synthase subunit beta	-9,61	8	88	56524,6	5,26

PM= peso molecular; Da= dalton; pI= punto isoeléctrico

178

Tabla A12. Proteínas diferencialmente expresadas identificadas mediante 2-DE y espectrometría de masas tras el tratamiento con STA-9090 de la línea celular de adenocarcinoma de pulmón H1437.

Nº Spot	Acceso UniProt	Descripción de la Proteína	Ratio promedio	Conteo Péptidos	Puntuación Proteica	PM (Da)	pI
7708	B3KSI4	Transketolase	7,39	15	292	59571,5	7,57
7801	K7EQB6	DNA ligase 3	7,00	5	31	21097,9	6,09
3505	Q53FB6	Mitochondrial aldehyde dehydrogenase 2 variant	6,81	7	55	56844,8	6,63
6704	Q9NSD9	Phenylalanine--tRNA ligase beta subunit	6,74	7	50	55338,9	7,19
6801	Q53ZX7	Protease serine 1	6,68	2	37	9222,8	9,24
4902	Q5JQ13	Vinculin	6,42	13	63	87732,1	5,64
5804	P13639	Elongation factor 2	6,00	25	296	96246,3	6,41
6902	Q9COH9	SRC kinase-signaling inhibitor 1	1,93	17	49	130668	9,29
7602	O60701	UDP-glucose 6-dehydrogenase	1,92	10	67	55673,5	6,73
8103	Q99714	3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase type-2	-5,57	8	149	27134,2	7,66
2605	L8ECL8	Alternative protein FGF1	-6,65	5	63	5995	7,79

8506	P12532	Creatine kinase U-type, mitochondrial	-7,55	6	65	47406,4	8,6
------	--------	---------------------------------------	-------	---	----	---------	-----

PM= peso molecular; Da= dalton; pI= punto isoeléctrico

Tabla A13. Proteínas diferencialmente expresadas identificadas mediante 2-DE y espectrometría de masas tras el tratamiento con AUY-922 de la línea celular de adenocarcinoma de pulmón HCC827.

Nº Spot	Acceso UniProt	Descripción de la Proteína	Ratio promedio	Conteo Péptidos	Puntuación Proteica	PM (Da)	pI
7703	Q59EJ3	Heat shock 70kDa protein 1A variant	9,09	16	153	78017,9	5,97
401	E2DRY6	Enolase	8,36	6	48	36873,8	6,17
3402	Q53F91	Villin 1 variant	7,63	13	55	93122,9	5,93
305	A8W2J9	MutL-like 1 protein	7,45	3	39	6583,2	7,93
4404	L8EBH5	Alternative protein EML5	6,67	4	34	7919	4,69
1203	H0YK25	Serine/threonine-protein phosphatase 2A 56 kDa regulatory subunit gamma isoform	6,58	3	32	8070	8,86
1205	E5RK51	Clathrin coat assembly protein AP180	6,50	4	30	17140,7	9,79
2406	H0Y456	Protein FAM210B	6,02	3	31	5784,9	10,23
1815	I3L407	Ketosamine-3-kinase	5,98	6	55	6147	8,8
212	Q9UGN5	Poly [ADP-ribose] polymerase 2	5,92	11	47	66733,8	9,02
2807	F2Z3I5	TBC1 domain family member 5	5,21	2	27	4489,2	6
5712	D3DN77	HCG2022736, isoform CRA_a	4,95	4	32	30806	5,62
3811	Q9NY11	B-Raf protein	4,61	2	27	4795,5	9,31
7802	H0YK21	AN1-type zinc finger protein 6	4,60	4	27	19117,1	6,71
3807	A8DPD7	Protein zyg-11 homolog B	3,87	8	32	64270,3	6,42
7408	Q96P08	Upstream ORF	3,75	2	26	2400,2	5,91
6608	A4UHQ9	C2ORF3 variant 2	3,68	4	27	28031,7	5,08
3814	E5RIA0	Vinexin	3,35	4	38	10538,4	9,34
3806	Q6PKD3	RDX protein	3,28	4	46	40485,5	9,53
6805	B3KW56	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit E	2,84	8	39	46814,5	6,05
3801	E9PJN0	Acyl-coenzyme A thioesterase 8	2,29	6	43	25328,9	6,59
2705	BOYJ88	Radixin	2,20	12	82	68635,4	6,03

7701	P08107	Heat shock 70 kDa protein 1A/1B	1,01	21	434	70294,1	5,48
1605	D6RGH5	Kelch-like protein 8	-2,26	3	24	8965,2	6,25
3817	J3KN19	Coiled-coil domain-containing protein 90B, mitochondrial	-2,45	6	38	18896,7	6,43
5801	L0HBA3	Glucokinase	-2,82	3	27	5880,1	5,78
6810	Q2VPJ6	HSP90AA1 protein	-3,84	19	268	68613,9	5,11
5308	C9JAX4	Calcium-independent phospholipase A2-gamma	-5,80	8	47	22287,7	9,99
5605	P55854	Small ubiquitin-related modifier 3	-6,37	4	32	11686,8	5,32
9306	G9K388	YWHAE/FAM22A fusion protein	-6,76	6	142	41540,1	4,86
8701	Q53GZ6	Heat shock 70kDa protein 8 isoform 1 variant	-8,56	13	227	71083,2	5,28

PM= peso molecular; Da= dalton; pI= punto isoeléctrico

Tabla A14. Proteínas diferencialmente expresadas identificadas mediante 2-DE y espectrometría de masas tras el tratamiento con AUY-922 de la línea celular de adenocarcinoma de pulmón H3122.

Nº Spot	Acceso UniProt	Descripción de la Proteína	Ratio promedio	Conteo Péptidos	Puntuación Proteica	PM (Da)	pI
9007	O95994	Anterior gradient protein 2 homolog	11,48	8	270	20023,6	9,03
5601	Q6RFR5	Zinc finger protein 40	6,05	5	34	22043,8	9,52
8210	Q9Y617	Phosphoserine aminotransferase	2,01	7	77	40796	7,56
6102	P10768	S-formylglutathione hydrolase	1,83	4	20	31955,7	6,54
6001	G3V5Z7	Proteasome subunit alpha type	1,39	7	58	28528,4	6,35
2903	Q9P2M7	Cingulin	-1,44	16	183	136532,2	5,46
6504	A8K8D9	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	-7,38	8	60	59733,2	6,27
2304	Q5U0F4	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit I	-7,76	6	32	36877,8	5,38
1902	Q6IN67	HYOU1 protein	-8,63	13	126	75524,7	5,55

PM= peso molecular; Da= dalton; pI= punto isoeléctrico

Tabla A15. Proteínas diferencialmente expresadas identificadas mediante 2-DE y espectrometría de masas tras el tratamiento con AUY-922 de la línea celular de adenocarcinoma de pulmón A549.

Nº Spot	Acceso UniProt	Descripción de la Proteína	Ratio promedio	Conteo Péptidos	Puntuación Proteica	PM (Da)	pI
8406	Q6IPN6	Elongation factor 1-alpha	10,04	6	35	50433,3	9,1
8705	B8ZZG1	MAGUK p55 subfamily member 6	7,98	10	47	48955,5	8,88
5305	B6E242	MHC class I antigen	6,93	5	36	21162,1	5,32
4003	B2ZWH0	HCG1771495, isoform CRA_b	6,62	8	35	63630,9	9,33
6707	E7EP94	Heat shock 70 kDa protein 1A/1B	6,55	6	49	60090	5,45
7705	B3KSI4	Transketolase	6,10	8	89	59571,5	7,57
7907	F8VZR2	YY1-associated factor 2	-2,10	3	32	3898	10,91
4502	K7EM24	V-type proton ATPase 116 kDa subunit a isoform 1	-6,02	4	22	15540,8	4,75
5802	Q5VVD3	Filamin-binding LIM protein 1	-6,34	4	49	1863	9,99
9701	L8E9J1	Alternative protein ILF3	-7,72	5	41	11754,8	8,88
9005	Q8NEU1	TTL/TEL fusion protein TTL-B2	-8,05	3	36	2745,4	4,94
9103	B4DLR8	NAD(P)H dehydrogenase [quinone] 1	-8,39	3	40	22835,9	8,5
9703	D3DV75	Adenosine deaminase, RNA-specific, isoform CRA_b	-8,64	6	22	99823,3	8,89
9403	P50454	Serpin H1	-9,53	4	47	46525,2	8,75
1501	V9HW31	ATP synthase subunit beta	-9,61	8	88	56524,6	5,26
8601	P14618	Pyruvate kinase PKM	-9,97	14	108	58470,2	7,96
2901	H3BRR5	E3 ubiquitin-protein ligase ZNRF2	-10,53	1	11	1308,5	4,63

PM= peso molecular; Da= dalton; pI= punto isoeléctrico

Tabla A16. Proteínas diferencialmente expresadas identificadas mediante 2-DE y espectrometría de masas tras el tratamiento con AUY-922 de la línea celular de adenocarcinoma de pulmón H1437.

Nº Spot	Acceso UniProt	Descripción de la Proteína	Ratio promedio	Conteo Péptidos	Puntuación Proteica	PM (Da)	pI
7708	B3KSI4	Transketolase	8,16	15	292	59571,5	7,57
6704	Q9NSD9	Phenylalanine--tRNA ligase beta subunit	7,36	7	50	55338,9	7,19
7801	K7EQB6	DNA ligase 3	7,11	5	31	21097,9	6,09
3505	Q53FB6	Mitochondrial aldehyde dehydrogenase 2 variant	6,55	7	55	56844,8	6,63
6801	Q53ZX7	Protease serine 1	6,41	2	37	9222,8	9,24
4902	Q5JQ13	Vinculin	6,33	13	63	87732,1	5,64
5804	P13639	Elongation factor 2	5,90	25	296	96246,3	6,41
5103	P25786	Proteasome subunit alpha type-1	2,24	9	148	29822	6,15
6006	P62937	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	1,97	7	159	18229	7,68
8605	V9HWB8	Pyruvate kinase	-2,50	32	699	58470,2	7,96
8103	Q99714	3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase type-2	-5,57	8	149	27134,2	7,66
1204	M0R1T0	Zinc finger protein 83	-5,91	2	32	6483,3	5,1
2605	L8ECL8	Alternative protein FGF1	-6,65	5	63	5995	7,79
6205	D6R909	Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like 1	-7,12	2	33	13075,4	6,26

PM= peso molecular; Da= dalton; pI= punto isoeléctrico

Tabla A17. Proteínas diferencialmente expresadas identificadas mediante 2-DE y espectrometría de masas tras el tratamiento combinado con el inhibidor de HSP70 VER-155008 y el inhibidor de HSP90 17-AAG de la línea celular de adenocarcinoma de pulmón HCC827.

Nº Spot	Acceso UniProt	Descripción de la Proteína	Ratio promedio	Conteo Péptidos	Puntuación Proteica	PM (Da)	pI
7703	Q59EJ3	Heat shock 70kDa protein 1A variant	9,42	16	153	78017,9	5,97
401	E2DRY6	Enolase	8,47	6	48	36873,8	6,17
305	A8W2J9	MutL-like 1 protein	7,41	3	39	6583,2	7,93
4404	L8EBH5	Alternative protein EML5	6,84	4	34	7919	4,69

5712	D3DN77	HCG2022736, isoform CRA_a	4,69	4	32	30806	5,62
3814	E5RIA0	Vinexin	4,17	4	38	10538,4	9,34
7408	Q96P08	Upstream ORF	4,09	2	26	2400,2	5,91
3807	A8DPD7	Protein zyg-11 homolog B	3,86	8	32	64270,3	6,42
1608	Q53HV2	Chaperonin containing TCP1, subunit 7 (Eta) variant	3,42	7	46	59816,1	7,55
3816	Q6PJT4	MSN protein	3,11	7	42	38916,5	9,37
2705	B0YJ88	Radixin	3,08	12	82	68635,4	6,03
3801	E9PJN0	Acyl-coenzyme A thioesterase 8	3,04	6	43	25328,9	6,59
3806	Q6PKD3	RDX protein	3,01	4	46	40485,5	9,53
2805	F5H456	RRP12-like protein	2,77	11	32	113991,7	8,91
7803	P13667	Protein disulfide-isomerase A4	2,75	9	34	73229,1	4,96
1804	F2WW53	Catechol-O-methyltransferase	2,61	2	28	3073,6	6,13
8	O14818	Proteasome subunit alpha type-7	2,48	7	186	28040,7	8,6
5306	Q5TGN6	SAM and SH3 domain-containing protein 1	2,43	3	25	9862,6	4,34
101	P00338	L-lactate dehydrogenase A chain	2,39	18	225	36950,5	8,44
2706	H0YG99	Forkhead box protein M1	2,38	3	23	23039,4	9,84
3403	Q8TBX8	Phosphatidylinositol 5-phosphate 4-kinase type-2 gamma	2,35	12	122	47441,2	6,36
3505	P14868	Aspartate--tRNA ligase, cytoplasmic	2,28	24	347	57499,2	6,11
6	P37802	Transgelin-2	2,25	9	219	22548,2	8,41
603	B4E022	Transketolase	2,19	13	186	63409,5	7,23
8702	B4DUA0	Plastin-2	2,16	4	93	21949,2	5,31
5909	E5KNY5	Leucine-rich PPR-motif containing	2,16	14	50	159002,6	5,81
7701	P08107	Heat shock 70 kDa protein 1A/1B	2,08	21	434	70294,1	5,48
6001	E9PMA1	E3 ubiquitin-protein ligase synoviolin	2,05	6	40	28016,3	7,04
6704	Q9UMA4	IFN- α 2 protein	2,01	3	26	8288,2	8,88
6108	Q8N782	Zinc finger protein 525	2,00	4	24	24138,3	8,98
8604	P10809	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	-2,15	20	541	61187,4	5,7
4401	U3KPS1	Beta-secretase 1	-2,24	2	17	6242,1	5,09
4303	O43745	Calcineurin B homologous protein 2	-2,33	4	37	22438,5	5,89
3308	E7ER40	PHD finger protein 3	-3,95	10	30	97261,5	5,93
9803	Q9Y4C1	Lysine-specific demethylase 3A	-4,26	16	65	149471,9	8,4

2403	E9PK75	Retinoic acid receptor RXR-beta	-4,53	3	22	8497,1	8,94
5301	A8MY60	Leucine-rich repeat and IQ domain-containing protein 1	-4,88	4	27	18653,7	4,11
2505	H0Y562	Serine/threonine-protein phosphatase 2A activator	-4,90	3	21	14082,8	5,13
6205	O60699	Type V AF10 protein	-5,13	3	27	6782,1	7,04
4306	Q96DC8	Enoyl-CoA hydratase domain-containing protein 3, mitochondrial	-5,37	7	43	32955,1	8,9
6107	C9JP36	NADH dehydrogenase [ubiquinone] complex I, assembly factor 7	-5,48	3	19	16505,7	7,82
2608	P54577	Tyrosine--tRNA ligase, cytoplasmic	-5,48	10	60	59448,2	6,61
1309	V9GY50	Thioredoxin domain-containing protein 12	-5,49	2	18	6094,1	7,98
2504	Q5TCS8	Adenylate kinase 9	-5,55	22	58	222698,4	4,96
2904	A8MZI4	Ras-related protein Rab-37	-5,56	4	23	21899,1	6,9
4408	Q5VVL7	Lipoamide acyltransferase component of branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase complex, mitochondrial	-5,58	8	39	36500	8,94
9304	F8VQR7	Cysteine and glycine-rich protein 2	-5,62	3	18	21633,1	8,77
9305	Q8TDN2	Potassium voltage-gated channel subfamily V member 2	-5,64	9	39	63160,6	6,08
4407	Q53YD7	EEF1G protein	-5,72	6	31	50429,3	6,25
9702	Q59FJ2	Ubiquilin 1 isoform 1 variant	-5,72	4	31	34683,6	5,16
6907	B3KM80	Nucleolin, isoform CRA_c	-5,76	13	170	58576,3	4,57
2607	H0YDX1	ADP-ribosylation factor GTPase-activating protein 2	-5,76	4	28	15132,3	9,38
4811	D0EZN6	Cytochrome p450	-5,78	3	30	4851,4	5,04
503	Q6LC80	Phospholipase C-gamma 1	-5,79	2	21	1165,4	5,25
5308	C9JAX4	Calcium-independent phospholipase A2-gamma	-5,80	8	47	22287,7	9,99
3007	E5RGR0	Acyl-protein thioesterase 1	-5,86	4	131	21189,7	6,57
9607	U5YBT9	MHC class I antigen	-5,89	4	41	8897,4	5,36
6606	P50990	T-complex protein 1 subunit theta	-5,92	4	58	60152,7	5,42
8805	B4DEF7	cDNA FLJ60062, highly similar to 78 kDa glucose-regulated protein	-5,93	8	85	30457,9	5,77
1702	P02545	Prelamin-A/C	-6,02	15	144	74379,8	6,57
2707	B4X9P1	DSCR1	-6,17	1	13	977,4	3,68
4507	B5BUB1	RuvB-like 1	-6,20	8	53	50526,4	6,02
3506	F5H343	Ras association domain-containing protein 8	-6,22	2	24	3317,7	4,41
3301	P61163	Alpha-centractin	-6,23	5	41	42700,9	6,19
1701	H0Y7K8	Structural maintenance of chromosomes protein 1A	-6,26	5	24	30525,1	9,01

1302	J3KSS3	FYVE, RhoGEF and PH domain-containing protein 4	-6,35	3	37	3265,6	6,07
4504	F5H715	Axin interactor, dorsalization-associated protein	-6,48	9	50	32171,9	6,48
1103	Q8NFV4	Alpha/beta hydrolase domain-containing protein 11	-6,62	8	171	34725,1	9,5
3006	E9PFE2	General transcription factor II-I repeat domain-containing protein 1	-6,67	11	42	107009,2	7,52
9306	G9K388	YWHAE/FAM22A fusion protein	-6,76	6	142	41540,1	4,86
3503	O94925	Glutaminase kidney isoform, mitochondrial	-6,82	7	26	74269,2	7,85
3204	P11908	Ribose-phosphate pyrophosphokinase 2	-6,96	4	29	35146,1	6,15
3102	Q15056	Eukaryotic translation initiation factor 4H	-7,02	2	26	27425,4	6,67
2202	M0R071	Zinc finger protein 100	-7,09	5	36	17913,8	6,81
4004	Q14098	Steroid 18-hydroxylase	-7,09	2	24	3292,8	11,83
1004	Q53GF5	Proteasome subunit alpha type	-7,10	4	64	25938,3	7,71
4409	F5H361	Membrane-associated phosphatidylinositol transfer protein 2	-7,12	2	19	1832	6,04
2303	E9PRQ6	Acetyl-CoA acetyltransferase, mitochondrial	-7,15	6	46	15321,1	9,55
1605	D6RGH5	Kelch-like protein 8	-7,16	3	24	8965,2	6,25
4101	F8VY02	Endoplasmic reticulum resident protein 29	-7,26	3	133	18161,4	7,71
2704	H7C348	Glyoxalase domain-containing protein 5	-7,29	6	42	14580,4	5,54
3001	P60900	Proteasome subunit alpha type-6	-7,32	7	155	27838	6,34
5003	Q19UL8	Coagulation factor IX	-7,43	4	40	6547,1	5,1
2006	P49773	Histidine triad nucleotide-binding protein 1	-7,48	2	30	13907,1	6,43
2701	Q53F90	Guanine monophosphate synthetase variant	-7,55	4	36	77389,2	6,24
2301	Q9NR45	Sialic acid synthase	-7,80	3	53	40737,6	6,29
3406	J3KS23	Core-binding factor subunit beta	-7,82	3	21	9787,9	5,18
4402	P04181	Ornithine aminotransferase, mitochondrial	-7,95	17	400	48846,3	6,57
1101	Q13126	S-methyl-5'-thioadenosine phosphorylase	-8,06	5	56	31729	6,75
6810	Q2VPJ6	HSP90AA1 protein	-8,20	19	268	68613,9	5,11
1504	P43490	Nicotinamide phosphoribosyltransferase	-8,44	6	36	55771,7	6,69

PM= peso molecular; Da= dalton; pI= punto isoeléctrico

Tabla A18. Proteínas diferencialmente expresadas identificadas mediante 2-DE y espectrometría de masas tras el tratamiento combinado con el inhibidor de HSP70 VER-155008 y el inhibidor de HSP90 17-AAG de la línea celular de adenocarcinoma de pulmón H3122.

Nº Spot	Acceso UniProt	Descripción de la Proteína	Ratio promedio	Conteo Péptidos	Puntuación Proteica	PM (Da)	pI
9007	O95994	Anterior gradient protein 2 homolog	11,42	8	270	20023,6	9,03
9205	F8W6I7	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1	10,56	11	243	33248,9	9,18
9008	V9HWC6	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	9,97	4	63	22785	9,33
8507	P25705	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	8,39	6	90	59827,6	9,16
2803	Q14247	Src substrate cortactin	7,70	23	337	61719,6	5,24
1405	F5GWD8	Vesicle transport protein GOT1B	7,60	3	31	4402,3	4,85
4407	Q9UQ80	Proliferation-associated protein 2G4	6,92	8	65	44101,3	6,13
4705	P17066	Heat shock 70 kDa protein 6	6,60	7	57	71440,4	5,81
5903	Q5SW97	Phosphatidylinositol 4-phosphate 3-kinase C2 domain-containing subunit beta	6,52	3	28	6827,3	5,56
5802	L8ECL8	Alternative protein FGF1	1,47	3	36	5995	7,79
4404	A6PVW9	Selenium-binding protein 1	-1,49	14	147	57457,1	6,04
8003	E9PP50	Cofilin-1	-1,55	4	149	17994,3	8,22
8005	G5E9A8	Histone-lysine N-methyltransferase SUV39H2	-1,62	5	47	4870,5	9,43
6504	A8K8D9	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	-1,63	8	60	59733,2	6,27
7701	F5H5V0	Kinetochore-associated protein 1	-1,68	5	38	14902,6	7,77
2304	Q5U0F4	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit I	-7,76	6	32	36877,8	5,38

PM= peso molecular; Da= dalton; pI= punto isoeléctrico

Tabla A19. Proteínas diferencialmente expresadas identificadas mediante 2-DE y espectrometría de masas tras el tratamiento combinado con el inhibidor de HSP70 VER-155008 y el inhibidor de HSP90 17-AAG de la línea celular de adenocarcinoma de pulmón A549.

Nº Spot	Acceso UniProt	Descripción de la Proteína	Ratio promedio	Conteo Péptidos	Puntuación Proteica	PM (Da)	pI
4706	P17066	Heat shock 70 kDa protein 6	9,77	26	412	71440,4	5,81
4205	F8VWS0	60S acidic ribosomal protein P0	9,40	12	353	30607,8	5,9
4602	Q5SYQ9	Retinal dehydrogenase 1	8,49	4	60	25583,1	5,95
9804	H0YFD6	Trifunctional enzyme subunit alpha, mitochondrial	8,05	4	30	27376,2	8,54
5305	B6E242	MHC class I antigen	7,74	5	36	21162,1	5,32
4003	B2ZWH0	HCG1771495, isoform CRA_b	7,42	8	35	63630,9	9,33
1804	Q6PJZ0	RAB17 protein	7,01	3	24	9501,7	5,29
6807	Q5TZW1	Src-like-adaptor	7,01	7	38	31453,7	7,62
6706	A8MUA9	SMT3 suppressor of mif two 3 homolog 3 (Yeast), isoform CRA_d	7,00	4	28	15649,9	10,47
8407	B3KTN4	Citrate synthase	6,98	6	57	47218	6,74
3806	B4DS13	Eukaryotic translation initiation factor 4B	6,58	3	34	64824,1	5,86
3703	Q59EJ3	Heat shock 70kDa protein 1A variant	2,26	27	661	78017,9	5,97
6704	E9PK75	Retinoic acid receptor RXR-beta	-2,01	2	12	8497,1	8,94
2901	H3BRR5	E3 ubiquitin-protein ligase ZNRF2	-2,09	1	11	1308,5	4,63
5904	K7EKI6	INO80 complex subunit C	-2,09	2	17	3179,6	6,07
4505	G3V2D2	Serine hydroxymethyltransferase, mitochondrial	-2,12	2	21	5940,7	6,21
5706	Q5VVL7	Lipoamide acyltransferase component of branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase complex, mitochondrial	-2,84	10	54	36500	8,94
5705	Q6NUR7	Ezrin	-5,78	12	41	69312,7	5,94
5802	Q5VVD3	Filamin-binding LIM protein 1	-6,34	4	49	1863	9,99
5004	F8VQR7	Cysteine and glycine-rich protein 2	-6,61	4	24	21633,1	8,77
4703	A8MTC6	RAB37, member RAS oncogene family, isoform CRA_a	-6,97	4	26	20908,6	5,46
2107	Q6LEN1	MnSOD	-7,25	3	33	4161,1	9,11
5102	J3KNQ4	Alpha-parvin	-7,49	10	45	46617,9	8,37
3803	Q5TGN6	SAM and SH3 domain-containing protein 1	-7,63	3	24	9862,6	4,34
9701	L8E9J1	Alternative protein ILF3	-7,72	5	41	11754,8	8,88

4402	A6NJ11	Ubiquitin fusion degradation protein 1 homolog	-7,91	5	21	33584,8	6,56
4601	I6L9I9	FMNL1 protein	-8,09	10	48	69644	5,28

PM= peso molecular; Da= dalton; pI= punto isoeléctrico

Tabla A20. Proteínas diferencialmente expresadas identificadas mediante 2-DE y espectrometría de masas tras el tratamiento combinado con el inhibidor de HSP70 VER-155008 y el inhibidor de HSP90 17-AAG de la línea celular de adenocarcinoma de pulmón H1437.

