



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
FACULTAD DE MEDICINA  
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**LA PROTEÍNA HSP60 PROMUEVE LA SÍNTESIS DE PROGESTERONA EN  
CÉLULAS DE LA PLACENTA HUMANA**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
**DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**BIOL. MONREAL FLORES JESSICA**

**TUTOR PRINCIPAL: DR. FEDERICO MARTÍNEZ MONTES**  
**FACULTAD DE MEDICINA, UNAM**  
**COMITÉ TUTOR DRA. NORMA ARACELI BOBADILLA SANDOVAL**  
**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM**  
**DR. FABIÁN JESUS ARECHAVALTA VELASCO**  
**INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL**

**CD. MX., MARZO, 2019**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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





**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
FACULTAD DE MEDICINA  
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**LA PROTEÍNA HSP60 PROMUEVE LA SÍNTESIS DE PROGESTERONA EN  
CÉLULAS DE LA PLACENTA HUMANA**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
**DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**BIOL. MONREAL FLORES JESSICA**

**TUTOR PRINCIPAL: DR. FEDERICO MARTÍNEZ MONTES**  
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

**COMITÉ TUTOR DRA. NORMA ARACELI BOBADILLA SANDOVAL**  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM  
**DR. FABIÁN JESUS ARECHAULETA VELASCO**  
INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL

**MÉXICO, CD. MX., MARZO, 2019**





OFICIO CPCB/108/2019

Asunto: Oficio de Jurado para Examen de Grado.

M. en C. Ivonne Ramírez Wence  
Directora General de Administración Escolar, UNAM  
Presente

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 01 de octubre de 2018, aprobó el siguiente jurado para la presentación del examen para obtener el grado de **DOCTORA EN CIENCIAS** de la alumna **MONREAL FLORES JESSICA** con número de cuenta **508018682**, con la tesis titulada "**LA PROTEÍNA HSP60 PROMUEVE LA SÍNTESIS DE PROGESTERONA EN CÉLULAS DE LA PLACENTA HUMANA**", realizada bajo la dirección del **DR. FEDERICO MARTÍNEZ MONTES**:

Presidente: DR. ENRIQUE ANTONIO PEDERNERA ASTEGIANO  
Vocal: DRA. ELIZABETH LANGLEY McCARRON  
Secretario: DRA. NORMA ARACELI BOBADILLA SANDOVAL  
Suplente: DRA. MARÍA GENOVEVA GONZÁLEZ MORÁN  
Suplente: DRA. MARÍA DEL CARMEN URIBE ARANZABAL

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

**ATENTAMENTE**  
**"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"**  
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 30 de enero de 2019

  
**DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA**  
**COORDINADOR DEL PROGRAMA**



## **AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES**

**Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.**

**Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca para estudiantes nacionales de posgrado con número de registro: 215698.**

**Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) IN211912, IN211715.**

**Un agradecimiento especial a mi tutor Dr. Federico Martínez Montes por su disposición, apoyo, comentarios y sugerencias para este proyecto.**

**A mi comité tutor conformado por la Dra. Norma Bobadilla y el Dr. Fabián Arechavaleta por todos los comentarios y aportaciones.**

## **AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL**

**Se agradece la participación en este proyecto a la M. en C. María Teresa Espinosa y a la Biol. Sofia Olvera por su asistencia técnica.**



## ÍNDICE

### ABREVIATURAS

RESUMEN .....	1
ABSTRACT .....	3
INTRODUCCIÓN .....	4
Placenta humana .....	4
Progesterona.....	6
Transporte de colesterol a la mitocondria .....	7
Proteína MLN64/STARD3 .....	10
Sitios de contacto.....	13
Proteína HSP60 .....	15
HIPÓTESIS.....	19
OBJETIVOS .....	20
Objetivo general.....	20
Objetivos particulares .....	20
ANTECEDENTES .....	21
METODOLOGÍA.....	24
Plásmidos .....	24
Líneas celulares y condiciones de cultivo.....	24
Determinación de la eficiencia de la transfección con la proteína verde Fluorescente (GFP) .....	24
Transfecciones.....	25
Expresión y purificación de la proteína HSP60 recombinante .....	26
Purificación de proteína HSP60 y STARD3 recombinante .....	32
Inmunoprecipitación .....	33
Western blot .....	35
Aislamiento de mitocondria de células JEG-3.....	35
Integridad mitocondrial determinada por consumo de oxígeno .....	36
Síntesis de progesterona.....	37
Determinación de progesterona .....	37
Determinación de la fluorescencia intrínseca del colesterol.....	38
Ensayo de unión basado en la fluorescencia del colesterol .....	38
Ensayo de unión con colesterol [ <sup>3</sup> H] .....	39
Análisis Estadístico.....	40
RESULTADOS .....	41
Eficiencia de la transfección en células JEG-3 y HEK293 .....	41
HSP60 estimula la síntesis de progesterona en células JEG-3 y HEK293 ...	42
HSP60 estimula la síntesis de progesterona a nivel mitocondrial.....	45
La proteína HSP60 se asocia con las proteínas esteroideogénicas STARD3 y P450scc .....	47
La proteína HSP60 une colesterol .....	49

<b>La proteína HSP60 una colesterol dependiente de su estado conformacional.....</b>	<b>51</b>
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>53</b>
<b>CONCLUSIÓN.....</b>	<b>58</b>
<b>LITERATURA CITADA.....</b>	<b>59</b>
<b>APÉNDICE: Artículo requisito de egreso para la obtención de grado</b>	

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

### A

Adx	Adrenodoxina
ATAD3	Proteína 3 de la familia de ATPasas con dominio AAA
ATP	Adenosín Trifosfato

### B

Bak	Proteína antagonista asesina de Bcl-2
Bax	Proteína X asociada a Bcl-2

### C

CHO	Línea celular de ovario de hámster chino
CR	Control respiratorio
Cyt c	Citocromo c
Cyt b	Citocromo b

### E

ERK	Cinasas reguladas por señales extracelulares
-----	--

### F

FAD	Flavín adenín dinucleótido
FSH	Hormona estimulante del folículo

### G

GFP	Proteína verde fluorescente
-----	-----------------------------

### H

hCG	Hormona gonadotropina coriónica humana
HDL	Lipoproteínas de alta densidad
HEK293	Línea celular de riñón de embrión humano
HSP60	Proteína de choque térmico de 60 kDa

HSP10	Proteína de choque térmico de 10 kDa
HSP70	Proteína de choque térmico de 70 kDa
<b>I</b>	
ICDH	Isocitrato deshidrogenasa dependiente de NADP
IMS	Espacio intermembranal mitocondrial
IP3R	Receptor de inositol trifosfato
<b>J</b>	
JEG-3	Línea celular de coriocarcinoma humano
<b>M</b>	
MAMs	Membranas de retículo endoplásmico asociadas a la mitocondria
ME	Membrana mitocondrial externa
MENTAL	Dominio amino terminal de MLN64
MENTHO	Dominio amino terminal homologo a MLN64
Mfn1	Mitofusina 1
Mfn2	Mitofusina 2
MI	Membrana mitocondrial interna
<b>O</b>	
OSBP	Proteína de unión a oxisterol
<b>P</b>	
PAP7	Proteína asociada al receptor de benzodiazepina
PKA	Proteína cinasa A
P450scc	Citocromo P450 (enzima que corta la cadena lateral del colesterol)
P4	Progesterona



P5                      Pregnenolona

**S**

SCP2                    Proteína 2 transportadora de esteroides

SNARE                 Proteína soluble de unión al factor sensible a la  
N-Etilmaleimida

StAR/STARD1        Proteína reguladora de la esteroidogénesis aguda

STARD3                Proteína 3 con dominio de transferencia de lípidos relacionada  
a StAR

START                  Dominio de transferencia de lípidos relacionado con StAR

**V**

VDAC                    Canal aniónico dependiente de voltaje

## RESUMEN

La síntesis de progesterona en la placenta humana es esencial para el mantenimiento del embarazo y el paso limitante para la síntesis de la progesterona es el transporte de colesterol del citosol a la membrana interna mitocondrial. Se ha sugerido que las proteínas que constituyen los sitios de contacto mitocondriales son importantes para el transporte de colesterol; sin embargo, hasta el momento se desconocen los mecanismos moleculares que regulan el transporte de colesterol a nivel mitocondrial. En un estudio anterior, se identificó a la proteína de choque térmico de 60 kDa (HSP60) en los sitios de contacto en mitocondrias aisladas de placenta humana, sugiriendo que esta tiene un papel en la síntesis de progesterona.

En este trabajo, se demuestra la participación directa de la proteína HSP60 en la síntesis de progesterona en mitocondrias aisladas de una línea celular de coriocarcinoma humano (JEG-3). De igual forma, los resultados muestran que la sobreexpresión de la proteína HSP60 promueve la síntesis de progesterona de manera significativa en células JEG-3 y en células HEK293 transformadas en esteroideogénicas por la transfección del sistema P450<sub>scc</sub> y 3 $\beta$ -HSD. Por otra parte, la adición de la proteína recombinante HSP60 a mitocondrias aisladas de células JEG-3 estimula la síntesis de progesterona dependiente de su concentración. También se muestra que la proteína HSP60 interacciona con la proteína STARD3 y la enzima P450<sub>scc</sub>, las cuales son proteínas que se localizan en los sitios de contacto a nivel mitocondrial. Por último, experimentos muestran que la proteína recombinante HSP60 une colesterol. Estos resultados sugieren que la proteína HSP60 tiene un papel importante en la síntesis de progesterona a nivel mitocondrial. En conclusión, los datos proporcionan nuevos conocimientos sobre la

síntesis de progesterona en la placenta humana y su papel en el mantenimiento del embarazo.

## **ABSTRACT**

Progesterone synthesis in human placental is essential to maintain pregnancy. The limiting step in placental progesterone synthesis is cholesterol transport from cytoplasm to the inner mitochondrial membrane. Multiple proteins located in mitochondrial contact sites seem to play a key role in this process. Previously, our group identified the heat shock protein 60 (HSP60) as part of mitochondrial contact sites in human placenta, suggesting its participation in progesterone synthesis. Here, we examined the role of HSP60 in progesterone synthesis. Our results show that over-expression of HSP60 in human choriocarcinoma cells (JEG-3) and human embryonic kidney 293 cells (HEK293), converted to steroidogenic by transfection of cytochrome P450<sub>scc</sub> system and 3-beta-hydroxysteroid dehydrogenase isomerase, promotes progesterone synthesis. Furthermore, incubation of the HSP60 recombinant protein with intact isolated mitochondria from JEG-3 cells also promotes progesterone synthesis in a dose-dependent manner. We also show that HSP60 interacts with STARD3 and P450<sub>scc</sub> proteins from mitochondrial membrane contact sites. Finally, we show that the HSP60 recombinant protein binds cholesterol. Ours results demonstrate that HSP60 participates in mitochondrial progesterone synthesis. These findings provide novel insights into progesterone synthesis in the human placenta and its role in maintaining pregnancy.

## INTRODUCCIÓN

### Placenta humana

La placenta es un órgano transitorio, altamente especializado esencial en el embarazo, cuya principal función es proporcionar nutrientes y oxígeno estableciendo comunicación vital entre el feto y la madre. Produce hormonas que permiten el mantenimiento del embarazo, modificando el metabolismo y funciones fisiológicas maternas para el crecimiento y desarrollo del feto [1, 2].

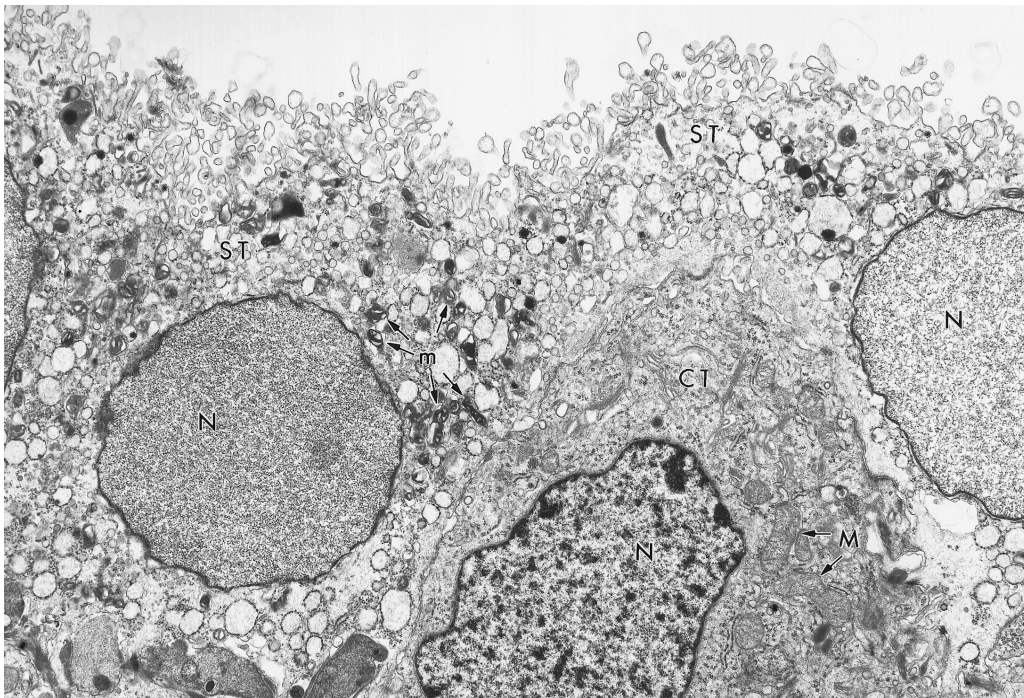
La placenta se forma a partir de la segunda semana después de la fecundación. Estructuralmente consiste de diferentes fenotipos de células con funciones especializadas: trofoblasto, células mesenquimales, células Hofbauer, fibroblastos y células vasculares fetales (Figura 1) [3, 4].



Tomada de Benirschke, et al., 1995

**Figura 1. Esquema de la estructura de la placenta y el feto.** Se observan las vellosidades de la placenta, la placa coriónica (CP), la placa basal (BP) y el espacio intervilloso (IVS) [4].

Las células del trofoblasto se forman durante la primera etapa del embarazo y son las primeras en diferenciarse. El trofoblasto vellosos está constituido por dos poblaciones: el citotrofoblasto y el sinciotrofoblasto. El sinciotrofoblasto es una capa constituida por células multinucleadas que provienen de la fusión de células mononucleares del citotrofoblasto y están en contacto directo con la sangre materna (por lo que la placenta es de tipo hemocorial) (Figura 2) [2, 5]. El sinciotrofoblasto se encarga de la absorción, intercambio y producción de hormonas tales como: estrógenos, lactógeno placentario, gonadotropina coriónica humana y progesterona [1, 3].



Tomada de Martínez, et al., 1997

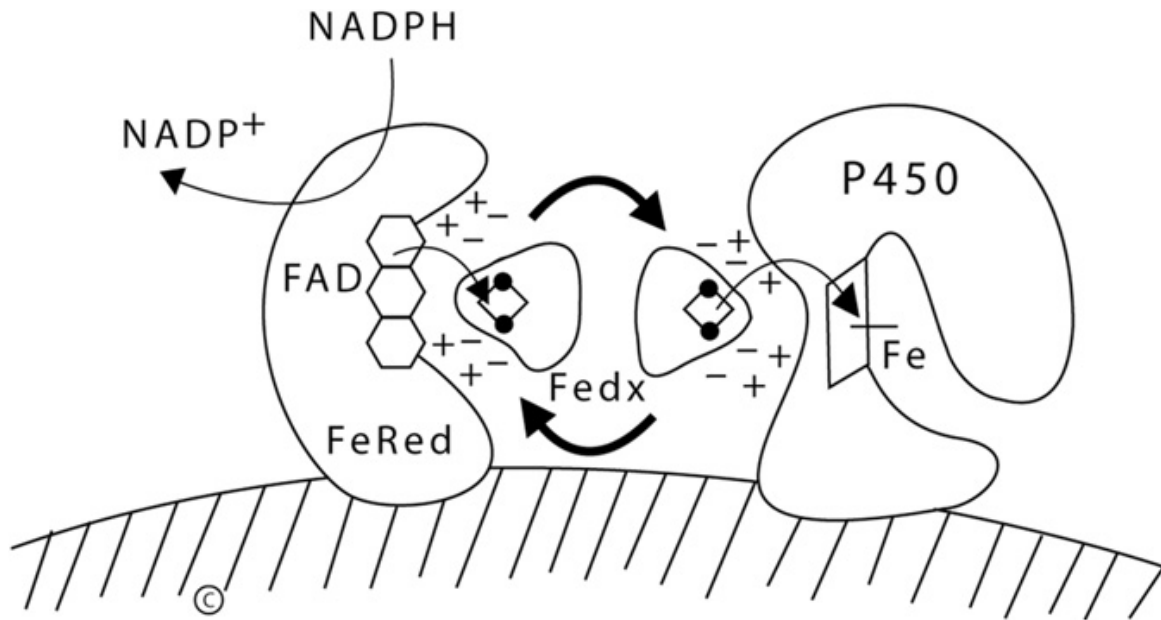
**Figura 2. Células del sinciotrofoblasto y citotrofoblasto humano.** Micrografía electrónica de placenta a término en donde se muestran las células del sinciotrofoblasto (ST) y citotrofoblasto (CT). Núcleo (N), mitocondria (m) [5].

El mantenimiento del embarazo durante el primer trimestre depende de la síntesis de progesterona por el cuerpo lúteo, gracias al estímulo trófico de la hCG (hormona gonadotropina coriónica humana). Posteriormente, a partir de la 6ª y 8ª semana, la placenta es la principal fuente de producción de progesterona [6].

### **Progesterona**

La progesterona es una hormona esteroide indispensable para el mantenimiento del embarazo, ya que induce proliferación, diferenciación, decidualización del endometrio y promueve la implantación adecuada del blastocisto [7]; además favorece la quiescencia del miometrio para que el producto llegue a término [8]. La progesterona es sintetizada en las mitocondrias del sinciotrofoblasto a partir de colesterol (proceso denominado esteroidogénesis) [5, 9].

La síntesis de progesterona inicia con la conversión del colesterol en pregnenolona por la enzima de corte de la cadena lateral de colesterol o citocromo P450<sub>scc</sub> (CYP11A1), localizada en la membrana mitocondrial interna [10, 11] y cataliza tres reacciones de mono-oxigenación. Los electrones requeridos para estas reacciones provienen desde el NADPH vía una pequeña cadena constituida por adrenodoxina y adrenodoxina reductasa (Figura 3) [12]. Posteriormente, la pregnenolona es convertida en progesterona por medio de la enzima 1,3β-hidroxiesteroide deshidrogenasa  $\Delta^{4-5}$  isomerasa de tipo I (3β-HSD) localizada en la membrana interna mitocondrial [13]. El paso limitante en la síntesis de progesterona es el transporte del colesterol desde el citosol a la mitocondria [14, 15].



Tomada de Papadopoulos et al., 2012

**Figura 3. Organización funcional de la enzima P450scc.** El NADPH primero dona electrones a la FAD, región media de la ferredoxina reductasa (FeRed); los residuos cargados positivamente en la ferredoxina reductasa interactúan con los residuos cargados negativamente en la ferredoxina (Fdx), permitiendo que los electrones sean transferidos al centro del  $\text{Fe}_2\text{S}_2$  (diagrama de líneas y círculos). Entonces, la ferredoxina se disocia de la ferredoxina reductasa y difunde a través de la matriz mitocondrial. La superficie de la ferredoxina que recibe los electrones de la ferredoxina reductasa interactúa con el sitio de unión redox del P450scc mitocondrial (CYP11A1). En ese momento, los electrones se desplazan desde el centro  $\text{Fe}_2\text{S}_2$  de la ferredoxina al anillo hemo del P450scc, para que posteriormente, el hierro hemo medie la catálisis con el sustrato unido al P450scc [12].

### Transporte de colesterol a la mitocondria

La mitocondria requiere de colesterol para la síntesis de los esteroides, y los niveles de éste en las membranas mitocondriales son determinados por su transporte a la membrana externa mitocondrial (ME), su transferencia a la membrana interna (MI) y por la tasa de colesterol metabolizado en la matriz mitocondrial (M). Se han descrito múltiples



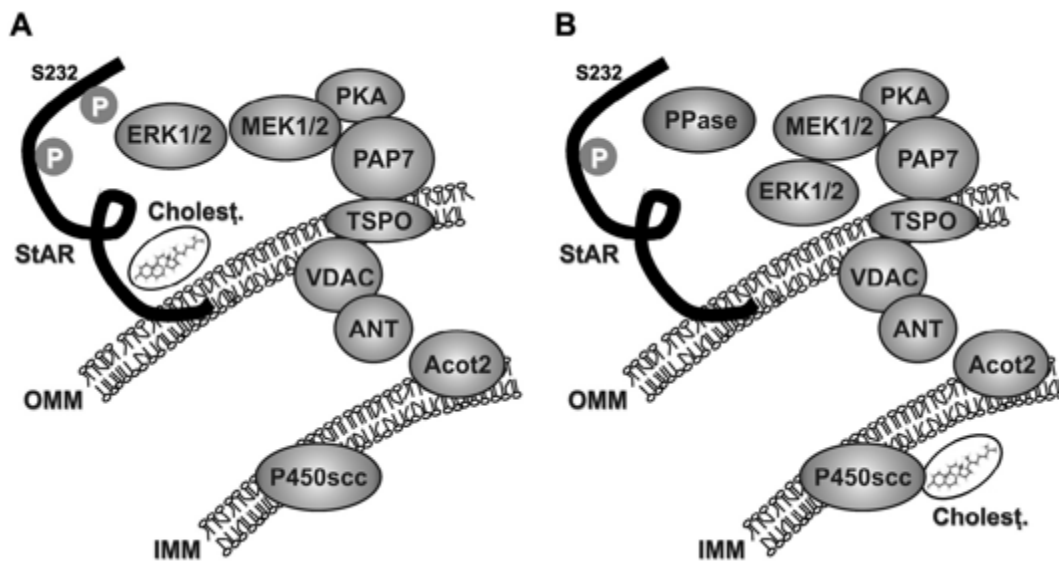
vías para el transporte de colesterol desde diferentes sitios intracelulares a la mitocondria y esto depende de la disponibilidad del colesterol.

Por sus características fisicoquímicas, el colesterol requiere de proteínas para ser transportado [16], por lo que se ha sugerido un proceso de tráfico no vesicular en donde se propone la participación de proteínas tales como: la proteína de unión a oxisterol (OSBP), las proteínas relacionadas con OSBP (ORPs), proteína transportadora de esteroides 2 (SCP2) y proteínas que contienen el dominio START, tal como: StAR/STARD1 y MLN64/STARD3; sin embargo, en la actualidad poco se sabe acerca de este mecanismo de transporte del colesterol a la mitocondria [17].

La proteína StAR/STARD1 posee un dominio START caracterizado por presentar una secuencia conservada de ~210 aminoácidos que interactúa con el colesterol [18]. Se ha propuesto que en tejidos y células tales como: corteza adrenal, cuerpo lúteo (células de la teca y de la granulosa), células de Leydig y cerebro, la proteína StAR/STARD1 es quien favorece el transporte de colesterol a nivel mitocondrial promoviendo la esteroidogénesis [19-21].

Los mecanismos propuestos por los cuales la proteína StAR/STARD1 regula el transporte de colesterol dependen de su procesamiento proteolítico que induce su localización en la membrana externa mitocondrial y de su fosforilación por las cinasas PKA y ERK, que causan cambios conformacionales en su estructura promoviendo el incremento en su capacidad de unión y transporte de colesterol [22, 23]. Una vez que la proteína StAR/STARD1 ha cumplido con su cometido de transportar colesterol, ésta es desfosforilada por fosfatasas mitocondriales permitiendo la liberación de la molécula de

colesterol en sitios cercanos a la enzima P450<sub>scc</sub> (Figura 4) [24]. Para que se lleve a cabo el transporte de colesterol a la membrana interna mitocondrial, se ha descrito que la proteína StAR/STARD1 interactúa con un complejo multiproteico formado por la porina o canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC) y la ATPasa con dominio 3AAA (ATAD3), las cuales se encuentran formando sitios de contacto a nivel mitocondrial [24]. También se ha sugerido que la proteína translocadora (TSPO) participa en el transporte del colesterol debido a su alta afinidad por el colesterol; sin embargo, el papel de esta proteína aún no se determina con exactitud [25].



