



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

“La proteína de choque térmico 90 beta (Hsp90 β) altera la actividad de la sintasa de óxido nítrico endotelial (eNOS)”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADO EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA

BÁSICA

P R E S E N T A :

JONATAN

BARRERA

CHIMAL

Facultad de Medicina



TUTOR
DRA. NORMA A. BOBADILLA SANDOVAL

MÉXICO, D. F.

2009.

AGOSTO DE



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

LICENCIATURA EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA BÁSICA
COORDINACIÓN

DR. ENRIQUE LUIS GRAUE WIECHERS
DIRECTOR
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM
PRESENTE

Estimado Dr. Graue:

Por este medio, me permito informar a usted que el Subcomité Académico de la Licenciatura ha designado Jurado para el examen profesional del alumno **JONATÁN BARRERA CHIMAL**, con número de cuenta **303114288**, quien presenta la tesis: "La proteína de choque térmico 90 beta (Hsp90 β) altera la actividad de la sintasa de óxido nítrico endotelial (eNOS)" dirigida por la Dra. Norma A. Bobadilla Sandoval.

El jurado está integrado por:

Presidente: Dr. Luis Alfonso Vaca Domínguez
Secretario: Dra. Norma Bobadilla Sandoval
Vocal: Dra. María Eugenia Gonsebatt Bonaparte
Suplente: Dra. Laura Escobar Pérez
Suplente: Dr. Gerardo Gamba Ayala

Agradezco su atención y aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente.

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Ciudad Universitaria, D.F., junio 1, 2008
EL COORDINADOR

DR. RAFAEL CAMACHO CARRANZA



Licenciatura en Investigación
Biomédica Básica
Coordinación

Reconocimientos

Este trabajo se realizó en la Unidad de Fisiología Molecular del departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental del Instituto de Investigaciones Biomédicas UNAM, y el departamento de Nefrología del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán” bajo la tutoría de la Dra. Norma Araceli Bobadilla Sandoval. México, Distrito Federal. Julio de 2008 a Julio de 2009.

Este trabajo fue realizado con el apoyo otorgado por el CONACYT a la Dra. Norma Bobadilla con el número de registro 48483 y por la UNAM-DGAPA proyectos No. IN228206-3 e IN200909-3.

Al Instituto de Investigaciones Biomédicas y a la Facultad de Medicina UNAM, por todas las facilidades otorgadas.

Al Dr. Gerardo Gamba por sus comentarios durante el desarrollo de este trabajo.

A la QFB Rosalba Pérez Villalba por su asesoría técnica durante la realización de este trabajo.

Al Dr. Alejandro Zentella Dehesa y a la Dra. María de Jesús Ibarra Sánchez por las facilidades otorgadas para el manejo y uso de las células HEK-293.

Al Dr. Enrique Ortega Soto y a la QFB Claudia Garay Canales por la asesoría en el uso del citómetro de flujo.

Durante la realización de mis estudios de licenciatura recibí el nombramiento como Ayudante de Investigador Nacional Nivel III otorgado por el Sistema Nacional de Investigadores - CONACYT No. de expediente 7497 (NAB).

Agradecimientos

A mis padres: **Esther y Rafael**: Gracias por enseñarme a valorar las cosas importantes de la vida, por alegrarse con mis logros y estar en todo momento a mi lado apoyándome de mil maneras. Por alentarme siempre a seguir siempre adelante para alcanzar los objetivos. Sin su apoyo esto no hubiera sido posible. Los amo.

A mi hermano **Helí**: Por compartir experiencias desde que nací, cuidarme y por mostrarme que no importan las adversidades, se que siempre estarás ahí.

A **Norma Bobadilla**: Por darme la oportunidad de integrarme a su equipo de trabajo, por su paciencia, sus valiosas enseñanzas, su compromiso y su entrega, por ser el gran ejemplo que es para mí. Por todo el apoyo incondicional que he recibido durante estos dos años. Gracias.

A mis tíos **Carlos, Antonia y Ana**: Por sus sabios consejos, su comprensión, las largas horas de plática y por ser un ejemplo de superación y dedicación.

A mis abuelitas **Senorina García Fabila y María Torrescano**: Por enseñarme que el amor, la paciencia y la perseverancia lo pueden todo.

A **Javier**: Gracias por tu paciencia, por comprenderme y mostrarme que la pasión y la entrega pueden con todo para lograr los objetivos.

A **Rosy**: Gracias por tu ayuda en el laboratorio, por escucharme, por tu apoyo desinteresado y por tu amistad.

A **Emmanuel**: Por mostrarme que no importa lo que pase, sé que cuento con tu apoyo, por las horas de estudio y diversión, por escuchar mis preocupaciones y mis quejas, por todo lo compartido.

A **Paulette**: Por ser tan paciente conmigo, compartir emociones y tristezas. Por los consejos. Gracias.

A mis amigos **Layla, Ever, Raúl, Clau, Juan, Katy, Gaby, David, Pepe, Betty y Paco**: Gracias por todos los momentos compartidos, por salir de la rutina y hacer que los momentos valgan la pena.

A **Victoria, Joyce y Marcos**: Por ser un ejemplo de perseverancia, compromiso, lucha y superación constante.

A **César**: Por las enseñanzas en el laboratorio, las largas horas de trabajo y las risas compartidas.

A mis compañeros del departamento de **Nefrología** y Metabolismo Mineral: Por sus consejos, ayuda y por crear un agradable ambiente en el laboratorio.

A todos los que han contribuido a mi crecimiento profesional e intelectual

A James: Wherever he may be...

*Hay una fuerza motriz más poderosa que el vapor, la electricidad y la energía
atómica: la voluntad.*

Albert Einstein

Índice

Resumen	I
Introducción	1
Las proteínas de choque térmico	1
Funciones de las proteínas de choque térmico	2
Proteínas de choque térmico de 90 KDa	3
Las isoformas citosólicas: Hsp90 α y Hsp90 β	3
Estructura de Hsp90	5
Forma activa de Hsp90	6
Principales funciones de Hsp90	7
Proteínas cliente de Hsp90	8
Óxido Nítrico	8
Mecanismos de regulación de eNOS	10
Hsp90 y la sintasa de óxido nítrico endotelial	12
La eNOS es capaz de producir el anión superóxido (O ^{2•-})	13
Fosforilación de la T495 de eNOS	13
Fosforilación de la S1177 de eNOS	15
Regulación de eNOS por su interacción con otras proteínas	16
Implicación de la Interacción Hsp90-eNOS en la Fisiología renal	17
Hipótesis	19
Objetivo General	20
Objetivos Particulares	20
Metodología	21
Clonación de Hsp90 β	21
Expresión heteróloga de Hsp90 β en células HEK-293	23
Producción de óxido nítrico	23
Niveles de Peróxido de hidrógeno	24
Detección del anión superóxido	25
Extracción de proteínas y western blot	26
Fosforilación de eNOS	27
Dímeros de Hsp90	27
Análisis estadístico	28
Resultados	29
Discusión	41
Conclusiones	47
Bibliografía	48

Resumen

Introducción: La subfamilia de las proteínas de choque térmico de 90 kDa está conformada por 5 isoformas conocidas como: Grp94, Hsp90N, TRAP1, Hsp90 α y Hsp90 β . Las isoformas citosólicas Hsp90 α y Hsp90 β ocupan el 80% de esta subfamilia. La asociación entre Hsp90 y la sintasa de óxido nítrico endotelial (eNOS) es un paso crítico para la producción de NO y por lo tanto para la regulación del tono vascular, sin embargo, el papel específico que ejercen Hsp90 α y Hsp90 β sobre la actividad de eNOS no se ha establecido.

Objetivo: Investigar el mecanismo de regulación de eNOS por Hsp90 β .

Métodos: Se clonó la isoforma Hsp90 β de la corteza renal de la rata en el vector de expresión pcDNA3.1(+) utilizando los sitios de restricción de las enzimas *Not I* y *Xba I*. La transfección de Hsp90 β se realizó utilizando liposomas en la línea celular HEK-293. En cada grupo de células se determinó la producción de NO y la producción de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) como indicador de los niveles de producción de anión superóxido (O^{2•-}). Así mismo, mediante análisis de Western Blot (WB) se corroboró la sobre-expresión de Hsp90 β , los niveles de proteína de eNOS, su estado de fosforilación en los residuos Ser-1179 y Tre-497 y la relación dímero/monómero de eNOS, Hsp90 α y Hsp90 β .

Resultados y conclusiones: La transfección del pcDNA3.1(+)-Hsp90 β en células HEK produjo un aumento de tres veces los niveles de expresión de Hsp90 β con respecto al grupo control que fue tratado con liposomas. Interesantemente, la sobre-expresión de Hsp90 β produjo una disminución significativa del 50% en los niveles de nitritos y nitratos y un aumento de tres veces en los niveles de H₂O₂. Este efecto no se asoció con cambios en los niveles de proteína de eNOS total. En cambio al analizar los niveles de fosforilación de eNOS se observó que la transfección del pcDNA3.1(+)-Hsp90 β indujo un aumento del 100% en la fosforilación de la Tre-497 (fosforilación inactivante), sin cambio en la fosforilación de la Ser-1179. Al analizar el estado de agregación de Hsp90 β se observó una mayor formación de monómeros (forma inactiva). Nuestros resultados sugieren que Hsp90 β modula la capacidad de eNOS para producir radicales libres.

Introducción

Nuestras células y tejidos están expuestos constantemente a condiciones extremas que desequilibran la homeostasis celular y que causan estrés agudo o crónico. En consecuencia, las células han desarrollado mecanismos evolutivamente conservados para detectar y responder a cambios extremos en el medio ambiente con el fin de evitar alteraciones en la fisiología celular.

Las proteínas de choque térmico

Uno de estos mecanismos de protección celular fue descrito por primera vez en 1962 por Ritossa y col.¹ en un trabajo en el que se observó que en glándulas salivales de *Drosophila melanogaster*, el aumento de la temperatura producía un incremento en la expresión de una familia de genes que se les denominó proteínas de choque térmico (Hsp por sus siglas en inglés). En la actualidad se sabe que estas proteínas se expresan constitutivamente y también se inducen ante diferentes tipos de estrés como lo son: el oxidativo, el osmótico, por rozamiento y estiramiento, la hipoxia, etc.²

La familia de proteínas de choque térmico esta formada por varios genes que codifican para proteínas con peso molecular que varía desde los 10 hasta los 160 kDa y se han clasificado de acuerdo con su peso molecular en seis subfamilias conocidas como las Hsp de: 100-110 KDa, 90 KDa, 70 KDa, 60 KDa, 40 KDa y 18-30kDa.^{3,4}

Funciones de las proteínas de choque térmico

En condiciones normales las Hsp cumplen una serie de funciones entre las que destacan: asistir el plegamiento y la compartimentalización de proteínas recién sintetizadas, reparar las proteínas dañadas, regular la actividad de otras proteínas, mantener la conformación del citoesqueleto, participar en la proliferación celular y en la apoptosis. En la tabla 1 se presenta un resumen de cada una de las subfamilias de choque térmico y sus funciones principales. ^{1, 5, 6, 7}







Subfamilia	Estructura	Principales Funciones
Hsp100	Anillos hexaédricos y heptaédricos 	Disolución de agregados proteicos, inhibición de la agregación proteica, termoresistencia y regulación osmótica
Hsp90	Dímero 	Plegamiento de proteínas, controla la actividad de sus proteínas cliente, transporte de proteínas, modulador alostérico y termoresistencia
Hsp70	Monómero (Heterodímeros con otras Hsp) 	Plegamiento de proteínas, protección contra desnaturalización por calor, transporte, importación
Hsp60	Anillos de multímeros 	Plegamiento de proteínas, transporte y degradación
Hsp40	Dímeros Complejos proteicos 	Plegamiento de proteínas, síntesis de colágena
small Hsp	Dímeros, hexámeros, hexadecámeros, esferas de 24 unidades 	Plegamiento de proteínas, evita agregados proteicos, polimerización de actina, previene apoptosis

Tabla 1. Generalidades de las subfamilias de Hsp.