Nº Spot	Acceso UniProt	Descripción de la Proteína	Ratio promedio	Conteo Péptidos	Puntuación Proteica	PM (Da)	pI
8612	V9HW26	ATP synthase subunit alpha	8,54	8	54	59827,6	9,16
7708	B3KSI4	Transketolase	8,09	15	292	59571,5	7,57
4208	Q3B7A4	60S acidic ribosomal protein P0	7,98	8	279	27589,4	8,36
3504	Q8IV48	3'-5' exoribonuclease 1	7,73	8	35	40494,4	6,29
6704	Q9NSD9	Phenylalanine--tRNA ligase beta subunit	7,28	7	50	55338,9	7,19
3505	Q53FB6	Mitochondrial aldehyde dehydrogenase 2 variant	7,25	7	55	56844,8	6,63
6801	Q53ZX7	Protease serine 1	7,03	2	37	9222,8	9,24
7807	Q96AE4	Far upstream element-binding protein 1	6,60	11	119	67689,5	7,18
7801	K7EQB6	DNA ligase 3	6,58	5	31	21097,9	6,09
4902	Q5JQ13	Vinculin	6,25	13	63	87732,1	5,64
5804	P13639	Elongation factor 2	5,49	25	296	96246,3	6,41
3807	O75534	Cold shock domain-containing protein E1	5,11	6	34	89684,2	5,88
2808	H3BSG7	V-type proton ATPase subunit d 1	5,06	3	28	13226,7	4,56
9301	Q2TSD0	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	2,03	19	506	36197,5	8,57
6902	Q9COH9	SRC kinase-signaling inhibitor 1	1,85	17	49	130667,9	9,29
8008	I4AY87	Macrophage migration inhibitory factor	-2,27	3	55	12639,3	7,74
8103	Q99714	3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase type-2	-5,57	8	149	27134,2	7,66
403	P07900	Heat shock protein HSP 90-alpha	-7,98	10	139	85005,8	4,94

PM= peso molecular; Da= dalton; pI= punto isoeléctrico

Anexo II

1. Producción científica derivada de la tesis doctoral.

1.1. Aportaciones a congresos.

- **Á Marrugal**, A Salinas, R Suarez, A Quintanal, L Ojeda, MD Pastor, MG Velasco, S Molina-Pinelo, I Ferrer, A Carnero, L Paz-Ares. Comparative effectiveness analysis of HSP90 inhibitors in non-small cell lung cancer. Póster en “15th ASEICA international congress”. Sevilla, 2015.
- **Á Marrugal**, A Quintanal, MD Pastor, L Ojeda, I Ferrer, L Paz-Ares, S Molina-Pinelo. Differential proteomics identification through HSP90 inhibition in non-small cell lung cancer cell lines. Póster en “The Vall d’Hebron Institute of Oncology special symposium: Towards predictive cancer models”. Barcelona, 2016.
- **Á Marrugal**, I Ferrer, MD Pastor, A Quintanal, L Ojeda, L Paz-Ares, S Molina-Pinelo. Effectiveness of targeting HSP90 according to several oncdrivers in non-small cell lung cancer. Póster en “Workshop: Chaperones in the maintenance of cellular proteostasis”. Baeza, 2016.
- **Á Marrugal**, I Ferrer, MD Pastor, A Quintanal, A Carnero, L Paz-Ares, S Molina-Pinelo. HSP90 inhibition leads to a differential proteomics profile in non-small cell lung cancer cell lines. Póster en American Association for Cancer Research Annual Meeting 2017. Washington, Estados Unidos de América, 2017.
- **Á Marrugal**, S Molina-Pinelo, I Ferrer, MD Pastor, A Quintanal, A Carnero, L Paz-Ares. Heat shock protein 90 as molecular target in non-small cell lung cancer cell lines. Póster en “CNIO-La Caixa Foundation frontiers meetings: Molecular chaperones in cancer”. Madrid, 2017.
- **Á Marrugal**, I Ferrer, MD Pastor, A Carnero, L Paz-Ares, S Molina-Pinelo. Understanding the biological basis for the differential response to HSP90 inhibition in NSCLC using proteomic technics. Póster en “1st ASEICA educational symposium”. Madrid, 2017.

- **Á Marrugal**, I Ferrer, MD Pastor, A Carnero, L Paz-Ares, S Molina-Pinelo. Identification of potential molecular mechanisms underlying the response to HSP90 inhibition in NSCLC. Póster en “16th ASEICA international congress”. Valencia, 2018.
- **Á Marrugal**, I Ferrer, MD Pastor, A Carnero, L Paz-Ares, S Molina-Pinelo. iTRAQ-based proteomic analysis of HSP90 inhibition on different molecular subgroups of lung adenocarcinoma. Póster en “Second Aseica Educational Symposium 2019”. Madrid, 2019.

1.2. Publicaciones científicas.

- **Á Marrugal**, L Ojeda, L Paz-Ares, S Molina, I Ferrer. Proteomic-based approaches for the study of cytokines in lung cancer. 2016. Disease markers.
- **Á Marrugal**, I Ferrer, MD Pastor, L Ojeda, A Quintanal-Villalonga, A Carnero, S Molina-Pinelo, L Paz-Ares. Impact of Heat Shock Protein 90 inhibition on the proteomic profile of lung adenocarcinoma as measured by two-dimensional electrophoresis coupled with mass spectrometry. 2019. Cells.

Review Article

Proteomic-Based Approaches for the Study of Cytokines in Lung Cancer

Ángela Marrugal, Laura Ojeda, Luis Paz-Ares, Sonia Molina-Pinelo, and Irene Ferrer

Medical Oncology Department, Hospital Universitario Doce de Octubre and Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO), 28041 Madrid, Spain

Correspondence should be addressed to Sonia Molina-Pinelo; pinelo_sonia@hotmail.com and Irene Ferrer; iferrer@ext.cnio.es

Received 31 March 2016; Accepted 12 June 2016

Academic Editor: Monica Neagu

Copyright © 2016 Angela Marrugal et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Proteomic techniques are currently used to understand the biology of different human diseases, including studies of the cell signaling pathways implicated in cancer progression, which is important in knowing the roles of different proteins in tumor development. Due to its poor prognosis, proteomic approaches are focused on the identification of new biomarkers for the early diagnosis, prognosis, and targeted treatment of lung cancer. Cytokines are proteins involved in inflammatory processes and have been proposed as lung cancer biomarkers and therapeutic targets because it has been reported that some cytokines play important roles in tumor development, invasion, and metastasis. In this review, we aim to summarize the different proteomic techniques used to discover new lung cancer biomarkers and therapeutic targets. Several cytokines have been identified as important players in lung cancer using these techniques. We underline the most important cytokines that are useful as biomarkers and therapeutic targets. We also summarize some of the therapeutic strategies targeted for these cytokines in lung cancer.

1. Introduction

Lung cancer is one of the most frequent types of cancer worldwide, accounting for approximately 13% of the total cancer diagnoses in the most recent global statistics [1, 2]. Adenocarcinoma, squamous carcinoma, large cell carcinoma, and small cell carcinoma are the four most prominent histological types of lung cancer. The first three classes are collectively named Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC) and they represent 85% of lung cancer cases [3]. In particular, adenocarcinoma is the most often reported subtype of NSCLC in most countries [4].

Lung cancer is characterized by a poor prognosis, with a five-year survival rate of 15%, mainly due to an initial diagnosis at advanced stages of the disease [5]. For this reason, in addition to advances in treatment, the search for diagnostic strategies for early lung cancer detection is very important. Thus, the use of biomarkers is essential for early detection. A biomarker is a measurable indicator of a biological process. There are three different groups of protein biomarkers: diagnostic biomarkers, prognostic biomarkers, and biomarkers that predict the treatment response [6].

Proteomics is the systematic analysis of protein profiles in tissues or cells [2, 7] and is directly related to genomics because proteins are the final effectors of the genes in nearly all situations. Proteins are extremely dynamic molecules whose function is regulated by posttranslational modifications, degradation, and compartmentalization [8]. Therefore, the functional protein concentrations would not always be related to the differential expression of mRNAs. For these reasons, proteomics may contribute to improving our knowledge of cancer, in addition to genomics or transcriptomics [9, 10]. Thus, proteomics is a particularly appropriate tool to research lung cancer because proteomics approaches are much more objective and more precise than current methods of cancer diagnosis and patient stratification, which have been based on the study of tissue specimens by pathologists [10].

In the history of cancer studies, different hallmarks have been described that characterize tumor initiation, promotion, and invasion. Some of these hallmarks are related to tumor cells by sustaining proliferative signaling, evading growth suppressors, activating invasion and metastasis, enabling replicative immortality, inducing angiogenesis, and resisting cell death. Later, four new emerging hallmarks

were added from studies of the tumor microenvironment: evasion of immune destruction, tumor-promoted inflammation, genome instability and mutation, and deregulated cellular energetics [11]. Thus, taking the tumor microenvironment into account, inflammation is an important factor in the pathogenesis of cancer [12, 13]. Inflammatory cells can provide growth and survival factors, which contribute to several hallmarks of cancer. Similar to other tumors, it has been reported that chronic inflammation due to pulmonary disorders such as chronic obstructive pulmonary disease (COPD) significantly increases the patients' risk of developing lung cancer [14, 15]. Inflammation is regulated by the tumor microenvironment, which plays an important role in immune suppression or activation and in the epithelial-to-mesenchymal transition [16–18].

The main mediators of inflammation are cytokines, proteins that can be classified as proinflammatory and anti-inflammatory molecules, such as chemokines and growth factors [19–21]. These proteins can modulate different cellular responses, including inflammation, the immune response, apoptosis, and chemoattractant processes [22–25]. Characteristic cytokine patterns have been described in different cancer patients and are related to their prognosis. Therefore, some cytokines are good prognostic biomarkers of cancer [26–28].

We review the cytokines that are good biomarkers for the diagnosis, prognosis, and prediction of treatment responses in patients with lung cancer as well as the cytokines that could act as therapeutic targets and describe the therapeutic strategies based on these targets that are being used in clinic. In addition, we describe some proteomic techniques that are the best tools to study these important molecules. An in-depth analysis of the cytokine patterns using proteomics could provide important insights into clinical purposes.

2. Proteomics in Cancer Research

Proteins are the real functional players in cells and define their phenotype [29]. Thus, in some terms, they could provide more precise information about cancer than DNA or RNA. In fact, proteomic analyses also have the ability to quantify the effects of genetic abnormalities related to oncogenesis. Among these quantifiable changes, we highlight the differential expression of proteins encoded by genes with altered DNA copy numbers, splice variants, mutations, deletions, and insertions and regulation by microRNAs or epigenetics. Consequently, proteomics can improve our biological knowledge of cancer and help in the search for new potential therapeutic targets and biomarkers by connecting cancer phenotypes and genomic alterations [30]. The proteomic approaches that are currently used to study cancer and the samples used for this purpose are described next (Figure 1).

2.1. Proteomic Techniques Used in Cancer Research. Since the late 90s, the development of high-throughput platforms has allowed researchers to measure thousands of proteins and their modifications. Thus, proteomic assays have become essential tools to decisively detect the molecular patterns in malignant cells, which might be associated with disease

evolution or the treatment response [31, 32]. In the last few years, the use of proteomic techniques in cancer research has produced great number of studies [5, 32–36]. The most frequently used proteomic techniques can be divided into gel-based or gel-free approaches, both of which are based on mass spectrometry (MS) and antibody-based techniques.

2.1.1. Gel-Based Techniques-Mass Spectrometry. These proteomic techniques employ two-dimensional gel electrophoresis (2D-PAGE), due to its relatively low cost and high applicability. In this assay, intact proteins are separated in two dimensions. Firstly, previously solubilized and denatured proteins are separated by their isoelectric point. Secondly, proteins are separated by their molecular weight to obtain different protein spots. Later, the resulting spots are analyzed and spots are picked and their peptides are digested for MS identification [32]. This technique allows researchers to study a large number of polypeptides in a single run and to evaluate different gels, making it possible to compare the spot patterns between different conditions, such as affected and unaffected patients. Unfortunately, this technique has limitations, which include low throughput, low sensitivity, and the need for large amounts of clinical material. Moreover, it is difficult to separate very low or very high molecular weight proteins, and there could be some variation among gels. However, progress in this approach has reduced gel-to-gel variation by marking the proteins with fluorescent dyes. Using 2D-DIGE, it is possible to evaluate different samples (such as test, control, and reference) in the same gel following the introduction of Cy3, Cy5, and Cy2 dyes immediately before 2D-PAGE [37].

2.1.2. Gel-Free Techniques-Mass Spectrometry. These methods provide high reproducibility by quantifying proteins in a gel-free setting, which decreases variability and allows researchers to measure complex, labelled, or label-free protein samples [38].

As an alternative to 2D electrophoresis, liquid chromatography separation (LC) can be coupled to MS (LC/MS) to identify the proteins contained in complex biological samples. In this workflow, the molecules resulting from the enzymatic digestion of the samples are separated in a liquid mobile phase by employing a solid stationary phase. Then, the amount of each peptide is quantified. These methods are known as shotgun proteomics and they principally use labelling (with a nonradioactive isotope) and nonlabelling approaches [33].

There are several isotope-based labelling approaches in which *in vivo* metabolic incorporation of the labels is essential. There are three principal techniques, ICAT, iTRAQ, and SILAC, according to the label used. Following trypsinization and subsequent MS analysis, these methods allow researchers to quantify and identify proteins from different samples at the same time. ICAT (isotope-coded affinity tag) employs chemical light or heavy reagents to label and compare pairs of samples. iTRAQ (isobaric tags for relative and absolute quantitation) can analyze up to 8 samples in the same experiment following labelling with fourplex or eightplex reagents [39, 40]. Currently, the most suitable method for quantitative

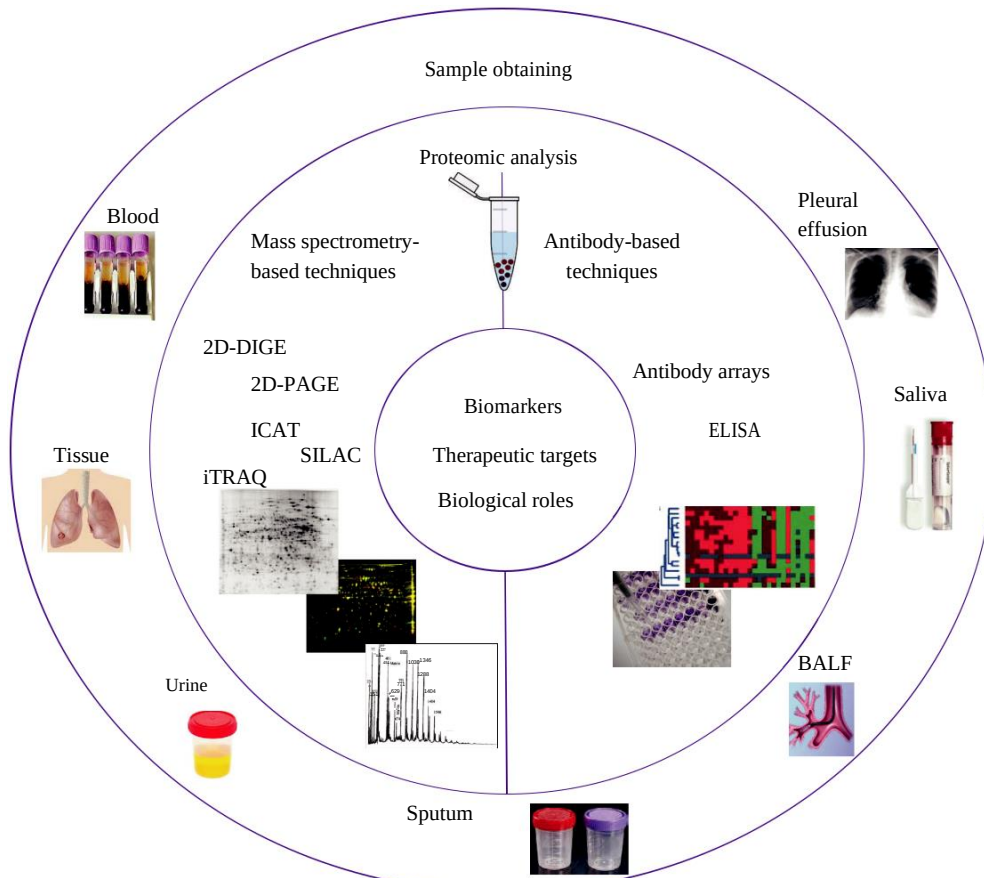


Figure 1: Workflow of the proteomic studies of cancer.

proteomics is SILAC (stable isotope labelling with amino acids in cell culture), mainly due to its robustness, reliability, and easy application [41]. This procedure differentiates two identical cell populations growing in distinct culture media. The “heavy” medium contains amino acids (usually arginine and lysine) substituted with stable isotopic nuclei (^2H , ^{13}C , and ^{15}N), whereas the “light” medium includes amino acids with the natural isotope. After a sufficient number of cell divisions, the whole proteome of the cell population growing in heavy medium is labelled, due to the incorporation of heavy amino acids into the newly synthesized proteins. Later, equivalent amounts of heavy and light samples are combined, digested, and analyzed by MS. The different signal intensities from both samples make it possible to quantitatively compare their relative abundances in the mixture, due to the specific masses of the heavy and light amino acids [42, 43]. At present, it is possible to compare up to five different samples in a single experiment based on mixtures of several isotopic forms of arginine and lysine [43]. Unfortunately, the clinical application of SILAC is limited because it cannot be used to directly label tissues or body fluids. However, the super-SILAC method has been recently developed to solve this problem. In this assay, a SILAC standard is generated to represent the clinical sample and is achieved using labelling and a combination of different cell lines to obtain a representation of the tissue or

body fluid of interest. In the MS analysis, the SILAC standard is the heavy population, which will be compared to the light population from the clinical sample [44, 45]. Therefore, it is possible to differentiate histological subtypes of cancers and to search for biomarkers for use in other applications due to the precise quantification of human tumor proteomes [46].

The last step in all gel-free techniques consists of mass spectrometry analysis. MS has been widely used for protein and peptide sequencing and identification by measuring the molecular weights and charges (m/z ratio) of their ions. Firstly, the samples are ionized by an ion source. The main ionization methods employed are electrospray ionization (ESI), matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI), and surface-enhanced laser desorption ionization (SELDI), where the sample is introduced as spray, matrix, or chip, respectively. Later, the ionized samples are injected into a mass analyzer, where the ions are separated according to their m/z ratios. Time-of-flight (TOF), Fourier transform, and quadrupole-Q, linear quadrupole-LTQ, and Orbitrap ion traps are the methods that are most frequently utilized for this purpose. If a second mass analyzer is added (tandem mass spectrometry), both proteins and peptides could be identified. Thus, mass spectrometry techniques are commonly used for peptide and protein discovery as a real biomarker application [8, 47].

2.1.3. Antibody-Based Techniques. The search of proteomic profiles using antibodies facilitates the systematic examination of the cancer proteome and evaluation of cancer biomarkers [33].

Enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs) are one of the most frequently used methods to identify proteins in biological samples because they are a financially reasonable screening method that is easy to perform. In simple terms, an ELISA is performed in plates with a capture antibody, which specifically binds to the protein of interest, and a detection antibody linked to an enzyme. The enzyme can transform a substrate into a perceptible and quantifiable signal [48, 49]. Moreover, due to proteomic advances, the levels of many proteins, such as cytokines, can be determined at the same time using ELISA-based protein array technology. In this assay, peptides resulting from previously digested protein samples compete with their identical synthetic peptide (prebound to the ELISA plate) for a specific antibody [50]. This approach does not require the isolation and purification of the protein of interest, although its sequence is essential. Thus, in contrast to MS approaches, it is possible to identify proteins from a damaged or unpurified sample using ELISAs [10].

Antibody arrays are multiplex assays that are able to detect a large number of proteins and compare different groups of samples. In this assay, different antibodies are ordered onto a solid support to which the sample is added. Then, proteins can be detected by a laser scanner using a fluorescence signal. Finally, the binding pattern is correlated with the expression level of each protein [51].

2.2. Samples Used in Proteomic Studies. In biological proteomic studies, it is essential to choose the type and number of samples for a proper comparison. It is also important to use well-known model systems and controlled clinical samples. In addition, a large number of samples are needed to obtain statistical power. In cancer, researchers must consider the histological type of the tumor as well as its heterogeneity [52]. Different samples can be used in proteomic studies, including tissue, blood (serum or plasma), urine, and different fluids related to the tissue of interest, such as pleural effusions, sputum, or bronchoalveolar lavage fluid (BALF) for the lung [40, 53]. The majority of cancer research studies use paraffin-embedded, formalin-fixed, or fresh-frozen tissue samples. The limitations of these samples are related to their heterogeneity due to the inflammatory and stromal components and necrotic areas adjacent to islands of tumor cells. The use of tissue microarrays (TMAs) or laser capture microdissection to isolate tissue samples on microscope slides is required to solve this problem [54].

On the other hand, blood is an excellent sample for proteomic analysis due to the ease of obtaining a large amount of sample. Blood can be separated into plasma and serum, which is very useful because the depletion of abundant serum proteins is often necessary for the detection of tumor-specific markers [54]. It is also essential to separate proteins by their molecular weights and characteristics, such as ionic charges, modifications (phosphorylation or glycosylation),

hydrophobicity, or hydrophilicity, by chromatographic methods to optimize the search for biomarker proteins in blood [10].

Another type of clinical sample that is particularly appropriate for analyses of tumor proteomes is pleural effusion (PE). PE is the fluid that accumulates in the presence of active disease. PE has a similar protein composition to plasma but is more enriched in tumor-derived proteins due to its proximity to the tumor. Therefore, PE is remarkably helpful in understanding tumor mechanisms and identifying cancer biomarker using proteomic techniques [34].

Urine has also been recognized as a potentially useful sample in nonurogenital diseases because it contains thousands of detectable proteins. These proteins are secreted in a mature and stable conformation. This point, together with the easy and noninvasive collection of a large volume of sample, makes urine a perfect biospecimen for the proteomic identification of cancer biomarkers [32].

Other proteomic studies are based on the proteins included in sputum [55, 56], BALF [5, 57], or saliva [37, 58]. These samples are often used to study nonmalignant conditions, although recent studies have employed them to search for potential lung cancer biomarkers. BALF is particularly useful for accessing cell populations that are in direct contact with lung tumors [57]. Saliva is a useful sample because of its easy accessibility and noninvasive collection and because it contains RNAs and a large amount of proteins [58]. Many of these proteins have been shown to be informative for the detection of oral and systematic diseases, such as lung cancer [37].

3. Cytokines as Biomarkers in Lung Cancer

Although several cytokines have been detected as powerful biomarkers, few are currently in clinical use because it is not easy to detect some proteins using noninvasive methods and their applicability may not always be very specific.

Here, we summarize the cytokines used as biomarkers in lung cancer, taking into account the different type of samples collected, blood, PE, BALF, lung tissue and sputum [6, 31, 59], and the type of information provided about the biomarker (Table 1). Several studies indicate the presence of different cytokines in samples of cancer patients compared to noncancer controls [26–28]. These cytokines are used as diagnostic biomarkers for the early detection and determination of the stage of the disease. Some examples of the cytokines detected in serum samples are IL-6, IL-2, IL-8, IL-10, IL-18, IL-13, IL-22, vascular endothelial growth factor (VEGF), tumor necrosis factor- α (TNF- α), and interferon- γ (IFN- γ) [26, 27, 60–63]. Moreover, increased levels of IL-6, IL-8, IL-18, and VEGF have been detected in BALF [27]. IL-8 and VEGF are common lung diagnostic biomarkers that have been detected in sputum samples [56]. IL-6, IL-22, and VEGF have also been detected in pleural effusion and lung cancer tissue [64, 65]. Some of these cytokines are good biomarkers with both diagnostic and prognostic value and can predict treatment response. Focusing on prognosis, markers are important for predicting tumor progression. IL-6 overexpression is indicative of inferior survival outcomes

Table 1: Cytokines used as different types of lung cancer biomarkers.

Cytokine	Sample	Current purpose as a biomarker	Current well-known function in lung cancer
IL-6	Blood, BALF, and pleural effusion	Diagnostic, prognostic, and predicting the treatment response	Prooncogenic
IL-8	Blood, BALF, and sputum	Diagnostic and prognostic	Prooncogenic
VEGF	Blood, BALF, sputum, pleural effusion, and tissue	Diagnostic and prognostic	Prooncogenic
TNF-	Blood	Predicting the treatment response	Prooncogenic and antitumor, depending on the context
IL-2	Blood	Prognostic and predicting the treatment response	Not yet determined
IL-18	Blood, BALF, and sputum	Diagnostic	Not yet determined
IL-10	Blood	Diagnostic	Prooncogenic and antitumor, depending on the context
IL-13	Blood	Diagnostic	Not yet determined
IL-22	Blood	Diagnostic and prognostic	Prooncogenic
IFN-	Blood	Diagnostic and prognostic	Not yet determined
IL-32	Tissue	Prognostic	Prooncogenic
IL-37	Tissue	Prognostic	Antitumor

in patients with NSCLC, and it is related to the acute phase response and cancer cachexia [66, 67]. Furthermore, high levels of IL-8 and VEGF are related to reduced survival of NSCLC patients [56, 61], and basal levels of VEGF and IL-22 in SCLC patients are associated with a poor prognosis [27, 64, 65, 68–70]. Another cytokine, IL-32, has been recently proposed as lung adenocarcinoma prognostic biomarker, as its overexpression in the tumor tissue correlates with a greater number of lymph node metastases [71]. Although most cytokines that are used as prognostic biomarkers have prooncogenic effects in lung cancer, some of them also have antitumor effects. In this sense, IL-37 is expressed at lower levels in the tumor tissues of patients with NSCLC, and it correlates with poorer overall survival compared to patients with high IL-37 expression [72]. Low IFN- levels are related to a shorter survival due to a lower lymphocyte count, indicating that some cytokines have important roles in the immune responses that protect against tumor formation [66].