Tomada de Castillo et al., 2015

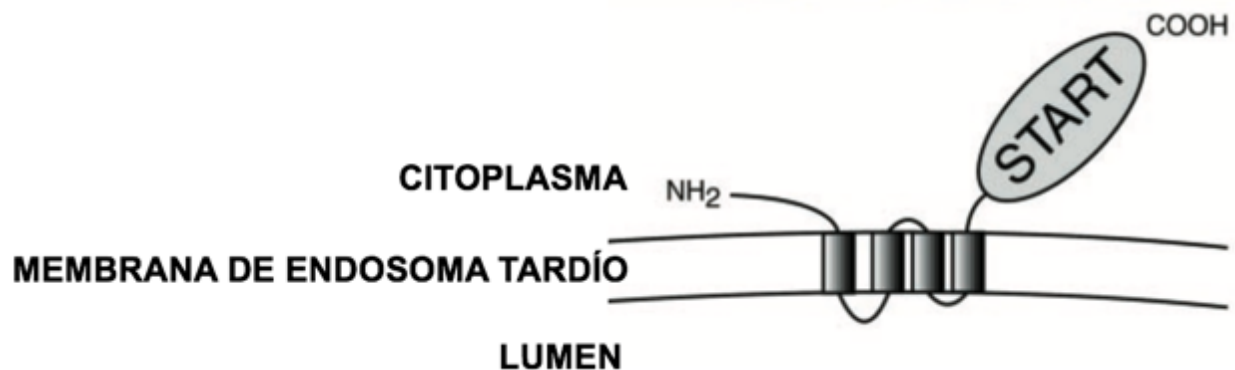
**Figura 4. Modelo del mecanismo de transporte de colesterol por la proteína StAR/STARD1.** A. StAR/STARD1 es transportada a la membrana externa mitocondrial donde es fosforilada por PKA ocasionando cambios conformacionales lo que permite la unión de una molécula de colesterol. La fosforilación de ERK incrementa su actividad y transporte. B. La proteína StAR/STARD1 es desfosforilada por fosfatasas mitocondriales para liberar la molécula de colesterol y posteriormente ser traslocada a la matriz para ser degradada por proteasas. Abreviaciones: S232 (Serina 232 de la proteína StAR que es fosforilado por ERK), Cholest (colesterol), TSPO (Proteína translocadora 18 kDa o receptor periférico de

benzodiazepinas), PAP7 (proteína 7 asociada a TSPO), VDAC (porina), ANT (Traslocador de nucleótidos de adenina), Acot2 (Acyl-CoA tioesterasa 2), PPase (fosfatasa), P450scc (citocromo P450scc) [24].

### **Proteína MLN64/STARD3**

La proteína StAR/STARD1 no es expresada en la placenta humana [26, 27]; sin embargo, se ha descrito que la proteína MLN64/STARD3, la cual posee un dominio START, se expresa constitutivamente en este tejido.

La proteína STARD3 fue descrita por primera vez como una proteína endosomal identificada en células de carcinoma metastásico de mama [28]. La proteína STARD3 estructuralmente está constituida en la región amino por 4 segmentos transmembranales, denominado MENTHO (dominio homologo al NH<sub>2</sub>-terminal de MLN64) y en la región carboxilo contiene el dominio START (Figura 5) [29, 30].



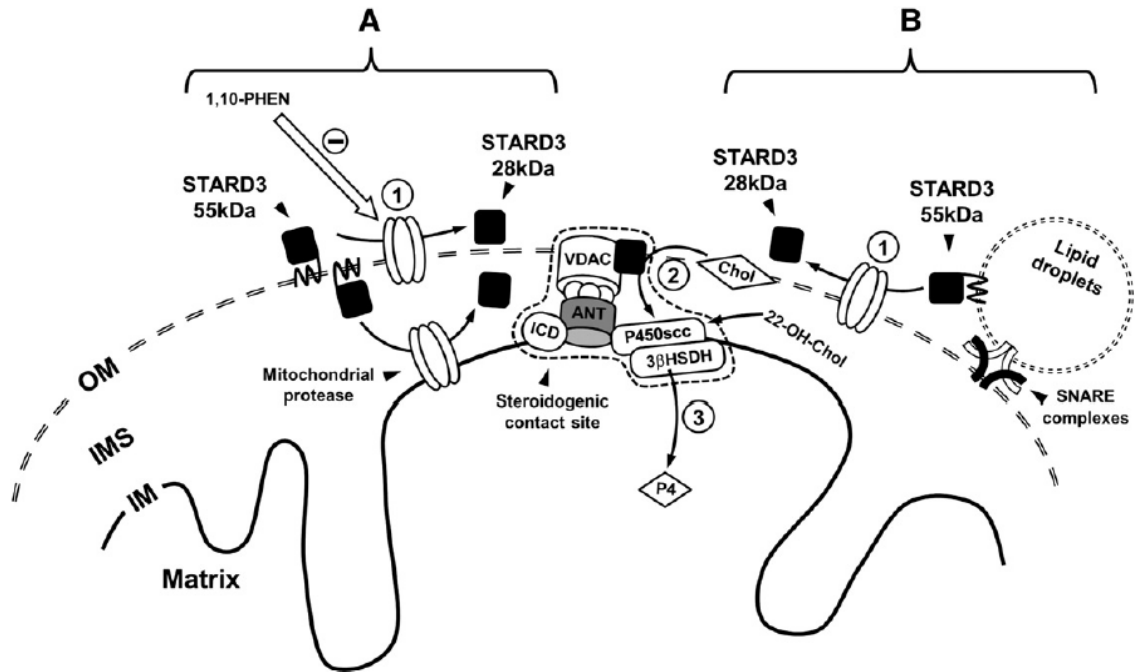
Modificada de Alpy et al., 2001

**Figura 5. Modelo de la topología de la proteína STARD3.** La proteína STARD3 tiene 4 segmentos transmembranales localizados en la membrana endosomal y el dominio START se localiza orientado al citosol [30].

Se ha reportado que STARD3 tiene un papel importante en la biosíntesis de las hormonas esteroides por potenciar la translocación mitocondrial del colesterol [31], ya

que la sobreexpresión de ésta incrementa la secreción de pregnenolona en células COS-1. Este mismo efecto es observado cuando se sobreexpresa en las mismas células, la proteína STARD3 con la región amino terminal eliminada [27]. En contraste, otro estudio demuestra que la disminución de la expresión de STARD3 en células CHO solo inhibe un 30% la síntesis de pregnenolona [32]. En virtud de que STARD3 es la encargada del transporte de colesterol a nivel mitocondrial, estos resultados sugieren la participación de otras proteínas en este evento.

En el caso de la placenta humana, reportes indican que la proteína STARD3 regula el transporte de colesterol de membrana externa a membrana interna mitocondrial, similar a la proteína STARD1, ya que se observa un incremento de la esteroidogénesis al adicionar la proteína recombinante STARD3 a mitocondrias aisladas de placenta humana [33, 34]. Se ha descrito que la proteína STARD3 asociada a gotas lipídicas puede ser incorporada a las mitocondrias del sinciciotrofoblasto a través del complejo SNARE formado por el factor sensible a N-etilmaleimida (NSF), la proteína soluble de unión a NSF (SNAP) y el receptor de SNAP (SNARE), el cual actúa como maquinaria de fusión intracelular. Una vez incorporada a la mitocondria, la proteína STARD3 es activada por cortes proteolíticos mediados por proteasas mitocondriales permitiendo su asociación con sitios de contacto para estimular la síntesis de progesterona (Figura 6) [35].



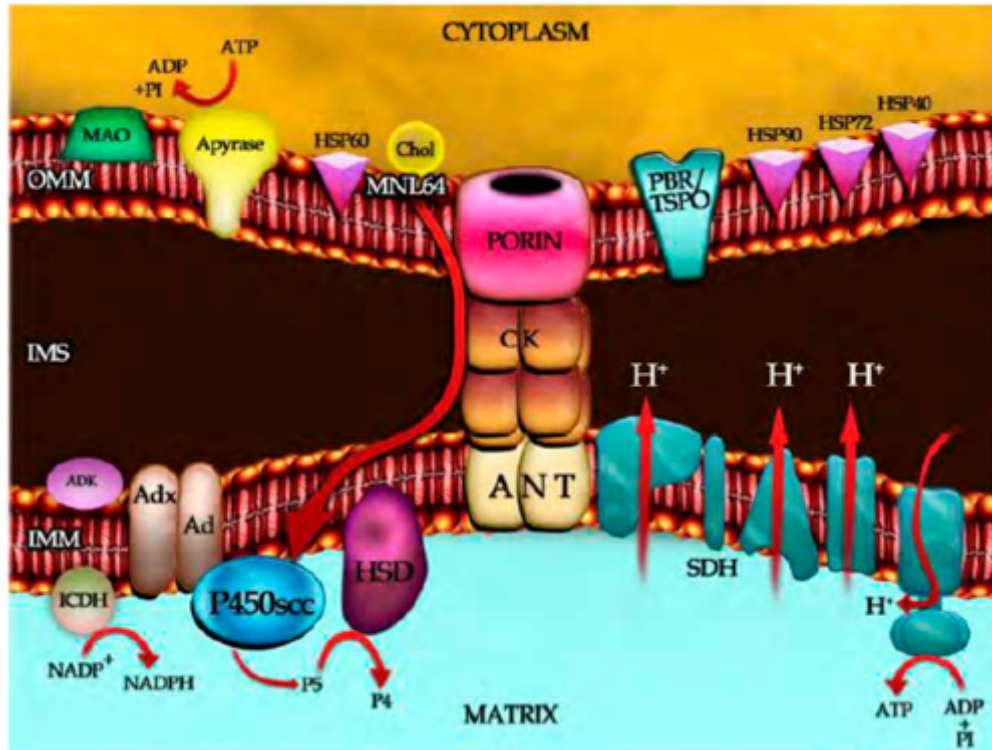
Tomada de Esparza-Perusquía et al., 2015

**Figura 6. Modelo del mecanismo de corte de la proteína STARD3 y la síntesis de progesterona en células del sincitiotrofoblasto humano.** La activación de STARD3 y el incremento en la síntesis de progesterona está dividido en tres pasos: 1) La transformación proteolítica de STARD3 desde una proteína de 55 kDa a una de 28 kDa por una proteasa que ejerce su actividad en el espacio intermembranal de la mitocondria (IMS). 2) La proteína STARD3-28 kDa, la cual posee el dominio de unión a colesterol, puede incrementar el flujo del colesterol de la membrana externa a la membrana interna mitocondrial donde se localiza la enzima P450scc, lo cual 3) promueve el incremento en la síntesis de progesterona. La incorporación de la proteína STARD3 a la mitocondria puede ser sin una pre-secuencia mitocondrial (A) o por medio de la asociación entre la mitocondria y las gotas lipídicas vía el complejo SNARE (B). OM: membrana externa mitocondrial, IMS: espacio intermembranal, IM: membrana interna mitocondrial, sitio de contacto esteroidogénico: marcado con una línea discontinua, Chol: colesterol, P450scc: citocromo P450scc, 3β-HSD: 3β-hidroxiesteroide deshidrogenasa, 22-OH-Chol: 22(R)-hidroxicolesterol, P4: progesterona [35].

### **Sitios de contacto**

Se han elaborado modelos en donde se describe que el transporte de colesterol se lleva a través de sitios de contacto o puntos de unión [36-39], los cuales son dominios de estrecha proximidad entre dos membranas. Se ha descrito que su formación es dinámica e involucra la asociación de diversas proteínas. La composición de proteínas en los sitios de contacto depende de los procesos que se lleven a cabo, tal como la fosforilación oxidativa [38], apoptosis [40-42], poro de transición de permeabilidad [43] y transporte de proteínas [44].

En el proceso de la esteroidogénesis, se ha propuesto que el sitio de contacto entre membrana externa y membrana interna mitocondrial se encuentran presentes proteínas tales como: VDAC, ATAD3, TSPO, ANT, PAP7, IP3R, Mfn1 y Mfn2, etc. [24, 45, 46]; las cuales están descritas en glándulas suprarrenales y gónadas. Sin embargo, para el caso de la placenta humana se ha propuesto un modelo de sitios de contacto mitocondrial específico; el cual está constituido por las siguientes proteínas: VDAC, ANT, P450scc, 3 $\beta$ -HSD, SNARE, STARD3 y HSP60 (Figura 7) [35, 36].



**Figura 7. Modelo de sitio de contacto esteroideogénico en mitocondrias de placenta humana.** Este modelo muestra las proteínas encontradas en los sitios de contacto a partir de mitocondrias de placenta humana. IMS (espacio intermembranal), P450 (citocromo P450scc), Adx (adrenodoxina), Cyt c (citocromo c), Cyt b (citocromo b), ICDH (isocitrato deshidrogenasa dependiente de NADP), PBR/TSPO (Proteína translocadora 18 kDa o receptor periférico de benzodiazepinas), HSD ( $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa), proteínas de choque térmico (HSP60, HS72, HSP40); IM (membrana mitocondrial interna), OM (membrana mitocondrial externa), Chol (colesterol), P5 (pregnenolona), P4 (progesterona), ANT (Traslador de nucleótidos de adenina), VDAC (porina), STARD3 [35]. (<https://www.intechopen.com/books/recent-advances-in-research-on-the-human-placenta/the-role-of-mitochondria-in-syncytiotrophoblast-cells-bioenergetics-and-steroidogenesis>)

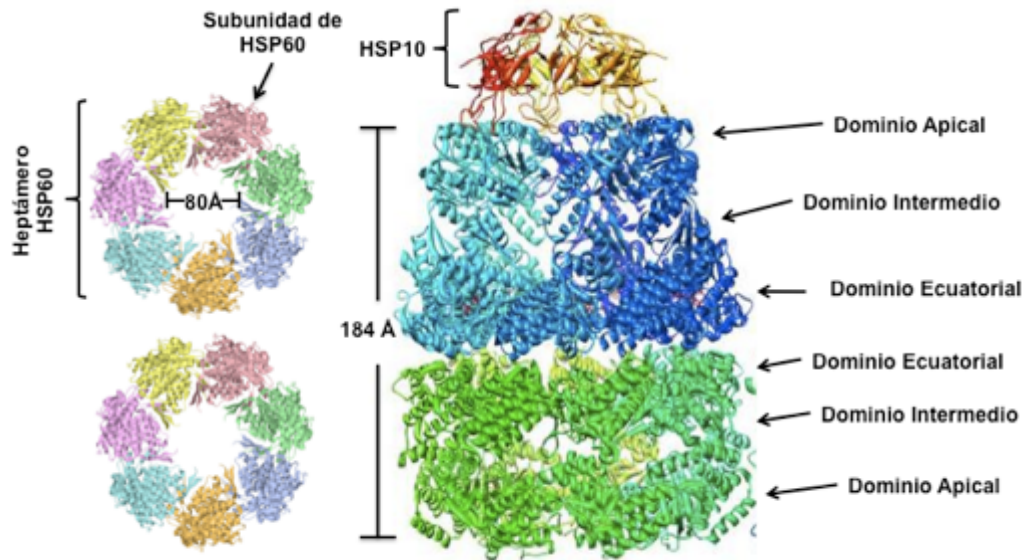
## **Proteína HSP60**

En la actualidad aun no queda claro cuál es el mecanismo de transporte de colesterol del citosol a la mitocondria en el sinciotrofoblasto humano, pero se ha propuesto que es a través de un complejo multiproteico asociado a sitios de contacto mitocondriales. En nuestro laboratorio, se identificó a la proteína de choque térmico de 60 kDa (HSP60) como parte de los sitios de contacto mitocondriales de la placenta humana [47]. Esta proteína es codificada por el gen nuclear HSPD1 (GeneID: 3329) en el cromosoma 2q33.1 [48], y su expresión es constitutiva. Sin embargo, también se ha descrito que factores tales como: altas temperaturas (42°C) [49], hipoxia [50], arsenito de sodio o cloruro de cadmio [51] son capaces de inducir una mayor expresión.

La HSP60 se traduce en el retículo endoplásmico rugoso y se transporta principalmente a la mitocondria [52], sin embargo, se ha demostrado que también se localiza en el citoplasma, núcleo, membrana plasmática y en algunos casos en el espacio extracelular [53, 54].

Estructuralmente la proteína HSP60 tiene una conformación cilíndrica de 184 Å de longitud formando un oligómero. A su vez, el oligómero está compuesto de dos anillos apilados conformados cada uno por 7 subunidades, los cuales crean una cavidad de 80 Å de diámetro (Figura 8) [55, 56]. Cada subunidad está constituida por tres dominios: uno ecuatorial que mantiene unidos a los 2 anillos, y que además posee el sitio de unión al ATP; un segundo dominio apical que posee residuos hidrofóbicos involucrados en el reconocimiento de péptidos desnaturalizados (proteína sustrato); y por último un dominio intermedio que transmite las señales producidas por los cambios conformacionales en el dominio apical [56].





(Modificada del Pubmed: 11563912 y PDB Código: IWF4).

**Figura 8. Dominios de la proteína HSP60.** Cada subunidad de HSP60 está constituida de 3 dominios: un dominio apical (reconocimiento de la proteína desnaturalizada), un dominio intermedio y el dominio ecuatorial (actividad de ATPasa).

Recientemente se ha descrito que la proteína HSP60 puede asumir diferentes características estructurales; encontrándose como tetradecámero, tetrámero, dímero y monómero [57]. Se ha propuesto que estas modificaciones estructurales se llevan a cabo mediante la fosforilación de residuos de tirosinas en la proteína HSP60 [58], sugiriendo que las modificaciones postraduccionales son importantes para regular su función en la célula [59].

La función principal de la proteína HSP60, que es el plegamiento y transporte de otras proteínas [57, 59-62], se puede explicar mediante un modelo, en el cual, los residuos hidrofóbicos de la proteína HSP60 interaccionan con la proteína desnaturalizada o

proteína sustrato mal plegada. Posteriormente, el ATP se une a la proteína HSP60, lo que ocasiona cambios conformacionales, que promueven la unión de la co-chaperonina HSP10, lo que genera el cierre de la cavidad. La HSP10 genera cambios conformacionales en la proteína desnaturalizada y las moléculas de ATP se hidrolizan, relajando la unión entre la HSP10 y la HSP60, lo que induce la liberación de la proteína sustrato, plegada en su conformación adecuada [59].

La proteína HSP60 es considerada como “*moonlighting*”, ya que posee más de una actividad biológica independiente de la actividad por la cual fue caracterizada [59]. Tal es el caso, cuando es secretada en el fluido extracelular para estimular a los receptores de tipo Toll en superficie de células adyacentes y desencadenar el inicio de las cascadas de señalización [63]. Otra función descrita es su capacidad para regular la apoptosis, ya que puede tener tanto efecto anti-apoptótico como pro-apoptótico. El efecto anti-apoptótico lo ejerce al formar un complejo macromolecular a nivel citosólico con Bak y Bax, previniendo así la apoptosis [64, 65]; mientras que el efecto pro-apoptótico lo ejerce al promover la maduración de la procaspasa 3 [66].

Finalmente, otra función descrita para la proteína HSP60 es el transporte de moléculas, ya que se ha descrito que es capaz de transportar moléculas cargo a través del torrente sanguíneo actuando en sitios distantes en el cuerpo [63]. Asimismo, también se ha demostrado que HSP60 juega un papel clave en el transporte y mantenimiento de proteínas mitocondriales, ya que se desplaza desde el citoplasma a la mitocondria [67-69].

## **JUSTIFICACIÓN**

Una de las principales funciones de la progesterona es el mantenimiento del embarazo, ofreciéndole al feto las condiciones necesarias para su crecimiento y desarrollo, además de modificar el metabolismo de la madre durante el embarazo para que éste llegue a término. Debido a la importancia de esta hormona para la supervivencia de la especie humana, la regulación de su síntesis ha sido ampliamente estudiada; sin embargo, poco se conoce aún de los mecanismos moleculares y de las proteínas que participan en el transporte de colesterol, molécula indispensable para la esteroidogénesis. Considerando los antecedentes presentados, el objetivo central de este trabajo es investigar la participación de la proteína HSP60 en el transporte de colesterol y la síntesis de progesterona en células de la placenta humana.

## **HIPOTESIS**

La sobreexpresión de la proteína HSP60 en células JEG-3 derivadas de placenta estimula la esteroidogénesis, debido a su capacidad de unión de colesterol.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo General**

- Determinar la participación de la proteína HSP60 en la esteroidogénesis de la placenta humana.

### **Objetivos Particulares**

- Establecer la participación de la HSP60 en la esteroidogénesis placentaria, entendida ésta como el transporte de colesterol a la mitocondria y su transformación en progesterona.
- Determinar si la proteína HSP60 interacciona con proteínas reguladoras de la esteroidogénesis tales como STARD3 y P450scc en mitocondrias de placenta humana.
- Determinar si la proteína HSP60 une colesterol.

## **ANTECEDENTES**

### **HSP60 y la esteroidogénesis**

La síntesis de todas las hormonas esteroideas depende de la disponibilidad de colesterol en la mitocondria, lo cual a su vez está determinado por la presencia de proteínas capaces de transportarlo desde el citoplasma a la membrana mitocondrial. En virtud de que la proteína HSP60 puede transportar moléculas a la mitocondria, es posible que juegue un papel importante en la esteroidogénesis. En este sentido, se han reportado altos niveles de HSP60 en células esteroidogénicas comparado con células no esteroidogénicas [70]. Además, se ha descrito que la proteína HSP60 presenta epítopes similares al dominio START y que posee una identidad del 26.1% en su secuencia de aminoácidos al compararse con STARD3 [47] (Figura 9).

En lo que respecta a la actividad biológica de la HSP60 en la esteroidogenesis, se ha descrito que la alta expresión de esta proteína en células de Leydig correlaciona con el aumento de la producción de la hormona testosterona [71]. En cuanto a la síntesis de progesterona, los reportes aún son escasos; sin embargo, se ha observado que al bloquear la cisteína en la posición 442 de la proteína HSP60 con N-etil-maleimida, la producción de esta hormona es inhibida [47, 72]. Más aún, estudios de inmunofluorescencia demostraron la co-localización de la proteína HSP60 con STARD3 en células del sinciotrofoblasto humano (Figura 10) [47]. Por lo que estos resultados sugieren que la proteína HSP60 podría estar involucrada en la síntesis de progesterona.

```

MLN64 -----MSKLPRELTRDLERSLPVAVASLGSSLSHSQSLSSHLLPP---
HSP60 MLRLPTVFRQMRPVSRLVLAHLTRAYAKDVKFGADARALMLQGVDLLADAVAVTMGPKGR
      i*.* ::*:: . * *i . . . iiii *

MLN64 -----PEKRRRAISDVRTFCLFVTFDLLFISLLWIIELNNTNGIRKN-----LE
HSP60 TVIIEQSWGSPKVTKDGVTVAKSIDLKDKYKNI GAKLVQDVANNTNEEAGDGTTTATVLA
      *iiii * ::* * . . . iiii* : *** .. *

MLN64 QEIIQYNFKTSFFDI FVLAFFRFSGLLLGAVLRLR-----HWWVIAVTTLVSSAFL
HSP60 RSIAKEGFEKISKGANPVEIRRGVMLAVDAVIAELKKQSKPVTTPEEIAQVATISANGDK
i* : .*:. . iiii * * :. ii .*: : *::: . .

MLN64 IVKVLSELLSKGAFG-----YLLPIVSFVLAWLETWFLDFKVLPEAEAE
HSP60 EIGNIISDAMKKVGRKGVITVKDGKTLNDELEIEGKMFDRGYISPYFINTSKGQKCEFQ
: *ii: :.* . ii :.* : . . . . *::: . iiii

MLN64 ERWYLAQVAVARGPLLFSGALSEGQFYSPPEFAG-SDNESDEEVAGKKSFSQAQEREYI
HSP60 DAYVLLSEKKISSIQSIVPALEIANAHRKPLVI IAEDVDGEALSTLVLNH LKVGQLQVVAV
iiii * :: : : . . . * : * *.* : . ii ii . iiii

MLN64 RQGKEATAVVDQILAQEENWKFEKNNEYGDTVYTIIEVPPFHGKTFILKTFLPCPAELVYQE
HSP60 KAPGFGDNRK NQL KDMAIATGGAVFG EGLTI NLE DVQPH DLGK VGEIVT KDDAMLLKG
iiiiii ii: . * * * : * * . iiii:: ii :

MLN64 YILQPERMVLWNKTVTACQILQRVEDNTLISYDVSAGAAGGVVSPRDFVNVRRIERRRDR
HSP60 KGDKAQIEKRI QEII EQLDVTTSEYEKEKLNLERLAKLSDGVAV LKVGGSDEVNEKKDR
iiii :: : : : : . ii : * . * . ii iiiiii**

MLN64 YLSSGIATSHSAKE-----PTHKYVRGENGGPFIVLKSASNPRVCTFVWI
HSP60 VTDALN ATRAAVEEGIVLGGCALLRCI FALDSLTPAN EDQKIGIEI IKRTL KIPAMTIA
ii ** :: : * : : *iiii : . ii : .

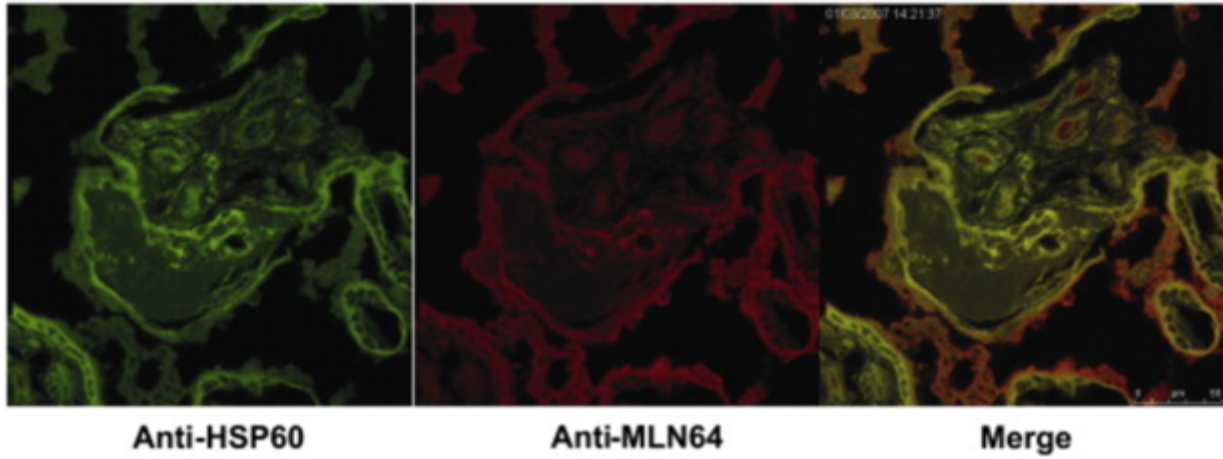
MLN64 LNTDLKGRLPRLYLIHQSLAATMFEFAPHLRQRISLGARA-----
HSP60 K NAGVEGSLIVEKIMQS SSEVGYDAMAGDFV NMVEKQ IIDPTKVVRTALLDAAGVASLLT
*iiii* * * ** : . ii : * *

MLN64 -----
HSP60 TAEVVVTEIPKEEKDPGMGAMGGMGGMGGGMF

```

Tomada de Olvera-Sanchez et al., 2011

**Figura 9. Alineamiento de STARD3 y HSP60.** Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la proteína STARD3 y HSP60, en el programa CLUSTAL W (1.8) MULTIPLE SEQUENCE ALIGNMENT (<http://align.genome.jp/>). \* Residuos idénticos; : Residuos conservados; \* Residuos semiconservados. El dominio START está marcado en amarillo. Epítopes similares de la proteína HSP60 que comparte con STARD3 (marcado en verde) [47].