Proteínas de choque térmico de 90 KDa

En particular, la subfamilia de las proteínas de 90 kDa es una de las más abundantes en el citosol. Existen 5 isoformas de Hsp90: Grp94, Hsp90N, TRAP1, Hsp90 α y Hsp90 β . Se ha descrito que las Hsp90 constituyen del 1 al 2% de la proteína citosólica soluble total. Estas isoformas se diferencian en la célula por su abundancia y localización celular; Hsp90 α y Hsp90 β ocupan el 85% de esta subfamilia y se localizan en el citoplasma mientras que el 15% restante lo conforman TRAP1, Grp94 y Hsp90N, las dos primeras se ubican en la mitocondria y en el retículo endoplásmico, respectivamente, mientras que Hsp90N sólo se expresa en procesos cancerígenos.^{8, 9, 10, 11.}

Las isoformas citosólicas Hsp90 α y Hsp90 β .

Tanto Hsp90 α como Hsp90 β son genes multicopia y se han identificado en diferentes cromosomas; HSP90 α se ubica en los cromosomas 1, 3, 4, 11 y 14 con un tamaño de 7393 pb, este gen genera un transcrito de 2912 pb que traduce una proteína de 733 aminoácidos, sin embargo únicamente la copia del gen ubicada en el cromosoma 14 presenta actividad. En cambio, HSP90 β se encuentra en los cromosomas 4, 6, 10, 13, 14 y 15 con un tamaño de 8210 pb y un RNAm de 2567 pb, que traduce una proteína de 726 aminoácidos; la copia que presenta actividad es la que se localiza en el cromosoma 6.^{12,13}

Como muestra la Figura 1, los transcritos de Hsp90 α y Hsp90 β presentan intrones y exones, con una característica particular: el primer exón no se traduce.¹⁴ La región 5' no transcrita de cada gen de Hsp90 es diferente, lo que sugiere que cada isoforma es regulada de forma diferente.

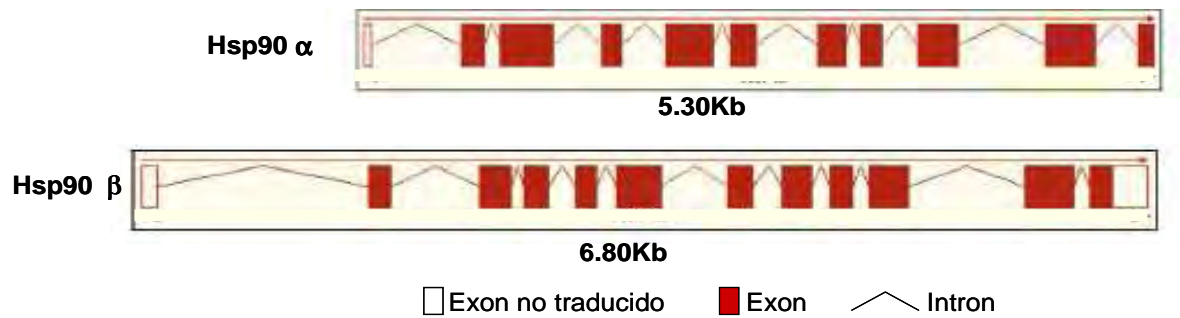


Figura 1. Representación esquemática de la estructura de los transcritos primarios de Hsp90α y Hsp90β, donde los cuadros blancos indican exones no traducidos, los cuadros rojos exones traducidos y las líneas continuas representan los intrones.¹⁴

La transcripción de los genes de HSP90 se regula principalmente por los elementos de respuesta a choque térmico (HSE). En células Jurkat (células T en leucemia) se demostró que Hsp90α es altamente regulada por al menos 3 secuencias HSE con el motivo 'nGAAn' localizadas en la región 5' y que son de importancia vital para la expresión constitutiva e inducible de la proteína. En cambio, en Hsp90β, los elementos de respuesta a estrés térmico se localizan en dos regiones diferentes: en la región 5' no transcrita (responsable de la expresión constitutiva) y en el primer intrón, donde se regula la transcripción inducible funcionando como potenciador de la transcripción en condiciones celulares adversas.¹⁴

Tanto Hsp90α como Hsp90β son reguladas por el factor de transcripción de choque térmico 1 (*Heat Shock Factor*, HSF-1). En condiciones normales HSF-1 se localiza en el citoplasma en estado inactivo unido a diferentes chaperonas incluyendo Hsp90, cuando se produce estrés celular, ya sea físico o químico, HSF-1 es liberado del complejo, fosforilado y se transloca al núcleo, en donde forma un

trímero activo que se une a los elementos de respuesta HSE, lo que activa la transcripción de los genes de choque térmico. ^{15,16,17,18,19}

Estructura de Hsp90

La figura 2 muestra los cuatro dominios que conforman la estructura proteica de Hsp90 α y Hsp90 β .

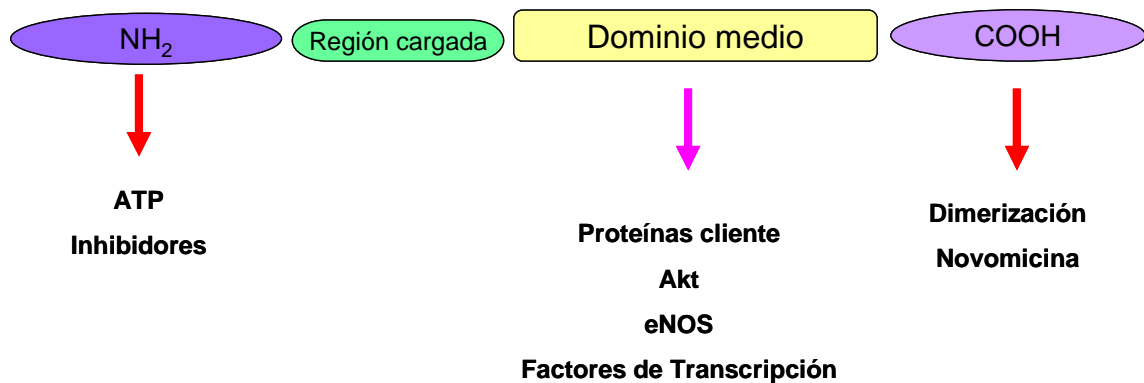


Figura 2. Estructura proteica de Hsp90 α y Hsp90 β

El primer dominio es el amino terminal donde se localiza el sitio de unión de ATP, también conocido como dominio ATPasa, aquí el ATP es hidrolizado en ciclos de asociación y disociación entre Hsp90 y sus proteínas cliente. Este dominio es particularmente importante porque es aquí donde se unen los inhibidores de Hsp90, como geldanamicina, radicicol y 17AAG que compiten por el sitio de unión a ATP y de esta forma impiden que Hsp90 se una a sus proteínas cliente. El segundo dominio es el denominado “cargado”, por la presencia de aproximadamente 30 aminoácidos con carga negativa y del cual se ha descrito que es importante para que la Hsp90 realice los cambios conformacionales durante el ciclo ATPasa. El tercer dominio es el llamado “dominio medio” en donde se unen proteínas cliente, entre ellas eNOS y cinasas como la Akt y por último el dominio carboxilo terminal donde se realiza la dimerización de Hsp90, la cual es una unión flexible y producto

de cambios en el ambiente celular. Estudios bioquímicos recientes muestran que en el extremo carboxilo hay un segundo sitio de unión a ATP, sensible a novomicina y cis-platino. La función de este sitio aun se desconoce, pero algunos autores sugieren que ambos sitios de unión a ATP pueden funcionar de forma cooperativa.

26, 27, 28, 29, 30

Forma activa de Hsp90

En condiciones fisiológicas, la Hsp90 α constituye el 40% de la Hsp90 citosólica total mientras que Hsp90 β el 60%. Hsp90 α y Hsp90 β mantienen un 86% de homología entre sí, pero se ha sugerido que son reguladas genéticamente de manera distinta.²⁰ Ambas isoformas se encuentran en forma, monomérica, dimerica o heterodimerica. La Hsp90 α se encuentra en mayor proporción en forma dimerica, mientras que la Hsp90 β se encuentra mayormente en forma monomérica (Figura 3).^{21, 22} A este respecto, se conoce que la conformación dimerica es la forma funcional de ambas isoformas.²³

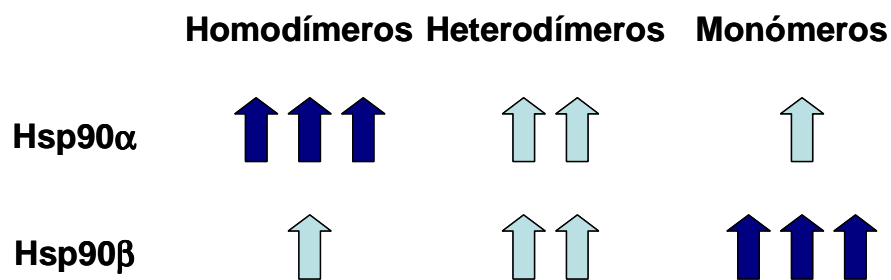


Figura 3. Conformación y abundancia de Hsp90 α y Hsp90 β en la célula.

En un estudio reciente se mostró que el dímero de Hsp90 adopta dos conformaciones, conocidas como: “cerrada” o activa y “abierta” o inactiva. La conformación cerrada se establece cuando una molécula de ATP se une al dímero

de Hsp90, esto genera un cambio en su estructura que permite que los extremos amino de cada monómero interactúen, favoreciendo la hidrólisis de ATP y la unión a sus proteínas cliente, sin embargo cuando el dímero se encuentra en conformación abierta, se une una molécula de ADP lo cual impide que Hsp90 interactúe con sus proteínas cliente. Esta asociación y disociación se conoce como ciclo ATPasa y es indispensable para la función correcta de Hsp90. ^{24, 25}

Principales funciones de Hsp90

Dentro de las principales funciones celulares de Hsp90 destacan²²:

1. El plegamiento de proteínas inmaduras, lo que proporciona la conformación adecuada y evita la agregación proteica.
2. Translocar proteínas cliente a organelos o a las membranas celular y nuclear.
3. Facilitar la fosforilación y dimerización de algunas de sus proteínas cliente.
4. Degradar proteínas dañadas irreversiblemente mediante ubiquitinación ³¹
5. Hsp90 esta involucrada en procesos antiapoptóticos a través de inhibir algunas vías que llevan a la muerte celular programada, como lo es la inhibición de la activación de caspasa 3 y 9 y del activador de la caspasa derivado de la mitocondria (SMAC/DIABLO second mitochondria-derived activator of caspase-direct IAP binding protein with low pl).³²
6. Regulación del ciclo celular en diferentes niveles.³³

Proteínas cliente de Hsp90

Hsp90 modula la actividad y estabilidad de un amplio rango de proteínas cliente. La unión a estas proteínas le permite participar en diferentes procesos celulares como lo son: la regulación del ciclo celular, la respuesta inmune, el estrés celular, la apoptosis, la remodelación del citoesqueleto, participar en procesos cancerígenos y la regulación el tono vascular.