On the other hand, as indicators of the treatment response, biomarkers can provide information about drug susceptibility, toxicity, and the clinical outcomes. The pleiotropic role of cytokines in the tumor microenvironment makes it difficult for cancer therapies to always be efficient. Cancer cells develop resistance to chemotherapy and targeted therapies through several mechanisms. In this sense, it has been shown that cancer cells can secrete cytokines that help them evade death induced by several anticancer drugs through the activation of tumor-promoting pathways and the induction of the secretion of other cytokines and growth factors. These molecules are also implicated in antiapoptotic mechanisms, vessel formation, tumor growth, and metastasis

[73]. In lung cancer, it has been reported that patients with IL-6 overexpression have a poor response to chemotherapy [66, 67], which is important because IL-6 is administered in combination with cancer treatments because of its ability to induce platelet production [72]. In addition, although

the increase in TNF- expression does not have a demonstrated prognostic value, its overexpression in chemoresponsive patients has been used as a biomarker for predicting the treatment response because high levels of TNF- indicate that the patients are sensitive to the treatments [60]. Moreover, the high levels of IL-2 are related to a good chemotherapeutic response in NSCLC patients [63].

Finally, it is known that some polymorphisms can act as genetic biomarkers. An association between some cytokine gene polymorphisms and the risk of developing lung cancer has been described. Variations in the cytokine protein levels resulting from polymorphisms have been investigated, and the conclusions in several meta-analyses are controversial [74–76]. Nevertheless, it has been reported that IL-10 and IL-6 polymorphisms increase the level of these proteins in serum, which correlates with higher number of cases of lung cancer. In the case of IL-10, the alleles IL-10-1082G, IL-10-819C, and IL-10-592 have been observed in lung cancer patients, suggesting a predictive value [74]. A recent study revealed that two IL-10 polymorphisms (-592C/A and -819C/T) show a significant association with the risk of developing lung cancer. In contrast, patients with the third polymorphism analyzed (-1082G/A) did not present susceptibility to this type of tumor [77]. Related to IL-6, several researchers agree that IL-6-174G/C polymorphism in the promoter region has prognostic value because NSCLC patients with G carrier genotypes (GG/CG) show lower overall survival compared with CC genotype carriers [76, 78].

4. The Roles of Cytokines in Lung Cancer

Cytokines can be secreted by tumor and stromal cells in the tumor microenvironment and they can function in an autocrine and/or paracrine manner. Although cytokines are important factors that preserve the correct function of

the organism, they can act as tumor-promoting or tumor-suppressor molecules in the context of neoplasia [28, 79]. Proteomic tools, such as ELISA or antibody arrays, are currently used to characterize the signaling pathways activated by cytokines in cancer. These approaches are making it possible to elucidate the roles of cytokines in lung cancer.

The increased levels of cytokines in cancer patients indicate their possible functional roles in tumor progression [61, 64, 70, 80–89]. Previously, we have described several cytokines that are used as lung cancer biomarkers (Table 1). Some of these cytokines (IL-6, IL-8, IL-10, IL-22, VEGF, TGF- β , and TNF- α) have also been studied to determine their role in lung cancer and are described in comparison to other cytokines next. Others, such as IL-2, IL-13, IL-18, and IFN- γ , require further in-depth study to determine their roles in lung cancer. Other cytokines that have not yet been shown to function as lung cancer biomarkers (TGF- β , IL-17, IL-32, IL-7, and IL-37) can play important roles in this disease, but further studies are required to determine whether they can act as biomarkers.

4.1. Prooncogenic Cytokines. There is evidence that some tumor cells may be able to use cytokines as autocrine growth factors and thereby promote tumor growth. Until now, most of the interest in cytokines in lung cancer has focused on IL-6, a proinflammatory cytokine that is upregulated in lung cancer patients and correlates with decreased cancer survival [61, 82, 83, 90–92]. It has been shown that IL-6 displays carcinogenic effects through the activation of the STAT3 pathway [84, 85, 93, 94]. STAT3 activation results in the secretion of malignant pleural effusion proteins and VEGF upregulation in patients' samples as well as increased cell colony formation in soft agar and tumor formation in nude mice [67, 85]. Moreover, the cell survival effect of STAT3 can limit the overall drug response to some lung cancer treatments, such as Erlotinib. Cells treated with Erlotinib exhibit changes in gene expression and the posttranslational regulation of secreted proteins, including IL-6, which is secreted from Erlotinib-treated cells at higher levels. Moreover, IL-6 triggers STAT3 activation, making the Erlotinib-treated cells more resistant to the treatment. STAT3 has well-known effects on cell growth, angiogenesis, immune system evasion, and the prevention of apoptosis [95].

Another prooncogenic cytokine is IL-22, which is a member of the IL-10 family. Its receptor (IL-22-R) is overexpressed in the lung of cancer patients and it is related to poor prognosis [64, 70]. It has been reported that IL-22 overexpression in lung cancer cells protects the cells from apoptosis by activating STAT3, Bcl-2, and Ccl-xL and inactivating ERK1/2 [64].

IL-8 is a proinflammatory chemokine that has autocrine and paracrine functions in lung cancer cells. It contributes to cancer progression, invasion, and metastasis because of its angiogenic and mitogenic properties [96]. IL-8 activates several oncogenic signaling pathways, such as the PI3-K, Ras/MAP-K and Jak/STAT pathways, which produce protumorigenic effects in many cancer types [97].

VEGF and its soluble receptors (VEGFR-2 and VEGFR-3) are expressed in some NSCLC cell lines [98]. VEGF and

VEGFRs mediate angiogenesis, which has an important role in cancer progression because it modulates the chemotaxis and migration of endothelial cells [99]. Some signaling pathways that are commonly associated with cancer are activated by VEGF, such as the PI3-K, MAP-K, and STAT3 pathways [100].

Transforming growth factor-beta (TGF- β) is a pleiotropic cytokine involved in cancer progression through the PI3-K and MAP-K pathways [101]. TGF- β downregulates the epithelial marker E-cadherin and promotes the upregulation of N-cadherin and fibronectin, triggering the epithelial-to-mesenchymal transition and increasing the migratory potential of NSCLC cell lines [102].

IL-17 is another proinflammatory cytokine that is produced by T helper cells, which plays an important role in lung cancer development and the innate and adaptive immune responses in Lewis Lung Carcinoma (LLC) [86]. It has been reported that IL-17 promotes the expression of VEGF, MMP-2, MMP-3, and TNF- α , which are proangiogenic molecules. On the other hand, IL-17 increases the level of IL-6 and IL-8 in NSCLC cell lines and activates the STAT3 signaling pathway, mediating tumor angiogenesis [103, 104].

Finally, IL-32 plays an important role in the tumor microenvironment by inducing the secretion of inflammatory mediators, such as TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8, IL-18, and MIP-2, which are related to invasion and metastasis. In NSCLC, IL-32 transactivates the nuclear transcription factor NF- κ B, which upregulates the expression of matrix metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9), increasing the invasion of tumor cells [71].

4.2. Antitumor Cytokines. Although most cytokines have prooncogenic effects, there is some evidence regarding the antitumor roles of cytokines in lung cancer, which are related to inflammation and the immune system. IL-7 signaling is required to induce an immune response in a lymphopenic mouse model [105]. It has been shown that lymphopenia induces IL-7 secretion and the subsequent proliferation of T cells, antagonizing immune suppression [88, 106]; however, more studies are needed to clarify the detailed role of IL-7 in the induction of the antitumor effects.

IL-37 is a member of the IL-1 family and although it has been described as a suppressor of immune responses and inflammation, some studies have revealed that it has a protective role against cancer progression [107]. In this sense, it has been reported that IL-37 could play an inhibitory role in NSCLC as it has inhibitory effects on tumor growth *in vivo* by decreasing tumor angiogenesis. A high level of IL-37 correlates with a lower level of VEGF in lung cancer cell lines and reduced microvessel density in NSCLC patients [89].

4.3. Context-Dependent Cytokines. Some cytokines have two opposite effects in lung cancer progression, according to the molecular context, which is the case for IL-10 and TNF- α .

In some cases, IL-10 improves the metastatic capability of lung tumor cells by increasing the vascular density in the primary tumor and increasing the resistance of lung tumor cells to apoptosis by activating STAT3 pathway [87]. On the other hand, IL-10 has an important role in immunosuppression and

cell-mediated immunity because it induces the production of regulatory T cells, which can induce immunosuppression and reduce the number of IFN- secreting cells [108]. Furthermore, IL-10 secretion could result in the deactivation of macrophages, which are important promoters of tumor progression and neovascularization; IL-10 secretion could also decrease angiogenesis by downregulating VEGF [109].

TNF- is another context-dependent cytokine. Although it has been reported that TNF- decreases lung adenocarcinoma cell death [110] and promotes angiogenesis and invasion, there is a positive correlation between the TNF- levels and the chemoresponse [60]. Doxorubicin treatments induce TNF- expression [111]. Therefore, TNF- can trigger cell apoptosis in the context of chemotherapy.

5. Cytokines in Lung Cancer Therapy

Immunotherapy, a tool for the treatment of malignancies that changes or stimulates the host immune system, has become a promising approach for cancer therapy [112, 113]. Traditionally, cytokine therapy has had a basic role in human cancer immunotherapy. In 1986, IFN- (Peg-Intron) was approved by the US Food and Drug Administration (FDA) for hairy cell leukemia therapy. IL-2 (Proleukin) was approved by the FDA in 1992 and has been used as a single agent to promote endogenous antitumor immune responses for the treatment of metastatic renal cell carcinoma and metastatic melanoma [114]. In 1995, IFN- was ratified as the first immunotherapy for adjuvant treatment of stage IIB/III melanoma [115].

Focusing on cytokine therapies, we can distinguish four options in lung cancer: decreasing cytokine expression in tumor cells, the use of cytokines as a treatment alone or the use of cytokines with other immunotherapies, and the use of endogenous cytokines to provide an advantage to immune system homeostasis [116].

On one hand, treatments based on a decrease in cytokine expression are commonly used. An excellent example of a treatment that reduces cytokine expression is Siltuximab (CANTO 328), an anti-IL-6-chimeric (murine-human) monoclonal antibody. Because IL-6 is involved in the pathophysiology of various solid tumors, such as lung cancer, the clinical use of this antibody has been analyzed in different contexts [117]. This treatment was evaluated in patients with EGFR-refractory or EGFR-resistant NSCLC, as well as in patients with other solid tumors, in Phase I/II study. However, the monotherapy of Siltuximab did not show clinical activity, although further studies with more patient samples should be performed [118]. In the same field, Belagenpumatucel-Lucanix is a whole-cell vaccine that decreases the expression of TGF-2, which is its immune target. This cytokine leads to immunosuppression in lung cancer. Thus, its inhibition is related to a better prognosis in NSCLC patients [119]. Important results in Phase II trial in stage II–IV NSCLC patients showed a dose-dependent difference in survival for the groups treated with the higher doses of Belagenpumatucel-L [120]. Therefore, a placebo-controlled, randomized, Phase III trial in stage III or IV NSCLC patients was performed. When the overall survival of patients treated with the vaccine was compared, improved survival was observed in patients who

were previously treated with chemo- or radiotherapy. These results are promising, although more studies are warranted [121].

On the other hand, the use of cytokines alone as a treatment is an excellent option. In some cases, TG4010, MUC-1 antigen-specific liposomal vaccine with the IL-2 gene [122], increases the levels of this cytokine and has been studied in different trials for lung adenocarcinoma. In combination with first-line chemotherapy, first Phase II trial in patients with advanced NSCLC showed the effectiveness of the treatment in patients with a normal number of activated natural killer cells, which improved their outcomes [123]. Based on these results, later Phase IIB trial showed that TG4010 enhanced the effect of chemotherapy in patients with advanced NSCLC [124], which led to Phase IIB/III trial. In these patients, the progression-free survival was improved when they were treated with TG4010 and chemotherapy [125]. Currently, Phase III part of the trial is ongoing.

As mentioned above, the third possibility of cytokine therapy in lung cancer is based on a combination of cytokine therapy with other immunotherapies. In this field, the most relevant clinical study includes the use of cytokines with Adoptive Cellular Therapy (ACT). This therapy consists of the transfusion of T cells, natural killer cells, or Cytokine-Induced Killer (CIK) cells to the patients. (V 9V 2) T cells are effector cells for immunotherapy that can secrete cytokines and display cytotoxic activity. Due to problems with the *in vivo* expansion of T cells, IL-2 has been required to stimulate their proliferation [126]. Based on this improvement, Phase I trial has been performed in patients with advanced or recurrent NSCLC and showed that the T cell treatments were viable and safe in this group of patients [127]. Similarly, cytokines are useful in NK cell therapy. IL-15 and hydrocortisone were used to activate and expand these cells *in vitro* and a clinical trial showed that allogeneic NK cells in combination with chemotherapy were safe and potentially clinically effective [128]. CIK cells are cytotoxic T lymphocytes with powerful antitumor activity that control and enhance the immune function of cancer patients [129]. Several studies have proved that CIK cells treatment improves the responses of NSCLC patients treated with chemotherapy, with a higher overall survival, clinical response rate, and T lymphocyte responses. To this end, supplementation with exogenous IL-2 or IFN- is required for the *in vitro* culture of CIK cells, suggesting the essential role of cytokines in this immunotherapy [130]. Finally, it should be noted that immune checkpoint inhibitors are promising lung cancer therapies that promote immunologic homeostasis through endogenous cytokines. The PD-1 (programmed death-1) signaling pathway is a receptor expressed on activated T cells, and its ligands, PD-L1 and PD-L2, are produced by stromal and cancer cells [131]. The activation of PD-1 following binding to its ligands promotes adaptive immune resistance [132]. PD-L1 overexpression has been noted in several cancer types. Therefore, monoclonal antibodies targeting PD-1 or PDL-1 have shown activity against these tumors [133, 134]. One of these monoclonal antibodies is Nivolumab, a human monoclonal IgG4-kappa antibody against PD-1. In randomized Phase III study, Nivolumab

promoted a superior overall survival, response rate, and progression-free survival for NSCLC patients compared to Docetaxel [135]. Nivolumab has obtained regulatory approval (FDA and EMA) as a first-line, standard, platinum-based chemotherapy for NSCLC progression. Another PD-1 blocking antibody is Pembrolizumab; its activity has been studied in Phase I trial and it showed antitumor activity in advanced NSCLC patients [136]. Therefore, Pembrolizumab has been approved by the FDA as therapy for advanced or metastatic NSCLC patients [137]. Based on this achievement, other studies, such as Phase II/III randomized KEYNOTE-001/010 trials, were performed. These studies focused on previously treated PD-L1-positive NSCLC patients. The trial showed an improved overall survival, progression-free survival, and response rate of the patients treated with Pembrolizumab compared to those treated with Docetaxel [138]. Further studies are ongoing, such as Phase III KEYNOTE-042 study, where Pembrolizumab is being compared to platinum-based chemotherapy in NSCLC patients expressing PD-L1 [137]. Based on these promising results, different studies of PD-1 inhibitors are ongoing. However, PD-L1 inhibition is also another excellent strategy. Atezolizumab, a human Ig-G1 antibody targeting PD-L1, has been analyzed in NSCLC patients. In this randomized Phase II trial, Atezolizumab produced an increase in the survival of previously treated patients compared to Docetaxel. The results are most obvious in patients with high expression of PD-L1 [139]. In addition to Atezolizumab, Avelumab and Durvalumab are PD-L1 blocking antibodies that are actually in Phase III trials in NSCLC patients [140].

6. Final Remarks

Cytokines are dynamic molecules that can regulate cellular functions and homeostasis in several types of tissues. In a neoplastic context, they can act as modulators of the initiation and progression of the disease due to their abilities to activate several signaling pathways implicated in tumor formation and metastasis. Their overexpression in several cancer types makes cytokines significant candidate biomarker molecules. Proteomics is the current tool used to study the whole proteome in several model systems. It will be useful to identify new biomarkers and study the effects of different proteins on cancer development. In this sense, proteomic approaches have been widely used to identify new cytokines related to lung cancer and they set the stage for the identification of new biomarkers and development of new treatments using these proteins as therapeutic targets. Due to the poor prognosis of lung cancer, it is important to continue to study the biology of this disease, and proteomic studies of cytokines have been widely used for this purpose. Further studies are needed to identify new biomarkers and to understand their roles in lung cancer, as they can act as new targets for the treatment of early stages of tumor progression.

Competing Interests

The authors declare that there are no competing interests.

Authors' Contributions

Angela Marrugal and Laura Ojeda contributed equally to this work. Irene Ferrer and Sonia Molina-Pinelo contributed equally to this work.

References

- [1] J. Ferlay, I. Soerjomataram, R. Dikshit et al., "Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012," *International Journal of Cancer*, vol. 136, no. 5, pp. E359–E386, 2015.
- [2] L. A. Torre, F. Bray, R. L. Siegel, J. Ferlay, J. Lortet-Tieulent, and A. Jemal, "Global cancer statistics, 2012," *CA—A Cancer Journal for Clinicians*, vol. 65, no. 2, pp. 87–108, 2015.
- [3] W. Liu, Y. Wu, L. Wang et al., "Protein signature for non-small cell lung cancer prognosis," *American Journal of Cancer Research*, vol. 4, no. 3, pp. 256–269, 2014.
- [4] J. Lortet-Tieulent, I. Soerjomataram, J. Ferlay, M. Rutherford, E. Weiderpass, and F. Bray, "International trends in lung cancer incidence by histological subtype: adenocarcinoma stabilizing in men but still increasing in women," *Lung Cancer*, vol. 84, no. 1, pp. 13–22, 2014.
- [5] S. A. Almatroodi, C. F. McDonald, A. L. Collins, I. A. Darby, and D. S. Pouniotis, "Quantitative proteomics of bronchoalveolar lavage fluid in lung adenocarcinoma," *Cancer Genomics and Proteomics*, vol. 12, no. 1, pp. 39–48, 2015.
- [6] P. Indovina, E. Marcelli, P. Maranta, and G. Tarro, "Lung cancer proteomics: recent advances in biomarker discovery," *International Journal of Proteomics*, vol. 2011, 7 pages, 2011.
- [7] K. K. Jain, "Role of proteomics in the development of person-alized medicine," in *Personalized Medicine*, vol. 102 of *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*, pp. 41–52, Elsevier, New York, NY, USA, 2016.
- [8] R. M. Sallam, "Proteomics in cancer biomarkers discovery: challenges and applications," *Disease Markers*, vol. 2015, Article ID 321370, 12 pages, 2015.
- [9] E. C. Kohn, N. Azad, C. Annunziata, A. S. Dhamoon, and G. Whiteley, "Proteomics as a tool for biomarker discovery," *Disease Markers*, vol. 23, no. 5-6, pp. 411–417, 2007.
- [10] S. Joshi, A. K. Tiwari, B. Mondal, and A. Sharma, "Oncoproteomics," *Clinica Chimica Acta*, vol. 412, no. 3-4, pp. 217–226, 2011.
- [11] D. Hanahan and R. A. Weinberg, "Hallmarks of cancer: the next generation," *Cell*, vol. 144, no. 5, pp. 646–674, 2011.
- [12] D. S. O'Callaghan, D. O'Donnell, F. O'Connell, and K. J. O'Byrne, "The role of inflammation in the pathogenesis of non-small cell lung cancer," *Journal of Thoracic Oncology*, vol. 5, no. 12, pp. 2024–2036, 2010.
- [13] L. M. Coussens and Z. Werb, "Inflammation and cancer," *Nature*, vol. 420, no. 6917, pp. 860–867, 2002.
- [14] A. Punturieri, E. Szabo, T. L. Croxton, S. D. Shapiro, and S. M. Dubinett, "Lung cancer and chronic obstructive pulmonary disease: needs and opportunities for integrated research," *Journal of the National Cancer Institute*, vol. 101, no. 8, pp. 554–559, 2009.
- [15] R. S. Loganathan, D. E. Stover, W. Shi, and E. Venkatraman, "Prevalence of COPD in women compared to men around the time of diagnosis of primary lung cancer," *Chest*, vol. 129, no. 5, pp. 1305–1312, 2006.
- [16] V. Mittal, T. El Rayes, N. Narula, T. E. McGraw, N. K. Altorki, and M. H. Barcellos-Hoff, "The microenvironment of lung

- cancer and therapeutic implications,” *Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol. 890, pp. 75–110, 2016.
- [17] M. A. Swartz, N. Iida, E. W. Roberts et al., “Tumor microenvironment complexity: emerging roles in cancer therapy,” *Cancer Research*, vol. 72, no. 10, pp. 2473–2480, 2012.
 - [18] W. Hu, X. Li, C. Zhang, Y. Yang, J. Jiang, and C. Wu, “Tumor-associated macrophages in cancers,” *Clinical and Translational Oncology*, vol. 18, no. 3, pp. 251–258, 2016.
 - [19] M. J. Smyth, E. Cretny, M. H. Kershaw, and Y. Hayakawa, “Cytokines in cancer immunity and immunotherapy,” *Immuno-logical Reviews*, vol. 202, pp. 275–293, 2004.
 - [20] A. Nicolini, A. Carpi, and G. Rossi, “Relationship of cellular immunity, cytokines and CRP with clinical course in breast cancer patients with endocrine-dependent distant metastases treated with immunotherapy,” *Cancer Letters*, vol. 251, no. 2, pp. 330–338, 2007.
 - [21] P. Van Lint and C. Libert, “Chemokine and cytokine processing by matrix metalloproteinases and its effect on leukocyte migration and inflammation,” *Journal of Leukocyte Biology*, vol. 82, no. 6, pp. 1375–1381, 2007.
 - [22] W.-W. Lin and M. Karin, “A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer,” *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 117, no. 5, pp. 1175–1183, 2007.
 - [23] E. Shacter and S. A. Weitzman, “Chronic inflammation and cancer,” *Oncology (Williston Park)*, vol. 16, no. 2, pp. 217–232, 2002.
 - [24] N. Mukaida and T. Baba, “Chemokines in tumor development and progression,” *Experimental Cell Research*, vol. 318, no. 2, pp. 95–102, 2012.
 - [25] S. P. Hussain, L. J. Hofseth, and C. C. Harris, “Radical causes of cancer,” *Nature Reviews Cancer*, vol. 3, no. 4, pp. 276–285, 2003.
 - [26] J. N. Hofmann, K. Yu, R. K. Bagni, Q. Lan, N. Rothman, and M. P. Purdue, “Intra-individual variability over time in serum cytokine levels among participants in the Prostate, Lung, Colorectal, and Ovarian Cancer Screening Trial,” *Cytokine*, vol. 56, no. 2, pp. 145–148, 2011.
 - [27] M. Crohns, S. Saarelainen, S. Laine, T. Poussa, H. Alho, and P. Kellokumpu-Lehtinen, “Cytokines in bronchoalveolar lavage fluid and serum of lung cancer patients during radiotherapy—association of interleukin-8 and VEGF with survival,” *Cytokine*, vol. 50, no. 1, pp. 30–36, 2010.
 - [28] T. Fukuyama, Y. Ichiki, S. Yamada et al., “Cytokine production of lung cancer cell lines: correlation between their production and the inflammatory/immunological responses both in vivo and in vitro,” *Cancer Science*, vol. 98, no. 7, pp. 1048–1054, 2007.
 - [29] S. Ocaik, P. Chaurand, and P. P. Massion, “Mass spectrometry-based proteomic profiling of lung cancer,” *Proceedings of the American Thoracic Society*, vol. 6, no. 2, pp. 159–170, 2009.
 - [30] B. Magi, E. Bargagli, L. Bini, and P. Rottoli, “Proteome analysis of bronchoalveolar lavage in lung diseases,” *Proteomics*, vol. 6, no. 23, pp. 6354–6369, 2006.
 - [31] H. J. Sung and J. Y. Cho, “Biomarkers for the lung cancer diagnosis and their advances in proteomics,” *BMB Reports*, vol. 41, no. 9, pp. 615–625, 2008.
 - [32] M. D. Pastor, A. Nogal, S. Molina-Pinelo et al., “Identification of proteomic signatures associated with lung cancer and COPD,” *Journal of Proteomics*, vol. 89, pp. 227–237, 2013.
 - [33] K. Honda, M. Ono, M. Shitashige et al., “Proteomic approaches to the discovery of cancer biomarkers for early detection and personalized medicine,” *Japanese Journal of Clinical Oncology*, vol. 43, no. 2, pp. 103–109, 2013.
 - [34] S.-H. Sheng and H.-L. Zhu, “Proteomic analysis of pleural effusion from lung adenocarcinoma patients by shotgun strategy,” *Clinical and Translational Oncology*, vol. 16, no. 2, pp. 153–157, 2014.
 - [35] D. O’Dwyer, L. D. Ralton, A. O’Shea, and G. I. Murray, “The proteomics of colorectal cancer: identification of a protein signature associated with prognosis,” *PLoS ONE*, vol. 6, no. 11, Article ID e27718, 2011.
 - [36] P. R. Sudhir and C. H. Chen, “Proteomics-based analysis of protein complexes in pluripotent stem cells and cancer biology,” *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 17, no. 3, p. 432, 2016.
 - [37] H. Xiao, L. Zhang, H. Zhou, J. M. Lee, E. B. Garon, and D. T. W. Wong, “Proteomic analysis of human saliva from lung cancer patients using two-dimensional difference gel electrophoresis and mass spectrometry,” *Molecular & Cellular Proteomics*, vol. 11, no. 2, Article ID M111.012112, 2012.
 - [38] R. Favicchio, C. Thepaut, H. Zhang, R. Arends, J. Stebbing, and G. Giamas, “Strategies in functional proteomics: unveiling the pathways to precision oncology,” *Cancer Letters*, 2016.
 - [39] D.-M. Zhang, L.-X. Feng, M. Liu et al., “Possible target-related proteins and signal network of bufalin in A549 cells suggested by both iTRAQ-based and label-free proteomic analysis,” *Proteomics*, vol. 16, no. 6, pp. 935–945, 2016.
 - [40] M. D. Pastor, A. Nogal, S. Molina-Pinelo, A. Carnero, and L. Paz-Ares, “Proteomic biomarkers in lung cancer,” *Clinical & Translational Oncology*, vol. 15, no. 9, pp. 671–682, 2013.
 - [41] M. Mann, “Fifteen years of stable isotope labeling by amino acids in cell culture (SILAC),” *Methods in Molecular Biology*, vol. 1188, pp. 1–7, 2014.
 - [42] S.-E. Ong, “The expanding field of SILAC,” *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 404, no. 4, pp. 967–976, 2012.
 - [43] X. Chen, S. Wei, Y. Ji, X. Guo, and F. Yang, “Quantitative proteomics using SILAC: principles, applications, and developments,” *Proteomics*, vol. 15, no. 18, pp. 3175–3192, 2015.
 - [44] G. Dittmar and M. Selbach, “SILAC for biomarker discovery,” *PROTEOMICS—Clinical Applications*, vol. 9, no. 3–4, pp. 301–306, 2015.
 - [45] A. Shenoy and T. Geiger, “Super-SILAC: current trends and future perspectives,” *Expert Review of Proteomics*, vol. 12, no. 1, pp. 13–19, 2015.
 - [46] W. Zhang, Y. Wei, V. Ignatchenko et al., “Proteomic profiles of human lung adenocarcinoma and squamous cell carcinoma using super-SILAC and label-free quantification approaches,” *Proteomics*, vol. 14, no. 6, pp. 795–803, 2014.
 - [47] C. A. Crutchfield, S. N. Thomas, L. J. Sokoll, and D. W. Chan, “Advances in mass spectrometry-based clinical biomarker discovery,” *Clinical Proteomics*, vol. 13, no. 1, article 13, 2016.
 - [48] C. Xu, W. Wang, Y. Wang, X. Zhang, J. Yan, and L. Yu, “Serum angiopoietin-2 as a clinical marker for lung cancer in patients with solitary pulmonary nodules,” *Annals of Clinical & Laboratory Science*, vol. 46, no. 1, pp. 60–64, 2016.
 - [49] L. Gong, D. Wu, J. Zou et al., “Prognostic impact of serum and tissue MMP-9 in non-small cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis,” *Oncotarget*, vol. 7, no. 14, pp. 18458–18468, 2016.
 - [50] R.-P. Huang, “Cytokine protein arrays,” *Methods in Molecular Biology*, vol. 264, pp. 215–231, 2004.
 - [51] C. A. K. Borrebaeck and C. Wingren, “Antibody array generation and use,” *Methods in Molecular Biology*, vol. 1131, pp. 563–571, 2014.