Tomada de Olvera-Sanchez et al., 2011

**Figura 10. Inmunolocalización de HSP60 y MLN64/STARD3.** Cotiledones de placenta que muestran la colocalización (amarillo) en el sinciciotrofoblasto de la proteína HSP60 (anti-HSP60 verde) y STARD3 (anti-STARD3 Rojo) [47].



## **METODOLOGÍA**

### **Plásmidos**

Se utilizó el cDNA que codifica para la proteína HSP60 humana (pGEM-HSP60) donado por el Dr. Radley S. Gupta, de McMaster University, Canadá. El plásmido que expresa el sistema de transporte de electrones, constituida por adrenodoxina, adrenodoxina reductasa y P450scc (pECE-F2), así como el vector control (pECE) y el plásmido que expresa a la enzima 3 $\beta$ -HSD (pCMV-3 $\beta$ HSD) fueron donados por el Dr. Jerome Strauss de Virginia Commonwealth University, E.U. La línea celular JEG-3 fue proporcionada por el Dr. Javier Camacho, del departamento de Farmacología, CINVESTAV-IPN y la línea celular HEK-293 fue proporcionada por el Dr. Alejandro García de la Facultad de Enfermería de la UASLP.

### **Líneas celulares y condiciones de cultivo**

La línea celular JEG-3 (células de coriocarcinoma humano) y HEK293 (células de riñón de embrión humano) fueron mantenidas a 37°C en un ambiente con 5% (v/v) CO<sub>2</sub> en medio DMEM (Gibco) suplementado con 10% de SFB (suero fetal bovino, Invitrogen), 2mM de glutamina, 100 IU/ml penicilina, 100  $\mu$ g/ml de estreptomicina, 1 mM de piruvato de sodio, 20 mM de HEPES, a pH 7.4.

### **Determinación de la eficiencia de la transfección con la proteína verde fluorescente (GFP).**

- a. Células JEG-3 o HEK293 fueron sembradas en cajas de 6 pozos, a una densidad de 300,000 células por pozo.
- b. Se transfectaron 2  $\mu$ g totales de DNA que codifica para la proteína GFP utilizando FuGENE6.

- c. Cuarenta y ocho horas posteriores a la transfección se lavaron las células 3 veces con PBS.
- d. Se fijaron las células con paraformaldehído 4% en PBS durante 20 minutos a temperatura ambiente.
- e. Se lavaron las células 5 veces durante 5 minutos cada una con PBS.
- f. Se lavaron las células 3 veces con H<sub>2</sub>O destilada.
- g. Se montó la muestra con 7 µl de medio de montaje antifade (Molecular Probes) y se guardó en la oscuridad a 4°C.
- h. Se examinó la muestra en un microscopio de fluorescencia LEICA modelo DMIRE2 con el filtro para la GFP (Ex.470/40 - Em.525/50).
- i. Para determinar la eficiencia de transfección se contaron 1000 células en campo claro, simultáneamente por microscopía de fluorescencia se contaron cuantas células de nuestro control expresan la proteína GFP con la finalidad de determinar el porcentaje de transfección mediante la siguiente formula: % Eficiencia de transfección= (número de células positivas para GFP / 1000) × 100.

### **Transfecciones**

- a. Para una transfección transitoria las células JEG-3 o HEK293 se sembraron en cajas de 12 pozos, a una densidad de 140, 000 células por pozo.
- b. Se transfectaron 2 µg totales de DNA utilizando FuGENE6. Se usó el vector vacío (pECE) para mantener la relación de la concentración equimolar en cada experimento. Las células JEG-3 fueron transfectadas con pECE o HSP60. Las

células HEK293 fueron transformadas en esteroideogénicas por la co-transfección de 3 $\beta$ -HSD, el sistema de P450<sub>scc</sub> (F2) y HSP60. La transfección se hizo como se indica a continuación:

1. Se colocaron 97  $\mu$ l de medio libre de suero sin antibióticos en un tubo Eppendorf de 0.5 ml.
  2. Se adicionaron 3  $\mu$ l de Fugene y se agitó.
  3. La reacción se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se adicionaron 2  $\mu$ g de DNA, se tapó el tubo y se agitó.
  4. La reacción se incubó nuevamente durante 30 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se adicionó a las células.
- c. A las 72 horas postransfección se recolectó el medio y posteriormente se determinó la producción de progesterona.
- d. Las células se incubaron en un buffer de lisis que contiene 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 5 mM Tris-HCl pH 9.0, 1% Nonidet-P40 y 1.2 mg/ml de inhibidores de proteasas (Complete; Roche) para posteriormente determinar la expresión de proteínas por Western blot.

### **Expresión y purificación de la proteína HSP60 recombinante**

-Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

A partir del plásmido pGEM-HSP60, el cDNA de HSP60 fue amplificado por PCR, los oligos utilizados fueron:

<b>Forward HSP60</b>	<b>5'-CCGCACATATGCTTCGGTTACCCA-3'</b>
<b>Reverse HSP60</b>	<b>5'-AAAGGTGCATCCATAATTGGATAC-3'</b>

La reacción de PCR se realizó con las siguientes condiciones:

<b>REACTIVOS</b>	<b>CANTIDADES</b>
<b>buffer 2X</b>	12.5 µl
<b>Magnesio</b>	1.5 µl (1.5 mM)
<b>dNTPs</b>	1 µl (0.4 mM)
<b>Oligo Fw</b>	1 µl (200 ng)
<b>Oligo Rv</b>	1 µl (200 ng)
<b>DNATemplado</b>	5.5 µl (500 ng)
<b>Taq polimerasa</b>	0.5 µl
<b>H<sub>2</sub>O</b>	2 µl

---



- g. La muestra fue colocada en una columna de sílica del kit gel extracción, y posteriormente centrifugada durante 1 minuto a 13,000 rpm.
- h. Se adicionó 750 µl del buffer PE a la columna y se centrifugó durante 1 minuto a 13,000 rpm. Posteriormente se descartó el precipitado.
- i. Nuevamente se centrifugó la columna durante 1 minuto a 13,000 rpm, seguido del descarte del precipitado.
- j. Finalmente se adicionaron 50 µl de agua miliQ a la columna, seguido de una centrifugación durante 1 minuto a 13,000 rpm. El precipitado obtenido fue recuperado en un tubo Eppendorf nuevo y almacenado a -20 °C.

#### -Digestión de DNA con enzimas de restricción

- a. El DNA purificado mediante la extracción por gel, fue cuantificado en un espectrofotómetro (NanoDrop ND-1000)
- b. Posteriormente, el DNA purificado fue digerido con las enzimas BamH1 y Nde1, al igual que el vector pET19b bajo las siguientes condiciones:

#### Reactivos:

DNA	1 µg
BamH1 (New England)	0.5 µL
Nde1 (New England)	0.5 µL
10X NEbuffer 3.1	5.0 µL
H <sub>2</sub> O	c.b.p. 50 µL

c. La mezcla de reacción se incubó a 37 °C durante 1 hora.

-Ligación del vector pET19b con el fragmento que corresponde al cDNA de HSP60

a. La ligación fue llevada a cabo en las siguientes condiciones:

Relación molar 1:3

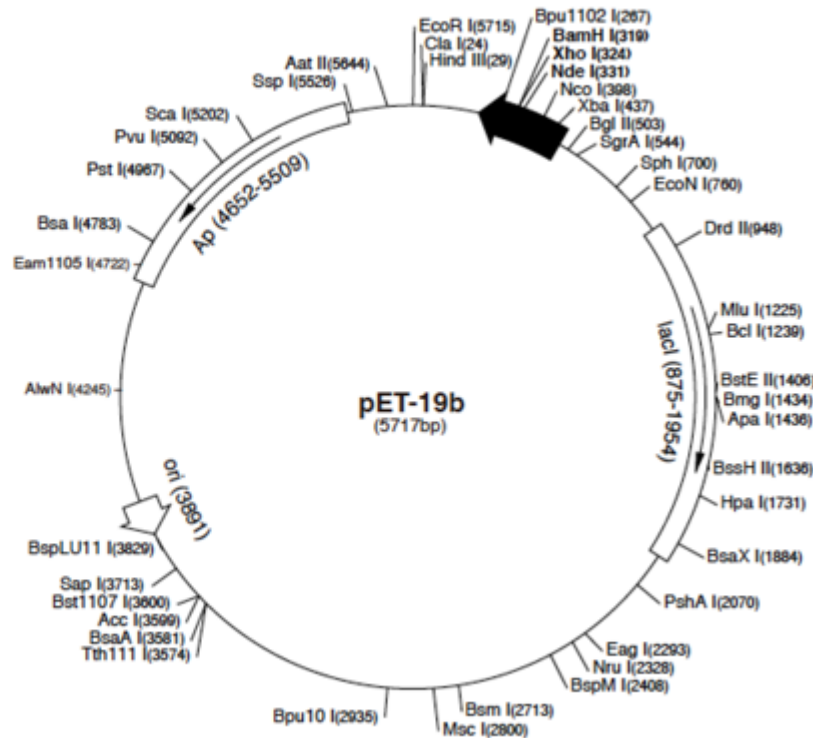
Vector (pET19b)	1 molar
Inserto (cDNA de HSP60)	1 molar
Buffer de ligación 5X (New England)	4.0 µL
Ligasa T4 (New England)	1.0 µL
H <sub>2</sub> O	c.b.p. 20 µL

b. La mezcla de reacción se incubó a 16 °C durante 12 horas.

El vector pET19b adicionó una cola de 10 Histidinas en la región amino terminal del péptido expresado. (Figura 11).

**pET-19b sequence landmarks**

T7 promoter	472-488
T7 transcription start	471
His•Tag coding sequence	366-395
Multiple cloning sites	
( <i>Nde</i> I - <i>Bam</i> H I)	319-335
T7 terminator	213-259
<i>lac</i> I coding sequence	875-1954
pBR322 origin	3891
<i>bla</i> coding sequence	4652-5509



Tomada de Novagen ([www.helmholtz-muenchen.de/fileadmin/PEPF/pET-19b\\_map.pdf](http://www.helmholtz-muenchen.de/fileadmin/PEPF/pET-19b_map.pdf))

**Figura 11. Vector pET19b.** Vector que posee una secuencia de 10 histidinas en la región amino terminal y múltiples sitios de clonación. Posee al promotor T7lac, el cual contiene la fusión del promotor de la T7 RNA polimerasa y el operón *lac* para expresión de proteínas en presencia de un inductor (como IPTG).

El producto de ligación fue transformado en *E. coli DH5α* para verificar por secuenciación que el marco de lectura del plásmido sea correcto.

-Transformación de células *E. coli BL21* con el producto de ligación para su expresión

- a. Se descongelaron 50 µl de las células *E. coli BL21* y se adicionó 5 µl del producto de ligación.



- b. La reacción se incubó por 30 minutos en hielo. Posteriormente se dio un choque térmico de 42°C durante 1 minuto. Inmediatamente se colocó en hielo.
- c. Se adicionaron 500 µl de medio LB y la reacción se colocó durante 1 hora en agitación constante a 37°C.
- d. Posteriormente se centrifugó a 6000 rpm durante 1 minuto. Enseguida se le quitó la mitad del sobrenadante y el sobrante se utilizó para resuspender la pastilla.
- e. Por último, se tomaron 50 µl de las células y se sembraron por estriado en cajas Petri.

Posteriormente se tomó una colonia y se creció en 5 ml de medio LB, durante toda la noche a 37°C en agitación constante.

#### **-Purificación de proteína HSP60 y STARD3 recombinante**

- a. Se agregaron los 5 ml de células *E. coli*. BL21 transformadas con el plásmido pET19b-HSP60 y pET22b-STARD3 a 100ml de LB con ampicilina 50 µg/ml y se incubó durante toda la noche a 37°C en agitación constante.
- b. Al siguiente día se incubaron las células *E. coli*. BL21 transformadas con el plásmido pET19b-HSP60 y pET22b-STARD3 en 500 ml de LB con ampicilina 50 µg/ml en agitación constante a 250 rpm a 37°C, hasta alcanzar una densidad óptica de 0.6 - 1 (OD<sub>600nm</sub>).
- c. Una vez alcanzada la densidad, la expresión génica fue inducida adicionando IPTG (isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido) al cultivo a una concentración de 1 mM, incubando por 3 horas más.

- d. Se centrifugó a 20,000 g, y al pellet que contenía las células, se le adicionó un buffer que contiene 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 10 mM imidazol a pH 8.
- e. Se lisaron las células adicionándoles la lisozima a una concentración final de 1 mg/ml y se incubaron durante 30 minutos en hielo.
- f. Posteriormente se sonicaron 3 veces por 30 segundos a 4°C, a una potencia de 7, utilizando un sonicador MSE Soniprep (UK) modelo 150.
- g. La suspensión se centrifugó a 20,000 g durante 40 minutos a 4°C.
- h. El sobrenadante fue incubado con la resina Ni-NTA a una concentración de 1 mg de proteína/200 µl, en agitación constante a 250 rpm durante toda la noche a 4°C.
- i. Al siguiente día el sobrenadante fue colocado en una columna y se lavó con 10 ml del buffer que contiene 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 20 mM imidazol a pH 8.
- j. Posteriormente las proteínas fueron eluidas con una solución que contenía 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 250 mM imidazol a pH 8.

Por último, se realizó un gel de acrilamida, en donde se separó la muestra y se transfirió, para Western blot y confirmar por medio de anticuerpos la identidad de las proteínas.

### **Inmunoprecipitación**

- a. Se cultivaron 1x10<sup>6</sup> células JEG-3, a llegar a la confluencia del 80%, se les retiró el medio y se lavaron con PBS.

- b. Se les adicionó un buffer de lisis que contiene 5 mM EDTA, 150 mM NaCl, 5 mM Tris-HCl, 1% Nonidet-P40 e inhibidor de proteasas (1 tableta/50 ml de extracto celular; Complete Roche) a pH 9.
- c. El extracto celular se pasó a través de una jeringa 10 veces y se centrifugó por 10 minutos a 17,000 g a 4°C.
- d. El sobrenadante se incubó durante 12 horas en agitación constante a 4°C con el anticuerpo anti-HSP60 (sc-13966, Santa Cruz) ó anti-STAR3 (sc-26062, Santa Cruz), a una concentración de 5 µg/ml.
- e. Se le adicionó 25 µl de Agarosa A/G (Roche) y se incubó durante 2 horas en agitación constante a 4°C.
- f. Posteriormente el complejo multiproteico con la resina fue lavado 3 veces con el buffer de lisis.
- g. Se eluyeron las proteínas inmunoprecipitadas de la resina de agarosa, incubándolas con buffer de muestra que contiene SDS y β-mercaptoetanol, para desnaturalizarlas a 100°C por 5 minutos.

Posteriormente las proteínas fueron separadas en un gel de poliacrilamida con SDS al 10% y transferidas a una membrana de PVDF en condiciones desnaturizantes, para Western blot.

### **Western blot**

- a. La membrana se lavó con una solución de TBS-Tween-20 0.05% (TBS-T) y fue bloqueada toda la noche con leche descremada al 3% en TBS-T.
- b. Al siguiente día, la membrana se incubó con los anticuerpos primarios anti-HSP60, anti-STARD3 con una dilución 1:1000, anti-P450scc (sc-292456, Santa Cruz) con una dilución 1:300, durante toda la noche.
- c. Posteriormente la membrana se lavó tres veces durante 30 minutos cada uno, con TBS-T y se incubó con el anticuerpo secundario mouse monoclonal anti-rabbit IgG durante 2 horas.
- d. Se lavó la membrana con TBS-T por 30 minutos, 3 veces y finalmente se reveló la membrana con reactivo quimio-luminiscente.

### **Aislamiento de mitocondrias de células JEG-3 (Kit Sigma MITOISO1, Sigma-Aldrich)**

- a. Se cultivaron  $2 \times 10^7$  células JEG-3, a llegar a la confluencia del 90%, se les retiró el medio y se lavaron con PBS.
- b. Se tripsinizaron y se les adicionó medio DMEM con 10% SFB para lavarlas.
- c. Se centrifugaron durante 5 minutos a  $600 \times g$  a  $4^\circ C$  y se descartó el sobrenadante.
- d. Al botón celular se les adicionó 1 ml del buffer de Extracción A y se incubó durante 15 minutos.
- e. Las células fueron homogenizadas en hielo mediante un homogeneizador de tipo Dounce por 30 veces.

- f. Se tomaron 20  $\mu$ l del homogenizado y se observaron en el microscopio más del 50% de células dañadas, que sirvió para determinar si hubo ruptura celular y se liberaron las mitocondrias al medio.
- g. El homogenado se centrifugó el homogenado a 600 X g a 4°C, durante 10 minutos.
- h. El sobrenadante se colocó en otro tubo y se centrifugó a 11,000 X g a 4°C, durante 10 minutos.
- i. Posteriormente se retiró el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 250  $\mu$ l del buffer Storage, para mantener las mitocondrias intactas.

#### **Integridad mitocondrial determinada por consumo de oxígeno mitocondrial**

- a. Mitocondrias aisladas JEG-3 (1mg/ml) se incubaron con 250 mM de sacarosa, 10 mM  $MgCl_2$ , 10 mM de succinato, 10 mM  $H_3PO_4$ , 1 mM EGTA, 0.5% BSA, a pH 7.4, 37°C.
- b. El consumo de oxígeno se determinó polarográficamente, empleando un electrodo tipo Clark.
- c. El consumo de oxígeno se estimuló por la adición de 300-500 nmol de ADP. El control respiratorio (CR) fue determinado como la tasa de consumo de oxígeno en el estado 3 entre la tasa de consumo de oxígeno en el estado 4, solo mitocondrias con un valor de CR más alto que 4 fueron usadas para asegurar la integridad mitocondrial [73].

### **Síntesis de progesterona**

- a. Mitocondrias aisladas de células JEG-3 (50 µg) se incubaron en un medio que contiene 120 mM KCl, 10 mM MOPS, 0.5 mM EGTA, 10 mM isocitrato, 4 µg aprotinina/ml, 1 µM leupeptina, 5 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH 7.4 [74].
- b. Posteriormente se incubó con la proteína His10-Hsp60 recombinante en diferentes concentraciones (10-30 µM), sin la proteína (control), o con albúmina (BSA) (10-30 µM); en un volumen final de 50 µl a una temperatura de 37°C durante 60 minutos.
- c. Posteriormente la reacción se detuvo adicionando 75 µl de metanol frío.
- d. Las muestras fueron almacenadas a -20°C para la determinación de progesterona posteriormente.

### **Determinación progesterona**

Los niveles de progesterona fueron determinados por un ensayo inmunoenzimático quimioluminiscente competitivo en fase sólida, con el kit IMMULITE Progesterone (Siemens USA) de acuerdo al protocolo del fabricante.

- a. Para el caso de células transfectadas, el medio de cultivo fue recolectado 72 horas postransfección.
- b. Posteriormente 25 µl del medio cultivo fue adicionado al tubo de reacción, el cual contiene la fase sólida que corresponde a microesferas recubiertas con el anticuerpo anti-progesterona.
- c. Enseguida al tubo de reacción se le adicionó la fase líquida que contiene fosfatasa alcalina conjugada con progesterona.

- d. El tubo de reacción fue incubado durante 30 minutos a temperatura ambiente.
- e. Pasado el tiempo de incubación, el tubo de reacción fue centrifugado a 17,000 g a 4°C.
- f. La reacción fue lavada con buffer de fosfato salino provisto por el fabricante y nuevamente centrifugada a 17,000 g a 4°C.
- g. Finalmente, el sustrato quimioluminiscente (dioxetano) fue adicionado a la reacción.
- h. La emisión de luz fue detectada en un luminómetro y los resultados fueron calculados para cada condición de transfección. La sensibilidad del kit Immulite para la detección de progesterona fue de 0.1 ng/ml.

#### **Determinación de la fluorescencia intrínseca del colesterol**

- a. La absorbancia óptica del colesterol fue determinada a una longitud de onda de 200 a 600 nm (en intervalos de 5 nm) en un lector de microplacas (Tecan Infinite M1000).
- b. El pico máximo de la absorbancia obtenida fue de 207 nm, la cual se utilizó posteriormente para excitar la molécula del colesterol y obtener la emisión de fluorescencia.

#### **Ensayo de unión basado en la fluorescencia del colesterol**

- a. A partir de un stock de colesterol al 0.1 mM en etanol, se preparó una solución de colesterol a una concentración de 10 µM en el buffer de unión que contenía 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 1 mM DTT, 2% etanol (v/v) con la adición forscolina 13 al 0.1% la cual permitió la solubilización del colesterol [75].

- b. Posteriormente diferentes concentraciones de His10-HSP60 recombinante (2-6  $\mu\text{M}$ ) fueron incubadas con una concentración constante de colesterol (6  $\mu\text{M}$ ) durante una hora a 37°C.
- c. En otros experimentos diferentes concentraciones de colesterol (2-6  $\mu\text{M}$ ) fueron incubadas con una concentración constante de His10-HSP60 recombinante (6  $\mu\text{M}$ ) durante una hora a 37°C.
- d. A continuación, las muestras se incubaron con la resina Ni-NTA en agitación constante a 250 rpm durante 2 horas.
- e. Las muestras se lavaron tres veces con un buffer que contiene 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 5 mM imidazol, pH 7.4.
- f. Enseguida las proteínas fueron eluidas con el buffer que contiene 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 250 mM imidazol, pH 7.4.
- g. El colesterol unido a las proteínas eluidas fue cuantificado por su fluorescencia intrínseca en el Infinite M1000, para excitar a la molécula de colesterol se utilizó una longitud de onda de 207 nm y la fluorescencia intrínseca fue obtenida en 305 nm.

#### **Ensayos de unión con colesterol [ $^3\text{H}$ ]**

- a. Para los ensayos de unión se preparó un stock de colesterol de 10  $\mu\text{M}$  y se adicionó al buffer de unión (Tsujiyama y Hurley, 2000); con 7.8 pmol [ $^3\text{H}$ ] colesterol (3,000 cpm) por muestra en un volumen final de 100  $\mu\text{l}$ .