Entre las mas de 100 proteínas cliente conocidas de Hsp90 se encuentran: la familia de los receptores de hormonas esteroideas, algunos factores de transcripción, cinasas de tirosina, subunidades de proteínas G y las sintasas de óxido nítrico neuronal, inducible y endotelial. ^{34, 35, 36}

Oxido Nítrico

El óxido nítrico (NO) es un gas hidrofóbico altamente volátil que participa en diferentes procesos biológicos entre los que destacan: la regulación de la presión arterial, inhibir la agregación plaquetaria y actuar como un neurotransmisor. Muchas de sus acciones las realiza a través de la activación de la guanilato ciclasa, lo cual induce un aumento en los niveles de GMP cíclico, como segundo mensajero. Esta vía involucra la difusión del NO desde su sitio de síntesis, hacia una enzima blanco en una célula o tejido adyacente, por lo que actúa como un mensajero parácrino. Las propiedades químicas del NO sugieren que la difusión del NO, no es una labor sencilla y que en el camino hay una serie de reacciones que pueden ocurrir. Las reacciones químicas entre el NO y otras moléculas tienen un gran impacto no solo en la eficiencia de la activación de la guanilato ciclasa sino que también contribuyen al efecto citotóxico del NO, es por eso que la síntesis no controlada de NO puede ser responsable de una variedad de procesos patológicos.³⁷

El óxido nítrico es sintetizado por una familia de proteínas conocidas como las sintasas de óxido nítrico (NOS). Como se muestra en la figura 4, estas sintasas catalizan la oxidación de la L-arginina para generar NO y L-citrulina en una reacción compleja que requiere de oxígeno molecular, NADPH, nucleótidos de flavina, tetrahidrobiopterina (BH₄) y la calmodulina dependiente de calcio (CaCaM). Existen tres isoformas de la enzima NOS las cuales son producto de genes diferentes que comparten del 55 al 60% de homología: la isoforma neuronal (nNOS) o NOS 1 que se expresa abundantemente en el cerebro, la isoforma inducible (iNOS) o NOS 2 se expresa en macrófagos y la isoforma endotelial (eNOS) o NOS 3 se expresa en células endoteliales. También se ha reportado la existencia de una NOS mitocondrial que fue identificada como una nNOS con modificaciones post-traduccionales específicas. En general la NOS 1 y la NOS 3 se expresan basalmente y se activan por elevaciones de la concentración de calcio intracelular en tipos celulares específicos, mientras que la NOS 2 se induce transcripcionalmente por mediadores inmunológicos como las citocinas.³⁷

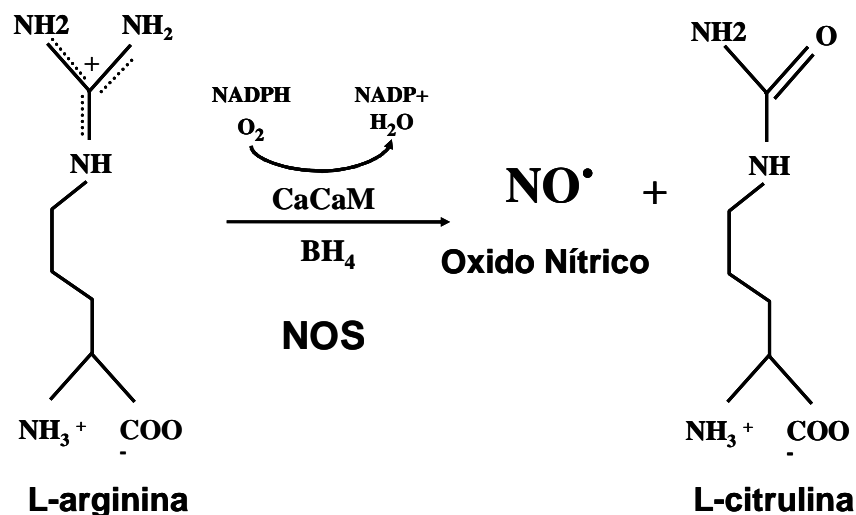


Figura 4. Síntesis de óxido nítrico (NO).

El NO participa en la fisiología renal al regular el tono vascular y por ende modificar las resistencias arteriolas pre y post glomerulares, regulando así la hemodinámica de la filtración glomerular. Se ha reportado que las tres isoformas de NOS se expresan en el riñón, cada una con localización específica. La nNOS se localiza en las células de la mácula densa, en el endotelio de las arteriolas aferentes, epitelio glomerular, nervios perivasculares, arterias arcuatas e interlobulares, túbulos colectores medulares y asa descendente de Henle. Parece ser regulada por estímulos como la privación de agua o el consumo crónico de sal. La iNOS se expresa en diversos segmentos de los túbulos renales, glomérulo, arteria interlobular y arcuata, túbulo proximal cortical y medular, abundantemente en el asa ascendente de Henle, túbulo contorneado distal, conductos colectores y células mesangiales del glomérulo. Esta isoforma se activa bajo condiciones inflamatorias lo que regula la relajación de las células mesangiales. Por último la eNOS se localiza en los capilares glomerulares, túbulos proximales, asas ascendentes de Henle, conductos colectores y en el endotelio de las arteriolas aferente y eferente, lo que contribuye a mantener el tono vascular y regular el flujo plasmático glomerular a través inducir vasodilatación bajo condiciones de estrés por rozamiento (shear estrés).^{38, 39, 40}

Mecanismos de regulación de eNOS

La vía de NO/eNOS se regula de diferentes maneras a nivel postraduccional. Una vez traducida la proteína de eNOS, ésta se regula por la interacción con otras proteínas que estimulan la síntesis de óxido nítrico, como la calmodulina y la proteína de choque térmico 90 (Hsp90) ó que inhiben su actividad, como lo es la interacción con caveolina-1, esta última mantiene a la eNOS anclada a la caveola en la membrana celular en su forma inactiva^{34,41,42,43,44}. Esta enzima tiene 5 sitios

potenciales de fosforilación, los cuales están implicados en la regulación de su actividad; la fosforilación de las serinas 617, 635, y 1179 se traduce en un aumento de la actividad de ésta enzima, mientras que, la fosforilación de la serina 116 y treonina 497 se asocia con reducción de la síntesis de NO.^{45,46,47}. Se conoce que para que la eNOS produzca NO, debe estar en forma dimérica dado que el flujo de electrones para la síntesis de NO se lleva a cabo del dominio reductor de un monómero, al dominio oxidante del otro (Figura 5). Mientras que, cuando se encuentra en forma monomérica se promueve la generación del anión $O_2^{\cdot-}$ ⁴⁸. De esta forma en presencia de Hsp90, la eNOS se dimeriza generando un incremento en la producción de NO, mientras que en ausencia de Hsp90, la eNOS

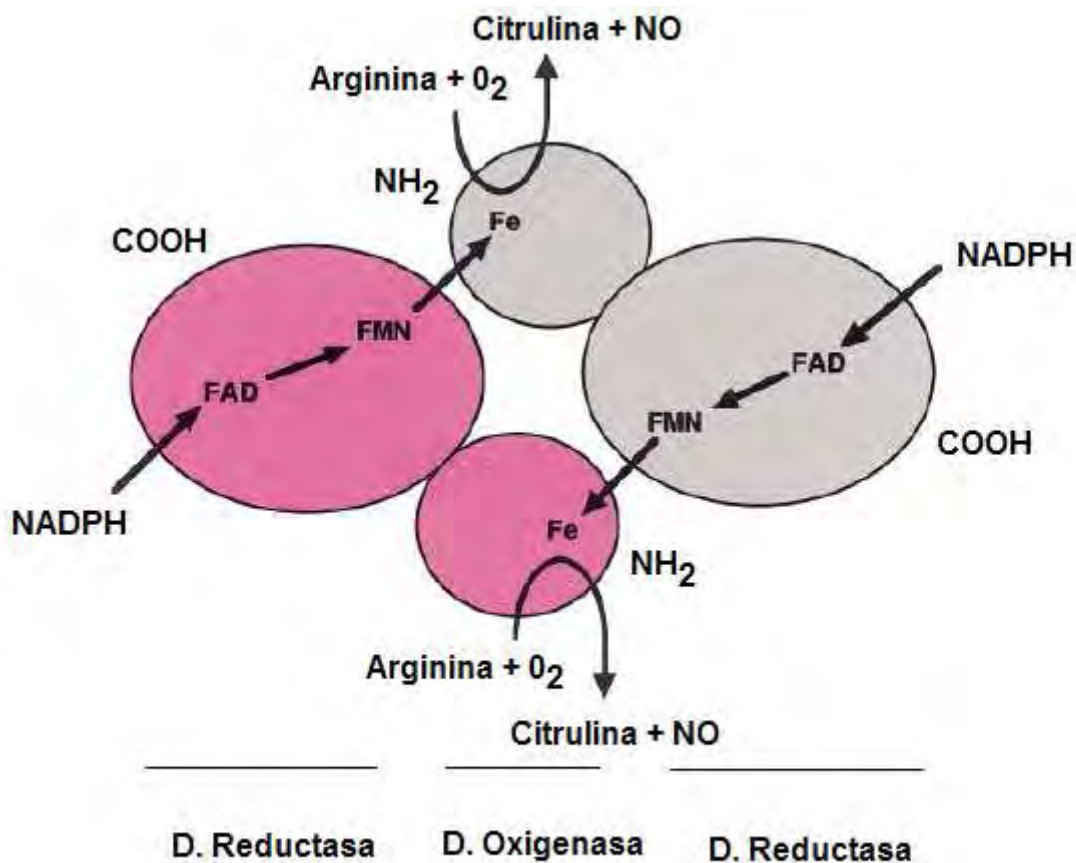


Figura 5. Esquema del flujo de electrones del dominio reductasa de un monómero al dominio oxidasa del otro monómero de eNOS para la producción de NO

se desacopla y se mantiene en su estado monomérico que impide el flujo de electrones, ocasionando que el dominio reductasa genere $O_2^{\bullet-}$ a partir del O_2 .