- [52] J. Lehtio and L. De Petris, "Lung cancer proteomics, clinical and technological considerations," *Journal of Proteomics*, vol. 73, no. 10, pp. 1851–1863, 2010.
- [53] L. De Petris, M. Pernemalm, G. Elmberger et al., "A novel method for sample preparation of fresh lung cancer tissue for proteomics analysis by tumor cell enrichment and removal of blood contaminants," *Proteome Science*, vol. 8, article 9, 2010.
- [54] Y. Liu, X. Luo, H. Hu et al., "Integrative proteomics and tissue microarray profiling indicate the association between overexpressed serum proteins and non-small cell lung cancer," *PLoS ONE*, vol. 7, no. 12, Article ID e51748, 2012.
- [55] R. D. Gray, G. MacGregor, D. Noble et al., "Sputum proteomics in inflammatory and suppurative respiratory diseases," *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, vol. 178, no. 5, pp. 444–452, 2008.
- [56] N. Rovina, G. Hillas, E. Dima et al., "VEGF and IL-18 in induced sputum of lung cancer patients," *Cytokine*, vol. 54, no. 3, pp. 277–281, 2011.
- [57] L. B. Anselmo, J. L. Gross, F. Haddad, D. Deheinzeln, R. N. Younes, and J. A. Marzagao~ Barbuto, "Functional analysis of cells obtained from bronchoalveolar lavage fluid (BALF) of lung cancer patients," *Life Sciences*, vol. 76, no. 25, pp. 2945–2951, 2005.
- [58] L. Zhang, H. Xiao, H. Zhou et al., "Development of transcriptomic biomarker signature in human saliva to detect lung cancer," *Cellular and Molecular Life Sciences*, vol. 69, no. 19, pp. 3341–3350, 2012.
- [59] G. M. Strauss and A. T. Skarin, "Use of tumor markers in lung cancer," *Hematology/Oncology Clinics of North America*, vol. 8, no. 3, pp. 507–532, 1994.
- [60] D. Derin, H. O. Soydic, N. Guney et al., "Serum levels of apoptosis biomarkers, survivin and TNF-alpha in nonsmall cell lung cancer," *Lung Cancer*, vol. 59, no. 2, pp. 240–245, 2008.
- [61] C. H. Chang, C. F. Hsiao, Y. M. Yeh et al., "Circulating interleukin-6 level is a prognostic marker for survival in advanced nonsmall cell lung cancer patients treated with chemotherapy," *International Journal of Cancer*, vol. 132, no. 9, pp. 1977–1985, 2013.
- [62] J. Kaminska, M. Kowalska, B. Kotowicz et al., "Pretreatment serum levels of cytokines and cytokine receptors in patients with non-small cell lung cancer, and correlations with clinico-pathological features and prognosis: M-CSF—an independent prognostic factor," *Oncology*, vol. 70, no. 2, pp. 115–125, 2006.
- [63] M. Orditura, C. Romano, F. De Vita et al., "Behaviour of interleukin-2 serum levels in advanced non-small-cell lung cancer patients: relationship with response to therapy and survival," *Cancer Immunology Immunotherapy*, vol. 49, no. 10, pp. 530–536, 2000.
- [64] W. Zhang, Y. Chen, H. Wei et al., "Antiapoptotic activity of autocrine interleukin-22 and therapeutic effects of interleukin-22-small interfering RNA on human lung cancer xenografts," *Clinical Cancer Research*, vol. 14, no. 20, pp. 6432–6439, 2008.
- [65] B. K. Zebrowski, S. Yano, W. Liu et al., "Vascular endothelial growth factor levels and induction of permeability in malignant pleural effusions," *Clinical Cancer Research*, vol. 5, no. 11, pp. 3364–3368, 1999.
- [66] F. Martín, F. Santolaria, N. Batista et al., "Cytokine levels (IL-6 and IFN- γ), acute phase response and nutritional status as prognostic factors in lung cancer," *Cytokine*, vol. 11, no. 1, pp. 80–86, 1999.
- [67] H. Yamaji, T. Iizasa, E. Koh et al., "Correlation between interleukin 6 production and tumor proliferation in non-small cell lung cancer," *Cancer Immunology, Immunotherapy*, vol. 53, no. 9, pp. 786–792, 2004.
- [68] P. Salven, T. Ruotsalainen, K. Mattson, and H. Joensuu, "High pre-treatment serum level of vascular endothelial growth factor (VEGF) is associated with poor outcome in small-cell lung cancer," *International Journal of Cancer*, vol. 79, no. 2, pp. 144–146, 1998.
- [69] Y. Hasegawa, S. Takanashi, K. Okudera et al., "Vascular endothelial growth factor level as a prognostic determinant of small cell lung cancer in Japanese patients," *Internal Medicine*, vol. 44, no. 1, pp. 26–34, 2005.
- [70] A. Guillon, F. Gueugnon, K. Mavridis et al., "Interleukin-22 receptor is overexpressed in nonsmall cell lung cancer and portends a poor prognosis," *European Respiratory Journal*, vol. 47, no. 4, pp. 1277–1280, 2016.
- [71] Q. Zeng, S. Li, Y. Zhou et al., "Interleukin-32 contributes to invasion and metastasis of primary lung adenocarcinoma via NF-kappaB induced matrix metalloproteinases 2 and 9 expression," *Cytokine*, vol. 65, no. 1, pp. 24–32, 2014.
- [72] M. M. Van Gameren, P. H. B. Willemse, N. H. Mulder et al., "Effects of recombinant human interleukin-6 in cancer patients: a phase I-II study," *Blood*, vol. 84, no. 5, pp. 1434–1441, 1994.
- [73] V. S. Jones, R.-Y. Huangb, L.-P. Chenc, Z.-S. Chend, L. Fue, and R.-P. Huang, "Cytokines in cancer drug resistance: cues to new therapeutic strategies," *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1865, no. 2, pp. 255–265, 2016.
- [74] W.-J. Peng, Q. He, J.-X. Yang et al., "Meta-analysis of association between cytokine gene polymorphisms and lung cancer risk," *Molecular Biology Reports*, vol. 39, no. 5, pp. 5187–5194, 2012.
- [75] A. L. Van Dyke, M. L. Cote, A. S. Wenzlaff et al., "Cytokine and cytokine receptor single-nucleotide polymorphisms predict risk for non-small cell lung cancer among women," *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, vol. 18, no. 6, pp. 1829–1840, 2009.
- [76] M. Gomes, A. Coelho, A. Araujo' et al., "IL-6 polymorphism in non-small cell lung cancer: a prognostic value?" *Tumor Biology*, vol. 36, no. 5, pp. 3679–3684, 2015.
- [77] X. Lan, T. Lan, and Q. Faxiang, "Interleukin-10 promoter polymorphism and susceptibility to lung cancer: a systematic review and meta-analysis," *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, vol. 8, no. 9, pp. 15317–15328, 2015.
- [78] W. Jia, G.-H. Fei, J.-G. Hu, and X.-W. Hu, "A study on the effect of IL-6 gene polymorphism on the prognosis of non-small-cell lung cancer," *OncoTargets and Therapy*, vol. 8, pp. 2699–2704, 2015.
- [79] J. W. Ortel, E. D. Staren, L. P. Faber, W. H. Warren, and D. P. Braun, "Cytokine biosynthesis by tumor-infiltrating T lymphocytes from human non-small-cell lung carcinoma," *Cancer Immunology Immunotherapy*, vol. 48, no. 11, pp. 627–634, 2000.
- [80] G. Mantovani, A. Maccio, L. Mura et al., "Serum levels of leptin and proinflammatory cytokines in patients with advanced-stage cancer at different sites," *Journal of Molecular Medicine*, vol. 78, no. 10, pp. 554–561, 2000.
- [81] C. Liao, Z. Yu, W. Guo et al., "Prognostic value of circulating inflammatory factors in non-small cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis," *Cancer Biomarkers*, vol. 14, no. 6, pp. 469–481, 2014.
- [82] S. R. Pine, L. E. Mechanic, L. Enewold et al., "Increased levels of circulating interleukin 6, interleukin 8, C-reactive protein, and risk of lung cancer," *Journal of the National Cancer Institute*, vol. 103, no. 14, pp. 1112–1122, 2011.

- [83] N. Songur, B. Kuru, F. Kalkan, C. Ozdilekcan, H. C. Akmak, and N. Hizel, "Serum interleukin-6 levels correlate with malnutrition and survival in patients with advanced non-small cell lung cancer," *Tumori*, vol. 90, no. 2, pp. 196–200, 2004.
- [84] X. Tan, J. Carretero, Z. Chen et al., "Loss of p53 attenuates the contribution of IL-6 deletion on suppressed tumor progression and extended survival in Kras-driven murine lung cancer," *PLoS ONE*, vol. 8, no. 11, Article ID e80885, 2013.
- [85] H.-H. Yeh, W.-W. Lai, H. H. W. Chen, H.-S. Liu, and W.-C. Su, "Autocrine IL-6-induced Stat3 activation contributes to the pathogenesis of lung adenocarcinoma and malignant pleural effusion," *Oncogene*, vol. 25, no. 31, pp. 4300–4309, 2006.
- [86] M.-C. Duan, X.-N. Zhong, G.-N. Liu, and J.-R. Wei, "The Treg/Th17 paradigm in lung cancer," *Journal of Immunology Research*, vol. 2014, Article ID 730380, 9 pages, 2014.
- [87] L. Zeng, C. O'Connor, J. Zhang, A. M. Kaplan, and D. A. Cohen, "IL-10 promotes resistance to apoptosis and metastatic potential in lung tumor cell lines," *Cytokine*, vol. 49, no. 3, pp. 294–302, 2010.
- [88] M. Pellegrini, T. Calzascia, A. R. Elford et al., "Adjuvant IL-7 antagonizes multiple cellular and molecular inhibitory networks to enhance immunotherapies," *Nature Medicine*, vol. 15, no. 5, pp. 528–536, 2009.
- [89] G. Ge, A. Wang, J. Yang et al., "Interleukin-37 suppresses tumor growth through inhibition of angiogenesis in non-small cell lung cancer," *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, vol. 35, no. 1, article 13, 2016.
- [90] W.-C. Liao, J.-T. Lin, C.-Y. Wu et al., "Serum interleukin-6 level but not genotype predicts survival after resection in stages II and III gastric carcinoma," *Clinical Cancer Research*, vol. 14, no. 2, pp. 428–434, 2008.
- [91] R. Salgado, S. Junius, I. Benoy et al., "Circulating interleukin-6 predicts survival in patients with metastatic breast cancer," *International Journal of Cancer*, vol. 103, no. 5, pp. 642–646, 2003.
- [92] J. Nakashima, M. Tachibana, Y. Horiguchi et al., "Serum interleukin 6 as a prognostic factor in patients with prostate cancer," *Clinical Cancer Research*, vol. 6, no. 7, pp. 2702–2706, 2000.
- [93] M. Lesina, M. U. Kurkowski, K. Ludes et al., "Stat3/Socs3 activation by IL-6 transsignaling promotes progression of pancreatic intraepithelial neoplasia and development of pancreatic cancer," *Cancer Cell*, vol. 19, no. 4, pp. 456–469, 2011.
- [94] S. P. Gao, K. G. Mark, K. Leslie et al., "Mutations in the EGFR kinase domain mediate STAT3 activation via IL-6 production in human lung adenocarcinomas," *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 117, no. 12, pp. 3846–3856, 2007.
- [95] H.-J. Lee, G. Zhuang, Y. Cao, P. Du, H.-J. Kim, and J. Settleman, "Drug resistance via feedback activation of Stat3 in oncogene-addicted cancer cells," *Cancer Cell*, vol. 26, no. 2, pp. 207–221, 2014.
- [96] Y. M. Zhu, S. J. Webster, D. Flower, and P. J. Woll, "Interleukin-8/CXCL8 is a growth factor for human lung cancer cells," *British Journal of Cancer*, vol. 91, no. 11, pp. 1970–1976, 2004.
- [97] D. J. J. Waugh and C. Wilson, "The interleukin-8 pathway in cancer," *Clinical Cancer Research*, vol. 14, no. 21, pp. 6735–6741, 2008.
- [98] S. Tanno, Y. Ohsaki, K. Nakanishi, E. Toyoshima, and K. Kikuchi, "Human small cell lung cancer cells express functional VEGF receptors, VEGFR-2 and VEGFR-3," *Lung Cancer*, vol. 46, no. 1, pp. 11–19, 2004.
- [99] J. Waltenberger, L. Claesson-Welsh, A. Siegbahn, M. Shibuya, and C.-H. Heldin, "Different signal transduction properties of KDR and Flt1, two receptors for vascular endothelial growth factor," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 269, no. 43, pp. 26988–26995, 1994.
- [100] T. Veikkola, M. Karkkainen, L. Claesson-Welsh, and K. Alitalo, "Regulation of angiogenesis via vascular endothelial growth factor receptors," *Cancer Research*, vol. 60, no. 2, pp. 203–212, 2000.
- [101] Y. E. Zhang, "Non-Smad pathways in TGF- signaling," *Cell Research*, vol. 19, no. 1, pp. 128–139, 2009.
- [102] L. Zhao, S. Liu, X. Che et al., "Bafalin inhibits TGF- induced epithelial-to-mesenchymal transition and migration in human lung cancer A549 cells by downregulating TGF- receptors," *International Journal of Molecular Medicine*, vol. 36, no. 3, pp. 645–652, 2015.
- [103] B. Pan, J. Shen, J. Cao et al., "Interleukin-17 promotes angiogenesis by stimulating VEGF production of cancer cells via the STAT3/GIV signaling pathway in non-small-cell lung cancer," *Scientific Reports*, vol. 5, article 16053, 2015.
- [104] L. Wang, T. Yi, M. Kortylewski, D. M. Pardoll, D. Zeng, and H. Yu, "IL-17 can promote tumor growth through an IL-6-Stat3 signaling pathway," *The Journal of Experimental Medicine*, vol. 206, no. 7, pp. 1457–1464, 2009.
- [105] T. Suzuki, H. Kishimoto, and R. Abe, "Requirement of interleukin 7 signaling for anti-tumor immune response under lymphopenic conditions in a murine lung carcinoma model," *Cancer Immunology, Immunotherapy*, vol. 65, no. 3, pp. 341–354, 2016.
- [106] I. E. Brown, C. Blank, J. Kline, A. K. Kacha, and T. F. Gajewski, "Homeostatic proliferation as an isolated variable reverses CD8⁺ T cell anergy and promotes tumor rejection," *Journal of Immunology*, vol. 177, no. 7, pp. 4521–4529, 2006.
- [107] M. F. Nold, C. A. Nold-Petry, J. A. Zepp, B. E. Palmer, P. Bulter, and C. A. Dinarello, "IL-37 is a fundamental inhibitor of innate immunity," *Nature Immunology*, vol. 11, no. 11, pp. 1014–1022, 2010.
- [108] P. Rybojad, A. Jablonka, B. Wilczynska, and J. Tabarkiewicz, "Surgery decreases number of cells secreting cytotoxic mediators and increases secretion of interleukin 10 in patients with lung cancer," *European Journal of Surgical Oncology*, vol. 39, no. 11, pp. 1269–1277, 2013.
- [109] T. Blankenstein, "The role of tumor stroma in the interaction between tumor and immune system," *Current Opinion in Immunology*, vol. 17, no. 2, pp. 180–186, 2005.
- [110] M. Kastamoulas, G. Chondrogiannis, P. Kanavaros et al., "Cytokine effects on cell survival and death of A549 lung carcinoma cells," *Cytokine*, vol. 61, no. 3, pp. 816–825, 2013.
- [111] M. Niiya, K. Niiya, T. Kiguchi et al., "Induction of TNF- α , uPA, IL-8 and MCP-1 by doxorubicin in human lung carcinoma cells," *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, vol. 52, no. 5, pp. 391–398, 2003.
- [112] J. Couzin-Frankel, "Breakthrough of the year 2013. Cancer immunotherapy," *Science*, vol. 342, no. 6165, pp. 1432–1433, 2013.
- [113] C. Zheng, G. Yu, H. Wang et al., "Meta-analysis of chemotherapy and dendritic cells with cytokine-induced killer cells in the treatment of non-small-cell lung cancer," *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, vol. 8, no. 8, pp. 14527–14537, 2015.
- [114] G. K. Antony and A. Z. Dudek, "Interleukin 2 in cancer therapy," *Current Medicinal Chemistry*, vol. 17, no. 29, pp. 3297–3302, 2010.

- [115] T. Floros and A. A. Tarhini, "Anticancer cytokines: biology and clinical effects of interferon- 2, interleukin (IL)-2, IL-15, IL-21, and IL-12," *Seminars in Oncology*, vol. 42, no. 4, pp. 539–548, 2015.
- [116] M. Pellegrini, T. W. Mak, and P. S. Ohashi, "Fighting cancers from within: augmenting tumor immunity with cytokine therapy," *Trends in Pharmacological Sciences*, vol. 31, no. 8, pp. 356–363, 2010.
- [117] R. Chen and B. Chen, "Siltuximab (CNTO 328): a promising option for human malignancies," *Drug Design, Development and Therapy*, vol. 9, pp. 3455–3458, 2015.
- [118] E. Angevin, J. Tabernero, E. Elez et al., "A phase I/II, multiple-dose, dose-escalation study of siltuximab, an anti-interleukin-6 monoclonal antibody, in patients with advanced solid tumors," *Clinical Cancer Research*, vol. 20, no. 8, pp. 2192–2204, 2014.
- [119] C. A. Perez, E. S. Santos, and L. E. Raez, "Active immunotherapy for non-small-cell lung cancer: moving toward a reality," *Expert Review of Anticancer Therapy*, vol. 11, no. 10, pp. 1599–1605, 2011.
- [120] J. Nemunaitis, R. O. Dillman, P. O. Schwarzenberger et al., "Phase II study of belagenpumatucel-L, a transforming growth factor beta-2 antisense gene-modified allogeneic tumor cell vaccine in non-small-cell lung cancer," *Journal of Clinical Oncology*, vol. 24, no. 29, pp. 4721–4730, 2006.
- [121] G. Giaccone, L. A. Bazhenova, J. Nemunaitis et al., "A phase III study of belagenpumatucel-L, an allogeneic tumour cell vaccine, as maintenance therapy for non-small cell lung cancer," *European Journal of Cancer*, vol. 51, no. 16, pp. 2321–2329, 2015.
- [122] J.-M. Limacher and E. Quoix, "TG4010: a therapeutic vaccine against MUC1 expressing tumors," *OncImmunology*, vol. 1, no. 5, pp. 791–792, 2012.
- [123] R. Ramlau, E. Quoix, J. Rolski et al., "A phase II study of Tg4010 (Mva-Muc1-IL2) in association with chemotherapy in patients with stage III/IV non-small cell lung cancer," *Journal of Thoracic Oncology*, vol. 3, no. 7, pp. 735–744, 2008.
- [124] E. Quoix, R. Ramlau, V. Westeel et al., "Therapeutic vaccination with TG4010 and first-line chemotherapy in advanced non-small-cell lung cancer: a controlled phase 2B trial," *The Lancet Oncology*, vol. 12, no. 12, pp. 1125–1133, 2011.
- [125] E. Quoix, H. Lena, G. Losonczy et al., "TG4010 immunotherapy and first-line chemotherapy for advanced non-small-cell lung cancer (TIME): results from the phase 2b part of a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2b/3 trial," *The Lancet Oncology*, vol. 17, no. 2, pp. 212–223, 2016.
- [126] H. Kobayashi and Y. Tanaka, "T cell immunotherapy—a review," *Pharmaceuticals*, vol. 8, no. 1, pp. 40–61, 2015.
- [127] K. Kakimi, H. Matsushita, T. Murakawa, and J. Nakajima, "T cell therapy for the treatment of non-small cell lung cancer," *Translational Lung Cancer Research*, vol. 3, no. 1, pp. 23–33, 2014.
- [128] E. G. Iliopoulou, P. Kountourakis, M. V. Karamouzis et al., "A phase I trial of adoptive transfer of allogeneic natural killer cells in patients with advanced non-small cell lung cancer," *Cancer Immunology, Immunotherapy*, vol. 59, no. 12, pp. 1781–1789, 2010.
- [129] C. Hontscha, Y. Borck, H. Zhou, D. Messmer, and I. G. H. Schmidt-Wolf, "Clinical trials on CIK cells: first report of the international registry on CIK cells (IRCC)," *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, vol. 137, no. 2, pp. 305–310, 2011.
- [130] M. Wang, J.-X. Cao, J.-H. Pan et al., "Adoptive immunotherapy of cytokine-induced killer cell therapy in the treatment of non-small cell lung cancer," *PLoS ONE*, vol. 9, no. 11, Article ID e112662, 2014.
- [131] V. Boolell, M. Alamgeer, D. N. Watkins, and V. Ganju, "The evolution of therapies in non-small cell lung cancer," *Cancers*, vol. 7, no. 3, pp. 1815–1846, 2015.
- [132] N. M. La-Beck, G. W. Jean, C. Huynh, S. K. Alzghari, and D. B. Lowe, "Immune checkpoint inhibitors: new insights and current place in cancer therapy," *Pharmacotherapy*, vol. 35, no. 10, pp. 963–976, 2015.
- [133] S. L. Topalian, C. G. Drake, and D. M. Pardoll, "Targeting the PD-1/B7-H1(PD-L1) pathway to activate anti-tumor immunity," *Current Opinion in Immunology*, vol. 24, no. 2, pp. 207–212, 2012.
- [134] E. B. Garon, "Current perspectives in immunotherapy for non-small cell lung cancer," *Seminars in Oncology*, vol. 42, supplement 2, pp. S11–S18, 2015.
- [135] J. Brahmer, K. L. Reckamp, P. Baas et al., "Nivolumab versus docetaxel in advanced squamous-cell non-small-cell lung cancer," *The New England Journal of Medicine*, vol. 373, no. 2, pp. 123–135, 2015.
- [136] A. Patnaik, S. P. Kang, D. Rasco et al., "Phase I study of pembrolizumab (MK-3475; Anti-PD-1 monoclonal antibody) in patients with advanced solid tumors," *Clinical Cancer Research*, vol. 21, no. 19, pp. 4286–4293, 2015.
- [137] E. B. Garon, N. A. Rizvi, R. Hui et al., "Pembrolizumab for the treatment of non-small-cell lung cancer," *New England Journal of Medicine*, vol. 372, no. 21, pp. 2018–2028, 2015.
- [138] R. S. Herbst, P. Baas, D.-W. Kim et al., "Pembrolizumab versus docetaxel for previously treated, PD-L1-positive, advanced non-small-cell lung cancer (KEYNOTE-010): a randomised controlled trial," *The Lancet*, vol. 387, no. 10027, pp. 1540–1550, 2016.
- [139] L. Fehrenbacher, A. Spira, M. Ballinger et al., "Atezolizumab versus docetaxel for patients with previously treated non-small-cell lung cancer (POPLAR): a multicentre, open-label, phase 2 randomised controlled trial," *The Lancet*, vol. 387, no. 10030, pp. 1837–1846, 2016.
- [140] J. M. Reichert, "Antibodies to watch in 2016," *mAbs*, vol. 8, no. 2, pp. 197–204, 2016.