- b. Posteriormente diferentes concentraciones de His10-HSP60 recombinante (2-6  $\mu\text{M}$ ), His6-STARD3 (4-6  $\mu\text{M}$ ) o BSA (4-6  $\mu\text{M}$ ) fueron incubadas con una concentración constante de colesterol (6  $\mu\text{M}$ ) durante una hora a 37°C.
- c. Enseguida las muestras se incubaron con la resina Ni-NTA en agitación constante a 250 rpm durante toda la noche a 4°C.
- d. Las muestras se lavaron con un buffer que contiene 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 5 mM imidazol, pH 7.4.
- e. A continuación, las proteínas fueron eluidas con el buffer que contiene 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 250 mM imidazol, pH 7.4.
- f. Por último, se les agregó el líquido de centelleo para determinar la radioactividad del colesterol unido en un Liquid Scintillation Analyzater (Tri-Crab 2910 TR, Perkin Elmer).

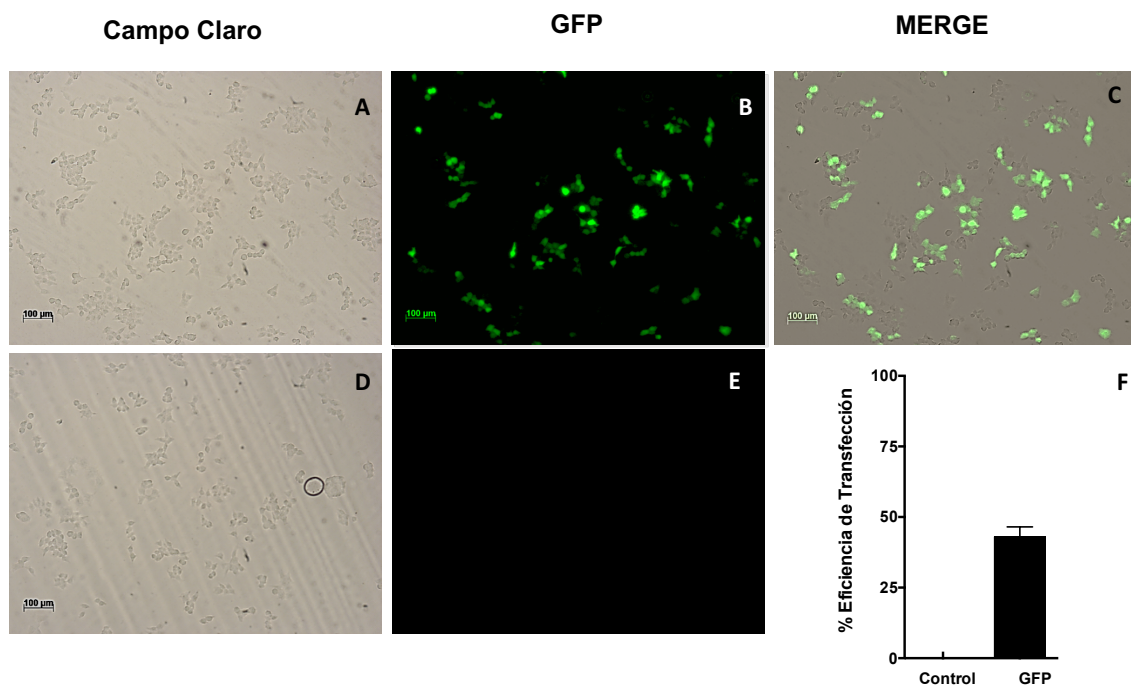
### **Análisis Estadístico**

El análisis estadístico de los datos se llevó a cabo mediante un análisis de varianza seguido de la prueba Student-Newman-Keuls utilizando el programa GraphPad Prism versión 6.0 para Mac (GraphPad Software, La Jolla California, EU, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)). El valor de  $p < 0.05$  fue considerado estadísticamente significativo.

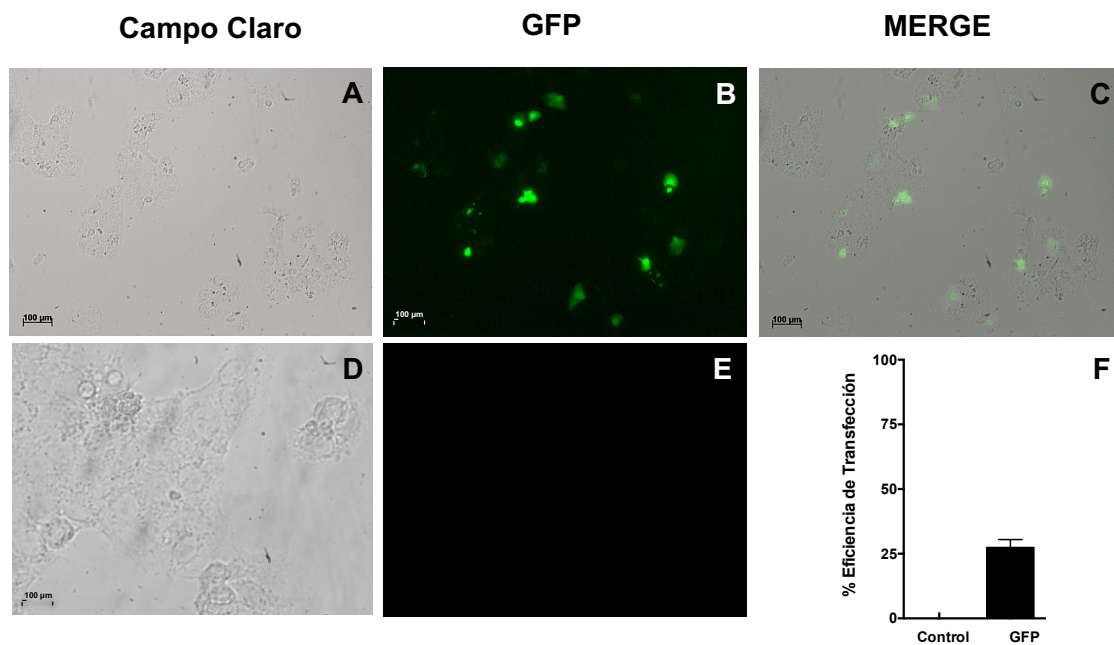
## RESULTADOS

### Eficiencia de la transfección en células JEG-3 y HEK293

La eficiencia de la transfección de las células JEG-3 y HEK293 se determinó registrando el porcentaje de células con expresión de GFP. Los resultados muestran que en células HEK293 la eficiencia de la transfección fue del 40% (Figura 12), mientras que en células JEG-3 fue del 25% (Figura 13).



**Figura 12. Eficiencia de transfección en la línea celular HEK293.** (A) Células transfectadas con la GFP observadas en microscopía de campo claro; (B) células transfectadas observadas por microscopía de epifluorescencia; (C) unión de la imagen del campo claro y de fluorescencia de células transfectadas. (D) Células sin transfectar observadas en microscopía de campo claro, (E) células sin transfectar observadas por microscopía de epifluorescencia. (F) Eficiencia de la transfección expresada en porcentaje con respecto al total de células contadas. Cada barra representa la media  $\pm$  SEM de tres experimentos independientes realizados por triplicado.



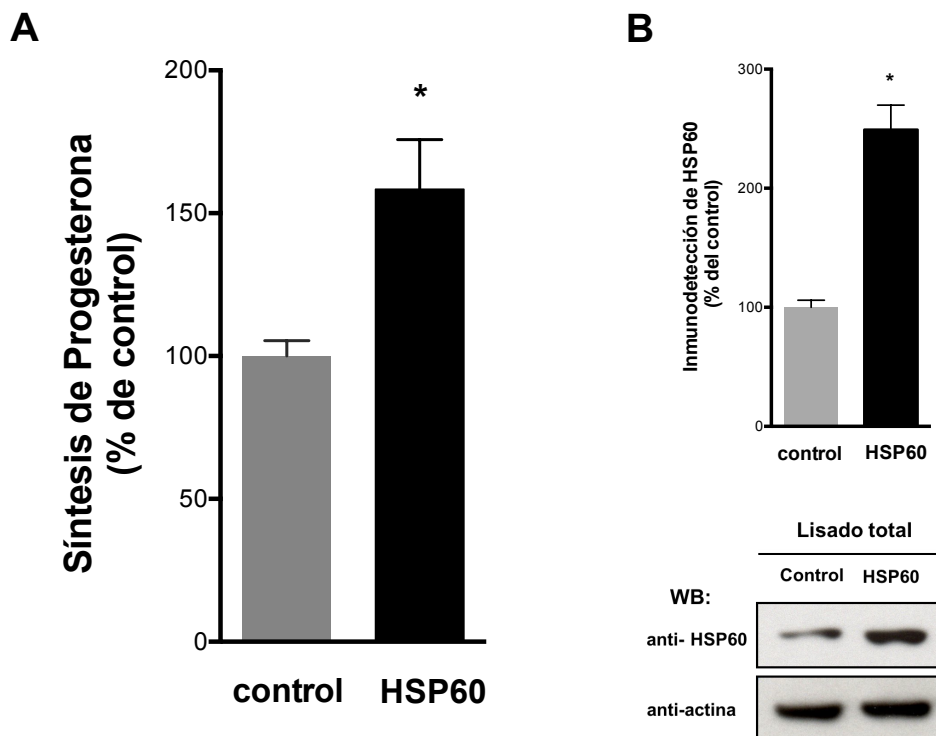
**Figura 13. Eficiencia de transfección en la línea celular JEG-3.** (A) Células transfectadas con la GFP observadas en microscopía de campo claro; (B) células transfectadas observadas por microscopía de epifluorescencia; (C) unión de la imagen del campo claro y de fluorescencia de células transfectadas. (D) Células sin transfectar observadas en microscopía de campo claro; (E) células sin transfectar observadas por microscopía de epifluorescencia. (F) Eficiencia de la transfección expresada en porcentaje con respecto al total de células contadas. Cada barra representa la media  $\pm$  SEM de tres experimentos independientes realizados por triplicado.

### **HSP60 estimula la síntesis de progesterona en células JEG-3 y HEK293**

Para determinar el papel de la proteína HSP60 en la síntesis de progesterona, se utilizó como modelo experimental una línea celular de coriocarcinoma humano (JEG-3), en la cual se sobre-expresó a la proteína HSP60 por medio de la transfección del cDNA que codifica para esta proteína y se determinó la cantidad de progesterona liberada en el medio. Los resultados del radioinmunoensayo muestran que la sobreexpresión de la proteína HSP60 incrementó de manera significativa la síntesis de progesterona

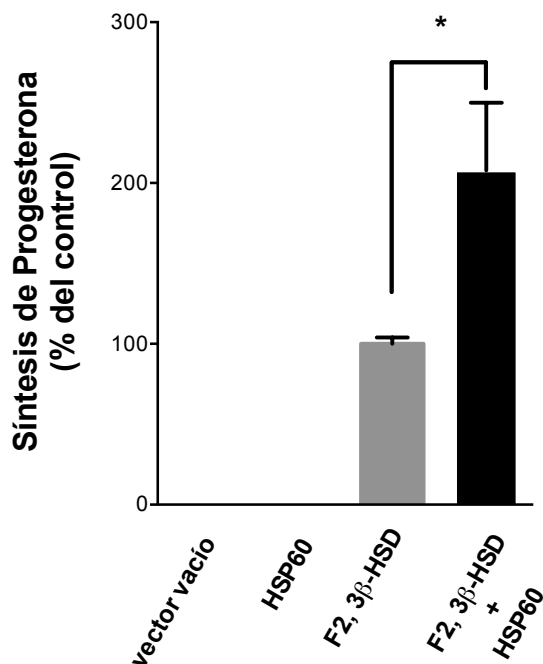
comparado con el control (vector vacío) (Figura 14 A). La sobreexpresión de HSP60 fue verificada por Western blot (Figura 14 B).

El efecto de la sobreexpresión de la proteína HSP60 en la síntesis de progesterona, también se demostró en células HEK293 que fueron transformadas en esteroideogénicas por medio de la co-transfección del sistema P450<sub>scc</sub> y 3 $\beta$ -HSD, como ha sido previamente descrito [27, 76]. Este modelo permite analizar el efecto de la proteína HSP60 en un sistema carente de síntesis endógena de la hormona. [77]. Los resultados muestran que la transfección con el sistema del P450<sub>scc</sub>, 3 $\beta$ -HSD y HSP60 incrementa de manera significativa la síntesis de progesterona comparada con la transfección de P450<sub>scc</sub>, 3 $\beta$ -HSD y el vector vacío (Figura 15).



**Figura 14. HSP60 incrementa la síntesis de progesterona en células JEG-3.** (A) Células JEG-3 transfectadas con el cDNA que codifica para la proteína HSP60 o pECE (control). A las 72 horas

postransfección, el medio fue colectado y se evaluó la síntesis de progesterona como se describe en la metodología. Posteriormente las células se lisaron y se determinó la expresión de la proteína HSP60 por Western blot utilizando anticuerpos específicos; como control de carga se utilizó actina. La gráfica representa el promedio  $\pm$  el error estándar de la media (SEM), de la síntesis de progesterona de siete experimentos por triplicado, los datos fueron normalizados respecto al control (vector vacío) que se tomó como el 100%. Prueba de t de Student mostró significancia estadística,  $*P < 0.05$ . (B) La gráfica representa el promedio  $\pm$  el error estándar de la media (SEM) de la densitometría de la proteína HSP60 de tres experimentos independientes realizados por triplicado, comparado con células transfectadas con vector vacío (control) que se tomó como el 100%, Prueba de t de Student,  $*P < 0.05$ . La figura inferior muestra un Western blot representativo de la sobreexpresión de la proteína HSP60 en células JEG-3. El análisis densitométrico fue realizado usando el programa ImageJ del NIH, el cual determinó el área bajo la curva de las bandas del Western blot.



**Figura 15. HSP60 incrementa la síntesis de progesterona en células no esteroideogénicas.** Células HEK293 transfectadas con los cDNAs que codifican para el sistema P450scc (F2), 3β-HSD y vector vacío (control positivo); co-transfectadas o no con el cDNA que codifica para HSP60. Como control negativo las

células son transfectadas únicamente con el vector vacío o con el cDNA que codifica para HSP60. A las 72 horas postransfección, el medio fue colectado y se evaluó la síntesis de progesterona como se describe en la metodología. La gráfica representa el promedio  $\pm$  el error estándar de la media (SEM) de la síntesis de progesterona de tres experimentos independientes realizados por triplicado; los datos fueron normalizados respecto al control (F2, 3 $\beta$ -HSD) que se tomó como el 100%. La prueba de ANOVA seguida por la prueba de Newman-Keuls mostró significancia estadística, \* $P$  < 0.05.

### **HSP60 estimula la síntesis de progesterona a nivel mitocondrial**

Para estudiar el efecto de HSP60 en la síntesis de progesterona, se decidió clonar el cDNA de HSP60 en el vector pET19b, el cual agrega una cola de histidinas. En la figura 16 se muestra el marco de lectura correcto de la clonación que se determinó por secuenciación. La figura 17 A muestra la expresión de la proteína recombinante HSP60 detectada mediante Western blot con anticuerpos contra anti-HSP60 y anti-Histidina. Una vez obtenida nuestra proteína HSP60 recombinante, se procedió a determinar si ésta puede actuar a nivel mitocondrial promoviendo la síntesis de progesterona, para lo cual se realizaron experimentos in vitro usando mitocondrias aisladas de células JEG-3, las cuales se incubaron con concentraciones crecientes de la proteína His10-HSP60 recombinante (Figura 17 B). Los resultados muestran que la adición de la proteína HSP60 a las mitocondrias incrementó de manera significativa y dosis-dependiente la síntesis de progesterona, con un incremento máximo observado a 30  $\mu$ M de His10-HSP60 comparado con el control (mitocondrias incubadas en ausencia de la proteína HSP60). En contraste, la albúmina (BSA) a 30  $\mu$ M no mostró ningún efecto en la síntesis de progesterona.

## Resultados Secuenciación

----GGAGCGG-  
TAACATTCCCTCTAgaataaTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACCATGGCCATCATCATCATCAT  
CATCATCATCACAGCAGCGGCCATATCGACGACGACGACAAGCATATGCTTCGGTTACCCACAGTCTT  
TCGCCAGATGAGACCGGTGTCCAGGGTACTGGCTCCTCATCTCACTCGGGCTTATGCCAAAGATGTAAAA  
TTTGGTGCAGATGCCCGAGCCTTAATGCTTCAAGGTGTAGACCTTTAGCCGATGCTGTGGCCGTTACAAT  
GGGGCCAAAGGGAAGAACAGTGATTATTGAGCAGGGTTGGGGAAGTCCCAAAGTAACAAAAGATGGTG  
TGACTGTTGCAAAGTCAATTGACTTAAAAGATAAAACAAGAACATTGGAGCTAACTTGTTCAAGATGT  
TGCCAATAACACAAATGAAGAAGCTGGGGATGGCACTACCACTGCTACTGTACTGGCACGCTCTATAGCC  
AAGGAAGGCTTCGAGAAGATTAGCAAAGGTGCTAATCCAGTGGAAATCAGGAGAGGTGTGATGTTAGC  
TGTTGATGCTGTAATTGCTGAACTTAAAAAGCAGTCTAAACCTGTGACCACCCTGAAGAAATTGCACAG  
GTTGCTACGATTTCTGCAAACGGAGACAAAGAAATTGGCAATATCATCTCTGATGCATGAAAAAGTTGGA  
AAAAGGGTGTATCACAGTAAAGGATGGAAACACTGAGATGAATTAATTTGGCATGAAGTTTGAT  
CGAGGCTATATTTCTCC-TACTTTATTAATACATCA

Vector pET19b

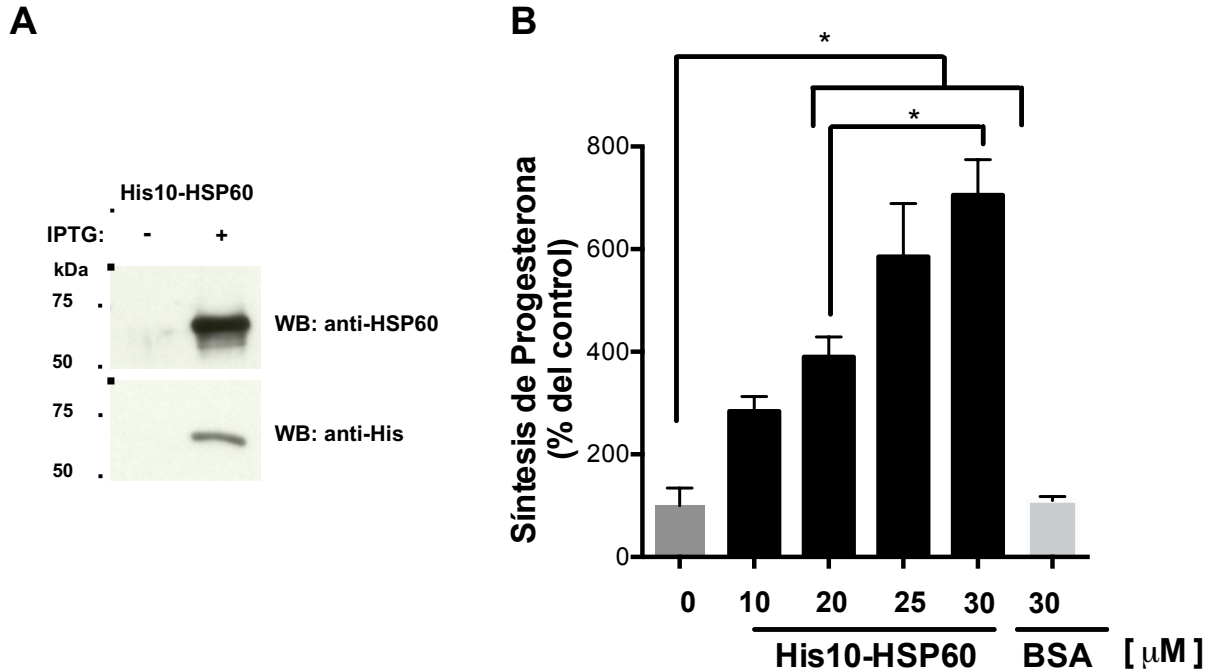
Ndel sitio de clonación

Codón de inicio

His-TAG

HSP60 completa

Figura 16. Fragmento de la secuenciación del plásmido HSP60-pET19b. En verde: el fragmento del vector, en azul: el codón de inicio, en rojo: la secuencia que codifica la cola de histidinas, en amarillo: un sitio de clonación y la región gris: es la secuencia que codifica para la proteína HSP60.



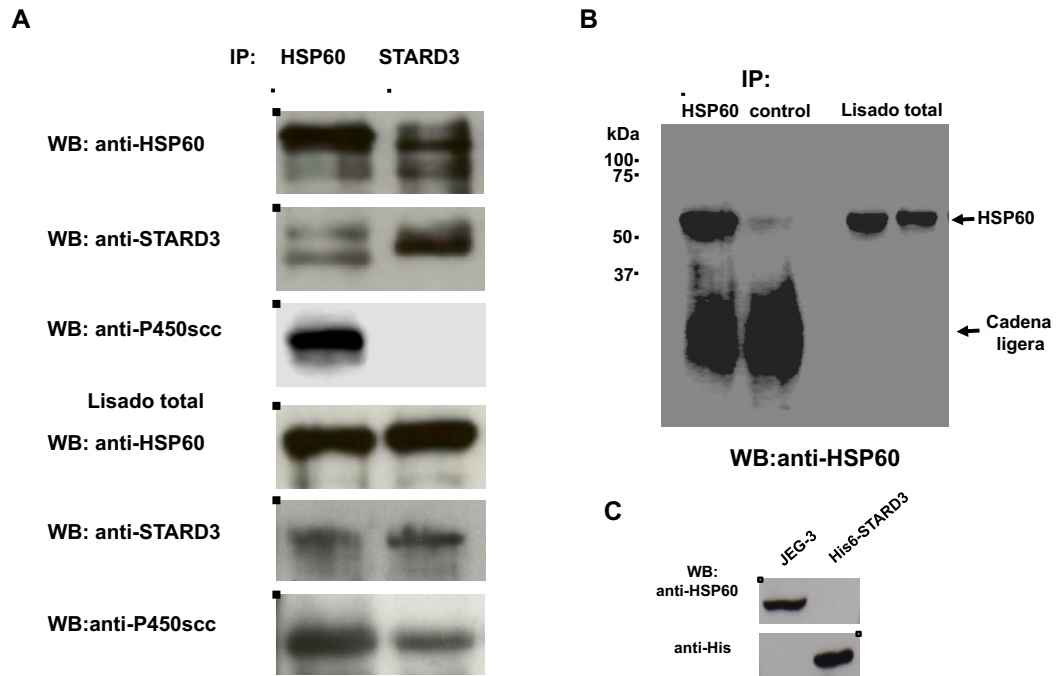
**Figura 17. HSP60 estimula la síntesis de progesterona en mitocondrias de células JEG-3.** (A) La proteína His10-HSP60 recombinante fue expresada y purificada desde *E. coli* BL21 pLys y su identidad fue confirmada por Western blot usando anticuerpos contra anti-His y anti-HSP60. (B) Síntesis de progesterona cuantificada por el kit immulite en mitocondrias aisladas (50 µg) de células JEG-3 incubadas con diferentes concentraciones de la proteína recombinante His10-HSP60 (10-30 µM) durante 1 hora a 37°C. Los datos fueron normalizados respecto al control (mitocondrias sin proteína HSP60) que se tomó como el 100%. La gráfica representa el promedio  $\pm$  el error estándar de la media (SEM) de tres experimentos independientes realizados por triplicado. La prueba ANOVA seguida de la prueba de Newman-Keuls,  $*P < 0.05$ . La albúmina sérica bovina (BSA) se utilizó como control.

### La proteína HSP60 se asocia con las proteínas esteroideogénicas STARD3 y P450scc

Se han propuesto sitios de contacto específicos para la esteroideogénesis a nivel mitocondrial los cuales están constituidos por complejos multiproteicos, que regulan el



transporte de colesterol de la membrana externa a la membrana interna mitocondrial. Las proteínas que conforman estos complejos multiproteicos incluyen a la proteína STARD3 que facilita el transporte del colesterol desde la membrana externa a la membrana interna en donde es proporcionado a la enzima P450scc, la cual lo convierte en pregnenolona. Con el objetivo de determinar si la proteína HSP60 endógena se asocia a estas dos proteínas, se realizaron ensayos de inmunoprecipitación con lisados de células JEG-3. Los resultados muestran que las proteínas STARD3 y P450scc coprecipitan con la proteína HSP60. En contraste, inmunoprecipitados de STARD3 solo coprecipitan a la proteína HSP60 y no P450scc (Figura 18 A). Como control negativo de la inmunoprecipitación se utilizó suero de conejo preinmune el cual no precipita proteínas (Figura 18 B). Adicionalmente se corroboró la especificidad del anticuerpo anti-HSP60, demostrando que no existe reacción cruzada con la proteína STARD3 (Figura 18 C).