Hsp90 y la sintasa de óxido nítrico endotelial eNOS

Se conoce que la asociación entre Hsp90 y eNOS es un paso crítico para la producción de NO y por lo tanto para la regulación del tono vascular⁴⁹. Se ha descrito que diferentes estímulos como, la presencia de Angiotensina II, el incremento en los niveles de calcio intracelular, el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) o cambios en las fuerzas de rozamiento en los vasos sanguíneos por vasoconstricción, son capaces de incrementar la síntesis de NO mediada por la eNOS.^{50, 51}

El NO producido difunde a la célula de músculo liso y activa a la guanilato ciclasa soluble GCs. La GCs promueve la conversión de GTP a CMPc, el cual tiene tres efectos: 1) inhibe la entrada de calcio a la célula, 2) activa los canales de potasio favoreciendo así la hiperpolarización y 3) activa a la fosfatasa de las cadenas ligeras de miosina, favoreciendo la defosforilación de cadenas ligeras de miosina; en conjunto estos tres efectos producen un efecto relajador del músculo liso y por ende la vasodilatación.^{52, 53}

La asociación entre Hsp90 y eNOS se mostró por primera vez en 1998³⁴ en un estudio en el que se observó mediante ensayos de inmunoprecipitación que Hsp90 establece una interacción directa con eNOS, además de que esta interacción produce un aumento en la actividad de esta enzima, generando mayor producción de NO. Para conocer el papel fisiológico de esta interacción, se incubaron anillos de aorta con un inhibidor de Hsp90: la geldanamicina y encontraron que la producción

de NO disminuía, así como la relajación dependiente de endotelio, por lo que se concluyó que la interacción Hsp90-eNOS tiene un papel preponderante en la regulación del tono vascular a través de regular el efecto vasodilatador del NO.³⁴

Recientemente se caracterizó el sitio de unión de Hsp90 a eNOS⁶¹, mediante el uso de péptidos “señuelo” de la eNOS que fueron diseñados en la región de unión a Hsp90 (aa 291-400). Los péptidos fueron incubados con lisados de células de endotelio de bovino y se determinaron cual de éstos péptidos inhibía la asociación de Hsp90 con eNOS. Se mostró que el péptido B2 (diseñado del aa 301 al 320) disminuyó la producción de NO y la asociación de Hsp90, concluyendo así que eNOS se une a Hsp90 en los aminoácidos 301 a 320.

La eNOS es capaz de producir el anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$)

Posteriormente se demostró que el desacople de la interacción de Hsp90 con eNOS, mediante la inhibición farmacológica de Hsp90 con geldanamida, no solo resulta en una disminución en la generación de NO, sino también aumenta la producción del $O_2^{\bullet-}$, por lo que concluyeron que la interacción Hsp90-eNOS es esencial para la producción de NO y que la inhibición de Hsp90 desacopla la actividad de la eNOS para producir NO, en cambio incrementa la producción de $O_2^{\bullet-}$ dependiente de eNOS (figura 6)⁵⁴.

Fosforilación de la T495 de eNOS

Se ha propuesto que la formación de radicales libres por la eNOS esta regulado por la fosforilación del sitio T495, pues cuando se fosforila este sitio, se correlaciona con una elevación en la concentración del $O_2^{\bullet-}$ ^{55, 56}.

En un estudio reciente realizado por Sessa *et. al.* mediante el uso de mutantes de eNOS en el residuo de T495, se mostró que la fosforilación de eNOS en este residuo inducía el desacople de la forma dimérica de eNOS, impidiendo el flujo correcto de electrones del dominio reductasa de un monómero al dominio oxigenasa del otro y que la fosforilación de la T495 es un “switch” que determina cuando la enzima produce NO y cuando produce $O_2^{\bullet-}$ (figura 6) .⁵⁶

A este respecto, recientemente se demostró que la inhibición de Hsp90 en pulmón de ratas con tromboembolismo pulmonar agudo produce un aumento en la fosforilación de la T495 de eNOS, lo cual se asocia de manera directa con un incremento en la producción de $O_2^{\bullet-}$ dependiente de eNOS⁵⁷.

Se conoce que la actividad de eNOS puede ser regulada de manera dependiente o independiente al calcio. En un estudio realizado en el 2001 se reportó el efecto de la activación de eNOS con agonistas del calcio sobre la fosforilación de la T495. Mediante análisis de Western blot se observó que la T495 se encuentra constitutivamente fosforilada en células endoteliales de aortas porcinas y que al estimular estas células con bradicinina se observó una rápida defosforilación del residuo de T495. Asimismo esta defosforilación se asoció con un incremento en la asociación de eNOS con la calmodulina, aumentando así la actividad de la sintasa. En este estudio se concluyó que la fosforilación constitutiva de eNOS en la T495 previene la unión de eNOS con la calmodulina y que para activar a eNOS, un proceso esencial, es la defosforilación de este residuo⁵⁵.

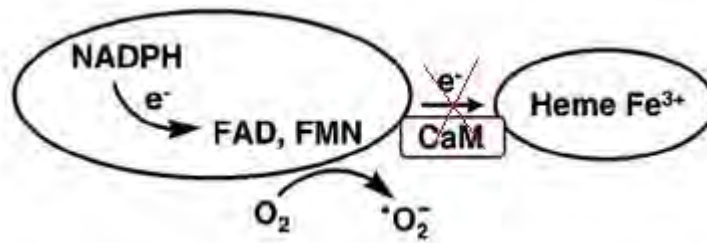


Figura 6. Esquema que ilustra la producción de anión superóxido dependiente de eNOS. Cuando el flujo de electrones se interfiere, los electrones pasan del FAD ó FMN al O₂, éste se reduce y se genera anión superóxido.

Fosforilación de la S1177 de eNOS

Como se mencionó anteriormente se sabe que eNOS se regula post-traduccionalmente por su estado de fosforilación. En particular se sabe que al estar fosforilada la S1177 la actividad de eNOS aumenta. En un estudio realizado por Takahasashi S y Col.⁵⁸ se mostró “*in vitro*” que Hsp90 facilita la fosforilación de eNOS en la S1177 y que esta fosforilación es mediada por la cinasa Akt. Mediante la utilización de las proteínas purificadas de Akt, eNOS y Hsp90 se observó que en presencia de Akt, la Hsp90 incrementó la fosforilación basal de eNOS en la S1177, mientras que, cuando solo se incubó Akt con eNOS, la fosforilación basal no fue modificada.

En un estudio posterior se evaluó la relevancia de esta fosforilación “*in vivo*” utilizando células endoteliales de bovino y se mostró que Hsp90 promueve la actividad de eNOS incrementando la fosforilación de la serina 1177 y que esta es mediada por la cinasa Akt. Estos estudios sugieren que la Hsp90 regula la actividad de eNOS, al inducir cambios en el estado de fosforilación de esta enzima⁵⁹.

Regulación de eNOS por su interacción con otras proteínas.

Además de la regulación de eNOS por su estado de fosforilación, también se conoce que es regulada por su interacción con otras proteínas. En el año 2003 se caracterizó uno de estos mecanismos. Mediante el uso de péptidos purificados Takahashi y col. demostraron que en presencia de calmodulina, la Hsp90 incrementa la actividad de la eNOS a concentraciones bajas y altas de calcio, efecto que se veía abatido al inhibir farmacológicamente a Hsp90 con geldanamicina. Asimismo, en este estudio se menciona que Hsp90 promueve la activación de eNOS a través de un mecanismo que opera a bajas concentraciones de calcio, el cual incrementa la afinidad de eNOS por la calmodulina y un segundo mecanismo que actúa en altas concentraciones de calcio caracterizado por estimular el dominio reductasa de la eNOS de manera independiente a su unión con la calmodulina⁶⁰.

En resumen: La Hsp90 activa a eNOS a través de tres mecanismos diferentes: 1) Favorece que el calcio y la calmodulina se unan a eNOS, 2) Mantiene la forma dimérica activa de la eNOS y 3) Facilita la fosforilación de la serina 1177 (Ser-1177) de la eNOS por la cinasa Akt. En forma contraria, el desacople entre Hsp90 y eNOS propicia la fosforilación de la treonina 497 (Tre-497) de eNOS, con lo que no solo se inactiva, sino que también se favorece que eNOS ahora produzca el anión superóxido. Sin embargo, pocos de estos estudios especifican cual isoforma de Hsp90 ejerce estos efectos. (Figura 7)

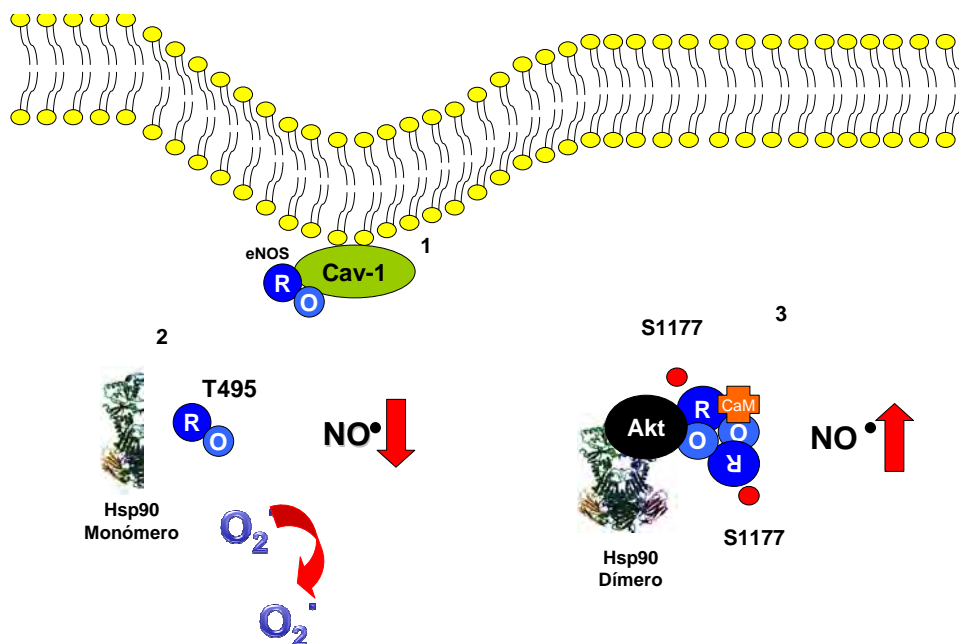


Figura 7. Ilustración que muestra las formas en que se puede regular a la eNOS. 1) Su unión con caveolina-1 la mantiene anclada a la membrana celular en su forma inactiva 2) Cuando Hsp90 está en forma de monómero y no interactúa con la eNOS, ésta se mantiene como monómero y se fosforila en la T495, lo que desacopla la transferencia de electrones y genera que eNOS produzca anión superóxido. 3) Cuando el dímero activo de Hsp90 interactúa con la eNOS, ésta se dimeriza, se fosforila en la S1177 y se facilita su unión con la calmodulina, lo que acopla el flujo de electrones para la síntesis de NO.

Implicación de la interacción Hsp90-eNOS en la fisiología renal

El óxido nítrico es un mediador molecular muy importante que participa en numerosos procesos y en diferentes órganos. En el riñón, el NO juega papeles importantes en la regulación homeostática y la integración de la función tubular, glomerular y vascular así como en procesos que incluyen: la proliferación celular, la transcripción y el metabolismo energético. En la vasculatura, el NO funciona no solo como un potente vasodilatador sino también como, antitrombótico, anti-inflamatorio, antiproliferativo y como antioxidante.