Impact of Heat Shock Protein 90 Inhibition on the Proteomic Profile of Lung Adenocarcinoma as Measured by Two-Dimensional Electrophoresis Coupled with Mass Spectrometry

Ángela Marrugal ¹, Irene Ferrer ^{1,2}, Maria Dolores Pastor ³, Laura Ojeda ¹,
 Álvaro Quintanal-Villalonga ⁴, Amancio Carnero ^{2,3}, Sonia Molina-Pinelo ^{2,3,*} and
 Luis Paz-Ares ^{1,2,5,6,*} 

¹ H12O-CNIO Lung Cancer Clinical Research Unit, Instituto de Investigación Hospital 12 de Octubre & Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO), 28029 Madrid, Spain

² CIBERONC, 28029 Madrid, Spain

³ Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBIS) (HUVR, CSIC, Universidad de Sevilla), 41013 Sevilla, Spain

⁴ Program in Molecular Pharmacology, Memorial Sloan Kettering Cancer Center, New York, NY 10065, USA

⁵ Medical Oncology Department, Hospital Universitario Doce de Octubre, 28041 Madrid, Spain

⁶ Medical School, Universidad Complutense, 28040 Madrid, Spain

* Correspondence: smolina-ibis@us.es (S.M.-P.); lpazaresr@seom.org (L.P.-A.)

† These authors contributed equally to this work.

Received: 24 June 2019; Accepted: 30 July 2019; Published: 31 July 2019



Abstract: Heat shock protein 90 (HSP90) is an important chaperone in lung adenocarcinoma, with relevant protein drivers such as EGFR (epidermal growth factor receptor) and EML4-ALK (echinoderm microtubule-associated protein-like protein4 fused to anaplastic lymphoma kinase) depending on it for their correct function, therefore HSP90 inhibitors show promise as potential treatments for lung adenocarcinoma. To study responses to its inhibition, HSP90 was pharmacologically interrupted by geldanamycin and resorcinol derivatives or with combined inhibition of HSP90 plus HSP70 in lung adenocarcinoma cell lines. Two-dimensional electrophoresis was performed to identify proteomic profiles associated with inhibition which will help to understand the biological basis for the responses. HSP90 inhibition resulted in altered protein profiles that differed according the treatment condition studied. Results revealed 254 differentially expressed proteins after treatments, among which, eukaryotic translation initiation factor3 subunit I (eIF3i) and citrate synthase demonstrated their potential role as response biomarkers. The differentially expressed proteins also enabled signalling pathways involved in responses to be identified; these included apoptosis, serine-glycine biosynthesis and tricarboxylic acid cycle. The proteomic profiles identified here contribute to an improved understanding of HSP90 inhibition and open possibilities for the detection of potential response biomarkers which will be essential to maximize treatment efficacy in lung adenocarcinoma.

Keywords: lung cancer; proteomic; chaperones; HSP90 inhibitors

1. Introduction

Lung cancer is the leading cause of cancer-related death globally, with a 5-year relative survival rate of only 18% on account of it being commonly diagnosed at advanced stages [1]. There are two major types of lung cancer non-small-cell lung cancer (NSCLC), which accounts for 85% of lung tumors, and small-cell lung cancer (SCLC) accounting for the rest. In turn, NSCLCs are histologically classified according to three subtypes: adenocarcinoma, squamous cell carcinoma and large cell

carcinoma [2], with several molecular alterations underlying each histological subtype. This has allowed therapies that target some of these molecular aberrations to be developed [3,4]. While such targeted treatments have achieved improved responses and survival rates, acquired resistance to these treatments is a problem. Moreover, not all NSCLC molecular subtypes have a specific targeted therapy. There is consequently a clear need for novel and broader-spectrum therapies that improve patient responses [5]. Focusing on adenocarcinoma, the main NSCLC subtype (50%), more than half of the cases are driven by recognized oncogenic alterations, such as epidermal growth factor receptor (EGFR), Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog (KRAS), Echinoderm Microtubule-associated protein-like protein 4 fused to anaplastic lymphoma kinase (EML4-ALK), mesenchymal-epithelial transition (MET) factor, serine/threonine-protein kinase B-Raf (BRAF) or human epidermal growth factor 2 (HER2/ErbB2/neu) [6,7]. As most of these proteins are clients of 90kDa heat shock protein (HSP90) [8], an elevated expression of HSP90 has consequently been correlated with a poorer clinical prognosis [9,10] as well as with resistance to chemo- and radiotherapy [11–15].

HSP90 is one of the most abundant and evolutionarily conserved molecular chaperones. Besides representing 1–2% of all cellular proteins, this chaperone can increase its expression up to 10-fold in response to physiological stress [16]. Dominant isoforms are the constitutively expressed HSP90 β and the stress inducible HSP90 α which can be found in the cytoplasm, nucleus or even on the cell surface and extracellular space (for HSP90 α) [17]. Both isoforms are collectively named HSP90 unless specified, and play a critical role in the maturation, stabilization and regulation of so-called “client” proteins via an ATP-driven chaperone cycle regulated by co-chaperones such as HSP70 and p23 [18]. Many of the approximately 300 client proteins (<https://www.picard.ch/downloads/Hsp90interactors.pdf>) play key roles in oncogenic signalling and in different hallmarks of cancer such as proliferation, evasion of apoptosis, immortalization, angiogenesis, invasion and metastasis. Due to their strong dependence on HSP90, inhibition of the latter leads to ubiquitin-mediated proteasomal degradation of client proteins concluding with the downregulation of different oncogenic signalling pathways [19]. Since EGFR [20], BRAF [21], ERBB2 [22], MET [23,24] and the EML4-ALK translocation product [8] are clients of HSP90, acting as oncodrivers in different clinico-pathological subsets of lung adenocarcinoma, degradation of these oncoproteins through HSP90 inhibition leads to loss of tumor-cell viability [25–28]. Promising results have been shown in different clinical studies, especially in malignancies that possess an HSP90 client as an onco-driver [29–31]. However, as not all lung adenocarcinomas respond equally to HSP90 inhibitors [32,33], a better understanding of the cellular consequences of HSP90 inhibition will therefore be key to improve clinical outcomes in this tumor type.

Proteomic methods have been used widely to identify protein network alterations that may be linked to drugs used to treat lung cancer in terms of sensitivity and resistance [34–37]. Specifically, two-dimensional gel electrophoresis has been employed to analyze protein expression profiles and identify novel diagnostic, prognostic or predictive biomarkers in these tumors [38–44]. Due to the complex interactome of HSP90 and the enormous number of cellular processes in which it is involved, the use of proteomic tools for the study of this chaperone and its clients is a common approach [17,45–47]. However, additional information is needed to dissect responses to HSP90 inhibitors in lung cancer. For this reason, we analyzed proteome modulation by HSP90 inhibitors in different lung adenocarcinoma cell lines using two-dimensional electrophoresis coupled with tandem mass spectrometry. Comparisons of proteomic expression profiles in drug-treated and untreated cells showed remarkable changes in both the number and expression levels of many proteins. Differentially expressed proteins could help in the identification of plausible biomarkers and elucidate cellular processes involved in responses arising from the inhibition of HSP90 in these tumors.

2. Materials and Methods

2.1. Cell Cultures

The human lung adenocarcinoma cell lines HCC827 (CRL-2868), A549 (CCL-185) and H1437 (CRL-5872) were obtained from American Type Culture Collection (ATCC), and the H3122 cell line was kindly provided by Dr. Koivunen. Cell lines were propagated in RPMI-1640 medium (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA), with the exception of A549 which was cultured in DMEM (Sigma-Aldrich). All cell lines were supplemented with 10% (*v/v*) fetal bovine serum (FBS, TICO Europe, Amstelveen, The Netherlands), 1% (*v/v*) antibiotic-antimycotic solution (Sigma-Aldrich) and 1% (*v/v*) glutamine. Cells were maintained at 37 °C in a humidified incubator in a 5% CO₂ and 95% air atmosphere. Cells were authenticated and regularly checked for mycoplasma.

2.2. siRNA Transfection

Transient silencing of HSP90 was achieved through small interfering RNAs (siRNAs). For HSP90 α and HSP90 β silencing, siRNAs were purchased from Origene (Rockville, MD USA) (SR302262 and SR302264). In turn, control cells were transfected with scrambled siRNA (SR30002). LipofectamineTM RNAiMAX (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), a cationic lipid transfection reagent, was used to transfect all cell lines according to the manufacturer's instructions. Simultaneous transfections were performed to silence both genes in the same cell line.

2.3. Drug Treatment

The HSP90 inhibitors used in this study included analogues of geldanamycin: tanespimycin (17-N-allylamino-17-demethoxygeldanamycin, 17-AAG) (Selleckchem, Munich, Germany) and retaspimycin hydrochloride ((4E,6Z,8S,9S,10E,12S,13R,14S,16R)-19-(allylamino)-13,20,22-trihydroxy-8,14-dimethoxy-4,10,12,16-tetramethyl-3-oxo-2-azabicyclo[1.6.3.1]docosa-1(22),4,6,10,18,20-hexaen-9-yl carbamate, IPI-504) (Eurodiagnóstico, Madrid, Spain) and radicicol derivatives: ganetespib (3-(2,4-Dihydroxy-5-isopropylphenyl)-4-(1-methylindol-5-yl)-5-hydroxy-4H-1,2,4-triazole, STA-9090) and luminespib (5-(2,4-dihydroxy-5-isopropylphenyl)-N-ethyl-4-(4-(morpholinomethyl)phenyl) isoxazole-3carboxamide, AUY-922) (Selleckchem). VER-155008 (5'-O-[(4-Cyanophenyl)methyl]-8-[(3,4-dichlorophenyl)methyl]amino-adenosine) (ApexBio, Houston, TX, USA) was used as an HSP70 inhibitor. The chemical structure of all inhibitors used can be accessed on the website <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>. All drugs were dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) as stock solutions according to manufacturers' instructions. Cells were treated for 96 h with the different inhibitors in concentrations ranging from 0.33 nM to 20 μ M to calculate half-maximal inhibitory concentrations (IC₅₀). Thereafter, the concentration for each drug at which growth is reduced to 80% (IC₈₀) was calculated and applied to cell lines maintained in complete growth medium. Protein extracts were collected at different times (10, 24 and/or 48 h) according to subsequent techniques to be used.

2.4. Immunoblotting

Total protein extracts from the studied cell lines were isolated with RIPA buffer (Sigma-Aldrich) containing a protease inhibitor cocktail (cOmpleteTM Mini EDTA-free, Roche, Basel, Switzerland) and a phosphatase inhibitor cocktail (PhosSTOP EASYpack, Roche). A standard western blot protocol was employed with a miniProtean electrophoretic system (BioRad, Berkeley, CA, USA) and a wet electroblotting system (BioRad). Primary antibodies against HSP90 α (ab79849, Abcam, Cambridge, UK), HSP90 β (ab53497, Abcam), GRP94 (ab18055, Abcam), HSP70 (ab45133, Abcam), HSP27 (#2402, Cell Signaling, Danvers, MA, USA) EGFR (#4267, Cell Signaling), pEGFR (#2234, Cell Signaling), ALK (#3633, Cell Signaling), eIF3i (ab40745, Abcam), citrate synthase (#14309, Cell Signaling), α -Tubulin (T9026, Sigma-Aldrich) or β -actin (A5316, Sigma-Aldrich) were used. Antibody-bound proteins were detected by enhanced chemiluminescence (Clarity Western ECL Blotting Substrates (BioRad)) using the ChemiDoc system (BioRad) after incubation with horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse

secondary antibody (#7076, Cell Signaling) or anti-rabbit secondary antibody (#7074, Cell Signaling). The ratios between signals from proteins of interest and α -tubulin or β -actin were calculated to determine the relative protein expression values. No grouping of gels/blots cropped from different parts of the same gel, or from different gels, fields or exposures was performed.

2.5. Proteomic Sample Preparation

Cells were seeded into 10 cm diameter dishes with the relevant culture medium at the appropriate density to reach 80 percent confluence 24 h post-seeding. On the following day, cells were treated with the different HSP90 inhibitors or the HSP90 (17-AAG) plus HSP70 (VER-155008) inhibitors at its IC80 while the negative control was treated with the same amount of vehicle DMSO used in the inhibited cells. After 24 h, cells were collected, precipitated, washed with ice-cold PBS and finally each pellet was shock-frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until further use. Before use, pellets were thawed on ice and then cells were resuspended in HEN buffer (50 mM HEPES (Sigma-Aldrich), 5 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) (Invitrogen Ambion), 250 mM sodium chloride (NaCl) (Panreac, Barcelona, Spain), 5 mM dithiothreitol (DTT) (GE Healthcare, Chicago, IL, USA), 1 mM sodium orthovanadate (Sigma-Aldrich), 0.2% IGEPAL (Sigma-Aldrich) and 5 μL of protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich)) and lysed for 1 h on ice with intermittent vortexing.

Protein samples from each cell line and condition were pre-treated with the 2-D Clean Up Kit (GE Healthcare) and the final pellets were resuspended in 2-DE lysis buffer (8 M urea (GE Healthcare), 4% CHAPS (GE Healthcare), 2% IPG buffer pH 3-11 nonlinear (NL) (GE Healthcare) and 40 mM DTT (GE Healthcare)). Protein samples were maintained overnight at 4°C with gentle rotation to ensure their complete resolubilization. Protein concentrations in the 2-DE samples were determined by the 2-D Quant-Kit (GE Healthcare).

2.6. Two-Dimensional Electrophoresis and Gel Image Analysis

In the experiment, 240 μg of total protein from each individual sample were diluted to up to 250 μL with DeStreak rehydration solution (GE Healthcare) and 0.5% 3-11 NL pH IPG buffer (GE Healthcare). Each mixture was loaded onto 13 cm IGP DryStrips (GE Healthcare) with a 3-10 NL pH gradient. The first-dimension separation—isoelectric focusing (IEF)—was then carried out on an Ettan IPGphor II system (GE Healthcare). IPG DryStrips were equilibrated in a reducing agent followed by an alkylating agent. The second dimension was performed by placing the strips on 8-16% CriterionTM TGX stain-free acrylamide gels (Bio-Rad) to allow protein separation by electrophoresis in a Criterion DodecaTM cell (Bio-Rad). The analytical gels were visualized with Typhoon 9400 (GE Healthcare) after SYPRO[®] (Bio-Rad) staining. The digitalized 2-DE gel images were studied (protein spot detection, spot matching and semi-quantitative statistical analysis) using PDQuest software (Bio-Rad). For each studied condition, three different gel images were analyzed and a corresponding reference synthetic image was obtained. To improve accuracy, detected spots and spot matches after *in silico* matching, were manually edited.

2.7. MALDI-TOF/TOF Mass Spectrometry Analysis

Spots that were present in only one of the conditions or displayed quantitative abundance changes of more than 2-fold were selected for identification by MALDI-TOF/TOF. Protein spots of interest were picked from the stained gel using the Investigator ProPic robotic workstation (Genomic Solution, Huntingdon, UK) and were then washed and digested. The samples were mixed with a matrix solution CCA (α -cyano-4-hydroxycinnamic acid), spotted on a MALDI plate (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and allowed to air-dry. To obtain a peptide mass fingerprint (PMF), lists of peak intensities and mass-to-charge (m/z) values were analyzed with a 4800 Proteomics Analyzer MALDI-TOF/TOF Mass Spectrometer (Applied Biosystems).

2.8. Protein Identification

High-resolution tandem mass spectra MS + (MS/MS) data, peptide matching and protein identification were determined with web-based MASCOT software (<http://www.matrixscience.com/>) using SWISS-PROT as the protein sequence database with a mass tolerance of ± 50 ppm. Candidate proteins were selected from each spot, using the number of matched peptides, sequence coverage, molecular mass and isoelectric point, among other variables, as criteria for accepting the identification.

2.9. Protein Functional Analysis

The gene ontology enrichment analysis of identified proteins was performed using the PANTHER (Protein ANalysis THrough Evolutionary Relationships) online database (<http://pantherdb.org/>) [48,49]. Pathway analyses were carried out for differentially expressed proteins from the cell lines studied in response to different inhibitors. This database was also used to categorize identified proteins according to their biological processes and molecular functions. Only results whose adjusted p-value was lower than 0.05 were considered statistically significant and used in the study.

3. Results

3.1. Characterization of Lung Adenocarcinoma Cell Lines

Lung adenocarcinoma cell lines from different backgrounds were characterized based on protein expression levels measured for HSP90, other related HSPs and HSP90 client proteins such as EGFR and EML4-ALK (Figure 1). The EGFR-mutant cell line (HCC827) showed highest level of EGFR expression (followed by the KRAS-mutant A549 cells) and was the only cell line showing EGFR activation. The presence of EML4-ALK fusion protein was detected exclusively in the H3122 cell line. Focusing on HSPs, three of the four cell lines studied showed similar levels of cytosolic HSP90 (α and β) protein expression, while the H1437 cell line (triple-negative; EGFR, ALK and KRAS wild-type) exhibited a higher expression of HSP90 α and a lower expression of HSP90 β than the other cell lines studied. Similarly, GRP94 (the endoplasmic reticulum HSP90 isoform) expression was higher in the H1437 cell line than the other cell lines. On the other hand, protein levels of HSP70 were similar in all cell lines although slightly higher in the A549 and H1437 cell lines. Furthermore, the HCC827 and A549 cell lines showed high HSP27 protein expression levels compared to almost undetectable levels in the other cell lines.

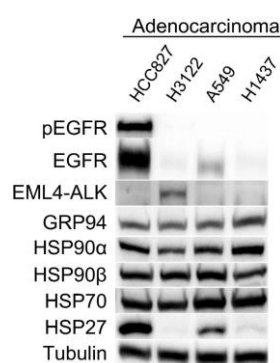


Figure 1. Characterization of a panel of adenocarcinoma cell lines. Western blot analysis of adenocarcinoma cell lines whose oncogenes are either directly (epidermal growth factor receptor (EGFR) in HCC827 and EML4-ALK in H3122 cell lines) or indirectly Kirsten rat sarcoma (KRAS) viral oncogene homolog) in the A549 cell line) related to HSP90, as well as an EGFR, anaplastic lymphoma kinase (ALK) and KRAS wild-type cell line (H1437). This technique was employed to study protein expression levels of constitutive and inducible HSP90, other related heat shock proteins (HSPs) (GRP94, HSP70 and HSP27) as well as the HSP90 clients EGFR, its phosphorylated form pEGFR, and EML4-ALK. For Western blots, a representative image is shown. Densitometry analysis may be found in Figure S1.

3.2. Effectiveness of HSP90 Inhibitors in Lung Adenocarcinoma Cell Lines

Cells were treated with different doses of HSP90 (17-AAG, IPI-504, STA-9090 and AUY-922) and HSP70 (VER-155008) inhibitors with a view to calculating IC₅₀ values and examining the efficacy of each drug in each cell line (Table 1).

Table 1. IC₅₀ values of different HSP90 and HSP70 inhibitors in the studied cell lines.

Cell Line	HSP90 Inhibitors				HSP70 Inhibitor	EGFR	ALK	KRAS
	IC ₅₀	IC ₅₀	IC ₅₀	IC ₅₀	IC ₅₀			
	17-AAG nM	IPI-504 nM	STA-9090 nM	AUY-922 nM	VER-155008 μ M			
HCC827	26.255	17.145	5.138	4.167	2.081	E746-A750 del	WT	WT
H3122	26.165	28.371	7.991	9.11	33.898	WT	EML4-ALK v1	WT
A549	16.296	19.492	6.31	30.733	24.487	WT	WT	p.G12S
H1437	3.708	3.473	6.794	2.814	24.811	WT	WT	WT

nM = nanomolar; μ M = micromolar.

The studied cell lines (especially the cell line harboring EML4-ALK translocation, H3122) were more sensitive to HSP90 inhibitors than to the HSP70 inhibitor used. In relation to HSP90 inhibition, IC₅₀ values ranged from 2814 to 30,733 μ M, with the radicicol derivatives (STA-9090 and AUY-922) generally having lower IC₅₀ values particularly in the EGFR-mutant and EML4-ALK translocated cell lines. Subsequently, western blot analyses were used to evaluate responses to HSP90 inhibition at different time points based on IC₈₀ values (Figure 2). We identified that HSP90 inhibitors induced compensatory expression of HSP70 and HSP90, along with significant reductions in the HSP90 clients EGFR and EML4-ALK since the 10 h time-point in analyzed treatments. Moreover, EGFR degradation was faster and more pronounced in the EGFR-mutant cell line HCC827 than in the KRAS-mutant cell line A549 despite the high initial expression of EGFR. It is also worth noting that HSP90 inhibition in the H3122 cell line dramatically inhibited expression of its oncodriver EML4-ALK.

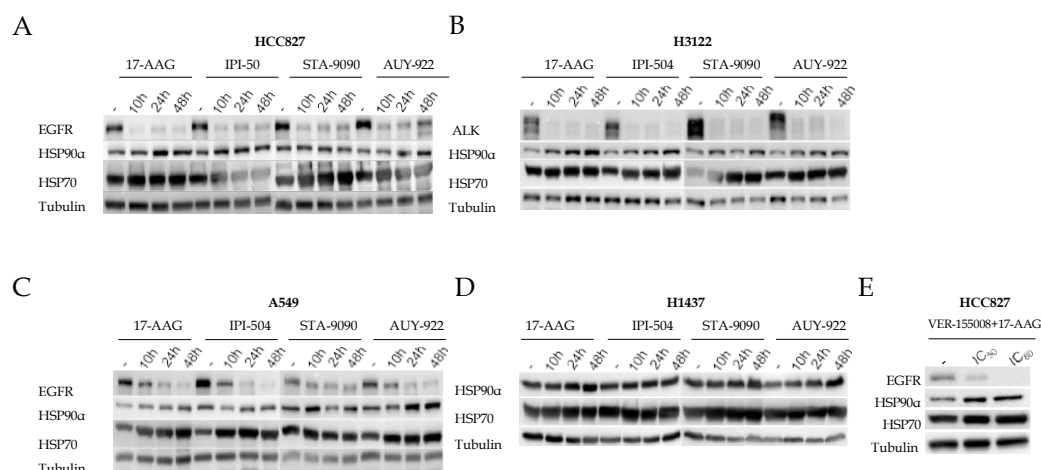


Figure 2. Analysis of sensitivity of adenocarcinoma cell lines to HSP90 inhibitors. Western blot determination of the effect of 17-AAG, IPI-504, STA-9090 and AUY-922 inhibitors on adenocarcinoma cell lines characterized by (A) mutated EGFR, (B) EML4-ALK translocation, (C) mutated KRAS and (D) EGFR, ALK and KRAS wild-type. (E) Study of combined treatment of HSP70 and HSP90 inhibitors in the HCC827 cell line. HSP90α and HSP70 expression was determined in each of the cell lines along with the HSP90 clients EGFR and EML4-ALK. For Western blots, a representative image is shown. Densitometry analysis may be found in Figure S2.

3.3. Effects of HSP90 Inhibition on Protein Expression Patterns in Adenocarcinoma Cell Lines

To identify proteins correlated with HSP90 inhibition, we used 2-DE to analyze the proteome from each cell line treated with the four selected HSP90 inhibitors, the HSP90 (17-AAG) plus HSP70 (VER-155008) inhibitors combination, or vehicle treatment for 24 h. To eliminate gel to gel variation, isoelectric focusing and the second dimension of all samples for each cell line were performed at the one time in a single assay. Different proteome profiles of treated and control groups in the studied cell lines could be visualized following image analysis by PDQuest 2-D software. Representative 2-DE gels for inhibited and untreated HCC827, H3122, A549 and H1437 cells are shown in Figures S3–S7 where the two most over- and down-expressed protein spots for each condition and cell line are given. An average of 473, 201, 257 and 263 protein spots were detected, quantified, normalized and inter-gel-matched in the EGFR, EML4-ALK, KRAS, and triple-negative cell lines, respectively (Table 2).

Table 2. Number of matched protein spots in the considered cell lines under the different treatment conditions.

Condition	Cell Line			
	HCC827	H3122	A549	H1437
Control	492	199	263	253
17-AAG	488	200	259	264
IPI-504	480	202	266	262
STA-9090	499	200	235	265
AUY-922	507	197	259	261
VER-155008+17AAG	374	209	257	275

Protein spots included in the analyses were those with significant quantitative differences of at least 2-fold expression variation between treatments and control or those qualitative spots present only in some of the treatments or the control. The results, after mass spectrometry analysis, of identified protein variations after treatments are shown in Table 3 and Tables S1–S5.

Table 3. Number of differentially expressed proteins identified in the studied cell lines for the different treatments.