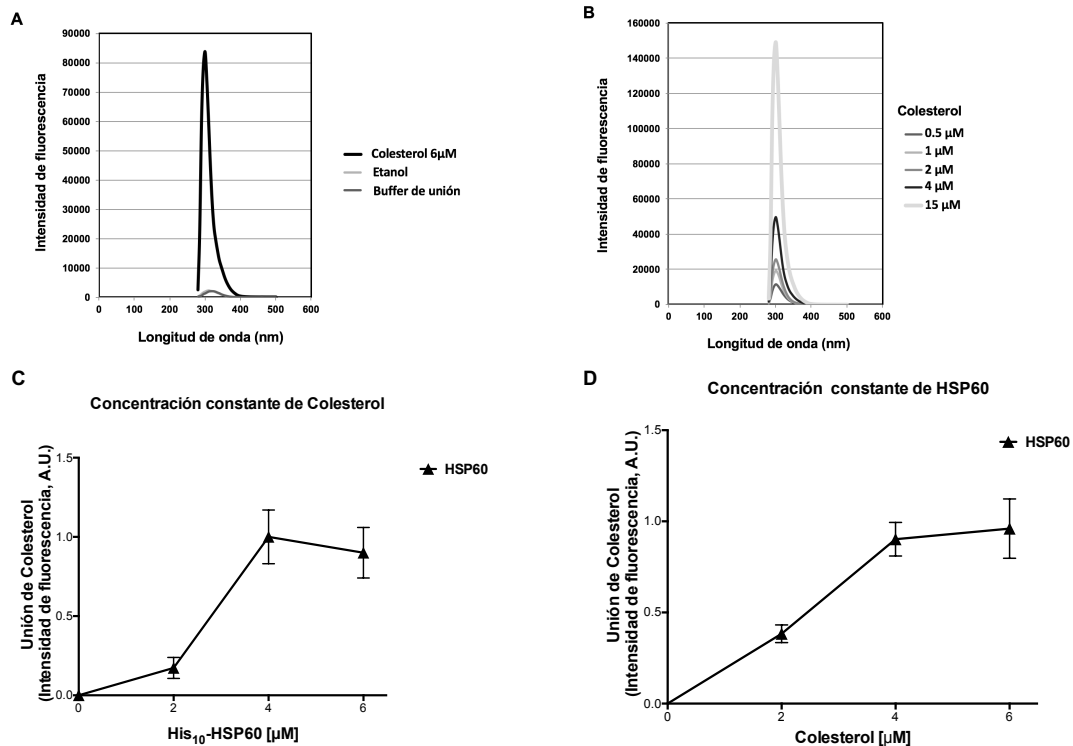


**Figura 18. HSP60 interactúa con proteínas esteroidogénicas.** (A) La proteína HSP60 fue inmunoprecipitada a partir de células JEG-3; la presencia de STARD3 y P450scc fue detectada por Western blot. STARD3 fue también inmunoprecipitada a partir de células JEG-3, la presencia de HSP60, pero no P450scc fue detectada por Western blot usando anticuerpos específicos. (B) Control negativo de inmunoprecipitación, lisado de células JEG-3 fueron incubadas con suero de conejo preimmune (control) o con anticuerpo anti-HSP60, mientras que para la detección de proteínas en el Western blot se utilizó un anticuerpo secundario que detecta únicamente cadenas ligeras (C) Western blot anti-HSP60 en lisados de células JEG-3 y en muestras que contienen la proteína recombinante His6-STARD3. La imagen muestra blots representativas de tres experimentos independientes. WB = Western blot, IP = Inmunoprecipitación.

### La proteína HSP60 une colesterol

Se ha propuesto que las proteínas StAR/STARD1 y MLN64/STARD3 regulan el transporte de colesterol a nivel mitocondrial, ya que cuentan con un dominio de unión a colesterol. Para determinar si la proteína HSP60 tiene la capacidad de unir colesterol; se utilizó la proteína His10-HSP60 recombinante y se diseñó un ensayo de unión *in vitro*,

mediante la medición de la fluorescencia intrínseca del colesterol. El primer paso fue determinar si el colesterol presentaba fluorescencia intrínseca. Los resultados muestran que el pico máximo de fluorescencia del colesterol fue en una longitud de onda de 305 nm (Figura 19 A). Además, la intensidad de fluorescencia incrementa proporcionalmente a la cantidad de colesterol adicionado (Figura 19 B). El segundo paso fue determinar la unión de HSP60 a la molécula del colesterol utilizando su fluorescencia intrínseca. Los resultados muestran que el colesterol se une a la proteína His10-HSP60 recombinante de forma dosis-dependiente (Figura 19 C y D).



**Figura 19. La proteína HSP60 une colesterol.** (A) Se determinó el espectro de emisión del colesterol en un rango de 280/600 nm en el Tecan Infinite M1000, y se observó que el pico máximo de fluorescencia es a 305 nm; el buffer de unión y etanol fueron usados como control negativo. (B) Diferentes concentraciones de colesterol (0.5-15  $\mu$ M) se excitaron a una longitud de 207 nm y su emisión fue colectada a 305 nm. (C)

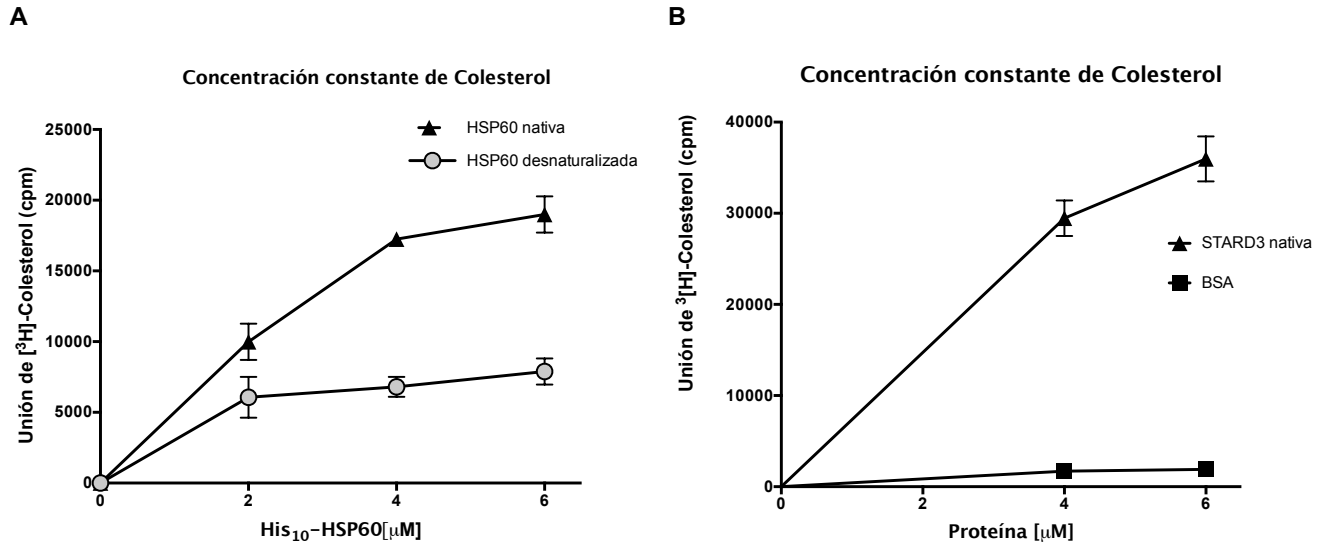
Diferentes concentraciones de la proteína His<sub>10</sub>-HSP60 recombinante fueron incubadas durante 1 hora con 6  $\mu$ M de colesterol. Transcurrido el tiempo de incubación, la proteína fue recuperada por afinidad con una resina que contiene níquel. La unión del colesterol a la proteína HSP60 se determinó midiendo la intensidad de fluorescencia del colesterol a 305 nm. La gráfica representa el promedio  $\pm$  el error estándar de la media (SEM) de la afinidad del colesterol de tres experimentos independientes realizados por triplicado. Los datos fueron normalizados con respecto al control (muestras sin la proteína His<sub>10</sub>-HSP60).

(D) Concentraciones crecientes de colesterol fueron incubadas con 6  $\mu$ M de His<sub>10</sub>-HSP60 nativa por 1 h. Transcurrido el tiempo de incubación, la proteína se recuperó por afinidad con una resina que contiene níquel. La unión del colesterol a la proteína HSP60 se determinó midiendo la intensidad de fluorescencia del colesterol a 305 nm. La gráfica representa el promedio  $\pm$  el error estándar de la media (SEM) de la afinidad del colesterol de tres experimentos independientes realizados por triplicado. Los datos fueron normalizados respecto al control (muestras sin colesterol).

### **La proteína HSP60 une colesterol dependiente de su estado conformacional**

Para determinar si la estructura de la HSP60 es indispensable para unir colesterol, se realizaron ensayos de unión utilizando colesterol marcado con tritio [<sup>3</sup>H] y la proteína recombinante en condiciones desnaturalizantes.

El tratamiento de la proteína His<sub>10</sub>-HSP60 con urea disminuye su capacidad para unir colesterol, demostrando que la unión es dependiente de su estructura nativa (Figura 20 A). Asimismo, se realizaron experimentos control para determinar que esta unión fuera específica, utilizando a la proteína His<sub>6</sub>-STARD3 como control positivo y a la albumina como control negativo. Los resultados muestran que la proteína His<sub>6</sub>-STARD3 une colesterol de manera dosis dependiente, mientras que la albumina no es capaz de unirla de manera significativa (Figura 20 B) [78].



**Figura 20. La unión de colesterol a la proteína HSP60 es dependiente de su estado nativo.** (A) Concentraciones crecientes de la proteína recombinante HSP60 nativa (triángulos negros) y HSP60 desnaturalizada con 8 M de urea durante 12 horas (círculos grises) fueron incubadas durante 1 h a 37°C con 6  $\mu\text{M}$  de colesterol frío y con 7.8 pmol  $^3\text{H}$  colesterol. (B) Concentraciones crecientes de la proteína recombinante His6-STARD3 nativa (triángulos negros) o BSA (cuadrados negros), fueron incubadas durante 1 h a 37°C con 6  $\mu\text{M}$  de colesterol frío y con 7.8 pmol  $^3\text{H}$  colesterol. Transcurrido el tiempo de incubación, las proteínas fueron recuperadas por afinidad con una resina que contiene níquel. La unión del colesterol a la proteína HSP60, STARD3 y BSA se determinó en un contador de centelleo. La gráfica representa el promedio  $\pm$  el error estándar de la media (SEM) de tres experimentos independientes realizados por triplicado.

## DISCUSIÓN

Una de las principales funciones de la progesterona en el embarazo es mantener la relación entre el feto y la madre, permitiendo que el producto llegue a término. La síntesis de progesterona se lleva a cabo en las mitocondrias de las células del sinciciotrofoblasto humano, en donde el transporte del colesterol a nivel mitocondrial es el paso limitante en su síntesis; sin embargo, aún se desconoce el mecanismo que regula su transporte en la placenta humana. Se ha sugerido que la proteína STARD3 participa en la esteroidogénesis ya que posee el dominio START de unión a colesterol [27]; sin embargo, su papel fisiológico no es bien conocido, ya que mutaciones en su dominio START no modifican la capacidad reproductiva en ratones, sugiriendo que su función en la esteroidogénesis podría ser complementaria, abriendo la posibilidad de la participación de otras proteínas en el proceso esteroidogénico [79].

Es necesario hacer notar que el transporte de colesterol a nivel mitocondrial no depende de una sola proteína, ya que requiere de puntos de unión mitocondriales en donde participan un conjunto de proteínas [36]. En este sentido, los resultados mostrados en el presente trabajo sugieren que la proteína HSP60 participa en el transporte de colesterol a nivel mitocondrial favoreciendo la esteroidogénesis tanto en células como en las mitocondrias aisladas de la placenta.

La hipótesis de que la HSP60 participa en la esteroidogénesis se confirmó con experimentos de sobreexpresión de esta proteína en células JEG-3, en donde se observa un incremento significativo en la síntesis de progesterona. Este mismo efecto es observado en células HEK293 transformadas en esteroidogénicas por la co-transfección

del sistema F2 y la enzima  $3\beta$ -HSD, estrategia experimental empleada como modelo de poco fondo para determinar el efecto de proteínas en la esteroidogénesis [27, 76]. Datos de la literatura apoyan los resultados mostrados en este trabajo, en donde se han reportado altos niveles de expresión de la proteína HSP60 en células esteroidogénicas en comparación con los bajos niveles en células no esteroidogénicas [70]. Además, un reporte reciente ha mostrado que el choque térmico en células de la granulosa induce el incremento de los niveles del ARNm de HSP60 (aproximadamente 3 veces), mientras que disminuye parcialmente los niveles del citocromo P450 y casi por completo los niveles del ARNm de STARD1 y de la aromatasa, provocando una reducción significativa de la síntesis de estradiol, sin tener mayor efecto en la síntesis de progesterona [80]. Lo anterior apoya la hipótesis de que la proteína HSP60 juega un papel clave en la síntesis de progesterona, ya que en la ausencia de STARD1, la proteína HSP60 presenta un efecto redundante en la síntesis de esta hormona.

En contraste, la inducción de la expresión de otra proteína mitocondrial de la familia de chaperonas [81], tal como la HSP70, inhibe significativamente la síntesis de progesterona en células de Leydig, a través de secuestrar proteínas esteroidogénicas en el citoplasma [82], este resultado demuestra que únicamente de la familia de chaperonas, la HSP60 tiene características particulares en promover la síntesis de progesterona.

Datos de la literatura sugieren que la proteína HSP60 se localiza en el interior mitocondrial. Los experimentos realizados en las mitocondrias aisladas de las células JEG-3, mostraron que la HSP60 promueve la síntesis de progesterona de manera dependiente de su concentración. Esto adquiere relevancia, ya que actualmente se ha discutido si el papel de la HSP60 en diferentes procesos celulares se debe a su posible

localización. Al respecto, hay datos de la literatura que describen que la proteína HSP60 se localiza en la membrana interna mitocondrial, en la matriz mitocondrial y en el espacio extramitocondrial [54, 83, 84].

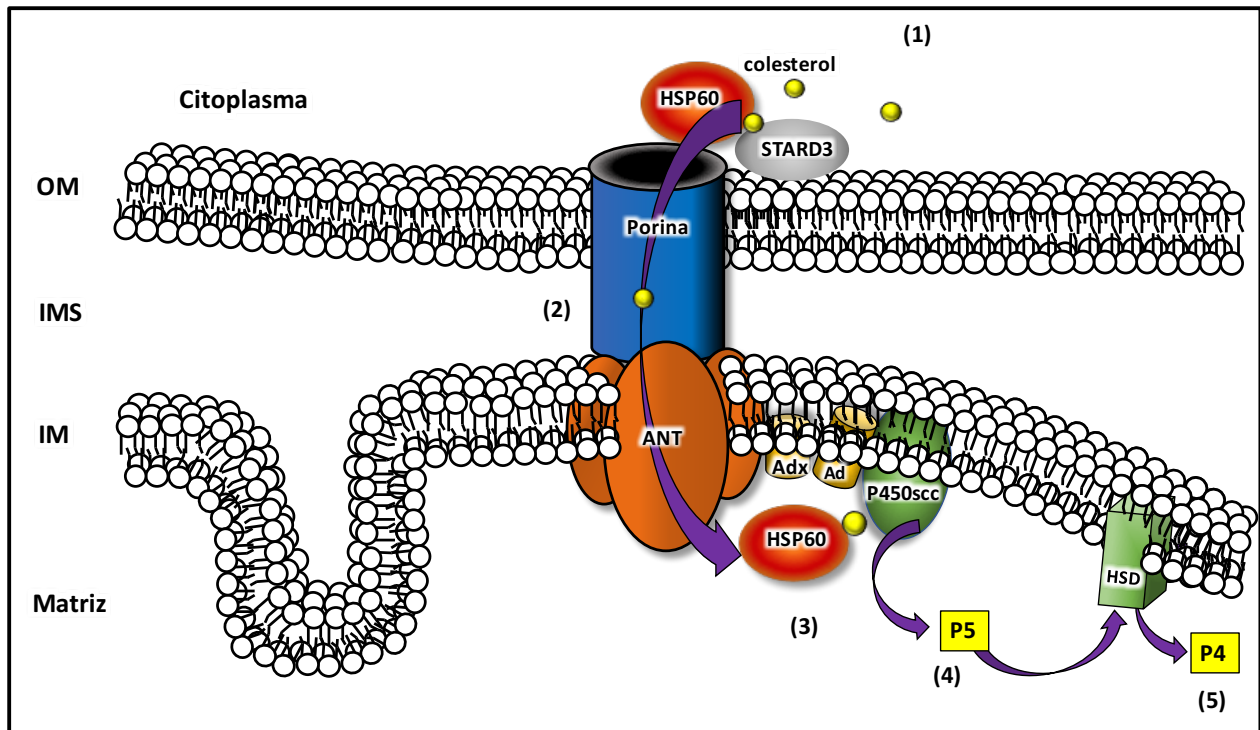
En este sentido, los resultados obtenidos en este trabajo con la inmunoprecipitación, muestran que la HSP60 se asocia con las proteínas de los sitios de contacto mitocondrial, como son la STARD3 y la enzima P450scc, pero no se observa una interacción entre la STARD3 y el P450scc. Estos resultados adquieren relevancia ya que permiten inferir el sitio de localización de la HSP60 en el proceso esteroidogénico. Por un lado, se sabe que el transporte de colesterol se realiza desde la membrana externa a la interna mitocondrial una vez que la proteína STARD3 lo ha depositado en la membrana externa [85]. La interacción entre la proteína HSP60 y la STARD3, como lo demuestran nuestros resultados, nos hace sugerir que HSP60 actúa desde el exterior mitocondrial. Al mismo tiempo, los resultados muestran una interacción entre la HSP60 y el citocromo P450scc, el cual se localiza en la membrana interna mitocondrial [86]. En este caso, la HSP60 tendría una localización asociada a la membrana interna mitocondrial. Estos resultados son apoyados por datos en la literatura, en donde se describe la localización de la proteína HSP60 en estos sitios [54, 83, 84], sugiriendo que la distribución subcelular de la HSP60 es clave en la interacción proteína-proteína.

Aunado a los datos anteriores, en este trabajo se demostró por dos métodos diferentes que la HSP60 une colesterol de una manera dosis-dependiente y que dicha unión depende del estado nativo de ésta, ya que su desnaturalización disminuye de manera significativa la unión al colesterol, de manera similar a lo que se ha reportado con las proteínas STARD1 y STARD3 [18, 87].



La unión del colesterol a la proteína HSP60 es relevante, ya que se ha reportado que la HSP60 puede encontrarse asociada a balsas lipídicas que son microdominios de la membrana plasmática enriquecidos con colesterol [88], lo que sugiere que la HSP60 podría tener un papel importante con el colesterol que se localiza en estos sitios. Además, se han asociado niveles elevados de HSP60 con el incremento de colesterol plasmático [89, 90]. En conjunto, los resultados mostrados sugieren que la proteína HSP60 tiene un papel importante en la distribución del colesterol y con base en la información proporcionada, en el presente trabajo se propone el siguiente modelo:

El colesterol llega a la membrana externa mitocondrial por medio de la proteína STARD3 en conjunto con la HSP60 (Paso 1), donde la HSP60 contribuye en el transporte del colesterol a la membrana mitocondrial interna, a través de sitios de contacto mitocondriales conformados por la porina y el traslocador de nucleótidos de adenina (ANT), entre otras proteínas (Paso 2). En la membrana interna mitocondrial, la proteína HSP60 facilita la unión del colesterol al citocromo P450<sub>scc</sub> (Paso 3), la cual cataliza la conversión del colesterol en pregnenolona dependiente de los electrones cedidos por la adrenodoxina (Adx) y la adrenodoxina reductasa (AdR) (Paso 4). Posteriormente, la pregnenolona (P5) es convertida en progesterona (P4) por la acción de la HSD (Paso 5).



**Figura 21. Modelo de la participación de la proteína HSP60 en la síntesis de progesterona en mitocondrias de placenta humana.**

OM= membrana externa mitocondrial; IMS= espacio intermembranal, IM= membrana interna mitocondrial.

## **CONCLUSIÓN**

Los resultados muestran que la sobreexpresión de la proteína HSP60 incrementa la síntesis de progesterona en células JEG-3 y en células HEK293 transformadas en esteroideogénicas. También se demostró que HSP60 induce la síntesis de progesterona a nivel mitocondrial. Por otra parte, se confirmó que HSP60 une colesterol e interactúa con proteínas en el sitio de contacto esteroideogénico. Con estos resultados, se propone por primera vez, que la proteína HSP60 forma parte de un complejo proteico encargado del transporte del colesterol para promover la síntesis de progesterona a nivel mitocondrial.

## LITERATURA CITADA

- [1] D. Evain-Brion, A. Malassine, Human placenta as an endocrine organ, *Growth Horm IGF Res* 13 Suppl A (2003) S34-7.
- [2] N.M. Gude, C.T. Roberts, B. Kalionis, R.G. King, Growth and function of the normal human placenta, *Thromb Res* 114(5-6) (2004) 397-407.
- [3] Y. Wang, S. Zhao, *Vascular Biology of the Placenta*, San Rafael (CA), 2010.
- [4] K. Benirschke, P. Kaufmann, *Pathology of the human placenta*, 3rd ed., Springer-Verlag, New York, 1995.
- [5] F. Martinez, M. Kiriakidou, J.F. Strauss, 3rd, Structural and functional changes in mitochondria associated with trophoblast differentiation: methods to isolate enriched preparations of syncytiotrophoblast mitochondria, *Endocrinology* 138(5) (1997) 2172-83.
- [6] R.C. Tuckey, Progesterone synthesis by the human placenta, *Placenta* 26(4) (2005) 273-81.
- [7] J.D. Graham, C.L. Clarke, Physiological action of progesterone in target tissues, *Endocr Rev* 18(4) (1997) 502-19.
- [8] S. Mesiano, Myometrial progesterone responsiveness, *Semin Reprod Med* 25(1) (2007) 5-13.
- [9] H.K. Ghayee, R.J. Auchus, Basic concepts and recent developments in human steroid hormone biosynthesis, *Rev Endocr Metab Disord* 8(4) (2007) 289-300.
- [10] D.W. Nebert, K. Wikvall, W.L. Miller, Human cytochromes P450 in health and disease, *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 368(1612) (2013) 20120431.
- [11] J.T. Sanderson, The steroid hormone biosynthesis pathway as a target for endocrine-disrupting chemicals, *Toxicol Sci* 94(1) (2006) 3-21.
- [12] V. Papadopoulos, W.L. Miller, Role of mitochondria in steroidogenesis, *Best practice & research. Clinical endocrinology & metabolism* 26(6) (2012) 771-90.
- [13] W.L. Miller, Steroid hormone synthesis in mitochondria, *Molecular and cellular endocrinology* 379(1-2) (2013) 62-73.
- [14] R.C. Tuckey, A.J. McKinley, M.J. Headlam, Oxidized adrenodoxin acts as a competitive inhibitor of cytochrome P450<sub>scc</sub> in mitochondria from the human placenta, *Eur J Biochem* 268(8) (2001) 2338-43.
- [15] J. Hu, Z. Zhang, W.J. Shen, S. Azhar, Cellular cholesterol delivery, intracellular processing and utilization for biosynthesis of steroid hormones, *Nutr Metab (Lond)* 7 (2010) 47.
- [16] M.T. Espinosa-Garcia, J.F. Strauss, 3rd, F. Martinez, A trypsin-sensitive protein is required for utilization of exogenous cholesterol for pregnenolone synthesis by placental mitochondria, *Placenta* 21(7) (2000) 654-60.
- [17] T.Y. Chang, C.C. Chang, N. Ohgami, Y. Yamauchi, Cholesterol sensing, trafficking, and esterification, *Annu Rev Cell Dev Biol* 22 (2006) 129-57.
- [18] Y. Tsujishita, J.H. Hurley, Structure and lipid transport mechanism of a StAR-related domain, *Nat Struct Biol* 7(5) (2000) 408-14.
- [19] D.M. Stocco, StAR protein and the regulation of steroid hormone biosynthesis, *Annu Rev Physiol* 63 (2001) 193-213.