Sin embargo, a pesar de que el NO tiene muchos papeles benéficos, un exceso en la producción de NO puede ser citotóxico, por ejemplo la reacción de NO

con el oxígeno reactivo lleva a la formación del anión peroxinitrito, del radical nitroxil y a la formación del radical hidroxilo provocando nitración proteica. El exceso de NO contribuye a la patogénesis de enfermedades renales y vasculares caracterizadas por inflamación y daño, entre las cuales destacan: la glomerulonefritis, la enfermedad renal tubulointersticial, la falla renal post-isquémica, la nefropatía obstructiva y el rechazo de trasplante renal.

Se conoce que la biodisponibilidad de NO puede ser disminuida por un aumento del estrés oxidativo y se sabe que una biodisponibilidad reducida de NO se asocia con procesos fisiopatológicos renales como la insuficiencia renal crónica y aguda, ya sea debido a una reducción en su síntesis o al incremento en la formación de radicales libres.^{62, 63}

Es por eso que en este trabajo decidimos estudiar el papel específico de Hsp90 β sobre la regulación de la vía de NO/eNOS, pues hallazgos sobre como se regula esta vía pueden tener una implicación importante en la fisiología vascular anormal en donde la generación del O^{2•-} y una disponibilidad reducida de NO tienen lugar.

Hipótesis

Si la Hsp90 β desempeña un papel importante en la regulación de la vía Hsp90/eNOS/NO; entonces, la transfección de Hsp90 β de rata en células HEK-293 modificara la síntesis de NO.

Objetivo General.

- Investigar el mecanismo de regulación de eNOS por Hsp90 β

Objetivos particulares:

1. Clonar Hsp90 β de riñón de corteza renal de rata en el vector de expresión pcDNA3.1(+)

En células HEK-293:

2. Evaluar el efecto de Hsp90 β sobre la producción de óxido nítrico.
3. Investigar si Hsp90 β modifica los niveles de expresión de eNOS, y/o el estado de fosforilación (S1179 y T497) de esta enzima.
4. Determinar si Hsp90 β modifica la producción de radicales libres.
5. Evaluar si la sobre-expresión de Hsp90 β modifica la relación dímero/monómero de Hsp90 α y/o de Hsp90 β .

Metodología.

Clonación de Hsp90 β .

Extracción de RNA y Obtención de cDNA.

Se extrajo el RNA total del tejido de corteza renal de la rata Wistar macho utilizando el método de Trizol (Invitrogen), la integridad del RNA aislado se examinó por electroforesis en gel de agarosa al 1% y la concentración se determinó mediante la absorbancia de luz UV a 260 nm. Se sintetizó cDNA mediante transcripción reversa (RT) utilizando 2.5 μ g de RNA total de la corteza renal. El RNA se calentó a 65° C por 10 minutos, posteriormente se adicionaron 200 U de Transcriptasa Reversa (Invitrogen), 100 pmol de hexameros (Invitrogen), 0.5 mM de dNTP's (Sigma, St. Louis, MO), 10 mM de DTT y buffer de RT 1X (75mM KCl, 50mM Tris-HCl, 3mM MgCl₂) en un volumen final de 20 μ l; se incubó a 37° C por 1 hr y 95° C por 5 minutos.

Amplificación de Hsp90 β de riñón de rata.

La amplificación del transcrito de Hsp90 β (2220 pb) se realizó mediante una reacción de PCR utilizando como templado el cDNA sintetizado, los siguientes oligonucleótidos: sentido (5' AAG GAA AAA **AGC GGC CGC** TCG TCA AGA TGC CTG AGG AA 3') y antisentido (5' CTA **GTC TAG** AGA GCC TTT AAT CCA CTT CTT CC 3'), los cuales introducen los sitios de restricción para las enzimas *Not I* y *Xba I* respectivamente (resaltados en negritas), en presencia de 2.5 U de la enzima Platinum Pfx DNA polymerase (Invitrogen), buffer de amplificación de Pfx 1X, 10 mM de dNTP's, 10mM de cada oligonucleótido, 5 mM MgSO₄ y se llevó a un

volumen final de 50 µl con H₂O. La amplificación del cDNA de Hsp90β con el tamaño esperado se corroboró mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%.

Clonación de Hsp90β en pcDNA3.1

El producto de PCR fue digerido con las enzimas *Not I* y *Xba I* (New England Biolabs) para su clonación en el vector de expresión en mamíferos pcDNA3.1(+) (Invitrogen), el cual se trató con las mismas enzimas. Se llevó a cabo la inserción del fragmento de PCR en el vector mediante una reacción de ligación utilizando la ligasa de DNA T4 (Fermentas). Con los productos de ligación obtenidos se transformaron bacterias *E. coli* XL-1 Blue supercompetentes. Se obtuvieron colonias a las cuales se les extrajo el DNA plasmídico con el estuche comercial QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN). Se analizó el plásmido obtenido de la miniprep sometándolo a doble digestión con *Xba I* y *Not I* para liberar el fragmento de 2220 pb correspondientes a Hsp90β.

Análisis de restricción y secuenciación automática.

Se realizó análisis de restricción del cDNA clonado con las enzimas *Kpn I*, *EcoR I*, *Kpn I*, y *Mfe I* con el fin de obtener el patrón de bandas esperado para la secuencia de Hsp90β. Finalmente la identidad del gen fue corroborada por secuenciación automática de las 2220 pb clonadas en pcDNA3.1, para lo cual se utilizó el primer T7 y se diseñaron los siguientes oligonucleótidos internos:

P1 (5' GCT GGT GCA GAC ATC CTC CAT G 3')

P2 (5' GGA GGA TGA GGA GAA GCC T 3')

P3 (5' CAT CCG TGG TGT GGT TGA TTC 3')

P4 (5' CTT CGT GGA GCG TGT GCG CGG A 3')

P5 (5' GCT ACA TGA TGG CCA AGA AAC 3')

utilizando el Secuenciador ABI PRISM 310 Genetic Analyzer PE Applied Biosystems.

Expresión heteróloga de Hsp90 β de rata en células HEK-293.

Transfección de la construcción pcDNA3.1-Hsp90 β células HEK-293

Se realizó la transfección del cDNA clonado de Hsp90 β utilizando lipofectamine 2000 (Invitrogen) en placas de cultivo de 6 pozos (Corning). La línea celular HEK-293 fue cultivada en medio D-MEM (Gibco), suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado por calor (Gibco), 1mM de piruvato de sodio y 0.1mM de aminoácidos no esenciales, 0.1 mM L-glutamina, 100 U/mL de penicilina y 100 μ g/ml de estreptomina. Los cultivos se mantuvieron en una atmósfera húmeda a 37° C con 5% de CO₂. Se sembraron 500 000 células por pozo un día antes de la transfección, a las 24 h se corroboró que las células estuvieran adheridas a la placa y que tuvieran una confluencia del 70%, se procedió con el protocolo del proveedor (Invitrogen). Se transfectaron dos grupos de células: el grupo control tratado con 20 μ l de lipofectamina y el grupo de sobre-expresión tratado con 6 μ g de la construcción pcDNA3.1(+)-Hsp90 β y 20 μ l de lipofectamina.

Producción de óxido nítrico.

A partir de lisados celulares de cada grupo, se determinó la producción de NO a través de la medición de sus metabolitos estables: los nitritos y los nitratos, utilizando un ensayo comercial colorimétrico (Oxford Biomedical Research), el cual consiste en reducir los nitratos en nitritos usando la enzima nitrato reductasa

(figura 8). Posterior a la reducción se cuantificaron espectrofotométricamente los nitritos totales mediante la reacción de Griess a una absorbancia de 540nm, dando así de una determinación confiable de la producción de NO, la cual se expresa en $\mu\text{M}/\mu\text{g}$ de proteína.

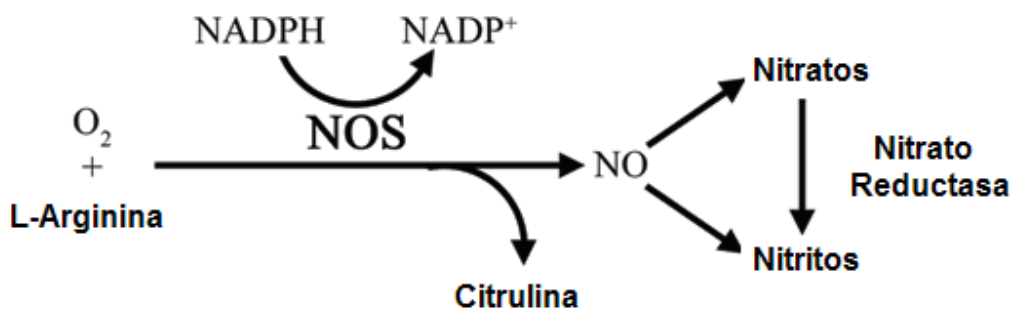


Figura 8. Conversión de Nitratos a Nitritos utilizando la enzima Nitrato Reductasa (NaR), previo a la cuantificación de nitritos mediante la reacción de Griess.

Niveles de peróxido de hidrógeno

La cantidad de peróxido de hidrógeno se determinó en lisados celulares de cada grupo de transfección utilizando el estuche comercial Amplex Red Hydrogen Peroxide/Peroxidase Assay Kit (Invitrogen), de acuerdo a las indicaciones del proveedor. La determinación se basa en que en presencia de peroxidasa, el reactivo “Amplex red” reacciona con el H₂O₂ produciendo un producto de oxidación rojo-fluorescente; la resurfina, la cual puede ser cuantificada espectrofotométricamente. Se mezclaron 50 μl de lisado celular y 50 μl del reactivo del estuche comercial, las muestras se incubaron por 30 minutos a temperatura ambiente protegidos de la luz, se obtuvo la densidad óptica a 560 nm y la absorbancia fue extrapolada con la curva estándar para determinar la concentración. La cantidad H₂O₂ detectada se expresa en $\mu\text{M}/\mu\text{g}$ de proteína.

Detección del anión superóxido

Para la determinación de los niveles intracelulares de $O_2^{\bullet-}$ las células fueron teñidas con hidroetidina (Polysciences, Inc). La hidroetidina entra libremente a la célula y en presencia de anión $O_2^{\bullet-}$ es deshidrogenada a bromuro de etidio, el cual se intercala en el DNA de la célula y emite fluorescencia de color rojo cuando es excitada a 535nm; ésta fluorescencia puede ser detectada y cuantificada por medio de citometría de flujo.