Treatment	Protein Deregulation	Cell Line			
		HCC827	H3122	A549	H1437
17-AAG	Up	23	4	9	10
	Down	15	3	2	3
IPI-504	Up	26	3	11	18
	Down	16	2	6	3
STA-9090	Up	25	14	6	9
	Down	18	4	32	3
AUY-922	Up	23	5	6	9
	Down	8	4	11	5
VER-155008 + 17AAG	Up	30	10	12	15
	Down	61	6	15	3

The EGFR (HCC827) cell line showed the highest number of deregulated proteins after treatment with the different HSP90 inhibitors studied without major differences between treatments. The triple-negative cell line (H1437) had a higher number of differentially expressed proteins following treatment with geldanamycin derivatives whereas more deregulated proteins were detected in the EML4-ALK (H3122) and KRAS (A549) cell lines after treatment with radicicol derivatives. The KRAS cell line was the only line where the number of down-expressed proteins was higher than that of overexpressed proteins, concretely after treatment with radicicol derivatives.

Regarding differentially expressed proteins in the EGFR cell line, HSP70, enolase and mutL-like 1 (MLH1) protein were among the most overexpressed proteins, while HSP90AA1 (HSP90 α), sumo3 and HSC71 were the most down-expressed. In the EML4-ALK cell line, anterior gradient protein 2 homolog (AGR2) was the most overexpressed protein while eukaryotic translation initiation factor 3 subunit I (eIF3i) was the most down-expressed protein after inhibition. MHC class I antigen, citrate synthase (CS), transketolase and elongation factor 1- α were some of the most overexpressed proteins in the KRAS cell line, while pyruvate kinase and ATP synthase subunit beta were among the most down-expressed. Lastly, in the triple-negative cell line, transketolase, mitochondrial aldehyde dehydrogenase 2 variant (ALDH2) and phenylalanine tRNA ligase beta subunit were among the most overexpressed proteins, whereas 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase type-2, alternative protein fibroblast growth factor 1 (FGF1) and creatine kinase U-type were commonly detected as down-expressed after treatments.

Concerning HSP90 inhibitors, the radicicol derivative STA-9090 was the treatment in response to which more proteins were deregulated and the only one that showed a higher number of down-expressed than overexpressed proteins. On the other hand, the geldanamycin derivative IPI-504 showed the second highest dysregulation of the HSP90 inhibitors. It was also the treatment which produced the largest number of overexpressed proteins, which was mainly due to the response of the A549 and H1437 cell lines exposed to this inhibitor. Finally, the HSP90 (17-AAG) plus HSP70 (VER-155008) inhibitor combination led to greater protein dysregulation than that seen with the HSP90 inhibitors studied alone. Like under HSP90 inhibition, the highest number of deregulated proteins was detected in the EGFR cell line. Besides, this along with the KRAS cell line were the only cell lines where the number of down-expressed proteins was greater than that of overexpressed proteins in response to the combined inhibition treatment.

Following an in-depth analysis of the geldanamycin-derivative inhibition, we identified 65 differentially expressed proteins in the 17-AAG treated cell lines, four of which were deregulated in several of the studied cell lines. eIF3 subunit I was down-expressed in the HCC827 (EGFR-mutated) and H3122 (EML4-ALK rearrangement) cell lines. MHC class 1 antigen was down-expressed after treatment of HCC827 cells but overexpressed in A549 (KRAS-mutated) cells. Ras-related protein Rab-37 and transketolase were also identified in the A549 as well as in the H1437 (triple-negative; EGFR, ALK and KRAS wild-type) cell lines. Rab-37 was overexpressed after treatment of A549 cells but down-expressed in H1437 cells. Transketolase on the other hand was overexpressed in both cell lines. In the case of the IPI-504 treatment, 79 proteins were identified. Five of them were deregulated in two or more of the cell lines tested. HSP90 α was down-expressed in the EGFR-mutated cell line (HCC827) and overexpressed in the ALK translocation (H3122) cell line. HSP70 protein in its 1A and 1B variants was overexpressed in HCC827 and A549 cell lines in response to treatment. Transketolase was detected again, this time in three different cell lines, where its expression was decreased in H3122 and increased in A549 and H1437 cells after inhibition with IPI-504. Finally, Heat shock cognate 71 kDa protein (HSC71), also known as heat shock 70 kDa protein 8 (HSPA8), was down-expressed in HCC827 and overexpressed in H1437 cells.

With respect to the radicicol derivatives used, inhibition with STA-9090 led to 107 different proteins being identified, four of which were found in two or more cell lines. HSP90 α as well as the mitochondrial 60kDa heat shock protein, were down-expressed in HCC827 cells but overexpressed in H3122 cells. Rab-37 was again identified as being down-expressed following treatment of the HCC827 and A549 cell lines. Finally, the MHC class II antigen was overexpressed in H3122 cells and down-expressed in A549 cells. On the other hand, sixty-nine differentially expressed proteins were detected after cells were treated with AUY-922. Only two proteins were identified in more than one cell line. HSP70 was overexpressed in HCC827 and A549 cells while transketolase was overexpressed in A549 and H1437 cells.

Combination of the HSP90 inhibitor 17-AAG plus the HSP70 inhibitor VER-155008 gave rise to 143 deregulated proteins, 9 of which were common to two cell lines. Six proteins were deregulated in HCC827 and A549 cells. Retinoic acid receptor RXR-beta, lipoamide acyltransferase component of

branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase complex mitochondrial and cysteine and glycine-rich protein 2 were down-expressed while HSP70 1A was overexpressed in both cell lines. SAM and SH3 domain-containing protein 1 were overexpressed in HCC827 and down-expressed in A549 cells. In contrast, MHC class I antigen expression was decreased in HCC827 cells and increased in A549 cells. Heat shock 70 kDa protein 6 was overexpressed in the H3122 and A549 cell lines, while 60S acidic ribosomal protein P0 was one of the more highly expressed proteins following treatment of A549 and H1437 cells. The double inhibition treatment resulted in transketolase overexpression in HCC827 and H1437 cells.

With the purpose of searching a common protein signature after HSP90 inhibition and taking together results for the most deregulated proteins and those detected in two or more cell lines for the same inhibitor, six shared proteins (HSP70, HSP90 α , HSC71, eIF3i, MHC class 1 antigen and transketolase) were identified to be involved in the response to HSP90 inhibitors. It is important to note that adenocarcinoma is a molecularly diverse entity, in which many different molecular alterations have been identified as drivers of different subsets of patients in this context, each of them showing different prognosis and response to therapy. This fact makes each cell line harboring a different molecular driver unique. Nevertheless, a protein dysregulation pattern common for all cell lines tested was identified in this study, where 90% of the dysregulated proteins were found among the first ten proteins with average ratios greater than 5, which indicates the strength of our results. It is also remarkable that not only the expected HSP70, but also eIF3i, were detected unexpressed and down-expressed, respectively, in different cell lines.

3.4. Functional Annotation Analysis of Differentially Expressed Proteins

Proteins that were differentially expressed in response to the different HSP inhibitors were analyzed using PANTHER software for mapping of the molecular pathways that were possibly involved (Figure 3). Results showed that the deregulated proteins identified in response to 17-AAG inhibition participated in nine pathways, including the pentose phosphate pathway (PPP), which was the only pathway enriched in two different cell lines (A549 (KRAS) and H1437 (TN)) (Figure 3A). In the case of the other geldanamycin-derivative inhibitor, IPI-504 19, enrichment pathways were identified that included the platelet-derived growth factor (PDGF) and interleukin pathways which were shared by the EGFR (HCC827) and the EML4-ALK (H3122) cell lines. Two other pathways also coincided, consisting of apoptosis in HCC827, A549 and H1437 cells, and PPP in H3122, A549 and H1437 cells (Figure 3B). On the other hand, for radicicol derivatives, the set of STA-9090-associated proteins were assigned to 16 pathways, three of which were shared by different cell lines: serine glycine synthesis (detected in the EGFR and EML4-ALK cell lines), deregulated glycolysis (in the EML4-ALK and KRAS cell lines) and ATP synthesis (in the KRAS and triple-negative cell lines) (Figure 3C). AUY-922 was the HSP90 inhibitor with more shared pathways among the cell lines studied. These included serine glycine synthesis (again detected in the EGFR and the EML4-ALK cell lines), glycolysis (enriched in the EGFR, KRAS and triple-negative cell lines), and deregulated apoptosis (in the EGFR and KRAS cell lines). The A549 (KRAS) and H1437 (TN) cell lines also showed enrichment in ATP synthesis, PPP and pyruvate metabolism (Figure 3D).

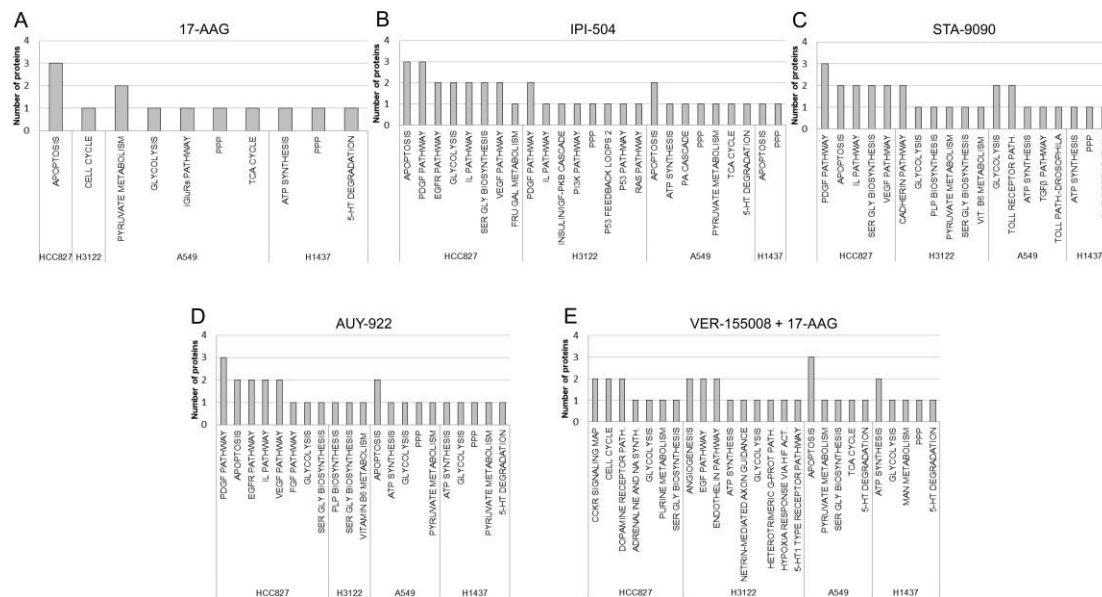


Figure 3. Canonical pathway analysis of proteins identified by two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry (2-DE/MS) in response to HSP90 inhibition. Functional analysis of the differentially expressed proteins in response to (A) 17-AAG, (B) IPI-504, (C) STA-9090, (D) AUY-922 and (E) VER-155008 + 17-AAG inhibitors in the adenocarcinoma cell lines HCC827, H3122, A549 and H1437. Enriched pathways were determined from the PANTHER database. The number of proteins involved in each identified pathway is represented on the y axis. iGluRs pathway = ionotropic glutamate receptor pathway, PPP= pentose phosphate pathway, TCA cycle = tricarboxylic acid cycle, 5-HT degradation = 5-hydroxytryptamine or serotonin degradation, PDGF pathway = platelet-derived growth factor signaling pathway, EGFR pathway = epidermal growth factor receptor pathway, IL pathway = interleukin signaling pathway, SER GLY biosynthesis = serine and glycine biosynthesis, VEGF pathway = vascular endothelial growth factor signaling pathway, FRU GAL metabolism = fructose and galactose metabolism, insulin/IGF-PKB cascade = insulin/ insulin-like growth factor pathway-protein kinase B signaling cascade, PI3K pathway = phosphoinositide-3 kinase pathway, PA cascade = plasminogen activating cascade, PLP biosynthesis = pyridoxal-5-phosphate biosynthesis, TGF β pathway = transforming growth factor beta signaling pathway, FGF pathway = Fibroblast Growth Factor signaling pathway, adrenaline and NA synth. = adrenaline and noradrenaline biosynthesis, EGF pathway = epidermal growth factor pathway, heterotrimeric G-protein signaling pathway = heterotrimeric G-protein signalling pathway Gi alpha- and Gs alpha-mediated pathway, 5-HT1 type receptor pathway = serotonin 1A receptor-mediated signalling pathway, MAN metabolism = mannose metabolism.

It is noteworthy that the largest number of pathways was identified when a HSP90 inhibitor was used in combination with the HSP70 inhibitor (VER155008). Four of 21 pathways were shared by cell lines. Glycolysis was detected in the EGFR, EML4-ALK and triple-negative cell lines, while serine glycine synthesis was found in the EGFR and KRAS cell lines. Moreover, ATP synthesis was enriched in the EML4-ALK and triple-negative cell lines such as 5-hydroxytryptamine (5-HT) degradation was found in the KRAS and triple-negative cell lines (Figure 3E).

3.5. Protein Expression Profiles and Signalling Pathways Associated with the HSP90 Inhibitor Family in Lung Adenocarcinoma Cell Lines

From the deregulated proteins under HSP90 inhibition in the four studied cell lines, Venn diagrams were constructed to illustrate the overlap of altered proteins within each HSP90 inhibitor family. Among the differentially expressed proteins after treatment with the geldanamycin derivatives, 33 were specific for 17-AAG and 47 for IPI-504, with 32 proteins (Table S6) common to both inhibitors

(Figure 4A). Among the proteins common to both inhibitors, the overexpression of HSP70, CS, AGR2, enolase and sumo3 are of note. On the other hand, only V-ATPase 116 kDa isoform a1, anamorsin, calcium-independent phospholipase A2-gamma (iPLA2-2) and 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase type-2 were exclusively down-expressed under geldanamycin derivatives. Four proteins (HSC71, MHC class I antigen, HSP90 α and transketolase) showed different expression patterns depending on the cell line under consideration.

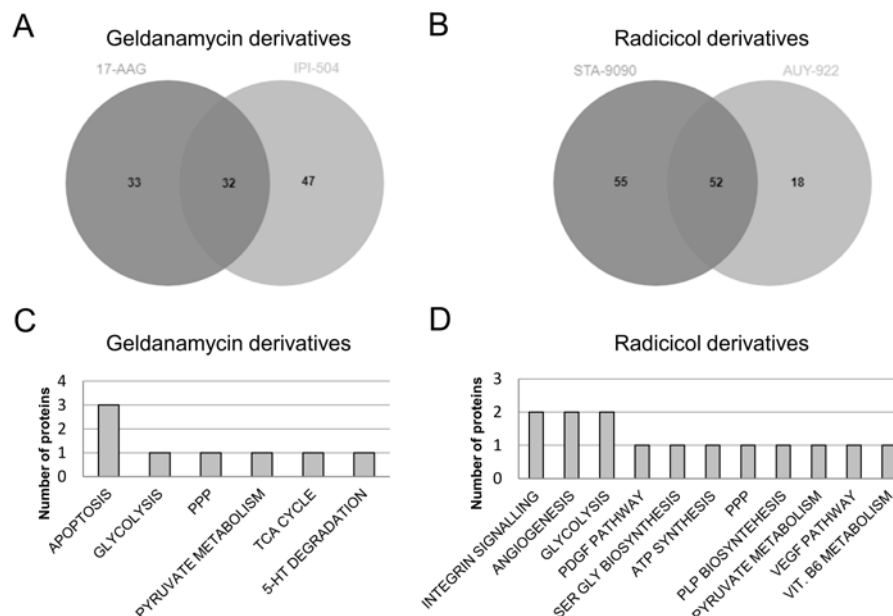


Figure 4. Study of cell line response to HSP90 inhibitors according to inhibitor family. Venn diagrams showing overlap of differentially expressed proteins as well as those specific to inhibition with (A) geldanamycin or (B) radicicol derivatives. The analysis of shared proteins following (C) geldanamycin or (D) radicicol treatments was performed with PANTHER software which identified deregulated pathways associated with each HSP90 inhibitor family. The number of proteins involved in each identified pathway is represented on the y axis. PPP= pentose phosphate pathway, TCA cycle = tricarboxylic acid cycle, 5-HT degradation = 5-hydroxytryptamine or serotonin degradation, PDGF pathway = platelet-derived growth factor signaling pathway, SER GLY biosynthesis = serine and glycine biosynthesis, PLP biosynthesis = pyridoxal-5-phosphate biosynthesis, VEGF pathway = vascular endothelial growth factor signaling pathway.

The radicicol derivatives group shared 52 deregulated proteins (Table S7). Fifty-five proteins were exclusively related to STA-9090 treatment while 18 were exclusive to AUY-922 inhibition (Figure 4B). Among the 30 shared proteins that were overexpressed, HSP70, AGR2 and enolase were again present in addition to new ones such as transketolase, vinculin or radixin. A smaller number of proteins were down-expressed such as V-ATPase 116 kDa isoform a1, iPLA2-2, 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase type-2, ATP synthase subunit beta, HSC71, eIF3i and sumo3. MHC class I antigen, HSP90 α , pyruvate kinase (PKM) and glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase (G6PD) showed different protein expression patterns according to the cell lines in question.

We identified that proteins that were deregulated following treatment with geldanamycin derivatives were involved in six pathways, while those detected after radicicol derivative treatments participated in 11 pathways. Three pathways (apoptosis, TCA cycle and 5-HT degradation) were exclusively enriched in response to treatment with geldanamycin derivatives (Figure 4C). The differentially expressed proteins related to these pathways were the different isoforms of HSP70 and HSC71 (for apoptosis), CS (for TCA cycle) and aldehyde dehydrogenase (for 5-HT degradation). In turn, the integrin signalling pathway, angiogenesis, the PDGF pathway, serine glycine biosynthesis, ATP synthesis, pyridoxal-5-phosphate (PLP) biosynthesis, the VEGF pathway and vitamin B6 metabolism

were specific to radicicol derivative treatment (Figure 4D). In this case, the proteins related to the enriched pathways (in parentheses) were BRAF and vinculin (integrin signalling pathway), BRAF and FGF1 (angiogenesis), BRAF (PDGF pathway), phosphoserine aminotransferase (serine glycine biosynthesis), ATP synthase subunit α and β (ATP synthesis), phosphoserine aminotransferase (PLP biosynthesis), BRAF (VEGF pathway) and phosphoserine aminotransferase (vitamin B6 metabolism). Only three signalling pathways (PPP, glycolysis, and pyruvate metabolism) were detected across the two HSP90 inhibitor families. Transketolase was the protein whose dysregulation was involved in the enrichment of PPP in both inhibitor families. Enolase was the common protein related to glycolysis dysregulation, but PKM also took part in inhibition by radicicol family derivatives. The final common pathway, pyruvate metabolism, was related to CS for inhibition by geldanamycin derivatives and to PKM for radicicol derivatives.

3.6. Validation of the Differential Expression of Proteins Involved in the Response to Chaperone Inhibitors

Two proteins (eIF3i and CS) were evaluated by western blotting owing to their important changes in expression in different cell lines in response to inhibitors as well as to their relationship with the deregulated pathways. The first of these, eIF3i, was the most down-expressed protein in response to treatment with 17-AAG, STA-9090, and VER-155008 + 17-AAG, and the second one under AUY-922 in the EML4-ALK cell line H3122. The down-expression of this important initiation factor was also detected in HCC827, the EGFR cell line, under the inhibitor 17-AAG. Western blotting of eIF3i and the corresponding internal control of the four studied cell lines are shown in Figure 5A. Since this technique is not as sensitive as 2-DE, the expression trend was observed more clearly in genetic silencing of HSP90 (α and β) than under drug inhibition of HSP90 in the EGFR and EML4-ALK cell lines. At the same time, these cell lines presented a noticeable eIF3i degradation after treatment with VER-155008, the HSP70 inhibitor, alone or in combination with 17-AAG. In contrast, the triple-negative cell line (H1437), showed an increased expression after genetic silencing of HSP90 and most of the studied conditions. In fact, H1437 cells showed an exclusive, small decreased expression of eIF3i after inhibition with 17-AGG in monotherapy or in conjunction with VER-155008. Finally, the KRAS cell line showed an intermediate expression pattern with increased expression of eIF3i after HSP70 inhibitor in conjunction with 17-AAG, as well as a decreased expression of this protein under genetic silencing or inhibition of HSP90.

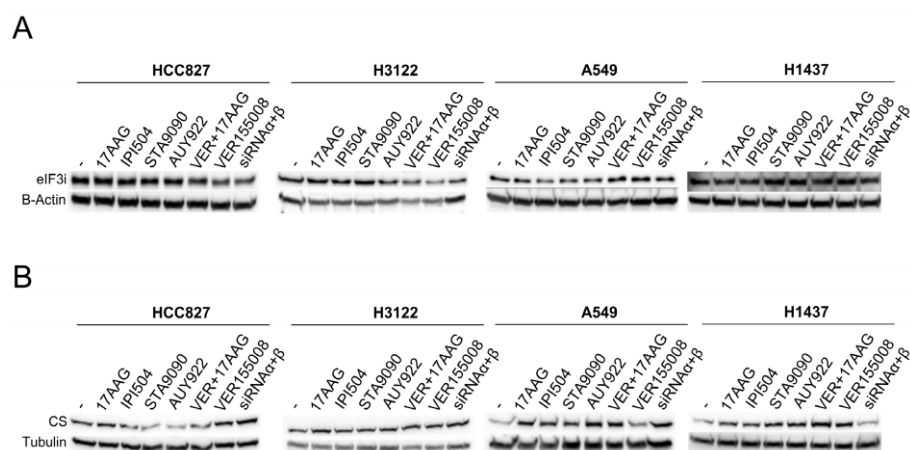


Figure 5. Western blotting validation of proteins identified as differentially expressed in the 2-DE/MS analysis. Protein lysates from HCC827, H3122, A549 and H1437 cells without treatment or inhibited with 17-AAG, IPI-504, STA-9090, AUY-922 VER-155008 + 17AAG and VER-155008 as well as the genetic silencing of HSP90 were immunoblotted. Expression study of (A) eIF3i and (B) CS after HSP90 inhibition as well as its loading control are shown. eIF3i = eukaryotic translation initiation factor 3 subunit I, CS = citrate synthase. For Western blots, a representative image is shown. Densitometry analysis may be found in Figure S8.

We also validated CS, which was differentially expressed across cell lines. This protein is an enzyme of the TCA cycle whose regulation is related to ATP synthesis and other metabolic pathways such as glycolysis, which were detected as deregulated pathways after HSP90 inhibition in the enrichment analysis. CS showed the largest increase of expression in the A549 cell line after treatments, confirming the 2-DE results, where approximately 7-fold expression changes were detected after 17-AAG, IPI-504 and VER-155008 + 17-AAG treatment. It should be pointed out that the EGFR cell line HCC827 was the only line where a decrease in expression of this protein after treatments was detected (Figure 5B).

4. Discussion

In this study we used 2-DE coupled with mass spectrometry to analyze differences that take place in the proteome of lung adenocarcinoma cell lines in response to HSP90 inhibition. For each lung adenocarcinoma cell line studied, we identified clear alterations in the protein profiles in treated compared to untreated control cell lines. These differences were notable for individual HSP90 inhibitors and in combination with an HSP70 inhibitor, with responses always being more effective for radicicol derivative treatments given the lower IC₅₀ values and higher proteomic dysregulation in the studied cell lines treated with these inhibitors.

Treatment with HSP90 inhibitors of lung adenocarcinoma cell lines, as expected, showed remarkable changes in the homeostasis of HSPs, leading to deregulation of HSP90, HSP70, HSP60, HSC71, HSP70 protein 6 (HSPA6), and mitochondrial HSP70 (mitHSP70). It has been reported that HSP90 inhibitors usually result in induction of the HSR leading to HSP70 overexpression mediated by heat shock factor 1 (HSF1) [50]. HSP70 upregulation has thus been related to the confirmation of HSP90 inhibition [51,52]. Besides HSP70, HSP90 overexpression occurs after HSP90 inhibition due to the HSR after inhibition as well as dissociation of HSF1 from HSP90 [53]. In this way, we have identified compensatory responses specific for each HSP90 inhibitor used, alone or in combination with a HSP70 inhibitor. On the other hand, we found that HSP60 was down-expressed in the EGFR mutant cell line after treatment with STA-9090 and 17-AAG plus VER-155008 combination; however, it was overexpressed in the EML4-ALK cell line in response to STA-9090 inhibition. This protein could be related to STA-9090 sensitivity, and if its inhibition in the EML4-ALK cell line was successful, this could indicate that the HSR may not be as important here as in other cell lines. A cytoprotective role of mitochondrial HSP60 in the apoptotic process was previously described [54,55]. Concretely in lung cancer, low expression of this chaperone has been proposed as a good prognostic factor of disease-free survival [56,57]. HSC71 was detected to be down-regulated after treatment with geldanamycin and radicicol derivatives, which could be related to an optimal response in the EGFR-mutated cell line. However, the expression of this chaperone was increased in response to STA-9090 treatment in the EML4-ALK cell line as well as in the triple negative cell line following IPI-504 treatment. This result is consistent with other studies on different tumor types where HSC71 plays a regulatory role in the HSR and homeostasis [47,58]. Another HSP70 family member, inducible HSPA6, was overexpressed in the H3122 and A549 cell lines following the combined inhibition of HSP90 plus HSP70. The upregulation of this protein, which is only minimally expressed under normal conditions, could be induced through the HSE/HSF1 system [59] and is related to cell survival in response to extracellular stress such as toxicity exposure [60,61]. However, in a recent study, HSPA6 expression was correlated with the inhibition of proliferation, migration and invasion, thereby enhancing the anti-tumor effect of garlic extract in bladder cancer [62]. This could be the reason why we observed a greater number of deregulated pathways in the combined inhibition protocol. Other member of the HSP70 family, mitHSP70, also known as mortalin, has been shown to promote and contribute to the process of carcinogenesis in numerous ways, including the merging and inactivation of tumor suppressor protein p53, which plays a key role in anti-apoptosis pathways, in regulation of the RAS RAF MEK pathway and activation of EMT signalling [63,64]. As mortalin is enriched in many types of cancers its overexpression has been used as a predictor of poor outcome in lung cancer [65,66]. In the present study, mortalin was down-expressed in the EGFR cell line after treatment with the inhibitor 17-AAG and overexpressed

in the EML4-ALK cell line with STA-9090. In cancer cells, mortalin responds to stress, including chemicals, and sequesters p53 in the cytoplasm to thereby avoid apoptosis [67]. Since cell death induced by inhibition of HSP90 partly depends on the p53 pathway [33], the mutational status of the tumor suppressor could be in charge of the differential response since in our study the EGFR cell line (HCC827) expresses wild-type (wt) p53 [68] while the EML4-ALK cell line (H3122) expresses mutated p53 [69]. Since wt and mutant p53 as well as Akt, whose action suppresses p53 activity, have been described as HSP90 clients, the inhibition of this chaperone would drive the activation of wt p53 or down-regulation of mutant p53 [70,71]. This fact could be the cause of differential expression in the HCC827 and H3122 cell lines, with degradation of mortalin after nuclear translocation of wt p53 in the EGFR cell line and mortalin accumulation after breaking of the HSP90-mutated p53 complex in the EML4-ALK cell line. Furthermore, the different mutational state of p53 could be related to a larger HSP response in the EML4-ALK cell line than in the EGFR cell line as it was seen with increased HSP90 α , HSP60 and HSC71 expression, which could modulate the response to inhibition [72]. In this way, in lung adenocarcinoma cells presenting mutated p53, such as H3122 cells, sensitivity to HSP90 inhibition could be increased by the restoration of wt p53.