- [20] F. Arakane, S.R. King, Y. Du, C.B. Kallen, L.P. Walsh, H. Watari, D.M. Stocco, J.F. Strauss, 3rd, Phosphorylation of steroidogenic acute regulatory protein (StAR) modulates its steroidogenic activity, *The Journal of biological chemistry* 272(51) (1997) 32656-62.
- [21] A. Bhangoo, W.X. Gu, S. Pavlakis, H. Anhalt, L. Heier, S. Ten, J.L. Jameson, Phenotypic features associated with mutations in steroidogenic acute regulatory protein, *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 90(11) (2005) 6303-9.
- [22] Z. Granot, N. Melamed-Book, A. Bahat, J. Orly, Turnover of StAR protein: roles for the proteasome and mitochondrial proteases, *Molecular and cellular endocrinology* 265-266 (2007) 51-8.
- [23] Z. Granot, O. Kobilier, N. Melamed-Book, S. Eimerl, A. Bahat, B. Lu, S. Braun, M.R. Maurizi, C.K. Suzuki, A.B. Oppenheim, J. Orly, Turnover of mitochondrial steroidogenic acute regulatory (StAR) protein by Lon protease: the unexpected effect of proteasome inhibitors, *Molecular endocrinology* 21(9) (2007) 2164-77.
- [24] A.F. Castillo, U. Orlando, K.E. Helfenberger, C. Poderoso, E.J. Podesta, The role of mitochondrial fusion and StAR phosphorylation in the regulation of StAR activity and steroidogenesis, *Molecular and cellular endocrinology* 408 (2015) 73-9.
- [25] K. Morohaku, S.H. Pelton, D.J. Daugherty, W.R. Butler, W. Deng, V. Selvaraj, Translocator protein/peripheral benzodiazepine receptor is not required for steroid hormone biosynthesis, *Endocrinology* 155(1) (2014) 89-97.
- [26] S.E. Pollack, E.E. Furth, C.B. Kallen, F. Arakane, M. Kiriakidou, K.F. Kozarsky, J.F. Strauss, 3rd, Localization of the steroidogenic acute regulatory protein in human tissues, *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 82(12) (1997) 4243-51.
- [27] H. Watari, F. Arakane, C. Moog-Lutz, C.B. Kallen, C. Tomasetto, G.L. Gerton, M.C. Rio, M.E. Baker, J.F. Strauss, 3rd, MLN64 contains a domain with homology to the steroidogenic acute regulatory protein (StAR) that stimulates steroidogenesis, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94(16) (1997) 8462-7.
- [28] C. Tomasetto, C. Regnier, C. Moog-Lutz, M.G. Mattei, M.P. Chenard, R. Lidereau, P. Basset, M.C. Rio, Identification of four novel human genes amplified and overexpressed in breast carcinoma and localized to the q11-q21.3 region of chromosome 17, *Genomics* 28(3) (1995) 367-76.
- [29] C. Moog-Lutz, C. Tomasetto, C.H. Regnier, C. Wendling, Y. Lutz, D. Muller, M.P. Chenard, P. Basset, M.C. Rio, MLN64 exhibits homology with the steroidogenic acute regulatory protein (STAR) and is over-expressed in human breast carcinomas, *International journal of cancer. Journal international du cancer* 71(2) (1997) 183-91.
- [30] F. Alpy, M.E. Stoeckel, A. Dierich, J.M. Escola, C. Wendling, M.P. Chenard, M.T. Vanier, J. Gruenberg, C. Tomasetto, M.C. Rio, The steroidogenic acute regulatory protein homolog MLN64, a late endosomal cholesterol-binding protein, *The Journal of biological chemistry* 276(6) (2001) 4261-9.
- [31] R. van der Kant, I. Zondervan, L. Janssen, J. Neefjes, Cholesterol-binding molecules MLN64 and ORP1L mark distinct late endosomes with transporters ABCA3 and NPC1, *Journal of lipid research* 54(8) (2013) 2153-65.
- [32] M. Charman, B.E. Kennedy, N. Osborne, B. Karten, MLN64 mediates egress of cholesterol from endosomes to mitochondria in the absence of functional Niemann-Pick Type C1 protein, *Journal of lipid research* 51(5) (2010) 1023-34.

- [33] M. Zhang, P. Liu, N.K. Dwyer, L.K. Christenson, T. Fujimoto, F. Martinez, M. Comly, J.A. Hanover, E.J. Blanchette-Mackie, J.F. Strauss, 3rd, MLN64 mediates mobilization of lysosomal cholesterol to steroidogenic mitochondria, *The Journal of biological chemistry* 277(36) (2002) 33300-10.
- [34] R.C. Tuckey, H.S. Bose, I. Czerwionka, W.L. Miller, Molten globule structure and steroidogenic activity of N-218 MLN64 in human placental mitochondria, *Endocrinology* 145(4) (2004) 1700-7.
- [35] M. Esparza-Perusquia, S. Olvera-Sanchez, O. Flores-Herrera, H. Flores-Herrera, A. Guevara-Flores, J.P. Pardo, M.T. Espinosa-Garcia, F. Martinez, Mitochondrial proteases act on STARD3 to activate progesterone synthesis in human syncytiotrophoblast, *Biochimica et biophysica acta* 1850(1) (2015) 107-17.
- [36] A. Uribe, J.F. Strauss, 3rd, F. Martinez, Contact sites from human placental mitochondria: characterization and role in progesterone synthesis, *Archives of biochemistry and biophysics* 413(2) (2003) 172-81.
- [37] C.A. Mannella, K. Buttle, B.K. Rath, M. Marko, Electron microscopic tomography of rat-liver mitochondria and their interaction with the endoplasmic reticulum, *BioFactors* 8(3-4) (1998) 225-8.
- [38] D. Brdiczka, Contact sites between mitochondrial envelope membranes. Structure and function in energy- and protein-transfer, *Biochimica et biophysica acta* 1071(3) (1991) 291-312.
- [39] C.R. Hackenbrock, Chemical and physical fixation of isolated mitochondria in low-energy and high-energy states, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 61(2) (1968) 598-605.
- [40] M.Y. Vyssokikh, D. Brdiczka, The function of complexes between the outer mitochondrial membrane pore (VDAC) and the adenine nucleotide translocase in regulation of energy metabolism and apoptosis, *Acta biochimica Polonica* 50(2) (2003) 389-404.
- [41] D.G. Brdiczka, D.B. Zorov, S.S. Sheu, Mitochondrial contact sites: their role in energy metabolism and apoptosis, *Biochimica et biophysica acta* 1762(2) (2006) 148-63.
- [42] M. Crompton, E. Barksby, N. Johnson, M. Capano, Mitochondrial intermembrane junctional complexes and their involvement in cell death, *Biochimie* 84(2-3) (2002) 143-52.
- [43] D. Brdiczka, G. Beutner, A. Ruck, M. Dolder, T. Wallimann, The molecular structure of mitochondrial contact sites. Their role in regulation of energy metabolism and permeability transition, *BioFactors* 8(3-4) (1998) 235-42.
- [44] C. Schulz, A. Schendzielorz, P. Rehling, Unlocking the presequence import pathway, *Trends in cell biology* 25(5) (2015) 265-75.
- [45] M. Bose, R.M. Whittal, W.L. Miller, H.S. Bose, Steroidogenic activity of StAR requires contact with mitochondrial VDAC1 and phosphate carrier protein, *The Journal of biological chemistry* 283(14) (2008) 8837-45.
- [46] L. Issop, J. Fan, S. Lee, M.B. Rone, K. Basu, J. Mui, V. Papadopoulos, Mitochondria-associated membrane formation in hormone-stimulated Leydig cell steroidogenesis: role of ATAD3, *Endocrinology* 156(1) (2015) 334-45.
- [47] S. Olvera-Sanchez, M.T. Espinosa-Garcia, J. Monreal, O. Flores-Herrera, F. Martinez, Mitochondrial heat shock protein participates in placental steroidogenesis, *Placenta* 32(3) (2011) 222-9.

- [48] J.J. Hansen, P. Bross, M. Westergaard, M. Nielsen, H. Eiberg, A.D. Borglum, J. Mogensen, K. Kristiansen, L. Bolund, N. Gregersen, Genomic structure of the human mitochondrial chaperonin genes: HSP60 and HSP10 are localised head to head on chromosome 2 separated by a bidirectional promoter, *Hum Genet* 112(4) (2003) 436.
- [49] S.B. Nadin, L.M. Vargas-Roig, F.D. Cuello-Carrion, D.R. Ciocca, Deoxyribonucleic acid damage induced by doxorubicin in peripheral blood mononuclear cells: possible roles for the stress response and the deoxyribonucleic acid repair process, *Cell Stress Chaperones* 8(4) (2003) 361-72.
- [50] D. Chandra, G. Choy, D.G. Tang, Cytosolic accumulation of HSP60 during apoptosis with or without apparent mitochondrial release: evidence that its pro-apoptotic or pro-survival functions involve differential interactions with caspase-3, *The Journal of biological chemistry* 282(43) (2007) 31289-301.
- [51] S. Somji, J.H. Todd, M.A. Sens, S.H. Garrett, D.A. Sens, Expression of heat shock protein 60 in human proximal tubule cells exposed to heat, sodium arsenite and CdCl<sub>2</sub>, *Toxicol Lett* 115(2) (2000) 127-36.
- [52] F. Trapasso, F. Pichiorri, M. Gaspari, T. Palumbo, R.I. Aqeilan, E. Gaudio, H. Okumura, R. Iuliano, G. Di Leva, M. Fabbri, D.E. Birk, C. Raso, K. Green-Church, L.G. Spagnoli, S. Venuta, K. Huebner, C.M. Croce, Fhit interaction with ferredoxin reductase triggers generation of reactive oxygen species and apoptosis of cancer cells, *The Journal of biological chemistry* 283(20) (2008) 13736-44.
- [53] J.E. Alard, M. Dueymes, P. Youinou, C. Jamin, Modulation of endothelial cell damages by anti-Hsp60 autoantibodies in systemic autoimmune diseases, *Autoimmun Rev* 6(7) (2007) 438-43.
- [54] B.J. Soltys, R.S. Gupta, Immunoelectron microscopic localization of the 60-kDa heat shock chaperonin protein (Hsp60) in mammalian cells, *Exp Cell Res* 222(1) (1996) 16-27.
- [55] Z. Xu, A.L. Horwich, P.B. Sigler, The crystal structure of the asymmetric GroEL-GroES-(ADP)<sub>7</sub> chaperonin complex, *Nature* 388(6644) (1997) 741-50.
- [56] H.R. Saibil, W.A. Fenton, D.K. Clare, A.L. Horwich, Structure and allostery of the chaperonin GroEL, *J Mol Biol* 425(9) (2013) 1476-87.
- [57] T. Okamoto, R. Ishida, H. Yamamoto, M. Tanabe-Ishida, A. Haga, H. Takahashi, K. Takahashi, D. Goto, E. Grave, H. Itoh, Functional structure and physiological functions of mammalian wild-type HSP60, *Archives of biochemistry and biophysics* 586 (2015) 10-9.
- [58] W.H. Leung, Q.P. Vong, W. Lin, D. Bouck, S. Wendt, E. Sullivan, Y. Li, R. Bari, T. Chen, W. Leung, PRL-3 mediates the protein maturation of ULBP2 by regulating the tyrosine phosphorylation of HSP60, *Journal of immunology* 194(6) (2015) 2930-41.
- [59] B. Henderson, M.A. Fares, P.A. Lund, Chaperonin 60: a paradoxical, evolutionarily conserved protein family with multiple moonlighting functions, *Biol Rev Camb Philos Soc* 88(4) (2013) 955-87.
- [60] F.U. Hartl, R. Hlodan, T. Langer, Molecular chaperones in protein folding: the art of avoiding sticky situations, *Trends Biochem Sci* 19(1) (1994) 20-5.
- [61] R.U. Mattoo, P. Goloubinoff, Molecular chaperones are nanomachines that catalytically unfold misfolded and alternatively folded proteins, *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 71(17) (2014) 3311-25.
- [62] S. Priya, S.K. Sharma, P. Goloubinoff, Molecular chaperones as enzymes that catalytically unfold misfolded polypeptides, *FEBS letters* 587(13) (2013) 1981-7.

- [63] S.K. Calderwood, S.S. Mambula, P.J. Gray, Jr., Extracellular heat shock proteins in cell signaling and immunity, *Ann N Y Acad Sci* 1113 (2007) 28-39.
- [64] A.M. Czarnecka, C. Campanella, G. Zummo, F. Cappello, Mitochondrial chaperones in cancer: from molecular biology to clinical diagnostics, *Cancer Biol Ther* 5(7) (2006) 714-20.
- [65] C.C. Deocaris, S.C. Kaul, R. Wadhwa, On the brotherhood of the mitochondrial chaperones mortalin and heat shock protein 60, *Cell Stress Chaperones* 11(2) (2006) 116-28.
- [66] R. Arya, M. Mallik, S.C. Lakhota, Heat shock genes - integrating cell survival and death, *J Biosci* 32(3) (2007) 595-610.
- [67] L. Tutar, Y. Tutar, Heat shock proteins; an overview, *Curr Pharm Biotechnol* 11(2) (2010) 216-22.
- [68] H. Itoh, A. Komatsuda, H. Ohtani, H. Wakui, H. Imai, K. Sawada, M. Otaka, M. Ogura, A. Suzuki, F. Hamada, Mammalian HSP60 is quickly sorted into the mitochondria under conditions of dehydration, *Eur J Biochem* 269(23) (2002) 5931-8.
- [69] P. Maiti, J. Manna, S. Veleri, S. Frautschy, Molecular chaperone dysfunction in neurodegenerative diseases and effects of curcumin, *Biomed Res Int* 2014 (2014) 495091.
- [70] A. Bahat, S. Perlberg, N. Melamed-Book, I. Lauria, T. Langer, J. Orly, StAR enhances transcription of genes encoding the mitochondrial proteases involved in its own degradation, *Molecular endocrinology* 28(2) (2014) 208-24.
- [71] A. Meinhardt, J. Seitz, M. Arslan, G. Aumuller, G.F. Weinbauer, Hormonal regulation and germ cell-specific expression of heat shock protein 60 (hsp60) in the testis of macaque monkeys (*Macaca mulatta* and *M. fascicularis*), *Int J Androl* 21(5) (1998) 301-7.
- [72] Y. Nagumo, H. Kakeya, M. Shoji, Y. Hayashi, N. Dohmae, H. Osada, Epilactaene binds human Hsp60 Cys442 resulting in the inhibition of chaperone activity, *Biochem J* 387(Pt 3) (2005) 835-40.
- [73] F. Martinez, T. Espinosa-Garcia, O. Flores-Herrera, J.P. Pardo, Respiratory control induced by ATP in human term placental mitochondria, *Placenta* 14(3) (1993) 321-31.
- [74] C. Gomez-Concha, O. Flores-Herrera, S. Olvera-Sanchez, M.T. Espinosa-Garcia, F. Martinez, Progesterone synthesis by human placental mitochondria is sensitive to PKA inhibition by H89, *Int J Biochem Cell Biol* 43(9) (2011) 1402-11.
- [75] A. Radhakrishnan, L.P. Sun, H.J. Kwon, M.S. Brown, J.L. Goldstein, Direct binding of cholesterol to the purified membrane region of SCAP: mechanism for a sterol-sensing domain, *Mol Cell* 15(2) (2004) 259-68.
- [76] T. Sugawara, J.A. Holt, D. Driscoll, J.F. Strauss, 3rd, D. Lin, W.L. Miller, D. Patterson, K.P. Clancy, I.M. Hart, B.J. Clark, et al., Human steroidogenic acute regulatory protein: functional activity in COS-1 cells, tissue-specific expression, and mapping of the structural gene to 8p11.2 and a pseudogene to chromosome 13, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92(11) (1995) 4778-82.
- [77] P. Rubtsov, M. Karmanov, P. Sverdlova, P. Spirin, A. Tiulpakov, A novel homozygous mutation in CYP11A1 gene is associated with late-onset adrenal insufficiency and hypospadias in a 46,XY patient, *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 94(3) (2009) 936-9.



- [78] N. Okamura, S. Kiuchi, M. Tamba, T. Kashima, S. Hiramoto, T. Baba, F. Dacheux, J.L. Dacheux, Y. Sugita, Y.Z. Jin, A porcine homolog of the major secretory protein of human epididymis, HE1, specifically binds cholesterol, *Biochimica et biophysica acta* 1438(3) (1999) 377-87.
- [79] T. Kishida, I. Kostetskii, Z. Zhang, F. Martinez, P. Liu, S.U. Walkley, N.K. Dwyer, E.J. Blanchette-Mackie, G.L. Radice, J.F. Strauss, 3rd, Targeted mutation of the MLN64 START domain causes only modest alterations in cellular sterol metabolism, *The Journal of biological chemistry* 279(18) (2004) 19276-85.
- [80] L. Li, J. Wu, M. Luo, Y. Sun, G. Wang, The effect of heat stress on gene expression, synthesis of steroids, and apoptosis in bovine granulosa cells, *Cell Stress Chaperones* 21(3) (2016) 467-75.
- [81] J.N. Dahlseid, R. Lill, J.M. Green, X. Xu, Y. Qiu, S.K. Pierce, PBP74, a new member of the mammalian 70-kDa heat shock protein family, is a mitochondrial protein, *Mol Biol Cell* 5(11) (1994) 1265-75.
- [82] Z. Liu, D.M. Stocco, Heat shock-induced inhibition of acute steroidogenesis in MA-10 cells is associated with inhibition of the synthesis of the steroidogenic acute regulatory protein, *Endocrinology* 138(7) (1997) 2722-8.
- [83] R.S. Gupta, Mitochondria, molecular chaperone proteins and the in vivo assembly of microtubules, *Trends Biochem Sci* 15(11) (1990) 415-8.
- [84] J. Chenevert, G. Pruliere, H. Ishii, C. Sardet, T. Nishikata, Purification of mitochondrial proteins HSP60 and ATP synthase from ascidian eggs: implications for antibody specificity, *PloS one* 8(1) (2013) e52996.
- [85] H.S. Bose, M.A. Baldwin, W.L. Miller, Evidence that StAR and MLN64 act on the outer mitochondrial membrane as molten globules, *Endocr Res* 26(4) (2000) 629-37.
- [86] I. Hanukoglu, B.S. Suh, S. Himmelhoch, A. Amsterdam, Induction and mitochondrial localization of cytochrome P450scc system enzymes in normal and transformed ovarian granulosa cells, *J Cell Biol* 111(4) (1990) 1373-81.
- [87] A. Roostae, E. Barbar, P. Lavigne, J.G. LeHoux, The mechanism of specific binding of free cholesterol by the steroidogenic acute regulatory protein: evidence for a role of the C-terminal alpha-helix in the gating of the binding site, *Biosci Rep* 29(2) (2009) 89-101.
- [88] S. Chen, D. Bawa, S. Besshoh, J.W. Gurd, I.R. Brown, Association of heat shock proteins and neuronal membrane components with lipid rafts from the rat brain, *J Neurosci Res* 81(4) (2005) 522-9.
- [89] Q. Xiao, K. Mandal, G. Schett, M. Mayr, G. Wick, F. Oberhollenzer, J. Willeit, S. Kiechl, Q. Xu, Association of serum-soluble heat shock protein 60 with carotid atherosclerosis: clinical significance determined in a follow-up study, *Stroke* 36(12) (2005) 2571-6.
- [90] K. Mandal, G. Foteinos, M. Jahangiri, Q. Xu, Role of antiheat shock protein 60 autoantibodies in atherosclerosis, *Lupus* 14(9) (2005) 742-6.

## APÉNDICE

### ARTICULO REQUISITO DE EGRESO PARA LA OBTENCIÓN DE GRADO



## Original article

# The heat shock protein 60 promotes progesterone synthesis in mitochondria of JEG-3 cells



Jessica Monreal-Flores<sup>a</sup>, María Teresa Espinosa-García<sup>a</sup>, Alejandro García-Regalado<sup>b</sup>, Fabian Arechavaleta-Velasco<sup>c</sup>, Federico Martínez<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70-159, Coyoacán, 04510 Mexico City, Mexico

<sup>b</sup>Facultad de Enfermería, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Avenida Niño Artillero 130, 78240, Zona Universitaria, SLP, Mexico

<sup>c</sup>Research Unit in Reproductive Medicine, UMAE Hospital de Gineco-Obstetricia, No. 4 Luis Castelazo Ayala, IMSS, Mexico City, Mexico

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 16 December 2016

Received in revised form 5 April 2017

Accepted 12 April 2017

Available online 20 April 2017

## Keywords:

Heat shock protein 60 (HSP60)

Mitochondria

JEG-3 cells

HEK293 cells

Cholesterol transport

## ABSTRACT

Progesterone synthesis in human placenta is essential to maintain pregnancy. The limiting step in placental progesterone synthesis is cholesterol transport from the cytoplasm to the inner mitochondrial membrane. Multiple proteins located in mitochondrial contact sites seem to play a key role in this process. Previously, our group identified the heat shock protein 60 (HSP60) as part of mitochondrial contact sites in human placenta, suggesting its participation in progesterone synthesis. Here, we examined the role of HSP60 in progesterone synthesis. Our results show that over-expression of HSP60 in human placental choriocarcinoma cells (JEG-3) and human embryonic kidney 293 cells (HEK293) promotes progesterone synthesis. Furthermore, incubation of the HSP60 recombinant protein with intact isolated mitochondria from JEG-3 cells also promotes progesterone synthesis in a dose-related fashion. We also show that HSP60 interacts with STARD3 and P450scc proteins from mitochondrial membrane contact sites. Finally, we show that the HSP60 recombinant protein binds cholesterol. Our results demonstrate that HSP60 participates in mitochondrial progesterone synthesis. These findings provide novel insights into progesterone synthesis in the human placenta and its role in maintaining pregnancy.

© 2017 Society for Biology of Reproduction & the Institute of Animal Reproduction and Food Research of Polish Academy of Sciences in Olsztyn. Published by Elsevier Sp. z o.o. All rights reserved.

## 1. Introduction

Progesterone is a steroid hormone whose major functions are to prepare the uterine lining for implantation of the embryo, maintaining pregnancy and carrying it to term [1]. Progesterone is synthesized in the human placenta by mitochondria of syncytiotrophoblast cells [2], where cholesterol is converted to progesterone, a process known as steroidogenesis [3]. The rate-limiting step of placental progesterone synthesis is the transport of cholesterol from the outer to the inner mitochondrial membrane [4–6].

In tissues such as the adrenal cortex and corpus luteum, the transport of cholesterol to the mitochondrial inner membrane is mediated by the steroidogenic acute regulatory protein, commonly known as StAR (STARD1) [7,8]. In the case of the human placenta, the STARD1 protein is not expressed [9], suggesting an alternative

cholesterol transport pathway into mitochondria. Recent reports suggest that the STARD3 protein (also known as MLN64) is involved in mitochondrial cholesterol transport in the placenta [10–12]. The STARD3 is expressed constitutively in the placenta, and contains a START (StAR-related lipid-transfer) domain at its C-terminal, which binds cholesterol [13]. Furthermore, recombinant STARD3 or its C-terminal regions stimulate progesterone synthesis in mitochondria isolated from human placenta [14].

In a previous paper, we identified a 60-kDa protein in mitochondria isolated from human placenta by using an antibody that recognizes the START domain of STARD3; this protein was identified by two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry as the heat shock protein 60 (HSP60).

Both proteins, HSP60 and STARD3, are localized in mitochondrial contact sites, suggesting that the HSP60 location could contribute to placental steroidogenesis, involved in cholesterol movement among mitochondrial membranes [15].

The HSP60 belongs to the chaperonin family that regulates the folding and assembling of proteins in mitochondria [16–18], however, recent reports indicate that the HSP60 protein acts in

\* Corresponding author.

E-mail address: [fedem@bq.unam.mx](mailto:fedem@bq.unam.mx) (F. Martínez).

multiple biological activities that have nothing to do with protein folding [16].

The aim of the present study was to evaluate the direct participation of HSP60 in progesterone synthesis in mitochondria isolated from a human placental choriocarcinoma cell line (JEG-3). The JEG-3 cells have been widely used as a model for steroidogenesis studies in the placenta, since they express at a high level the specific steroidogenic enzymes [19–22]. Here, we demonstrate that HSP60 significantly increased progesterone synthesis in JEG-3 cells, as well as in HEK293, converted to steroidogenic by transfection of the cytochrome P450<sub>scc</sub>-chain system (F2) and 3 $\beta$ -HSD (3-beta-hydroxysteroid dehydrogenase isomerase). Furthermore, the recombinant HSP60 protein stimulated progesterone synthesis when added directly to mitochondria isolated from JEG-3 cells. We also demonstrate that HSP60 binds cholesterol. In addition, HSP60 interacts with P450<sub>scc</sub> and STARD3 in mitochondrial contact sites. These data suggest that HSP60 plays a key role in progesterone synthesis.

## 2. Materials and methods

All reagents were purchased from Sigma Aldrich unless otherwise specified.