Se preparó la solución de tñido disolviendo 7mg de hidroetidina en 1 mL de N,N-dimetilacetamida (Sigma). La solución de trabajo (14 μ g/mL) se obtuvo añadiendo 20 μ l de la solución de tñido a 10 mL de PBS. Esta solución fue filtrada utilizando una membrana de 0.22 μ m de poro (Millipore). A las 48 horas de transfección se removió el medio de cultivo de las células y se lavaron 2 veces con PBS. Se añadió 1 mL de la solución de tñido y las células se incubaron por 15 minutos protegidas de la luz. Al final de la incubación se removió la solución de tñido y las células se lavaron nuevamente con PBS (3 veces). Se recuperaron las células y fueron resuspendidas en PBS, manteniéndose en frío para ser analizadas en el citómetro de flujo. Se capturó la información de 10000 células de cada grupo de transfección en el citometro FACScan (Becton Dickinson) utilizando una longitud de onda de excitación de 535 nm y de emisión de 610nm. Los datos fueron analizados con el programa CellQuest.

Extracción de proteínas y Western Blot.

Las proteínas de los cultivos celulares fueron extraídas 48 horas después de la transfección. Se recuperaron las células en buffer de homogenado (50mM HEPES pH 7.4, 250mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.1% NP-40) más un cocktail de inhibidores de proteasas (Roche). Las células se homogenizaron en vortex durante un minuto y se dejaron incubando 30 minutos a 4° C, posterior al tiempo de incubación se centrifugaron a 14000 rpm por 15 minutos, se obtuvo el sobrenadante con las proteínas, las cuales se cuantificaron por el método de Lowry (Bio-Rad DC).

Las muestras se sometieron a electroforesis. Utilizando 20 µg de proteína (50 µg para eNOS) en 10 µl de buffer de carga (6% SDS, 15 % glicerol, 150 mM Tris, azul de bromofenol 3%, β-mercaptoetanol 2% pH 7.6). Las proteínas fueron desnaturalizadas a 95° C por 5 minutos y fueron corridas en un gel SDS-PAGE al 8.5%. Las proteínas se transfirieron a una membrana de difloruro de polivinilo (PVDF, Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA), previamente equilibrados con buffer de transferencia 1X (190mM glicina, 2mM Tris base, SDS 0.1%, 200 ml Metanol) en un trans-blot (SD cell, BioRad) durante 60 minutos a 9V y se bloquearon por 90 minutos a temperatura ambiente en TBS-T y agente bloqueante (BIORAD) al 5%.

Después del bloqueo, las membranas fueron incubadas con el anticuerpo primario anti-Hsp90β (abcam) 1:5000, anti-Hsp90α (abcam) 1:5000, anti-eNOS (Cell Signaling) 1:500 o anti-β-actina (Santa Cruz Biotechnology Inc) 1:5000 por

una noche a 4 °C. Después de la incubación las membranas fueron lavadas 3 veces cada 10 minutos con TBS-T. Posteriormente se incubaron con el anticuerpo secundario; IgG goat-antirabbit conjugado a peroxidasa 1:10000 para Hsp90 β , Hsp90 α y eNOS o IgG donkey-antigoat conjugado a peroxidasa (Santa Cruz Biotechnology Inc) 1:2500 para β -actina, durante 90 minutos a temperatura ambiente y las membranas fueron nuevamente lavadas (6 veces).

Las proteínas fueron detectadas utilizando el Kit de quimio-luminiscencia ECL plus (GE Healthcare Life Sciences). Las bandas fueron escaneadas para el análisis densitométrico.

Fosforilación de eNOS

Se evaluó mediante WB con anticuerpos específicos para la fosforilación de eNOS en los residuos Serina 1179 y Treonina 497; antifosfo-eNOS T497 y antifosfo-eNOS S1179 (Cell Signaling) con una dilución 1:500.

Dímeros de Hsp90

La relación dímero/monómero de Hsp90 fue evaluado por Western Blot en proteínas no-desnaturalizadas. Las proteínas se sometieron a electroforesis en gel de acrilamida sin SDS al 7.5 % a 4 °C, utilizando buffer de corrida y de carga sin SDS. Se transfirieron a una membrana de difloruro de polivinilo (PVDF, Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA) y se realizó análisis de Western Blot para Hsp90 α y Hsp90 β como se describió previamente.

Análisis estadístico

En los casos donde se comparan más de dos grupos, los resultados se analizaron por ANOVA de una vía y las diferencias entre los grupos estudiados se determinaron con la prueba de Bonferroni. Cuando solo se comparan 2 grupos, los datos se analizaron por una prueba t de "Student". La diferencia se consideró significativa cuando el valor de p fue <0.05 . Los datos se presentan como el promedio +/- el error estándar. Para la representación gráfica de los datos se utilizó el programa Sigma Plot 10.0.

Resultados

El cDNA que codifica para Hsp90 β se amplificó de la corteza renal de la rata. Se analizó por electroforesis en gel de agarosa al 1% como se muestra en la figura 9. Se obtuvo un producto del tamaño esperado de 2220 pares de bases (pb).

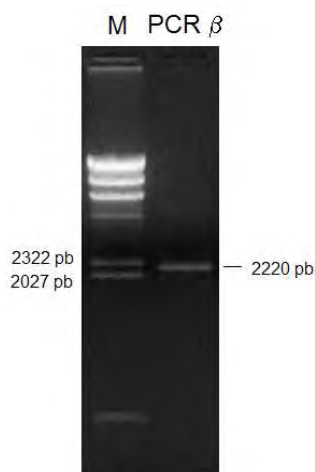


Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa al 1% que muestra el fragmento amplificado de 2220 pb correspondiente a Hsp90 β .

El producto de PCR se clonó en el vector de expresión pcDNA3.1(+), utilizando los sitios de restricción de las enzimas *Not I* y *Xba I*. Con este vector se transformaron bacterias XL-1 Blue supercompetentes. Para obtener suficiente material se realizaron minipreps de las colonias obtenidas. Una vez extraído el plásmido de las bacterias se digirió con *Not I* y *Xba I* para liberar el fragmento de 2220 pb, (Fig

10A). El fragmento también se digirió con otras cuatro enzimas; *Sac I*, *EcoR I*, *Kpn I* y *Mfe I* con el fin de realizar un análisis de restricción y comprobar que la secuencia correspondía a Hsp90 β , cabe mencionar que estos sitios de restricción no se encuentran en la secuencia de Hsp90 α . Los fragmentos esperados fueron: *Sac I* = 6020, 1158, 227, 117 y 109 pb, con *Kpn I* = 6948 y 683 pb y *Mfe I* no tiene ningún sitio de corte. Como se muestra en la figura 10B se obtuvieron los fragmentos del tamaño esperado, cuando se digirieron con las enzimas correspondientes.

También se corroboró la secuencia clonada y se comparó con la secuencia de Hsp90 β de rata para comprobar que no se habían introducido mutaciones en el

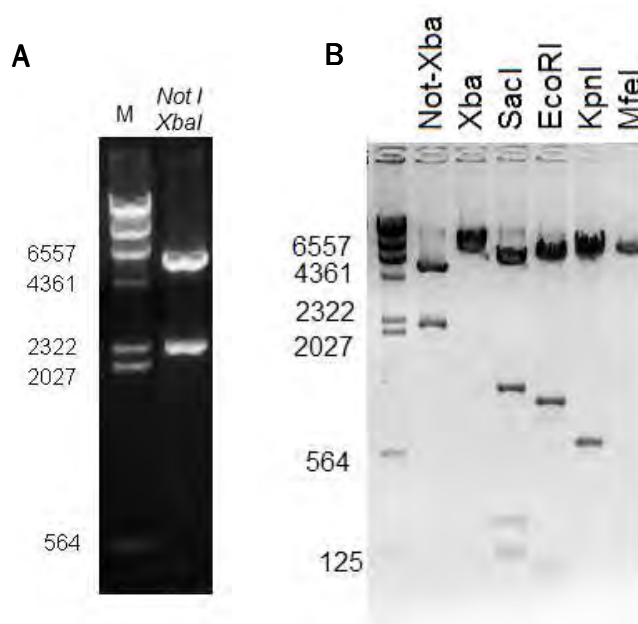


Figura 10. A) Análisis de restricción de Hsp90β. Se liberó el fragmento de 2220 pb correspondiente a Hsp90β con las enzimas *Not I* y *Xba I* del vector pcDNA3.1. B) Análisis de restricción de Hsp90β con *Not I*, *Xba I*, *Sac I*, *EcoR I*, *Kpn I* y *Mfe I*; al digerir la construcción pcDNA3.1/Hsp90β se obtuvieron los fragmentos del tamaño esperado.

proceso de clonación. Para este fin se diseñaron oligonucleótidos internos que nos permitieron secuenciar el fragmento completo. Una vez obtenida la secuencia se realizó el alineamiento entre la secuencia obtenida y la secuencia reportada en el GeneBank para Hsp90β de rata con el número de acceso BC082009 utilizando el programa CLUSTAL 2.0.5 multiple sequence alignment. El análisis reveló que la secuencia obtenida es 100% idéntica a la reportada en el GeneBank, la cual codifica para una proteína de 724 aminoácidos, por lo que concluimos que la Hsp90β se clonó exitosamente en el vector de expresión en mamíferos pcDNA3.1(+).

Una vez clonado el cDNA, nuestro objetivo siguiente fue sobre-expresar Hsp90β en células epiteliales de riñón humano HEK-293. Para ello se efectuó la transfección de las células HEK-293 con 4 μg, 6 μg y 8 μg de plásmido. Como se observa en la figura 11A, la expresión de Hsp90β aumenta de manera significativa en los 3 grupos de transfección, sin embargo, la cantidad de plásmido con la que

se obtiene el pico de sobre-expresión es de 6 μg . Posteriormente decidimos evaluar el tiempo ideal de transfección al cual con 6 μg de plásmido obtuviéramos el pico de sobre-expresión. Se realizó la transfección con 3 tiempos diferentes: 24, 48 y 72 horas. Después de transcurrido estos tiempos las células fueron recuperadas y se hizo el análisis de sobre-expresión de Hsp90 β por medio de western blot. Como se puede apreciar en la figura 9B, la sobre-expresión máxima fue alcanzada a las 48 horas.