Other response biomarkers to HSP90 inhibition were eIF3i, Rab-37, MLH1, AGR2 or transketolase. Deregulation of eIF3, an extremely complex multiprotein assembly with a key role in translation initiation and termination as in ribosomal recycling [73], has been correlated with the onset and progression of cancer [74–76]. Concretely, the I subunit of the eIF3 complex (eIF3i) was found to be overexpressed in different tumor types including colon adenocarcinoma and adenoma, head and neck squamous cell carcinomas, hepatocellular carcinoma, breast cancer, cervical cancer and metastatic melanoma [77–81]. Consistent with this, it was reported that eIF3i overexpression leads to malignant phenotype of cells [82,83] and could promote tumor angiogenesis [84,85]. Therefore, the down-expression of eIF3i observed in HCC827 and H3122 cell lines after treatment with HSP90 inhibitors could be a good prognostic factor for this therapeutic strategy in lung adenocarcinoma. Rab-37 is a small Rab-GTPase which regulates both exocytic and endocytic pathways and signal transduction pathways involving cell proliferation, migration, nutrition, innate immunity and fragmentation of compartments [86–88]. In lung cancer, low hRAB-37 mRNA expression has been associated with tumor metastasis [89]. It was demonstrated that Rab-37 suppresses lung cancer metastasis by mediating TIMP1 (tissue inhibitor of metalloproteinase) exocytosis, which inactivates extracellular matrix metalloproteinase 9 (MMP9) and suppresses cell invasion signalling [90,91]. However, MMP9 is an HSP90 client, so this protein should be degraded in response to HSP90 inhibition independently of Rab-37. For this reason, expression of this GTPase differed in response to treatments used on the different cell lines studied. However, while the MMP9 was not detected, it should be considered in future experiments for validation of its use as a possible prognostic factor of the response to inhibition. On the other hand, in the study of responses according to inhibitor family, approximately 50% of the differentially expressed proteins were common to inhibitors of the same family. In addition to previously mentioned proteins such as HSP70 and HSP90 α , other interesting proteins such as MLH1 and AGR-2 were detected for both HSP90-inhibitor families studied. MLH1 is one of the most important members of the DNA mismatch repair (MMR) system [92], and hence its downregulation was related to tumor progression and chemoresistance in different cancer types, among which is lung cancer [93–97]. In our study, the EGFR cell line showed increased MLH1 expression following treatment with all HSP90 inhibitors. We suggest that inhibition in this context could be restoring the expression of this tumor suppressor and consequently help drug resistance tumors become sensitive to other therapies. For its part, AGR2, which belongs to the protein disulfide isomerase (PDI) family, acts as a chaperone in periods of physiological stress [98]. This protein has been detected to be highly expressed in different tumor types, thus giving rise to the hypothesis that AGR2 acts as an oncogene due to its important role in the activation of survival and metastasis pathways [99,100]. However, other studies showed a down-expression of AGR2 in different cancer types [101–103], which raises serious doubts about its oncogenic role. In our study, AGR2 was overexpressed in the EML4-ALK cell

line (which has mutated p53) in response to all inhibitor treatments. These findings suggest that AGR2 could serve as a good prognostic factor of HSP90 inhibition, which is in agreement with a recent report where tumor aggressiveness and poorer disease-free survival were related to the downregulation of AGR2, p21 and cyclin D1 in the presence of mutated p53 in ovarian carcinoma [104].

Functional annotation analysis in our study showed that the differentially expressed proteins were involved in 40 different pathways. Six of these pathways (PPP, apoptosis, pyruvate metabolism, glycolysis, 5-HT degradation and ATP synthesis) were shared between all studied HSP inhibitors. In connection with this, the elevated expression of transketolase, an enzyme in the PPP, has been detected in lung cancer [105], confirming an increase in metabolic activity in this tumor type. We found that transketolase was deregulated in all of tested HSP90 inhibitors. However, it was only down-expressed in H3122 cells after inhibition with IPI-504 while it was overexpressed in the A549 and H1437 cell lines under all treatments. These findings suggest that transketolase could have a key role in metabolic activity of lung cancer as well as its downregulation could be also a good prognostic factor. These results showed a strong intervention of HSP90 inhibition on cell metabolism. Keeping in mind that a hallmark of lung cancer metabolism is the hyperactivity of glycolysis independent of oxygen availability [106,107], we looked for proteins related to this metabolic pathway in our assay. Furthermore, the study of protein expression in cell lines in response to treatment with specific inhibitor families led to the identification of six deregulated pathways following treatment with geldanamycin derivatives and 11 pathways after treatment with radicicol derivatives. Only three of these pathways (glycolysis, PPP and pyruvate metabolism) were shared between families, thus confirming our previous results of the importance of metabolism in HSP90 inhibition. One of the three geldanamycin-specific pathways was the TCA cycle. We showed here that CS, a key enzyme in the TCA cycle, was overexpressed in the KRAS-mutant and triple-negative cell lines after inhibition with 17-AAG and IPI-504. This deregulation could be related to a possible resistance mechanism as was previously reported in ovarian carcinoma where, after chemotherapy, an increase of CS expression levels was related to protection from apoptosis [108,109]. Concerning the 11 specific pathways detected with radicicol derivative treatment, the biosynthesis pathway for serine and glycine was among the most remarkable, since this metabolic pathway, besides leading to the production of amino acids, purines and pyrimidines, is linked to the NADH production needed to maintain redox balance [110]. The upregulation of serine and glycine synthesis has thus been associated with different tumor types [111,112], including lung cancer, where expression of the SHMT1 enzyme has been correlated with good prognosis and expression of SMHT2 with poor prognosis [113]. Interestingly, we found that SMHT2 was downregulated after treatment with STA-9090 in the EGFR cell line, which could be a good signal of treatment efficacy.

In summary, a classical proteomic approach was carried out to detect proteomic changes after HSP90 inhibition in lung adenocarcinoma cell lines. The protein profiles, which were based on 2-DE and mass spectrometry, were identified in response to five different inhibitors. Taken together, we identified a panel of 254 deregulated proteins after HSP90 inhibition. Different proteins detected in our study, such as eIF3i, may provide useful information concerning the specific mode of action of inhibitors. Bioinformatic analyses of the altered proteins suggested that HSP90 inhibitors could affect many pathways, most of which are related to energy production, metabolism and apoptosis. Our results showed that HSP90 interacts with many intracellular pathways which were deregulated after its inhibition. The effects of some of the identified proteins to alter these pathways, such as CS in the TCA cycle, could be related to a possible mechanism that gives rise to an undesired form of HSP90 inhibition. However, further research including models that take tumor microenvironment into account, such as mouse models, as well as clinical investigation, are required to provide context to the significance of these possible biomarkers of response to HSP90 inhibition. Despite the limitations in the models used in this study, the differential protein profiles presented here, such as the pathways identified, contribute to our expanding knowledge of the mechanism of action underlying HSP90 inhibition and the potential development of novel response biomarkers or therapeutic targets.

5. Conclusions

We analyzed the proteomics associated with HSP90 inhibition in lung adenocarcinoma using a combined approach of two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry analysis. A total of 254 deregulated proteins were found after treatment with HSP90 inhibitors. Functional annotation analysis of differentially expressed proteins revealed different pathways as serine and glycine synthesis or TCA cycle which could help improve our understanding of the biology behind HSP90 inhibition. eIF3i, HSC71, MHC class I antigen, transketolase, citrate synthase, Rab-37, MLH1 and AGR2 might be putative biomarkers in HSP90 inhibition response in lung adenocarcinoma. However, a thorough in vivo validation is required to future clinical uses in lung adenocarcinoma.

Supplementary Materials: The following are available online at <http://www.mdpi.com/2073-4409/8/8/806/s1>,

Figure S1: Graphical summary of densitometry results obtained from the Western blots of (A) pEGFR, (B) EGFR, (C) EML4-ALK, (D) GRP94, (E) HSP90 α , (F) HSP90 β , (G) HSP70 and (H) HSP27 of Figure S1. All experiments were independently reproduced three times in the laboratory.; **Figure S2:** Graphical summary of densitometry results obtained from the Western blots of (A) EGFR, (B) HSP90 α and (C) HSP70 of the cell line HCC827, Western blots of (D) EML4-ALK, (E) HSP90 α and (F) HSP70 of the cell line H3122, Western blots of (G) EGFR, (H) HSP90 α and (I) HSP70 of the cell line A549, and Western blots of (J) HSP90 α and (K) HSP70 of the cell line H1437; such as Western blots of (L) EGFR, (M) HSP90 α , (N) HSP70 after HSP70 and HSP90 inhibition in the cell line HCC827. All of quantified Western blots may be observed in the Figure S2. VER = VER-1555008.; **Figure S3:** Representative two-dimensional (2D) gel images for the cell lines (A) HCC827, (B) H3122, (C) A549 and (D) H1437 untreated versus treated with the HSP90 inhibitor 17-AAG. For each cell line, the two spots that were most up- and down-expressed proteins are highlighted by circles, with the accompanying numbers matching those listed in Table S1.; **Figure S4:** Representative two-dimensional (2D) gel images for the cell lines (A) HCC827, (B) H3122, (C) A549 and (D) H1437 untreated versus treated with the HSP90 inhibitor IPI-504. For each cell line, the two spots that were most up- and down-expressed proteins are highlighted by circles, with the accompanying numbers matching those listed in Table S2.; **Figure S5:** Representative two-dimensional (2D) gel images for the cell lines (A) HCC827, (B) H3122, (C) A549 and (D) H1437 untreated versus treated with the HSP90 inhibitor STA-9090. For each cell line, the two spots that were most up- and down-expressed proteins are highlighted by circles, with the accompanying numbers matching those listed in Table S3.; **Figure S6:** Representative two-dimensional (2D) gel images for the cell lines (A) HCC827, (B) H3122, (C) A549 and (D) H1437 untreated versus treated with the HSP90 inhibitor AUY-922. For each cell line, the two spots that were most up- and down-expressed proteins are highlighted by circles, with the accompanying numbers matching those listed in Table S4.; **Figure S7:** Representative two-dimensional (2D) gel images for the cell lines (A) HCC827, (B) H3122, (C) A549 and (D) H1437 untreated versus treated with the combination of the HSP70 inhibitor VER-155008 plus the HSP90 inhibitor 17-AAG. For each cell line, the two spots that were most up- and down-expressed proteins are highlighted by circles, with the accompanying numbers matching those listed in Table S5.; **Figure S8:** Graphical summary of densitometry results obtained from the Western blots of the eukaryotic translation initiation factor3 subunit I (eIF3) in the cell lines (A) HCC827, (B) H3122, (C) A549 and (D) H1437, such as Western blots of citrate synthase (CS) in the cell lines (E) HCC827, (F) H3122, (G) A549, (H) H1437 of Figure 5. All experiments were independently reproduced three times in the laboratory. VER= VER-1555008.; **Table S1:** Differentially expressed proteins identified by mass spectrometry after 17-AAG treatment of the HCC827, H3122, A549 and H1437 cell lines.; **Table S2:** Differentially expressed proteins identified by mass spectrometry after IPI-504 treatment of the HCC827, H3122, A549 and H1437 cell lines.; **Table S3:** Differentially expressed proteins identified by mass spectrometry after STA-9090 treatment of the HCC827, H3122, A549 and H1437 cell lines.; **Table S4:** Differentially expressed proteins identified by mass spectrometry after AUY-922 treatment of the HCC827, H3122, A549 and H1437 cell lines.; **Table S5:** Differentially expressed proteins identified by mass spectrometry after combined treatment with VER-155008 and 17-AAG of the HCC827, H3122, A549 and H1437 cell lines.; **Table S6:** List of 32 shared differentially expressed proteins under geldanamycin derivatives inhibitors.; **Table S7:** List of 52 common deregulated proteins after treatments with radicicol derivatives.

Author Contributions: Conceptualization A.M., I.F., A.C., S.M.-P., and L.P.-A.; methodology, A.M., M.D.P., I.F., S.M.-P., L.O., and A.Q.-V.; investigation, A.M., L.P.-A. and S.M.-P.; validation, A.M., and M.D.P.; formal analysis, A.M., and S.M.-P.; writing—original draft preparation, A.M., S.M.-P. and L.P.-A.; writing—review and editing, A.M., I.F., A.C., M.D.P., L.O., A.Q.-V., S.M.-P. and L.P.-A.; supervision, S.M.-P., and L.P.-A.; funding acquisition L.P.-A.

Funding: L.P.A. was funded by the Comunidad de Madrid, CAM, (B2017/BMD3884), ISCIII (PIE15/00076, PI17/00778 and DTS17/00089) and CIBERONC (CB16/12/00442), and co-funded by FEDER from Regional Development European Funds (European Union). S.M.P. is funded by the Fundación Mutua Madrileña (2014) Ministry of Health and Social Welfare of Junta de Andalucía (PI-0046-2012, Nicolas Monardes Program C-0040-2016), ISCIII (PI17/00033), and co-funded by FEDER from Regional Development European Funds (European Union). I.F. is funded by the AECC (AIO2015) and ISCIII (PI16/01311), and co-funded by FEDER from Regional Development European Funds (European Union). AC was funded by grants from the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness Plan Estatal de I+D+I 2018 co-funded by FEDER: RTI2018-097455-B-I00; CIBER de Cáncer

(CB16/12/00275), co-funded by FEDER from Regional Development European Funds. Especial thanks to the Fundación AECC. L.O. is funded by the Ministerio de Educación, Cultura y Deporte (FPU13/02595).

Acknowledgments: Not applicable.

Conflicts of Interest: The authors declare that they have no competing interests.

References

1. Siegel, R.L.; Miller, K.D.; Jemal, A. Cancer statistics. *Cancer J. Clin.* **2018**, *68*, 7–30. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Herbst, R.S.; Heymach, J.V.; Lippman, S.M. Lung cancer. *N. Engl. J. Med.* **2008**, *359*, 1367–1380. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Zugazagoitia, J.; Molina-Pinelo, S.; Lopez-Rios, F.; Paz-Ares, L. Biological therapies in nonsmall cell lung cancer. *Eur. Respir. J.* **2017**, *49*, 1601520. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Somasundaram, A.; A Socinski, M.; Burns, T.F. Personalized treatment of EGFR mutant and ALK-positive patients in NSCLC. *Expert Opin. Pharmacother.* **2014**, *15*, 2693–2708. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Chatterjee, S.; Bhattacharya, S.; A Socinski, M.; Burns, T.F. HSP90 inhibitors in lung cancer: Promise still unfulfilled. *Clin. Adv. Hematol. Oncol.* **2016**, *14*, 346–356. [[PubMed](#)]
6. Thunnissen, E.; Van Der Oord, K.; Bakker, M.D. Prognostic and predictive biomarkers in lung cancer. A review. *Virchows Arch.* **2014**, *464*, 347–358. [[CrossRef](#)]
7. Chan, B.A.; Hughes, B.G. Targeted therapy for non-small cell lung cancer: Current standards and the promise of the future. *Transl. Lung Cancer Res.* **2015**, *4*, 36–54.
8. Sequist, L.V.; Gettinger, S.; Senzer, N.N.; Martins, R.G.; Janne, P.A.; Lilenbaum, R.; Gray, J.E.; Iafrate, A.J.; Katayama, R.; Hafeez, N.; et al. Activity of IPI-504, a Novel Heat-Shock Protein 90 Inhibitor, in Patients With Molecularly Defined Non-Small-Cell Lung Cancer. *J. Clin. Oncol.* **2010**, *28*, 4953–4960. [[CrossRef](#)]
9. Ruiz, M.I.G.; Floor, K.; Roepman, P.; Rodriguez, J.A.; Meijer, G.A.; Mooi, W.J.; Jassem, E.; Nikliński, J.; Muley, T.; Van Zandwijk, N.; et al. Integration of Gene Dosage and Gene Expression in Non-Small Cell Lung Cancer, Identification of HSP90 as Potential Target. *PLoS ONE* **2008**, *3*, e0001722.
10. Liu, W.; Wu, Y.; Wang, L.; Gao, L.; Wang, Y.; Liu, X.; Zhang, K.; Song, J.; Wang, H.; A Bayer, T.; et al. Protein signature for non-small cell lung cancer prognosis. *Am. J. Cancer Res.* **2014**, *4*, 256–269.
11. Garcia-Carbonero, R.; Carnero, A.; Paz-Ares, L. Inhibition of HSP90 molecular chaperones: Moving into the clinic. *Lancet Oncol.* **2013**, *14*, e358–e369. [[CrossRef](#)]
12. Park, K.-S.; Oh, B.; Lee, M.-H.; Nam, K.-Y.; Jin, H.R.; Yang, H.; Choi, J.; Kim, S.-W.; Lee, D.H. The HSP90 inhibitor, NVP-AUY922, sensitizes KRAS-mutant non-small cell lung cancer with intrinsic resistance to MEK inhibitor, trametinib. *Cancer Lett.* **2016**, *372*, 75–81. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Kobayashi, N.; Toyooka, S.; Soh, J.; Yamamoto, H.; Dote, H.; Kawasaki, K.; Otani, H.; Kubo, T.; Jida, M.; Ueno, T.; et al. The anti-proliferative effect of heat shock protein 90 inhibitor, 17-DMAG, on non-small-cell lung cancers being resistant to EGFR tyrosine kinase inhibitor. *Lung Cancer* **2012**, *75*, 161–166. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Koizumi, H.; Yamada, T.; Takeuchi, S.; Nakagawa, T.; Kita, K.; Nakamura, T.; Matsumoto, K.; Suda, K.; Mitsudomi, T.; Yano, S. Hsp90 Inhibition Overcomes HGF-Trigging Resistance to EGFR-TKIs in EGFR-Mutant Lung Cancer by Decreasing Client Protein Expression and Angiogenesis. *J. Thorac. Oncol.* **2012**, *7*, 1078–1085. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Hirakawa, H.; Fujisawa, H.; Masaoka, A.; Noguchi, M.; Hirayama, R.; Takahashi, M.; Fujimori, A.; Okayasu, R. The combination of Hsp90 inhibitor 17AAG and heavy-ion irradiation provides effective tumor control in human lung cancer cells. *Cancer Med.* **2015**, *4*, 426–436. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Nathan, D.F.; Vos, M.H.; Lindquist, S. In vivo functions of the *Saccharomyces cerevisiae* Hsp90 chaperone. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 12949–12956. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Weidenauer, L.; Wang, T.; Joshi, S.; Chiosis, G.; Quadroni, M.R. Proteomic interrogation of HSP90 and insights for medical research. *Expert Rev. Proteom.* **2017**, *14*, 1105–1117. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Erlejan, A.G.; Lagadari, M.; Toneatto, J.; Piwien-Pilipuk, G.; Galigniana, M.D. Regulatory role of the 90-kDa-heat-shock protein (Hsp90) and associated factors on gene expression. *Biochim. Biophys. Acta Gene Regul. Mech.* **2014**, *1839*, 71–87. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Neckers, L.; Workman, P. Hsp90 molecular chaperone inhibitors: Are we there yet? *Clin. Cancer Res.* **2012**, *18*, 64–76. [[CrossRef](#)]

20. Shimamura, T. Epidermal Growth Factor Receptors Harboring Kinase Domain Mutations Associate with the Heat Shock Protein 90 Chaperone and Are Destabilized following Exposure to Geldanamycins. *Cancer Res.* **2005**, *65*, 6401–6408. [[CrossRef](#)]
21. Da Rocha Dias, S.; Friedlos, F.; Light, Y.; Springer, C.; Workman, P.; Marais, R. Activated B-Raf is an Hsp90 client protein that is targeted by the anticancer drug 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin. *Cancer Res.* **2005**, *65*, 10686–10691. [[CrossRef](#)][[PubMed](#)]
22. Xu, W.; Soga, S.; Beebe, K.; Lee, M.-J.; Kim, Y.S.; Trepel, J.; Neckers, L. Sensitivity of epidermal growth factor receptor and ErbB2 exon 20 insertion mutants to Hsp90 inhibition. *Br. J. Cancer* **2007**, *97*, 741–744. [[CrossRef](#)][[PubMed](#)]
23. Wang, S.; Pashtan, I.; Tsutsumi, S.; Xu, W.; Neckers, L. Cancer cells harboring MET gene amplification activate alternative signaling pathways to escape MET inhibition but remain sensitive to Hsp90 inhibitors. *Cell Cycle* **2009**, *8*, 2050–2056. [[CrossRef](#)][[PubMed](#)]
24. Choi, Y.J.; Kim, S.Y.; So, K.S.; Baek, I.-J.; Kim, W.S.; Choi, S.H.; Lee, J.C.; Bivona, T.G.; Rho, J.K.; Choi, C.-M. AUY922 Effectively Overcomes MET- and AXL-Mediated Resistance to EGFR-TKI in Lung Cancer Cells. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0119832. [[CrossRef](#)][[PubMed](#)]
25. Ueno, T.; Tsukuda, K.; Toyooka, S.; Ando, M.; Takaoka, M.; Soh, J.; Asano, H.; Maki, Y.; Muraoka, T.; Tanaka, N.; et al. Strong anti-tumor effect of NVP-AUY922, a novel Hsp90 inhibitor, on non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* **2012**, *76*, 26–31. [[CrossRef](#)][[PubMed](#)]
26. Niu, B.; Lin, J.; Feng, T. Effects of 17-AAG on the proliferation and apoptosis of human lung cancer A549 and H446 cells. *Chin. J. Tuberc. Resp. Dis.* **2015**, *38*, 267–272.
27. Normant, E.; Paez, G.; A West, K.; Lim, A.R.; Slocum, K.L.; Tunkey, C.; McDougall, J.; A Wylie, A.; Robison, K.; Caliri, K.; et al. The Hsp90 inhibitor IPI-504 rapidly lowers EML4-ALK levels and induces tumor regression in ALK-driven NSCLC models. *Oncogene* **2011**, *30*, 2581–2586. [[CrossRef](#)][[PubMed](#)]
28. Esfahani, K.; Cohen, V. HSP90 as a novel molecular target in non-small-cell lung cancer. *Lung Cancer* **2016**, *7*, 11–17. [[PubMed](#)]
29. Socinski, M.A.; Goldman, J.; El-Hariry, I.; Koczywas, M.; Vukovic, V.; Horn, L.; Paschold, E.; Salgia, R.; West, H.; Sequist, L.V.; et al. A Multicenter Phase II Study of Ganetespib Monotherapy in Patients with Genotypically Defined Advanced Non-Small Cell Lung Cancer. *Clin. Cancer Res.* **2013**, *19*, 3068–3077. [[CrossRef](#)]
30. Johnson, M.L.; Yu, H.A.; Hart, E.M.; Weitner, B.B.; Rademaker, A.W.; Patel, J.D.; Kris, M.G.; Riely, G.J. Phase I/II Study of HSP90 Inhibitor AUY922 and Erlotinib for EGFR-Mutant Lung Cancer with Acquired Resistance to Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitors. *J. Clin. Oncol.* **2015**, *33*, 1666–1673. [[CrossRef](#)]
31. Felip, E.; Barlesi, F.; Besse, B.; Chu, Q.; Gandhi, L.; Kim, S.-W.; Carcereny, E.; Sequist, L.V.; Brunsvig, P.; Chouaid, C.; et al. Phase 2 Study of the HSP-90 Inhibitor AUY922 in Previously Treated and Molecularly Defined Patients with Advanced Non-Small Cell Lung Cancer. *J. Thorac. Oncol.* **2018**, *13*, 576–584. [[CrossRef](#)][[PubMed](#)]
32. Butler, L.M.; Ferraldeschi, R.; Armstrong, H.K.; Centenera, M.M.; Workman, P. Maximizing the Therapeutic Potential of Hsp90 Inhibitors. *Mol. Cancer Res.* **2015**, *13*, 1445–1451. [[CrossRef](#)][[PubMed](#)]
33. Rong, B.; Yang, S. Molecular mechanism and targeted therapy of Hsp90 involved in lung cancer: New discoveries and developments (Review). *Int. J. Oncol.* **2018**, *52*, 321–336. [[CrossRef](#)][[PubMed](#)]
34. Pastor, M.D.; Nogal, A.; Molina-Pinelo, S.; Carnero, A.; Paz-Ares, L. Proteomic biomarkers in lung cancer. *Clin. Trans. Oncol.* **2013**, *15*, 671–682. [[CrossRef](#)][[PubMed](#)]
35. Cho, W.C. Application of proteomics in non-small-cell lung cancer. *Expert Rev. Proteom.* **2016**, *13*, 1–4. [[CrossRef](#)][[PubMed](#)]
36. Marrugal, Á.; Ojeda, L.; Paz-Ares, L.; Molina-Pinelo, S.; Ferrer, I. Proteomic-Based Approaches for the Study of Cytokines in Lung Cancer. *Dis. Markers* **2016**, *2016*, 1–12. [[CrossRef](#)][[PubMed](#)]
37. Nan, Y.; Du, J.; Ma, L.; Jiang, H.; Jin, F.; Yang, S. Early Candidate Biomarkers of Non-Small Cell Lung Cancer Are Screened and Identified in Premalignant Lung Lesions. *Technol. Cancer Res. Treat.* **2017**, *16*, 66–74. [[CrossRef](#)]
38. Pastor, M.; Nogal, A.; Molina-Pinelo, S.; Melendez, R.; Salinas, A.; De La Peña, M.G.; Martín-Juan, J.; Corral, J.; Garcia-Carbonero, R.; Carnero, A.; et al. Identification of proteomic signatures associated with lung cancer and COPD. *J. Proteom.* **2013**, *89*, 227–237. [[CrossRef](#)]