### 2.1. Plasmids and cell lines

The cDNA encoding the human mitochondrial HSP60 (pGEM-HSP60) was provided by Dr. Radhey S. Gupta (McMaster University, Canada). The plasmid (F2), consisting of a fusion protein from human P450<sub>scc</sub>, adrenodoxin and adrenodoxin reductase [23], pECE (empty vector), the plasmid that encodes 3 $\beta$ -HSD (pCMV-3 $\beta$ -HSD) and the plasmid that encodes His6-STARD3 (pET22b-STARD3) were provided by Dr. Jerome Strauss (Virginia Commonwealth University, School of Medicine, USA). The JEG-3 cell line was provided by Dr. Javier Camacho (Pharmacology, CINVESTAV-IPN, Mexico) and the HEK293 cell line (human embryonic kidney) was provided by Dr. Alejandro García (UASLP, Mexico). Both cell lines were maintained in culture in DMEM medium (Gibco), supplemented with 10% fetal bovine serum (Invitrogen), 100 IU/ml penicillin and 100  $\mu$ g/ml streptomycin at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere.

### 2.2. Transient transfection

The cells were seeded in a 12-well plate at a density of  $2.4 \times 10^5$  cells/well on day 0. On day 1, cells were transfected with FuGENE6 (Roche), according to the manufacturer's instructions. The total amount of DNA in all transfections was 2  $\mu$ g/well. The empty vector (pECE) was used to maintain an equimolar concentration in each experiment. JEG-3 cells were transfected with pECE or HSP60, whereas HEK293 cells were transformed into steroidogenic by co-transfecting 3 $\beta$ -HSD and F2, as previously described [24], with or without HSP60. On day 3, the medium was collected and frozen at -20°C until steroid analysis (see progesterone synthesis), and cells were harvested for protein determinations, using bovine serum albumin (BSA) as standard [25].

### 2.3. Expression and purification of recombinant HSP60 and STARD3

The human HSP60 cDNA was amplified by PCR using the primers 5'-CCGCACATATGCTTCGGTTACCCA-3' for sense and 5'-AAAGGTGCATCCATAATTGGATAC-3' for antisense, from pGEM-HSP60, and was subcloned into pET-19b (Novagen) at BamHI and NdeI sites. Ligation product was transformed in *Escherichia coli* strain DH5- $\alpha$  and verified by sequencing. For purification of proteins HSP60 and STARD3, *E. coli* strain BL21 cells (pLys) were

transformed with plasmid obtained in the previous step (pET19b-HSP60) and (pET22b-STARD3). The bacterial culture was grown at 37°C in 250 ml LB medium supplemented with 50  $\mu$ g/ml of ampicillin. The culture was induced with 1 mM IPTG when the optical density at 600 nm reached 0.6–1.0. Cells were harvested by centrifugation at 20,000g for 30 min and lysed with lysis buffer (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 10 mM imidazole, pH 8.0) containing 1 mg/ml lysozyme, followed by sonication on ice for 3 times, 30 s pulses, using a MSE Soniprep (UK) model 150. The cell lysates were centrifuged at 20,000g for 30 min, and the supernatant was collected for purification. The pET19b and pET22b vectors allows expression of recombinant proteins with a histidine tag. His10-HSP60 and His6-STARD3 were purified by incubation and rotation with Ni-NTA resin (Qiagen) for 2 h at 4°C. The resin was collected by centrifugation and washed three times with ice-cold lysis buffer containing 20 mM imidazole. Bound proteins were eluted with lysis buffer containing 250 mM imidazole. The eluted fractions were dialyzed overnight against a buffer containing 20 mM HEPES-KOH, pH 7.5, 150 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, and 0.5 mM dithiothreitol; protein concentration was determined by Bradford.

### 2.4. Immunoprecipitation and Western blot

The whole-cell extracts were obtained by lysis of JEG-3 cells in lysis buffer (5 mM EDTA, 150 mM NaCl, 5 mM Tris-HCl pH 9, 1% Nonidet-P40 and 1.2 mg/ml complete protease inhibitor cocktail; Roche). The protein extracts were forced through a 22-gauge needle 10 times and centrifuged for 10 min at 17,000g at 4°C; protein concentration was determined by the Bradford method. The supernatants were incubated for 12 h at 4°C with 5  $\mu$ g/ml anti-HSP60 (sc-13966, Santa Cruz) or anti-STARD3 (sc-26062, Santa Cruz). The immune complexes were recovered by incubation for 2 h at 4°C with 25  $\mu$ l of protein A/G agarose (Roche). Beads were washed three times with lysis buffer and boiled in 1x Laemmli sample buffer. Immunoprecipitated proteins were fractionated on 10% SDS-PAGE and transferred to a PVDF membrane (Millipore). Expression of proteins and putative interactions were detected by western blot using an anti-HSP60 antibody at dilution (1:1000), anti-P450<sub>scc</sub> (1:300) (sc-292456, Santa Cruz), and anti-STARD3 (1:1000). The mouse monoclonal anti-rabbit IgG, light chain specific antibody (1:10,000) (211-032-171, Jackson Immuno Research) and the mouse monoclonal anti-goat, light chain specific antibody (1:10,000) (205-032-176, Jackson Immuno Research) were used to respectively detect primary antibody.

### 2.5. Isolation of mitochondria from JEG-3 cells

Mitochondria were isolated from JEG-3 cells using a mitochondria isolation kit (MITOISO2, Sigma-Aldrich), following manufacturer's instructions. Isolated mitochondria were dissolved in 150  $\mu$ l storage buffer (50 mM HEPES, pH 7.5, containing 1.25 M sucrose, 5 mM ATP, 0.4 mM ADP, 25 mM sodium succinate, 10 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, and 5 mM DTT). The mitochondrial integrity was tested by measuring mitochondrial respiration. Briefly, oxygen consumption was determined polarographically using a Clark type electrode in a reaction mixture containing 250 mM sucrose, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM succinate, 10 mM H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 1 mM EGTA, 0.1% BSA, at pH 7.4. Mitochondria (1 mg/ml) were incubated at 37°C and oxygen consumption was stimulated by the addition of 300–500 nmoles ADP. Mitochondria respiratory control (RC) was determined as the rate between oxygen uptake in state 3 and oxygen uptake in state 4; only mitochondria with a value of RC higher than 4 were used to assure mitochondrial integrity [26].

## 2.6. Progesterone synthesis

Mitochondria isolated from JEG-3 cells (50  $\mu$ g of protein) were incubated in progesterone synthesis medium (P4M) containing 120 mM KCl, 10 mM MOPS, 0.5 mM EGTA, 10 mM isocitrate, 4  $\mu$ g of aprotinin/ml, 1  $\mu$ M leupeptin, 5 mM  $K_2HPO_4$ , pH 7.4 [27], with increasing concentrations of recombinant His10-HSP60 (0–30  $\mu$ M) in a final volume of 50  $\mu$ l. As a negative control, mitochondria were incubated with increasing BSA concentrations (data not shown). After 60 min of incubation at 37 °C, the reaction was stopped by adding 75  $\mu$ l of cold methanol. Aliquots of 50  $\mu$ l of each sample were taken to quantify progesterone. In other experiments, aliquots of 50  $\mu$ l of the culture medium from transfected cells were taken to quantify progesterone 48 h post-transfection.

Progesterone was determined by using the sequential solid-phase competitive chemiluminescent-labeled immunoassay (analytical sensitivity of 0.2 ng/ml) according to the manufacturer's protocol (Immulite Progesterone Kit, USA).

## 2.7. Fluorescence-based binding assay

Fluorescence excitation and emission of cholesterol. A stock solution of cholesterol (0.1 mM) was prepared in ethanol, 10  $\mu$ M of cholesterol was solubilized in 200  $\mu$ l binding buffer containing (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl at pH 7.5, 1 mM DTT, 0.1% Fos-Choline 13, 0.005% [w/v] sodium azide) according to [28], the sample was placed in deep 96-well microplates and the optical absorbance of cholesterol was measured (200–600 nm in 5 nm steps) in an UV and VIS range in an Infinite M1000 plate reader (Tecan Systems).

Fluorescence excitation of cholesterol was at 207 nm (data from absorbance measurements), full emission spectra were collected between 280 and 600 nm; maximal emission was measured at 305 nm.

With excitation and emission data, a cholesterol-binding assay was performed according to [29]. Briefly, different concentrations of the purified His10-HSP60 (2–6  $\mu$ M) were incubated with 6  $\mu$ M cholesterol in the binding buffer for 1 h at 37 °C. In some experiments, constant concentrations of His10-HSP60 (6  $\mu$ M) were incubated with different concentrations of cholesterol (2–6  $\mu$ M). Subsequently, His10-HSP60 was immobilized on Ni-NTA resin, washed three times to remove unbound cholesterol with binding buffer containing 5 mM imidazole. Bound proteins were eluted with binding buffer containing 250 mM imidazole. The cholesterol bound to the eluted proteins was quantified by its intrinsic fluorescence in an Infinite M1000 plate reader (Tecan Systems), where fluorescence excitation was at 207 nm, and emission was measured at 305 nm.

## 2.8. [<sup>3</sup>H] cholesterol binding to His10-HSP60

The radioligand-binding assay was performed according to [29] with modifications. Briefly, different amounts of His10-HSP60 (2–6  $\mu$ M), His6-STARD3 (4–6  $\mu$ M) or fatty acid-free BSA (4–6  $\mu$ M) were incubated with a mixture of 7.8 pmol [<sup>3</sup>H] cholesterol (3000 cpm), and 6  $\mu$ M unlabeled cholesterol for 1 h at 37 °C, in the binding buffer. His10-HSP60 and His6-STARD3 were immobilized on Ni-NTA resin (Qiagen); washed three times to remove unbound cholesterol and bound proteins were eluted with binding buffer containing 250 mM imidazole. The radioactivity of [<sup>3</sup>H] cholesterol bound to the eluted protein was quantified with a Liquid Scintillation Analyzer (Tri-Carb 2910 TR, Perkin Elmer).

## 2.9. Statistics

Statistical significance of the data was determined by analysis of variance and Student-Newman-Keuls test or *t* test, when appropriate, using GraphPad Prism version 6.0 software (San Diego, CA). \**p* < 0.05 was considered as statistically significant difference.

## 3. Results

### 3.1. HSP60 stimulated progesterone synthesis in JEG-3 cells and transformed HEK293 cells

To investigate the functional role of HSP60 in progesterone synthesis, we measured the amount of progesterone released in the culture medium from JEG-3 cells transfected with wild-type HSP60. Fig. 1A shows that over-expression of HSP60 significantly increased progesterone synthesis as compared to the control (cells transfected with the empty vector). Over-expression of HSP60 was verified by western blot analyses (Fig. 1B). The effect of HSP60 over-expression on progesterone synthesis was also demonstrated in non-steroidogenic HEK293 cells. These cells provide a suitable low noise model for studying the steroidogenesis, since not contain components of the steroidogenic machinery present in normal steroid producing cells [30]. The HEK293 cells were endowed with steroidogenic activity by co-transfection of F2 with the enzyme 3 $\beta$ -HSD, this co-transfection has been successfully used in diverse reports to convert non-steroidogenic cells into steroidogenic [9,11].

As shown in Fig. 2, the transfection with F2, 3 $\beta$ -HSD, and HSP60 significantly increased progesterone synthesis compared to the control (cells transfected with F2, 3 $\beta$ -HSD, and the empty vector). These results suggest that HSP60 participates in progesterone synthesis.

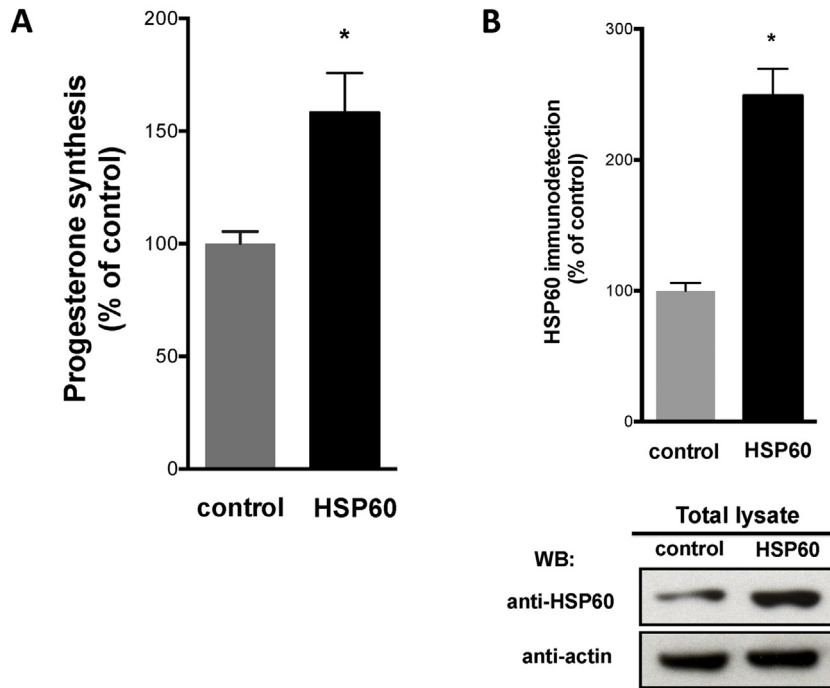
### 3.2. HSP60 stimulated progesterone synthesis at the mitochondrial level

A recombinant HSP60 fused with a His10-tag was obtained. The identity of the purified protein was confirmed by western blot, where the anti-His and anti-HSP60 antibodies detected a single protein of the expected molecular weight for His10-HSP60 (Fig. 3A).

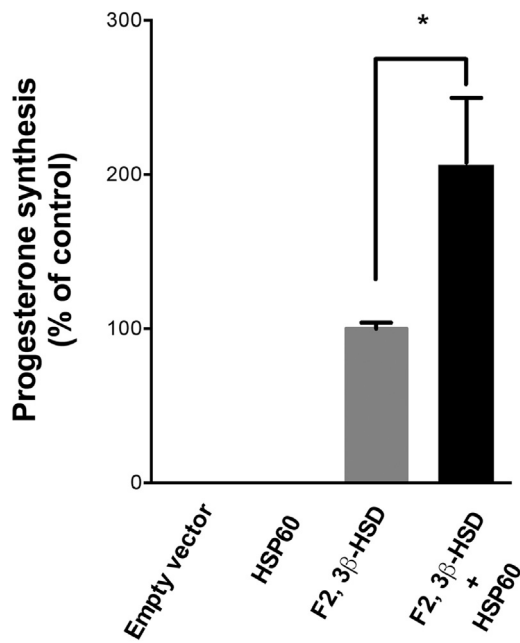
To determine whether HSP60 can act on mitochondria promoting the synthesis of progesterone, we performed an *in vitro* assay using mitochondria isolated from JEG-3 cells incubated with increasing concentrations of His10-HSP60 (Fig. 3B). The results showed that addition of HSP60 to mitochondria increased progesterone synthesis in a dose-dependent manner with the maximum increase achieved at 30  $\mu$ M of His10-HSP60 (600% increase vs. control without protein), whereas 30  $\mu$ M of BSA showed no effect on progesterone synthesis (data not shown). These results suggest that HSP60 acts on mitochondria to stimulate progesterone synthesis from the cholesterol endogenously present in the outer mitochondrial membrane.

### 3.3. HSP60 interacted with the steroidogenic proteins STARD3 and P450scc

The transport of cholesterol from the outer membrane to the inner mitochondrial membrane and its conversion to progesterone requires the participation of multiple proteins associated with the contact sites, such as proteins STARD3 and P450scc. To determine whether the endogenous HSP60 interacts with these proteins, we immunoprecipitated HSP60 from JEG-3 cells. As shown in Fig. 4, both STARD3 and P450scc co-immunoprecipitated with HSP60, whereas STARD3 immunoprecipitates only interacted with HSP60,



**Fig. 1.** HSP60 increased progesterone synthesis in placental cells. (A) Left, JEG-3 cells were transfected with plasmids expressing the human HSP60 or pECE (control). At 72 h after transfection, the medium was collected and progesterone synthesis was assayed as described in the Methods Section; cells were harvested for protein determinations. Mean progesterone level was 3.78 ng/ml in control and 6.0 ng/ml in HSP60. Progesterone synthesis values are expressed as percentage of the median control value of three independent experiments in triplicate (means  $\pm$  SEM,  $^*P < 0.05$  compared to cells transfected with the empty vector (control) assessed by *t* test analysis). (B) Right graph represents the mean densitometric values of HSP60 from three independent experiments (means  $\pm$  SEM,  $^*P < 0.05$  compared to cells transfected with the empty vector (control) assessed by *t* test analysis). Bottom panel shows the expression of HSP60 detected by western blot (WB) using specific antibodies. A representative blot is presented.



**Fig. 2.** HSP60 increased progesterone synthesis in non-steroidogenic cells. HEK293 cells were transfected with plasmids expressing the P450scc system (F2) and enzyme 3 $\beta$ -HSD and co-transfected with empty vector (positive control), or HSP60. As a negative control, cells were transfected with empty vector or HSP60 only. At 72 h after transfection, the medium was collected and progesterone synthesis was assessed as described in the Methods Section. Mean progesterone level was 0.75 ng/ml in positive control and 1.56 ng/ml in cells co-transfected with HSP60. Progesterone synthesis values are expressed as percentage of the median positive control value of three independent experiments in triplicate (means  $\pm$  SEM,  $^*P < 0.05$  compared to the positive control, assessed by analysis of variance and Newman-Keuls test).

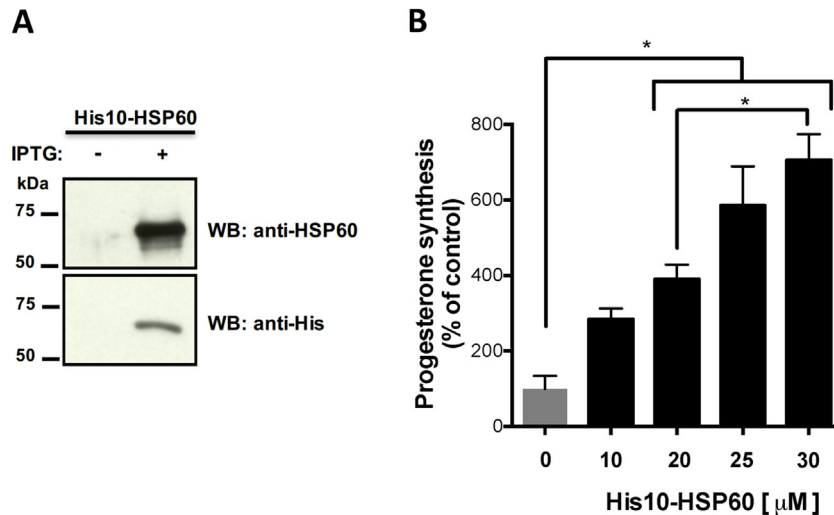
but not P450scc. Rabbit pre-immune serum was used for immunoprecipitation as negative control where pre-immune serum did not recognize the HSP60 protein (See Supplemental Fig. S1 in the online version at DOI:<http://dx.doi.org/10.1016/j.repbio.2017.04.001>).

### 3.4. The HSP60 protein binds cholesterol

Several proteins such as STARD1 and STARD3 have the ability to bind cholesterol and mediate cholesterol transport into the mitochondria. To determine whether the HSP60 has the capacity to bind cholesterol, we used the recombinant His10-HSP60 protein and performed *in vitro* cholesterol binding assays measuring intrinsic fluorescence of cholesterol. The first step was to determine whether cholesterol presents intrinsic fluorescence. The absorbance of cholesterol was determined at a wavelength range of 200–600 nm, where the maximum absorbance intensity peak occurred at  $\sim$ 207 nm (data not shown), these data were used to excite the cholesterol molecule. Fluorescence excitation was at 207 nm and full emission spectra were collected between 280 and 600 nm. As shown in Fig. 5A, the maximum fluorescence intensity peak occurred at 305 nm. Fig. 5B shows that fluorescence increased in direct proportion to the amount of cholesterol added. These results indicate that the amount of cholesterol can be measured by its intrinsic fluorescence.

To determine if cholesterol binds to HSP60, either increasing concentrations of His10-HSP60 with a fixed cholesterol concentration or increasing concentrations of cholesterol with fixed concentrations of His10-HSP60 were incubated. Protein-bound to cholesterol was isolated by affinity precipitation and quantified by fluorometry. Fig. 5C and D show that cholesterol binds to His10-HSP60 in a dose-dependent and saturable manner at 4  $\mu$ M of the protein. These results suggest that HSP60 binds cholesterol.

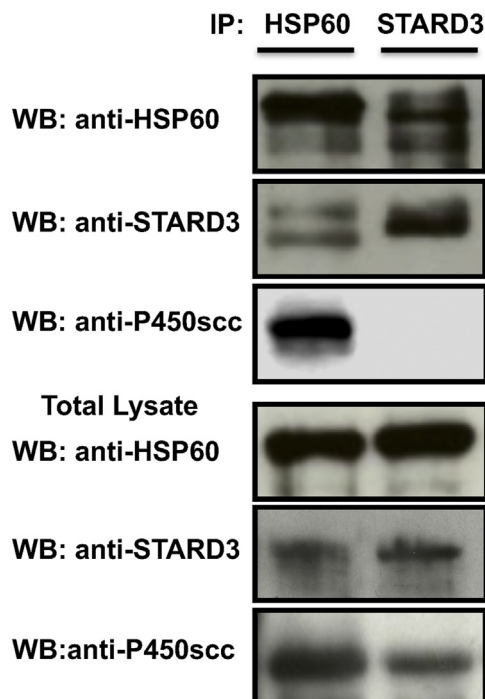




**Fig. 3.** HSP60 stimulated progesterone synthesis in mitochondria of JEG-3 cells. (A) His10-HSP60 was expressed and purified from *E. coli* BL21 and the identity was confirmed by western blot (WB) using anti-histidines and anti-HSP60 antibodies. (B) Mitochondria (50 μg protein) isolated from JEG-3 cells were incubated with different concentrations of the recombinant His10-HSP60 (10–30 μM) during 1 h at 37 °C in P4M medium, subsequently the medium was collected and progesterone synthesis was assayed as described in the Methods Section. Left graph represents the mean progesterone synthesis values of three independent experiments in triplicate (means ± SEM, \**P* < 0.05 compared to mitochondria without the HSP60 (control), assessed by analysis of variance and Newman-Keuls test).

To confirm that HSP60 binds cholesterol, we incubated the His10-HSP60 with [<sup>3</sup>H] cholesterol. Protein-bound to [<sup>3</sup>H] cholesterol was isolated again by affinity precipitation and measured in a liquid scintillation counter. The results show once again that cholesterol binds to His10-HSP60 in a dose-dependent manner (Fig. 6). Denaturation with urea on recombinant His10-HSP60 decreased its ability to bind cholesterol. This result suggests that

the capacity of HSP60 to bind cholesterol depends of its native-state conformation (Fig. 6). Two control experiments for specificity of [<sup>3</sup>H] cholesterol binding were also conducted. In the first, His10-HSP60 used in the previous assay was replaced with His6-STAR3, a protein that is known to bind cholesterol. The results show that cholesterol binds to His6-STAR3 in a dose-dependent manner (Fig. 6B), whereas STAR3 binds cholesterol with a higher affinity than the HSP60 protein. BSA, was used as second control. As shown in Fig. 6B, BSA did not show a significant binding to cholesterol, which is consistent with a previous report [31]. These results indicate that HSP60 specifically binds cholesterol.



**Fig. 4.** HSP60 interacted with steroidogenic proteins. HSP60 was immunoprecipitated from JEG-3 cells; the presence of STAR3 and P450scc in the HSP60 immunoprecipitate and total protein was detected by western blot (first column). STAR3 was immunoprecipitated from JEG-3 cells and the presence of HSP60 in the STAR3 immunoprecipitate and total protein were detected by western blot using specific antibodies (last column). Image shows one representative experiment of three independent ones. WB=western blot, IP=Immunoprecipitation.