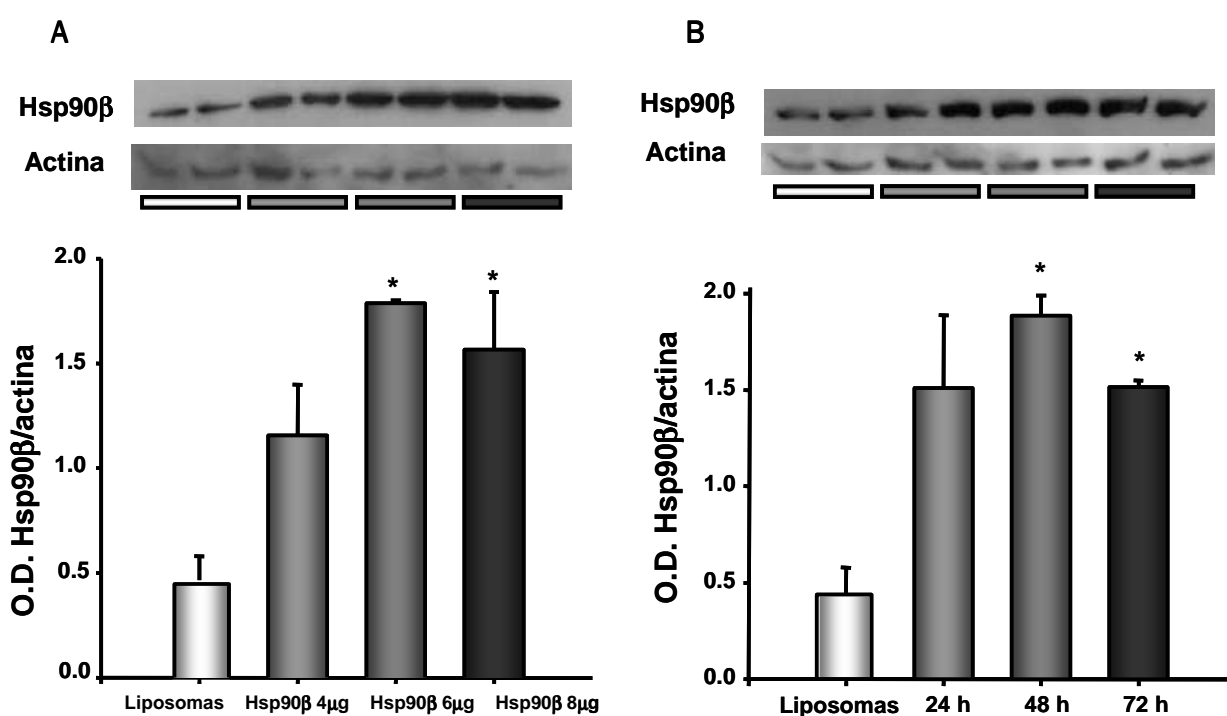


Figura 11. Expresión de Hsp90 β en células HEK-293 transfectadas. 11A) Curva de transfección con diferentes cantidades de plásmido (4, 6 y 8 μg). 11B) Análisis de sobre-expresión de Hsp90 β a las 24, 48 y 72 h post-transfección. (* $p < 0.01$ vs. Liposomas)

Para comenzar a evaluar cual es el efecto de Hsp90 β sobre la producción de NO, decidimos realizar la medición de la producción de NO, en cada uno de los grupos de transfección, tanto en la curva de plásmido como en la curva temporal. Como podemos apreciar en la figura 12A y 12B la producción de NO se ve drásticamente disminuida en todos los grupos de sobre-expresión de Hsp90 β ,

excepto en el de 72 h, lo que sugiere que Hsp90 β regula de manera negativa a la sintasa de NO endotelial.

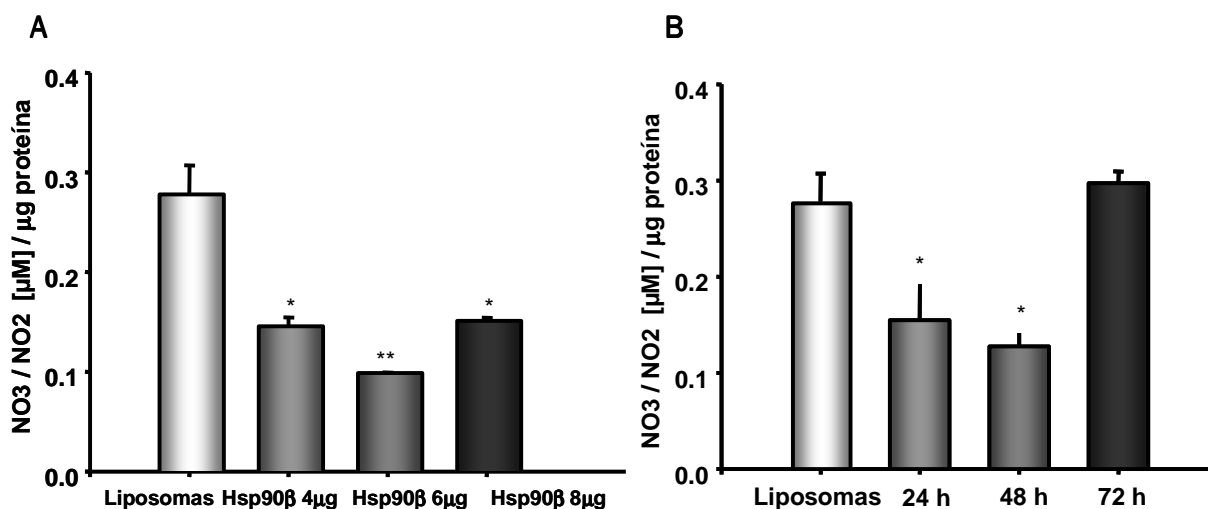


Figura 12. Producción de NO en células HEK-293 transfectadas con Hsp90 β . 10A) Medición de la producción de NO en células transfectadas con diferentes cantidades de plásmido. 10B) Producción de NO en células HEK transfectadas con 6 μ g de plásmido a diferentes tiempos post-transfección. (* $p < 0.01$ vs. Liposomas y ** $p < 0.001$ vs. Liposomas)

Una vez establecidas las condiciones ideales para obtener el pico máximo de sobre-expresión de Hsp90 β , se realizaron transfecciones independientes con las condiciones óptimas con el fin de estudiar con detalle la vía de Hsp90 β -NO/eNOS. Para lograr este objetivo se transfectaron dos grupos de células; el grupo control que se trató sólo con liposomas y el grupo de sobre-expresión de Hsp90 β tratado con liposomas mas la construcción pcDNA3.1(+)-Hsp90 β . Después de 48 horas de realizada la transfección se extrajeron las proteínas a partir de lisados totales de las células y se analizó la expresión de Hsp90 β mediante Western Blot para corroborar si había aumentado la expresión de esta proteína y al mismo tiempo se evaluó la expresión de Hsp90 α para comprobar que no hubiese sido afectada por la transfección de Hsp90 β . Como podemos apreciar en la figura 13A la transfección de pcDNA3.1(+)-Hsp90 β incrementó hasta 3 veces la cantidad de

Hsp90 β , logrando así la sobre-expresión de esta isoforma. La transfección de esta proteína no modificó la expresión de Hsp90 α como se muestra en la figura 13B. Los análisis de Western Blot nos aseguran que los resultados que observaremos son debidos exclusivamente al aumento en la expresión de la isoforma Hsp90 β .

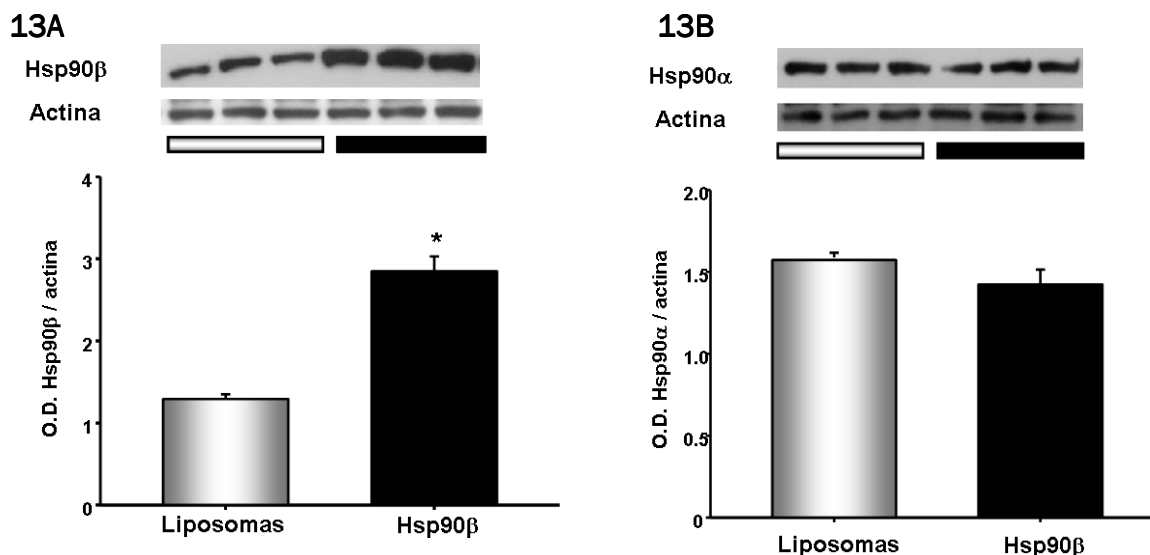


Figura 13. Expresión de Hsp90 β y Hsp90 α en células HEK-293 transfectadas con Liposomas o con Hsp90 β . (* $p < 0.001$ vs. Liposomas)

El objetivo siguiente fue conocer el efecto de la sobre-expresión de Hsp90 β sobre la producción de NO en estas células, para lo cual se determinó la cantidad de NO en los lisados celulares de cada grupo de células, mediante la medición de los metabolitos estables de la síntesis de NO; los nitritos y los nitratos. Interesantemente y contrario a lo que sucede al sobre-expresar Hsp90 α , la producción de óxido nítrico se vio drásticamente disminuida en las células transfectadas con Hsp90 β como se aprecia en la Figura 14, lo que sugiere que Hsp90 β regula de manera negativa la síntesis de NO.

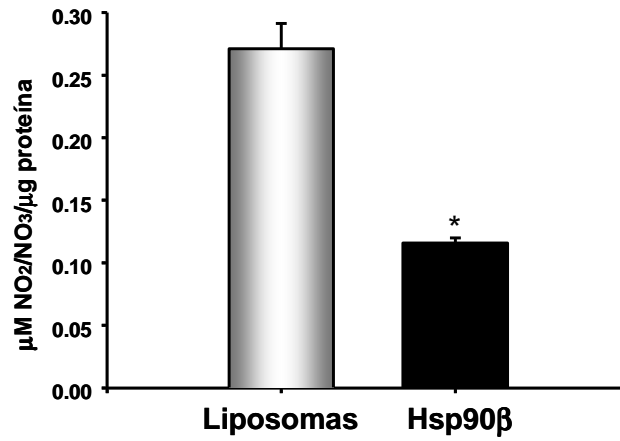


Figura 14. Producción de NO en células HEK-293 transfectadas con Hsp90β. * p<0.001 vs. Liposomas.

Para empezar a estudiar el mecanismo por el cual la sobre-expresión de Hsp90β modificó la producción de NO, se evaluó la expresión de eNOS. La figura 15 muestra la expresión de eNOS total en células tratadas con liposomas y en células transfectadas con Hsp90β, como podemos observar la expresión de eNOS total no se modificó por la transfección de Hsp90β en células HEK-293.

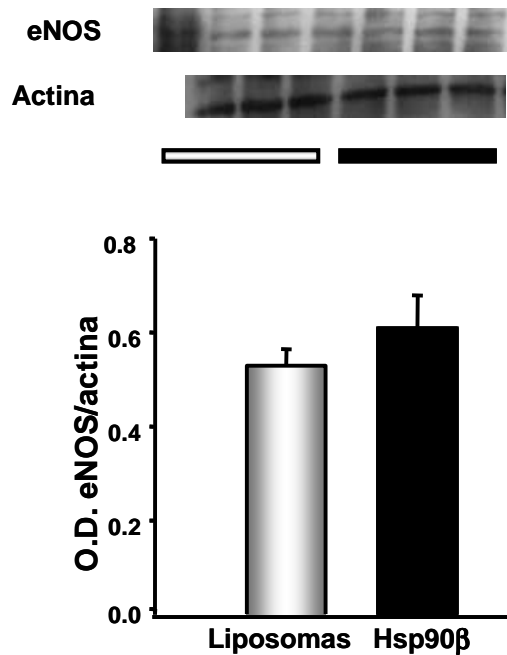


Figura 15. Efecto de la transfección de Hsp90β sobre los niveles de proteína de eNOS.