39. Kang, S.-M.; Sung, H.-J.; Ahn, J.-M.; Park, C.-S.; Park, J.-Y.; Lee, S.-Y.; Cho, J.-Y. The Haptoglobin β chain as a supportive biomarker for human lung cancers. *Mol. BioSyst.* **2011**, *7*, 1167. [\[CrossRef\]](#)
40. Chou, H.-C.; Lin, D.-Y.; Wen, Y.-F.; Lin, C.-C.; Lin, S.-H.; Chung, T.-W.; Liao, E.-C.; Chen, J.-Y.; Lin, C.-H.; Chen, Y.-J.; et al. Identification of Up- and Down-Regulated Proteins in Pemetrexed-Resistant Human Lung Adenocarcinoma: Flavin Reductase and Calreticulin Play Key Roles in the Development of Pemetrexed-Associated Resistance. *J. Proteome Res.* **2015**, *14*, 4907–4920. [\[CrossRef\]](#)
41. Nagano, K.; Imai, S.; Zhao, X.; Yamashita, T.; Yoshioka, Y.; Abe, Y.; Mukai, Y.; Kamada, H.; Nakagawa, S.; Tsutsumi, Y.; et al. Identification and evaluation of metastasis-related proteins, oxysterol binding protein-like 5 and calumenin, in lung tumors. *Int. J. Oncol.* **2015**, *47*, 195–205. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
42. Okano, T.; Seike, M.; Kuribayashi, H.; Soeno, C.; Ishii, T.; Kida, K.; Gemma, A. Identification of haptoglobin peptide as a novel serum biomarker for lung squamous cell carcinoma by serum proteome and peptidome profiling. *Int. J. Oncol.* **2016**, *48*, 945–952. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
43. Gao, H.; Niu, Y.; Li, M.; Fang, S.; Guo, L. Identification of DJ-1 as a contributor to multidrug resistance in human small-cell lung cancer using proteomic analysis. *Int. J. Exp. Pathol.* **2017**, *98*, 67–74. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
44. Lu, J.; Tang, M.; Liu, Y.; Wang, J.; Wu, Z. Comparative Proteomics of Chromium-Transformed Beas-2B Cells by 2D-DIGE and MALDI-TOF/TOF MS. *Boil. Trace Element Res.* **2018**, *185*, 78–88. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
45. Voruganti, S.; Kline, J.T.; Balch, M.J.; Rogers, J.; Matts, R.L.; Hartson, S.D. Proteomic Profiling of Hsp90 Inhibitors. *Methods Mol. Biol.* **2018**, *1709*, 139–162. [\[CrossRef\]](#)
46. Walter, R.; Pan, K.T.; Doebele, C.; Comoglio, F.; Tomska, K.; Bohnenberger, H.; Young, R.M.; Jacobs, L.; Keller, U.; Bonig, H.; et al. HSP90 promotes Burkitt lymphoma cell survival by maintaining tonic B-cell receptor signaling. *Blood* **2017**, *129*, 598–608. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
47. Nguyen, E.V.; Centenera, M.M.; Moldovan, M.; Das, R.; Irani, S.; Vincent, A.D.; Chan, H.; Horvath, L.G.; Lynn, D.J.; Daly, R.J.; et al. Identification of Novel Response and Predictive Biomarkers to Hsp90 Inhibitors Through Proteomic Profiling of Patient-derived Prostate Tumor Explants. *Mol. Cell. Proteom.* **2018**, *17*, 1470–1486. [\[CrossRef\]](#)
48. Thomas, P.D.; Campbell, M.J.; Kejariwal, A.; Mi, H.; Karlak, B.; Daverman, R.; Diemer, K.; Muruganujan, A.; Narechania, A. PANTHER: A Library of Protein Families and Subfamilies Indexed by Function. *Genome Res.* **2003**, *13*, 2129–2141. [\[CrossRef\]](#)
49. Mi, H.; Dong, Q.; Muruganujan, A.; Gaudet, P.; Lewis, S.; Thomas, P.D. PANTHER version 7: Improved phylogenetic trees, orthologs and collaboration with the Gene Ontology Consortium. *Nucleic Acids Res.* **2010**, *38*, D204–D210. [\[CrossRef\]](#)
50. Condé, R.; Belak, Z.R.; Nair, M.; O'Carroll, R.F.; Ovsenek, N. Modulation of Hsf1 activity by novobiocin and geldanamycin. *Biochem. Cell Biol.* **2009**, *87*, 845–851. [\[CrossRef\]](#)
51. Kudryavtsev, V.A.; Khokhlova, A.V.; Mosina, V.A.; Selivanova, E.I.; Kabakov, A.E. Induction of Hsp70 in tumor cells treated with inhibitors of the Hsp90 activity: A predictive marker and promising target for radiosensitization. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0173640. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
52. Grem, J.L. Phase I and Pharmacologic Study of 17-(Allylamino)-17-Demethoxygeldanamycin in Adult Patients with Solid Tumors. *J. Clin. Oncol.* **2005**, *23*, 1885–1893. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
53. Chen, Y.; Chen, J.; Loo, A.; Jaeger, S.; Bagdasarian, L.; Yu, J.; Chung, F.; Korn, J.; Ruddy, D.; Guo, R.; et al. Targeting HSF1 sensitizes cancer cells to HSP90 inhibition. *Oncotarget* **2013**, *4*, 816–829. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
54. Pace, A.; Barone, G.; Lauria, A.; Martorana, A.; Piccionello, A.P.; Pierro, P.; Terenzi, A.; Almerico, A.M.; Buscemi, S.; Campanella, C.; et al. Hsp60, a novel target for antitumor therapy: structure-function features and prospective drugs design. *Curr. Pharm. Des.* **2013**, *19*, 2757–2764. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
55. Nakamura, H.; Minegishi, H. HSP60 as a drug target. *Curr. Pharm. Des.* **2013**, *19*, 441–451. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
56. Xu, X.; Wang, W.; Shao, W.; Yin, W.; Chen, H.; Qiu, Y.; Mo, M.; Zhao, J.; Deng, Q.; He, J. Heat shock protein-60 expression was significantly correlated with the prognosis of lung adenocarcinoma. *J. Surg. Oncol.* **2011**, *104*, 598–603. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
57. Ağababaoğlu, İ.; Önen, A.; Demir, A.B.; Aktaş, S.; Altun, Z.; Ersöz, H.; Şanlı, A.; Özdemir, N.; Akkoçlu, A. Chaperonin (HSP60) and annexin-2 are candidate biomarkers for non-small cell lung carcinoma. *Medicine* **2017**, *96*, e5903. [\[CrossRef\]](#)

58. Korfanty, J.; Stokowy, T.; Widlak, P.; Gogler-Piglowska, A.; Handschuh, L.; Podkowiński, J.; Vydra, N.; Naumowicz, A.; Toma-Jonik, A.; Widlak, W. Crosstalk between HSF1 and HSF2 during the heat shock response in mouse testes. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2014**, *57*, 76–83. [\[CrossRef\]](#)
59. Stanhill, A.; Levin, V.; Hendel, A.; Shachar, I.; Kazanov, D.; Arber, N.; Kaminski, N.; Engelberg, D. Ha-ras(val12) induces HSP70b transcription via the HSE/HSF1 system, but HSP70b expression is suppressed in Ha-ras(val12)-transformed cells. *Oncogene* **2006**, *25*, 1485–1495. [\[CrossRef\]](#)
60. Ramirez, V.P.; Stamatis, M.; Shmukler, A.; Aneskievich, B.J. Basal and stress-inducible expression of HSPA6 in human keratinocytes is regulated by negative and positive promoter regions. *Cell Stress Chaperones* **2015**, *20*, 95–107. [\[CrossRef\]](#)
61. Khalouei, S.; Chow, A.M.; Brown, I.R. Stress-induced localization of HSPA6 (HSP70B') and HSPA1A (HSP70-1) proteins to centrioles in human neuronal cells. *Cell Stress Chaperones* **2014**, *19*, 321–327. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
62. Shin, S.-S.; Song, J.-H.; Hwang, B.; Noh, D.-H.; Park, S.L.; Kim, W.T.; Park, S.-S.; Kim, W.-J.; Moon, S.-K. HSPA6 augments garlic extract-induced inhibition of proliferation, migration, and invasion of bladder cancer EJ cells; Implication for cell cycle dysregulation, signaling pathway alteration, and transcription factor-associated MMP-9 regulation. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0171860. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
63. Na, Y.; Kaul, S.C.; Ryu, J.; Lee, J.-S.; Ahn, H.M.; Kalra, R.S.; Li, L.; Widodo, N.; Yun, C.-O.; Wadhwa, R. Stress chaperone mortalin contributes to epithelial-mesenchymal transition and cancer metastasis. *Cancer Res.* **2016**, *76*, 2754–2765. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
64. Yun, C.-O.; Bhargava, P.; Na, Y.; Lee, J.-S.; Ryu, J.; Kaul, S.C.; Wadhwa, R. Relevance of mortalin to cancer cell stemness and cancer therapy. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 42016. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
65. Sun, J.; Che, S.-L.; Piao, J.-J.; Xu, M.; Chen, L.-Y.; Lin, Z.-H. Mortalin overexpression predicts poor prognosis in early stage of non-small cell lung cancer. *Tumor Biol.* **2017**, *39*. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
66. Grills, C.; Jithesh, P.V.; Blayney, J.; Zhang, S.-D.; Fennell, D.A. Gene Expression Meta-Analysis Identifies VDAC1 as a Predictor of Poor Outcome in Early Stage Non-Small Cell Lung Cancer. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e14635. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
67. Lu, W.-J.; Lee, N.P.; Kaul, S.C.; Lan, F.; Poon, R.T.P.; Wadhwa, R.; Luk, J.M. Mortalin-p53 interaction in cancer cells is stress dependent and constitutes a selective target for cancer therapy. *Cell Death Differ.* **2011**, *18*, 1046–1056. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
68. Cai, Y.; Yan, X.; Zhang, G.; Zhao, W.; Jiao, S. The predictive value of ERCC1 and p53 for the effect of panobinostat and cisplatin combination treatment in NSCLC. *Oncotarget* **2015**, *6*, 18997–19005. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
69. Kriegs, M.; Gurtner, K.; Can, Y.; Brammer, I.; Rieckmann, T.; Oertel, R.; Wysocki, M.; Dorniok, F.; Gal, A.; Grob, T.J.; et al. Radiosensitization of NSCLC cells by EGFR inhibition is the result of an enhanced p53-dependent G1 arrest. *Radiother. Oncol.* **2015**, *115*, 120–127. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
70. Lin, K.; Rockliffe, N.; Johnson, G.G.; Sherrington, P.D.; Pettitt, A.R. Hsp90 inhibition has opposing effects on wild-type and mutant p53 and induces p21 expression and cytotoxicity irrespective of p53/ATM status in chronic lymphocytic leukaemia cells. *Oncogene* **2008**, *27*, 2445–2455. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
71. Chai, K.; Ning, X.; Nguyen, T.T.T.; Zhong, B.; Morinaga, T.; Li, Z.; Shingyoji, M.; Tada, Y.; Tatsumi, K.; Shimada, H.; et al. Heat shock protein 90 inhibitors augment endogenous wild-type p53 expression but down-regulate the adenovirally-induced expression by inhibiting a proteasome activity. *Oncotarget* **2018**, *9*, 26130–26143. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
72. Lai, S.-L.; Hwang, J.; Perng, R.-P. p53 gene status modulates the chemosensitivity of non-small cell lung cancer cells. *J. Biomed. Sci.* **2000**, *7*, 64–70. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
73. Gomes-Duarte, A.; Lacerda, R.; Menezes, J.; Romão, L. eIF3: A factor for human health and disease. *RNA Biol.* **2018**, *15*, 26–34. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
74. Spilka, R.; Ernst, C.; Mehta, A.K.; Haybaeck, J.; Seeböck, R. Eukaryotic translation initiation factors in cancer development and progression. *Cancer Lett.* **2013**, *340*, 9–21. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
75. Hershey, J.W. Regulation of protein synthesis and the role of eIF3 in cancer. *Braz. J. Med Biol. Res.* **2010**, *43*, 920–930. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
76. Hershey, J.W. The role of eIF3 and its individual subunits in cancer. *Biochim. Biophys. Acta* **2015**, *1849*, 792–800. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

77. Matsuda, S.; Katsumata, R.; Okuda, T.; Yamamoto, T.; Miyazaki, K.; Senga, T.; Machida, K.; A Thant, A.; Nakatsugawa, S.; Hamaguchi, M. Molecular cloning and characterization of human MAWD, a novel protein containing WD-40 repeats frequently overexpressed in breast cancer. *Cancer Res.* **2000**, *60*, 13–17. [[PubMed](#)]
78. Huang, J.-S.; Chao, C.-C.; Su, T.-L.; Yeh, S.-H.; Chen, D.-S.; Chen, C.-T.; Chen, P.-J.; Jou, Y.-S. Diverse cellular transformation capability of overexpressed genes in human hepatocellular carcinoma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2004**, *315*, 950–958. [[CrossRef](#)]
79. Ahlemann, M.; Zeidler, R.; Lang, S.; Mack, B.; Münz, M.; Gires, O. Carcinoma-associated eIF3i overexpression facilitates mTOR-dependent growth transformation. *Mol. Carcinog.* **2006**, *45*, 957–967. [[CrossRef](#)]
80. Wang, Y.-W.; Lin, K.-T.; Chen, S.-C.; Gu, D.-L.; Chen, C.-F.; Tu, P.-H.; Jou, Y.-S. Overexpressed-eIF3I interacted and activated oncogenic Akt1 is a theranostic target in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* **2013**, *58*, 239–250. [[CrossRef](#)]
81. Qi, J.; Dong, Z.; Liu, J.; Zhang, J.T. EIF3i promotes colon oncogenesis by regulating COX-2 protein synthesis and beta-catenin activation. *Oncogene* **2014**, *33*, 4156–4163. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
82. Lei, Y.X.; Joseph, P.; Ong, T.M. Antisense inhibition of translation initiation factor 3 reverses its oncogenic potential. *Teratog. Carcinog. Mutagen* **2002**, *22*, 403–409. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
83. Joseph, P.; Lei, Y.-X.; Ong, T.-M. Up-regulation of expression of translation factors—A novel molecular mechanism for cadmium carcinogenesis. *Mol. Cell. Biochem.* **2004**, *255*, 93–101. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
84. Yuan, Y.; Zhang, Y.; Yao, S.; Shi, H.; Huang, X.; Li, Y.; Wei, Y.; Lin, S. The Translation Initiation Factor eIF3i Up-regulates Vascular Endothelial Growth Factor A, Accelerates Cell Proliferation, and Promotes Angiogenesis in Embryonic Development and Tumorigenesis. *J. Biol. Chem.* **2014**, *289*, 28310–28323. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
85. Zhang, Y.; Wang, P.; Zhang, Q.; Yao, X.; Zhao, L.; Liu, Y.; Liu, X.; Tao, R.; Yu, C.; Li, Y.; et al. eIF3i activity is critical for endothelial cells in tumor induced angiogenesis through regulating VEGFR and ERK translation. *Oncotarget* **2017**, *8*, 19968–19979. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
86. Bucci, C.; Chiariello, M. Signal transduction gRABs attention. *Cell. Signal.* **2006**, *18*, 1–8. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
87. Zerial, M.; McBride, H. Rab proteins as membrane organizers. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2001**, *2*, 107–117. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
88. Masuda, E.S.; Luo, Y.; Young, C.; Shen, M.; Rossi, A.B.; Huang, B.C.; Yu, S.; Bennett, M.K.; Payan, D.G.; Scheller, R.H. Rab37 is a novel mast cell specific GTPase localized to secretory granules. *FEBS Lett.* **2000**, *470*, 61–64. [[CrossRef](#)]
89. Wu, C.-Y.; Tseng, R.-C.; Hsu, H.-S.; Wang, Y.-C.; Hsu, M.-T. Frequent down-regulation of hRAB37 in metastatic tumor by genetic and epigenetic mechanisms in lung cancer. *Lung Cancer* **2009**, *63*, 360–367. [[CrossRef](#)]
90. Tzeng, H.-T.; Li, T.-H.; Tang, Y.-A.; Tsai, C.-H.; Lu, P.-J.F.; Lai, W.-W.; Chiang, C.-W.; Wang, Y.-C. Phosphorylation of Rab37 by protein kinase C alpha inhibits the exocytosis function and metastasis suppression activity of Rab37. *Oncotarget* **2017**, *8*, 108556–108570. [[CrossRef](#)]
91. Tsai, C.-H.; Cheng, H.-C.; Wang, Y.-S.; Lin, P.; Jen, J.; Kuo, I.-Y.; Chang, Y.-H.; Liao, P.-C.; Chen, R.-H.; Yuan, W.-C.; et al. Small GTPase Rab37 targets tissue inhibitor of metalloproteinase 1 for exocytosis and thus suppresses tumour metastasis. *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 4804. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
92. Bronner, C.E.; Baker, S.M.; Morrison, P.T.; Warren, G.; Smith, L.G.; Lescoe, M.K.; Kane, M.; Earabino, C.; Lipford, J.; Lindblom, A.; et al. Mutation in the DNA mismatch repair gene homologue hMLH1 is associated with hereditary non-polyposis colon cancer. *Nature* **1994**, *368*, 258–261. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
93. Lu, Y.; Jiang, B.; Yuan, Y.; Fei, J.; Wang, J. MutL homolog 1 expression in thyroid carcinoma and its clinical significance. *J. Cancer Res. Ther.* **2016**, *12*, 281. [[CrossRef](#)]
94. Hu, H.; Chen, X.; Zhou, C.; Li, B.; Yang, Y.; Ying, X.; Mao, Y.; Zhang, Y.; Zhong, J.; Dai, J.; et al. Aberrant methylation of mutL homolog 1 is associated with increased risk of non-small cell lung cancer. *J. Clin. Lab. Anal.* **2018**, *32*, e22370. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
95. Hua, J.; Li, S.; Huang, C. Clinical significance of chromodomain helicase/ATPase DNA binding protein 1-like and human mutL homolog 1 gene expression in cholangiocarcinoma. *Oncol. Lett.* **2018**, *16*, 2989–2994. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
96. Gao, Q.; Shi, B.; Chu, J.; Tian, T. Promoter methylation of human mutL homolog 1 and colorectal cancer risk: A meta-analysis. *J. Cancer Res. Ther.* **2018**, *14*, 851. [[CrossRef](#)]

97. Hashimoto, T.; Kurokawa, Y.; Takahashi, T.; Miyazaki, Y.; Tanaka, K.; Makino, T.; Yamasaki, M.; Nakajima, K.; Ikeda, J.-I.; Mori, M.; et al. Predictive value of MLH1 and PD-L1 expression for prognosis and response to preoperative chemotherapy in gastric cancer. *Gastric Cancer* **2019**, *22*, 785–792. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
98. Zweitzig, D.R.; Smirnov, D.A.; Connelly, M.C.; Terstappen, L.W.M.M.; O'Hara, S.M.; Moran, E. Physiological stress induces the metastasis marker AGR2 in breast cancer cells. *Mol. Cell. Biochem.* **2007**, *306*, 255–260. [[CrossRef](#)]
99. Di Maro, G.; Salerno, P.; Unger, K.; Orlandella, F.M.; Monaco, M.; Chiappetta, G.; Thomas, G.; Oczko-Wojciechowska, M.; Masullo, M.; Jarza, B.; et al. Anterior gradient protein 2 promotes survival, migration and invasion of papillary thyroid carcinoma cells. *Mol. Cancer* **2014**, *13*, 160. [[CrossRef](#)]
100. Kim, S.J.; Kim, D.H.; Kang, D.; Kim, J.H. Expression of anterior gradient 2 is decreased with the progression of human biliary tract cancer. *Tohoku J. Exp. Med.* **2014**, *234*, 83–88. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
101. Maresh, E.L.; Mah, V.; Alavi, M.; Horvath, S.; Bagryanova, L.; Liebeskind, E.S.; A Knutzen, L.; Zhou, Y.; Chia, D.; Liu, A.Y.; et al. Differential expression of anterior gradient gene AGR2 in prostate cancer. *BMC Cancer* **2010**, *10*, 680. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
102. Willis, S.; Villalobos, V.M.; Gevaert, O.; Abramovitz, M.; Williams, C.; Sikic, B.I.; Leyland-Jones, B. Single Gene Prognostic Biomarkers in Ovarian Cancer: A Meta-Analysis. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0149183. [[CrossRef](#)]
103. Riener, M.O.; Thiesler, T.; Hellerbrand, C.; Amann, T.; Cathomas, G.; Fritzsche, F.R.; Dahl, E.; Bahra, M.; Weichert, W.; Terracciano, L.; et al. Loss of anterior gradient-2 expression is an independent prognostic factor in colorectal carcinomas. *Eur. J. Cancer* **2014**, *50*, 1722–1730. [[CrossRef](#)]
104. Alves, M.R.; E Melo, N.C.; Barros-Filho, M.C.; do Amaral, N.S.; Silva, F.I.B.; Baiocchi Neto, G.; Soares, F.A.; de Brot Andrade, L.; Rocha, R.M. Downregulation of AGR2, p21, and cyclin D and alterations in p53 function were associated with tumor progression and chemotherapy resistance in epithelial ovarian carcinoma. *Cancer Med.* **2018**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
105. Millares, L.; Barreiro, E.; Cortés, R.; Martínez-Romero, A.; Balcells, C.; Cascante, M.; Enguita, A.B.; Alvarez, C.; Rami-Porta, R.; De Cos, J.S.; et al. Tumor-associated metabolic and inflammatory responses in early stage non-small cell lung cancer: Local patterns and prognostic significance. *Lung Cancer* **2018**, *122*, 124–130. [[CrossRef](#)]
106. Li, X.-B.; Gu, J.-D.; Zhou, Q.-H. Review of aerobic glycolysis and its key enzymes—New targets for lung cancer therapy. *Thorac. Cancer* **2015**, *6*, 17–24. [[CrossRef](#)]
107. Giatromanolaki, A.; Sivridis, E.; Arelaki, S.; Koukourakis, M.I. Expression of enzymes related to glucose metabolism in non-small cell lung cancer and prognosis. *Exp. Lung Res.* **2017**, *43*, 1–8. [[CrossRef](#)]
108. Chen, L.; Liu, T.; Zhou, J.; Wang, Y.; Wang, X.; Di, W.; Zhang, S. Citrate Synthase Expression Affects Tumor Phenotype and Drug Resistance in Human Ovarian Carcinoma. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e115708. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
109. Anderson, N.M.; Mucka, P.; Kern, J.G.; Feng, H. The emerging role and targetability of the TCA cycle in cancer metabolism. *Protein Cell* **2018**, *9*, 216–237. [[CrossRef](#)]
110. Pavlova, N.N.; Thompson, C.B. The emerging hallmarks of cancer metabolism. *Cell Metab.* **2016**, *23*, 27–47. [[CrossRef](#)]
111. Amelio, I.; Cutruzzola, F.; Antonov, A.; Agostini, M.; Melino, G. Serine and glycine metabolism in cancer. *Trends Biochem. Sci.* **2014**, *39*, 191–198. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
112. Jain, M.; Nilsson, R.; Sharma, S.; Madhusudhan, N.; Kitami, T.; Souza, A.L.; Kafri, R.; Kirschner, M.W.; Clish, C.B.; Mootha, V.K. Metabolite Profiling Identifies a Key Role for Glycine in Rapid Cancer Cell Proliferation. *Science* **2012**, *336*, 1040–1044. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
113. Antonov, A.; Agostini, M.; Morello, M.; Minieri, M.; Melino, G.; Amelio, I. Bioinformatics analysis of the serine and glycine pathway in cancer cells. *Oncotarget* **2014**, *5*, 11004–11013. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]





UNIVERSIDAD
COMPLUTENSE
MADRID