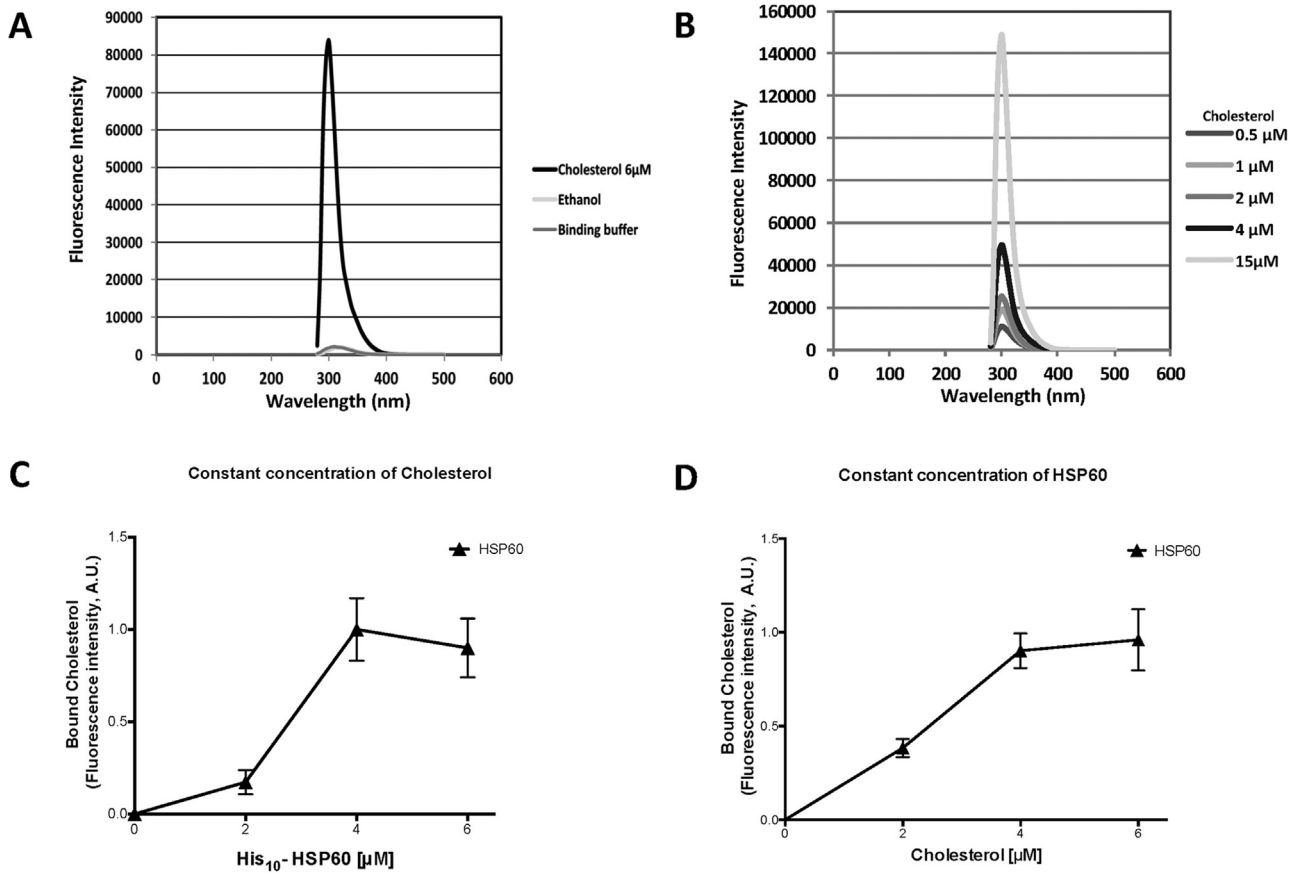
#### 4. Discussion

Progesterone synthesis is essential to maintain pregnancy and fetal development; however, the molecular mechanisms that regulate progesterone synthesis in the placenta are not well understood.

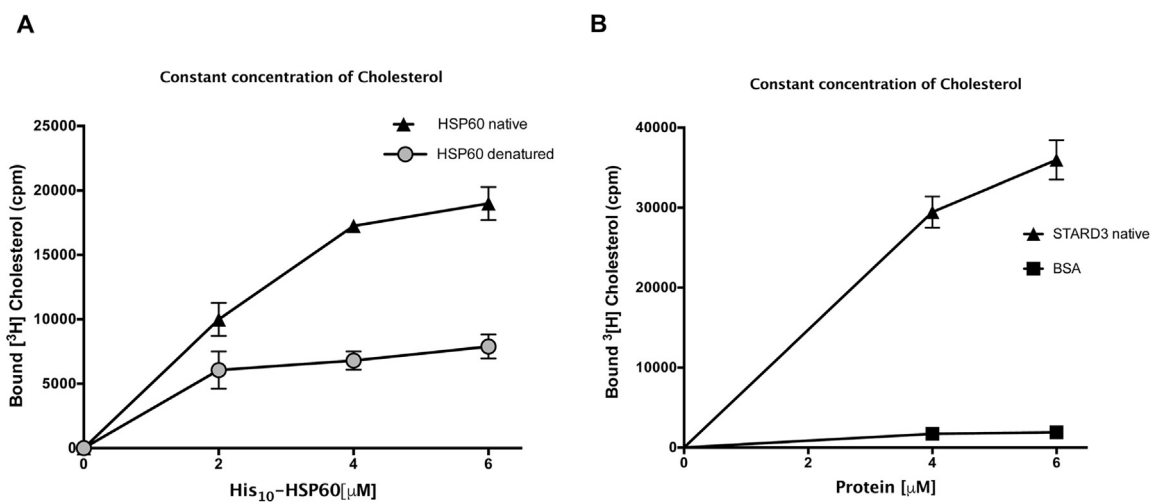
It has been proposed that the STAR3 protein participates in steroidogenesis in tissues that do not express STAR, such as the placenta [11]. However, mutations in the STAR domain of the STAR3 protein (domain that binds cholesterol) do not show steroidogenesis defects [32], indicating that other proteins are involved in steroidogenesis.

It has been suggested that a set of particular proteins associated to the mitochondrial contact sites are involved in cholesterol transport favoring placental steroidogenesis [33–35].

For the human placenta, it has been suggested that HSP60 plays a role in progesterone synthesis, as it has a 26.1% identity with the STAR domain of the STAR3 protein. In addition, inhibition of HSP60 labeled with fluorescein maleimide produces a decreased progesterone synthesis in placental mitochondria [15]. In the present study, we show that over-expression of HSP60 increased significantly progesterone synthesis in steroidogenic human placental JEG-3 cells. Furthermore, in non-steroidogenic HEK293 cells, transformed into steroidogenic cells by the over-expression of F2 and 3β-HSD, the addition of HSP60 increased progesterone synthesis again. Consistent with these data, higher levels of HSP60 in steroidogenic cells and lower levels of HSP60 in non-steroidogenic cells have been reported [36].



**Fig. 5.** HSP60 binds to cholesterol. (A) The cholesterol molecule was excited at a wavelength of 207 nm and the emission spectra were obtained with a Tecan Infinite M1000 microplate reader (emission collected at 305 nm). Binding buffer and ethanol were used as negative control fluorescence reagents as described in the Methods Section. (B) Different concentrations of cholesterol (0.5–15 μM) were excited at a wavelength of 207 nm and their emission was collected at 305 nm. (C) Indicated concentrations of His<sub>10</sub>-HSP60 were incubated with 6 μM cholesterol for 1 h at 37 °C. The cholesterol bound to eluted proteins was quantified by measuring the fluorescence intensity of cholesterol. (D) The indicated concentrations of cholesterol were incubated with 6 μM His<sub>10</sub>-HSP60 for 1 h at 37 °C. The cholesterol bound to eluted proteins was quantified by measuring the fluorescence intensity of cholesterol with a Tecan Infinite M1000 microplate reader. The graph shows the cholesterol bound to HSP60, averaged from three independent experiments in triplicate (means ± SEM).



**Fig. 6.** HSP60 binds to cholesterol dependent on its conformation state. (A) The indicated concentrations of native His<sub>10</sub>-HSP60 (black triangles) or His<sub>10</sub>-HSP60 denatured with 8 M urea (gray circles) were incubated with a mixture of 7.8 pmol [<sup>3</sup>H] cholesterol and 6 μM unlabeled cholesterol for 1 h at 37 °C. (B) The indicated concentrations of native His<sub>6</sub>-STARD3 (black triangles) or BSA (black squares), were incubated with a mixture of 7.8 pmol [<sup>3</sup>H] cholesterol and 6 μM unlabeled cholesterol for 1 h at 37 °C. Radioactivity of [<sup>3</sup>H] cholesterol bound to eluted proteins was quantified by scintillation counting. The graphs show the cholesterol bound to HSP60 and STARD3, averaged from three independent experiments in triplicate (means ± SEM).



In others experiments, the incubation of mitochondria isolated from JEG-3 cells with the recombinant His10-HSP60 protein increased progesterone synthesis in a concentration-dependent manner, indicating its direct participation at the mitochondrial level. In agreement, it has been reported that HSP60 is localized in the inner mitochondrial membrane, the mitochondrial matrix, and the extramitochondrial space [37–39]. Additionally, a recent report has shown that in granulosa cells, heat stress induces increased HSP60 mRNA (~3-fold). However, this heat stress induces a decrease of StAR mRNA, followed by a significant decreased estradiol synthesis, but without affecting progesterone synthesis [40]. These results reinforce our hypothesis that HSP60 is involved in progesterone synthesis. In contrast, the induction of another chaperone protein, such as HSP70, acutely inhibits progesterone synthesis in Leydig cells [41], where HSP70 is also localized in mitochondria [42], suggesting that HSP60 has particular characteristics to promote progesterone synthesis.

The STARD1 protein promotes steroidogenesis through its participation in the contact sites in association with other proteins [43–48].

In this work, we also explored the possible association of HSP60 with proteins involved in steroidogenesis. The results showed that HSP60 interacts with STARD3, results that are consistent with previous reports [15], HSP60 also interacts with P450<sub>scc</sub>, suggesting that HSP60 together with STARD3 could participate in the transport of cholesterol to the outer mitochondrial membrane, where HSP60-mediated delivery of cholesterol to the P450<sub>scc</sub> enzyme, which resides in the inner mitochondrial membrane. Consistent with this proposal, we found that STARD3 does not interact with P450<sub>scc</sub>. Both STARD3 and P450 proteins have different subcellular localization. STARD3 is located and acts on the outer mitochondrial membrane [49], whereas P450<sub>scc</sub> is located on the matrix side of the inner mitochondrial membrane [50]. In addition, HSP60 is localized in the inner mitochondrial membrane, the mitochondrial matrix, and the extramitochondrial space [37–39], indicating that the subcellular distribution is key for protein–protein interactions.

To give support to our hypothesis that HSP60 participates in cholesterol transport, we determined the binding of cholesterol to HSP60 through two different methods. The first method consisted of determining the binding of cholesterol by measuring its autofluorescence [51]. The results obtained with this method demonstrate that HSP60 is capable of binding cholesterol in a dose-dependent manner. The results obtained with this methodology were confirmed with a second method using tritium-labeled cholesterol. Besides, HSP60 binds cholesterol dependent on its conformational state, since its denatured state diminished significantly the binding to cholesterol, agreeing with reports on other proteins that bind cholesterol [29,52].

In agreement with the cholesterol-binding assays, previous reports show that HSP60 is associated with lipid rafts, which are plasma membrane microdomains enriched in cholesterol [53]. Besides, it has been suggested that elevated HSP60 levels are associated with an increased level of cholesterol and, hence, of the risk of atherosclerotic plaque development [54,55].

The overall results show that over-expression of HSP60 increases progesterone synthesis in JEG-3 cells and in HEK293 cells transformed into steroidogenic. We also demonstrate that HSP60 induces progesterone synthesis at the mitochondrial level. In addition, we confirm that HSP60 binds cholesterol and interacts with proteins at the steroidogenic contact sites. Finally, it is proposed, for the first time, that HSP60 is part of a complex system for cholesterol transport and for promoting progesterone synthesis (steroidosome) at the mitochondrial level. Follow-up experiments will include mutations in HSP60, such as replacement of Val-98 by Ile, which displays decreased ATPase activity and a severely

decreased capacity to promote folding of other proteins [56], or deletions in the START-like domain of HSP60 [15], with the purpose of exploring its chaperone function and its role on cholesterol transport in progesterone synthesis. Will not be performed RNAi or CRISPR strategies, since that downregulation and knockdown of HSP60 disrupts mitochondrial integrity leading to apoptosis [57,58].

## Conflicts of interest

The authors declare no conflict of interest.

## Acknowledgments

This work was supported by grants IN211912, IN211715 from DGAPA from *Universidad Nacional Autónoma de México* and CONACyT (168025). Jessica Monreal Flores thanks the support of the *Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas* (508018682), UNAM and CONACyT for fellowship to complete her Ph.D. program (215698), and part of this work was included in her PhD thesis.

The authors thank Sofía Olvera for the technical assistance during the experimental development of this work; Dr. Oscar Flores for discussing the paper; and Mrs. Josefina Bolado, Head of the Scientific Paper Translation Department, from Facultad de Medicina UNAM, for editing the English-language version of this manuscript.

## References

- [1] Halasz M, Szekeres-Bartho J. The role of progesterone in implantation and trophoblast invasion. *J Reprod Immunol* 2013;97:43–50.
- [2] Martinez F, Kiriakidou M, Strauss 3rd JF. Structural and functional changes in mitochondria associated with trophoblast differentiation: methods to isolate enriched preparations of syncytiotrophoblast mitochondria. *Endocrinology* 1997;138:2172–83.
- [3] Miller WL, Auchus RJ. The molecular biology, biochemistry, and physiology of human steroidogenesis and its disorders. *Endocr Rev* 2011;32:81–151.
- [4] Espinosa-García MT, Strauss 3rd JF, Martínez F. A trypsin-sensitive protein is required for utilization of exogenous cholesterol for pregnenolone synthesis by placental mitochondria. *Placenta* 2000;21:654–60.
- [5] Black SM, Szklarz GD, Harikrishna JA, Lin D, Wolf CR, Miller WL. Regulation of proteins in the cholesterol side-chain cleavage system in JEG-3 and Y-1 cells. *Endocrinology* 1993;132:539–45.
- [6] Miller WL. Mitochondrial specificity of the early steps in steroidogenesis. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1995;55:607–16.
- [7] Clark BJ, Stocco DM. StAR-A tissue specific acute mediator of steroidogenesis. *Trends Endocrinol Metab* 1996;7:227–33.
- [8] Lin D, Sugawara T, Strauss 3rd JF, Clark BJ, Stocco DM, Saenger P, et al. Role of steroidogenic acute regulatory protein in adrenal and gonadal steroidogenesis. *Science* 1995;267:1828–31.
- [9] Sugawara T, Holt JA, Driscoll D, Strauss 3rd JF, Lin D, Miller WL, et al. Human steroidogenic acute regulatory protein: functional activity in COS-1 cells, tissue-specific expression, and mapping of the structural gene to 8p11.2 and a pseudogene to chromosome 13. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:4778–82.
- [10] Moog-Lutz C, Tomasetto C, Regnier CH, Wendling C, Lutz Y, Muller D, et al. MLN64 exhibits homology with the steroidogenic acute regulatory protein (StAR) and is over-expressed in human breast carcinomas. *Int J Cancer* 1997;71:183–91.
- [11] Watari H, Arakane F, Moog-Lutz C, Kallen CB, Tomasetto C, Gerton GL, et al. MLN64 contains a domain with homology to the steroidogenic acute regulatory protein (StAR) that stimulates steroidogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:8462–7.
- [12] Tuckey RC, Bose HS, Czerwionka I, Miller WL. Molten globule structure and steroidogenic activity of N-218 MLN64 in human placental mitochondria. *Endocrinology* 2004;145:1700–7.
- [13] Calderon-Dominguez M, Gil G, Medina MA, Pandak WM, Rodriguez-Agudo D. The StarD4 subfamily of steroidogenic acute regulatory-related lipid transfer (START) domain proteins: new players in cholesterol metabolism. *Int J Biochem Cell Biol* 2014;49:64–8.
- [14] Zhang M, Liu P, Dwyer NK, Christenson LK, Fujimoto T, Martinez F, et al. MLN64 mediates mobilization of lysosomal cholesterol to steroidogenic mitochondria. *J Biol Chem* 2002;277:33300–10.
- [15] Olvera-Sanchez S, Espinosa-García MT, Monreal J, Flores-Herrera O, Martínez F. Mitochondrial heat shock protein participates in placental steroidogenesis. *Placenta* 2011;32:222–9.

- [16] Henderson B, Fares MA, Lund PA. Chaperonin 60: a paradoxical, evolutionarily conserved protein family with multiple moonlighting functions. *Biol Rev Camb Philos Soc* 2013;88:955–87.
- [17] Okamoto T, Ishida R, Yamamoto H, Tanabe-Ishida M, Haga A, Takahashi H, et al. Functional structure and physiological functions of mammalian wild-type HSP60. *Arch Biochem Biophys* 2015;586:10–9.
- [18] Mattoo RU, Goloubinoff P. Molecular chaperones are nanomachines that catalytically unfold misfolded and alternatively folded proteins. *Cell Mol Life Sci* 2014;71:3311–25.
- [19] Luo S, Yu H, Wu D, Peng C. Transforming growth factor-beta1 inhibits steroidogenesis in human trophoblast cells. *Mol Hum Reprod* 2002;8:318–25.
- [20] Ringler GE, Strauss 3rd JF. In vitro systems for the study of human placental endocrine function. *Endocr Rev* 1990;11:105–23.
- [21] Bahn RS, Worsham A, Speeg Jr. KV, Ascoli M, Rabin D. Characterization of steroid production in cultured human choriocarcinoma cells. *J Clin Endocrinol Metab* 1981;52:447–50.
- [22] Samson M, Labrie F, Luu-The V. Specific estradiol biosynthetic pathway in choriocarcinoma (JEG-3) cell line. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2009;116:154–9.
- [23] Harikrishna JA, Black SM, Szklarz GD, Miller WL. Construction and function of fusion enzymes of the human cytochrome P450scc system. *DNA Cell Biol* 1993;12:371–9.
- [24] Bose HS, Whittall RM, Huang MC, Baldwin MA, Miller WL. N-218 MLN64, a protein with StAR-like steroidogenic activity, is folded and cleaved similarly to StAR. *Biochemistry* 2000;39:11722–31.
- [25] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248–54.
- [26] Martinez F, Espinosa-Garcia T, Flores-Herrera O, Pardo JP. Respiratory control induced by ATP in human term placental mitochondria. *Placenta* 1993;14:321–31.
- [27] Gomez-Concha C, Flores-Herrera O, Olvera-Sanchez S, Espinosa-Garcia MT, Martinez F. Progesterone synthesis by human placental mitochondria is sensitive to PKA inhibition by H89. *Int J Biochem Cell Biol* 2011;43:1402–11.
- [28] Radhakrishnan A, Sun LP, Kwon HJ, Brown MS, Goldstein JL. Direct binding of cholesterol to the purified membrane region of SCAP: mechanism for a sterol-sensing domain. *Mol Cell* 2004;15:259–68.
- [29] Tsujishita Y, Hurlley JH. Structure and lipid transport mechanism of a StAR-related domain. *Nat Struct Biol* 2000;7:408–14.
- [30] Rubtsov P, Karmanov M, Sverdlova P, Spirin P, Tiulpakov A. A novel homozygous mutation in CYP11A1 gene is associated with late-onset adrenal insufficiency and hypospadias in a 46, XY patient. *J Clin Endocrinol Metab* 2009;94:936–9.
- [31] Okamura N, Kiuchi S, Tamba M, Kashima T, Hiramoto S, Baba T, et al. A porcine homolog of the major secretory protein of human epididymis, HE1, specifically binds cholesterol. *Biochim Biophys Acta* 1999;1438:377–87.
- [32] Kishida T, Kostetskii I, Zhang Z, Martinez F, Liu P, Walkley SU, et al. Targeted mutation of the MLN64 START domain causes only modest alterations in cellular sterol metabolism. *J Biol Chem* 2004;279:19276–85.
- [33] Uribe A, Strauss 3rd JF, Martinez F. Contact sites from human placental mitochondria: characterization and role in progesterone synthesis. *Arch Biochem Biophys* 2003;413:172–81.
- [34] Rone MB, Midzak AS, Issop L, Rammouz G, Jagannathan S, Fan J, et al. Identification of a dynamic mitochondrial protein complex driving cholesterol import, trafficking, and metabolism to steroid hormones. *Mol Endocrinol* 2012;26:1868–82.
- [35] Liu J, Rone MB, Papadopoulos V. Protein-protein interactions mediate mitochondrial cholesterol transport and steroid biosynthesis. *J Biol Chem* 2006;281:38879–93.
- [36] Bahat A, Perlberg S, Melamed-Book N, Lauria I, Langer T, Orly J. StAR enhances transcription of genes encoding the mitochondrial proteases involved in its own degradation. *Mol Endocrinol* 2014;28:208–24.
- [37] Gupta RS. Mitochondria, molecular chaperone proteins and the in vivo assembly of microtubules. *Trends Biochem Sci* 1990;15:415–8.
- [38] Soltys BJ, Gupta RS. Immunoelectron microscopic localization of the 60-kDa heat shock chaperonin protein (Hsp60) in mammalian cells. *Exp Cell Res* 1996;222:16–27.
- [39] Chenevert J, Pruliere G, Ishii H, Sardet C, Nishikata T. Purification of mitochondrial proteins HSP60 and ATP synthase from ascidian eggs: implications for antibody specificity. *PLoS One* 2013;8:e52996.
- [40] Li L, Wu J, Luo M, Sun Y, Wang G. The effect of heat stress on gene expression, synthesis of steroids, and apoptosis in bovine granulosa cells. *Cell Stress Chaperones* 2016;21:467–75.
- [41] Liu Z, Stocco DM. Heat shock-induced inhibition of acute steroidogenesis in MA-10 cells is associated with inhibition of the synthesis of the steroidogenic acute regulatory protein. *Endocrinology* 1997;138:2722–8.
- [42] Dahlseid JN, Lill R, Green JM, Xu X, Qiu Y, Pierce SK. PBPF74, a new member of the mammalian 70-kDa heat shock protein family, is a mitochondrial protein. *Mol Biol Cell* 1994;5:1265–75.
- [43] Martin LA, Kennedy BE, Karten B. Mitochondrial cholesterol: mechanisms of import and effects on mitochondrial function. *J Bioenerg Biomembr* 2016;48:137–51.
- [44] Fan J, Papadopoulos V. Evolutionary origin of the mitochondrial cholesterol transport machinery reveals a universal mechanism of steroid hormone biosynthesis in animals. *PLoS One* 2013;8:e76701.
- [45] Bose M, Whittall RM, Miller WL, Bose HS. Steroidogenic activity of StAR requires contact with mitochondrial VDAC1 and phosphate carrier protein. *J Biol Chem* 2008;283:8837–45.
- [46] Prasad M, Kaur J, Pawlak KJ, Bose M, Whittall RM, Bose HS. Mitochondria-associated endoplasmic reticulum membrane (MAM) regulates steroidogenic activity via steroidogenic acute regulatory protein (StAR)-voltage-dependent anion channel 2 (VDAC2) interaction. *J Biol Chem* 2015;290:2604–16.
- [47] Issop L, Fan J, Lee S, Rone MB, Basu K, Mui J, et al. Mitochondria-associated membrane formation in hormone-stimulated Leydig cell steroidogenesis: role of ATAD3. *Endocrinology* 2015;156:334–45.
- [48] Papadopoulos V, Miller WL. Role of mitochondria in steroidogenesis. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2012;26:771–90.
- [49] Bose HS, Baldwin MA, Miller WL. Evidence that StAR and MLN64 act on the outer mitochondrial membrane as molten globules. *Endocr Res* 2000;26:629–37.
- [50] Hanukoglu I, Suh BS, Himmelhoch S, Amsterdam A. Induction and mitochondrial localization of cytochrome P450scc system enzymes in normal and transformed ovarian granulosa cells. *J Cell Biol* 1990;111:1373–81.
- [51] DaCosta RS, Andersson H, Wilson BC. Molecular fluorescence excitation-emission matrices relevant to tissue spectroscopy. *Photochem Photobiol* 2003;78:384–92.
- [52] Roostaee A, Barbar E, Lavigne P, LeHoux JG. The mechanism of specific binding of free cholesterol by the steroidogenic acute regulatory protein: evidence for a role of the C-terminal alpha-helix in the gating of the binding site. *Biosci Rep* 2009;29:89–101.
- [53] Chen S, Bawa D, Besshoh S, Gurd JW, Brown IR. Association of heat shock proteins and neuronal membrane components with lipid rafts from the rat brain. *J Neurosci Res* 2005;81:522–9.
- [54] Mandal A, Chakraborti T, Choudhury R, Ghosh B, Chakraborti S. Role of MMP-2 in oxidant-mediated regulation of Ca<sup>2+</sup> uptake in microsomes of bovine pulmonary artery smooth muscle. *Indian J Biochem Biophys* 2005;42:19–27.
- [55] Xiao Q, Mandal K, Schett G, Mayr M, Wick G, Oberhollenzer F, et al. Association of serum-soluble heat shock protein 60 with carotid atherosclerosis: clinical significance determined in a follow-up study. *Stroke* 2005;36:2571–6.
- [56] Bross P, Naundrup S, Hansen J, Nielsen MN, Christensen JH, Kruhoffer M, et al. The Hsp60-(p.V98I) mutation associated with hereditary spastic paraplegia SPG13 compromises chaperonin function both in vitro and in vivo. *J Biol Chem* 2008;283:15694–700.
- [57] Tang H, Li J, Liu X, Wang G, Luo M, Deng H. Down-regulation of HSP60 suppresses the proliferation of glioblastoma cells via the ROS/AMPK/mTOR pathway. *Sci Rep* 2016;6:28388.
- [58] Xanthoudakis S, Roy S, Rasper D, Hennessey T, Aubin Y, Cassidy R, et al. Hsp60 accelerates the maturation of pro-caspase-3 by upstream activator proteases during apoptosis. *EMBO J* 1999;18:2049–56.