Como no observamos cambios en la expresión de eNOS total, decidimos estudiar su estado de fosforilación. Como mencioné en la introducción la eNOS es regulada pos-traduccionalmente de manera positiva o negativa por su estado de fosforilación. Se conoce que eNOS tiene 6 sitios potenciales de fosforilación, dos de los cuales han sido ampliamente estudiados; la treonina 497 (T497) que inactiva a la enzima provocando una disminución en la síntesis de NO mientras que la serina 1177 la activa, lo que resulta en mayor generación de NO.

Mediante análisis de Western blot con anticuerpos específicos contra aminoácidos fosforilados, se detectó la cantidad de eNOS fosforilada en estos residuos. En la figura 16 se muestra en la parte superior, la imagen del Western blot y en la parte inferior el análisis densitométrico del estado de fosforilación de estos residuos en las células tratadas con liposomas y en las transfectadas con Hsp90 β . Como podemos observar en la Figura 16A, la fosforilación en la T497 se incrementó hasta en un 100% en el grupo transfectado con Hsp90 β , lo que se asoció con una disminución en la producción de NO, en cambio la fosforilación de la S1177 no se modificó.

En observaciones previas de nuestro laboratorio se ha visto que la sobre-expresión de Hsp90 α induce un aumento en la fosforilación de la S1177, mientras que la fosforilación en la T497 no se modifica, lo que nos habla de una regulación diferencial de la actividad de eNOS por Hsp90 α y Hsp90 β . (Datos no publicados).

El desacople de Hsp90-eNOS por inhibición farmacológica de Hsp90 con geldanamicina o radicicol, no sólo resulta en menor síntesis de NO sino también se acompaña de mayor generación de (O²).

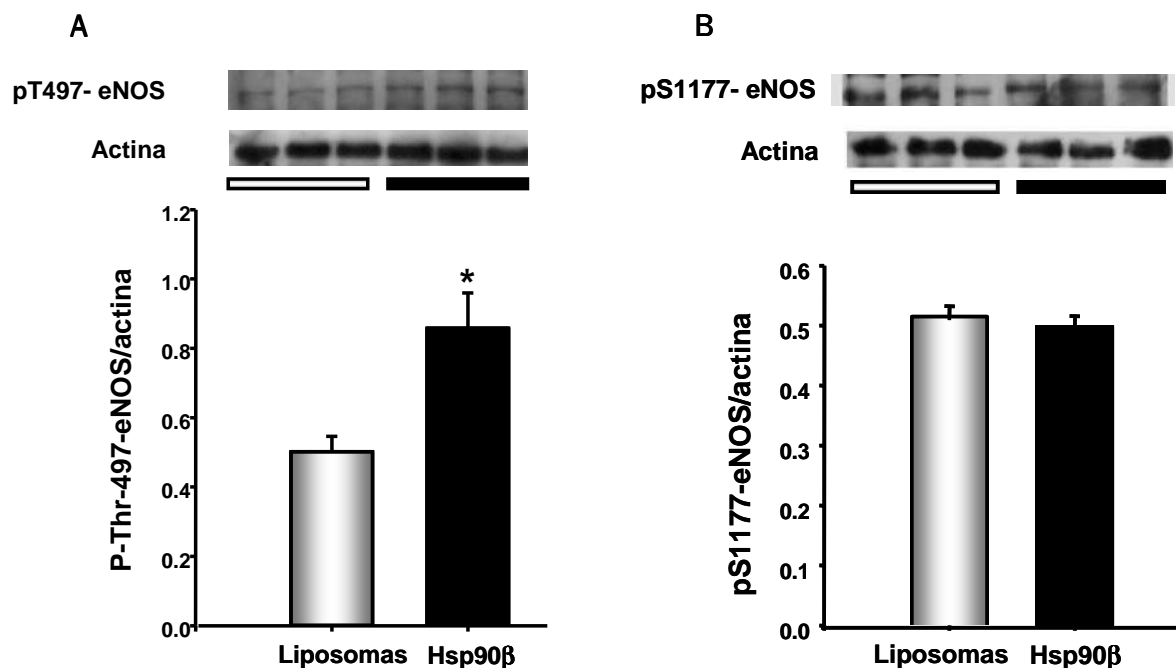


Figura 16. Efecto de la transfección de Hsp90β sobre la fosforilación de: 16a) T497 y 16b) S1177. * p<0.001 vs. Liposomas

Es por eso que decidimos evaluar el efecto de la transfección de Hsp90β sobre la producción de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) como un indicador de la producción de O^{2•-}. En la figura 17 se muestran los niveles de H₂O₂ en lisados totales de células. Sorprendentemente los niveles de H₂O₂ aumentaron hasta en un 150% en el grupo de sobre-expresión de Hsp90β.

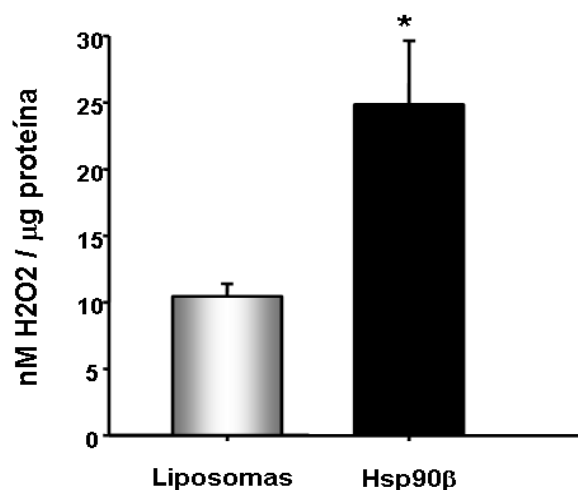


Figura 17. Producción de H₂O₂ en células HEK-293 transfectadas con Hsp90β. * p<0.01 vs. Liposomas.

Estos resultados nos sugirieron que Hsp90β podría estar modificando la capacidad de eNOS para producir radicales libres, promoviendo la generación de

O^{2•-} en lugar de generar NO, efecto similar a lo que ocurre cuando Hsp90 es inhibida farmacológicamente. Para estudiar con más detalle este efecto, se procedió a determinar los niveles intracelulares de anión superóxido en ambos grupos de transfección, mediante la tinción con hidroetidina (HE) y su cuantificación por citometría de flujo. En la figura 18A se muestran los histogramas representativos del grupo control y el transfectado con Hsp90 β , en ellos se puede observar claramente el incremento en la fluorescencia detectada como anión superóxido, lo cual es corroborado por medio de la cuantificación del % de células positivas y el incremento en la fluorescencia respecto al grupo control (Fig 18 B y

C).

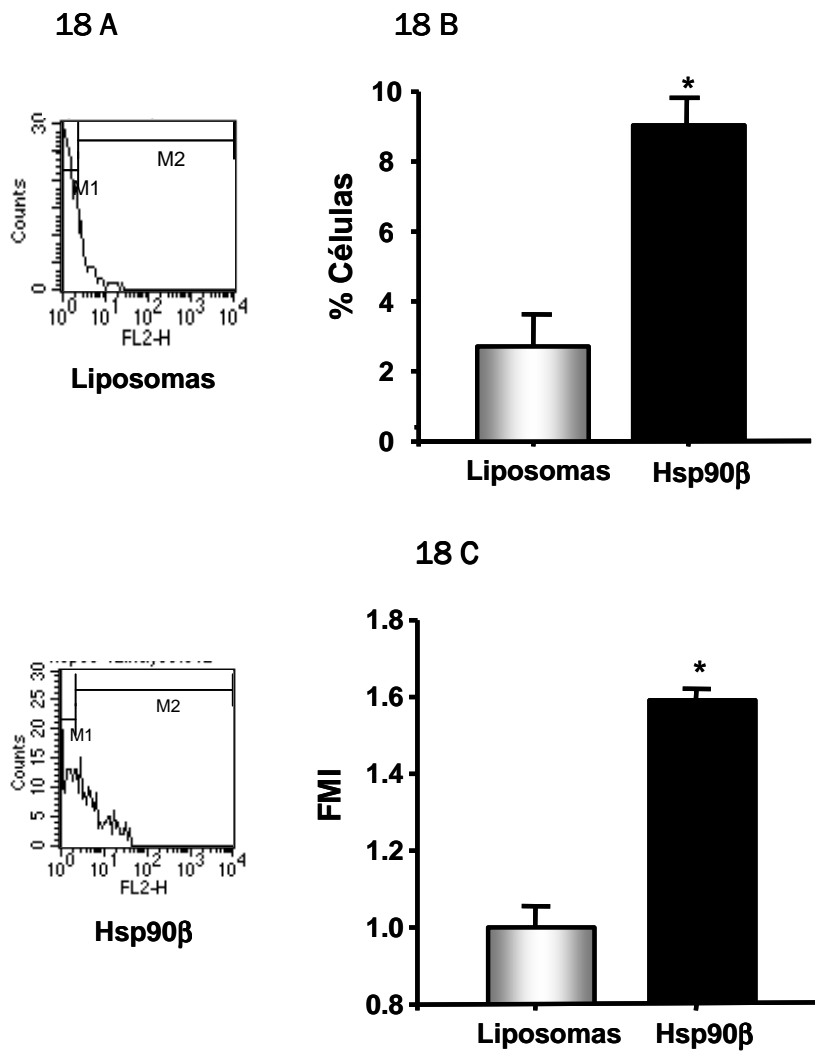


Figura 18. Citometría de flujo de la tinción con HE. 16A) Histogramas representativos de ambos grupos celulares. 16B) % células positivas a la tinción con HE. 16C) Aumento de la fluorescencia respecto al control.

El desacople de la interacción de Hsp90 con eNOS con inhibidores como el radiciol, propicia una disminución en la producción de NO acompañada de una mayor generación de $O^{2\bullet-}$, este efecto es similar al que observamos al sobreexpresar a la isoforma Hsp90 β . Esto nos llevo a la conclusión de que Hsp90 β funciona como un regulador negativo de eNOS, corroborado también por el incremento en la fosforilación de la T497. Una posibilidad por la que un aumento en la expresión de Hsp90 altere la actividad de la eNOS para producir radicales libres es la conformación en la que se encuentre Hsp90; homodímeros (Hsp90 α -Hsp90 α), (Hsp90 β -Hsp90 β) o heterodímeros (Hsp90 α -Hsp90 β). Recordemos que se ha descrito que la forma activa de Hsp90 es la dimérica. A este respecto decidimos evaluar la relación dímero/monómero (D/M) de Hsp90 α y Hsp90 β . En la parte superior de la figura 19 podemos observar un Western blot no-desnaturalizante de Hsp90 α , como se puede apreciar y corroborar con el análisis densitométrico la mayor parte de Hsp90 α se encuentra en conformación dimérica.

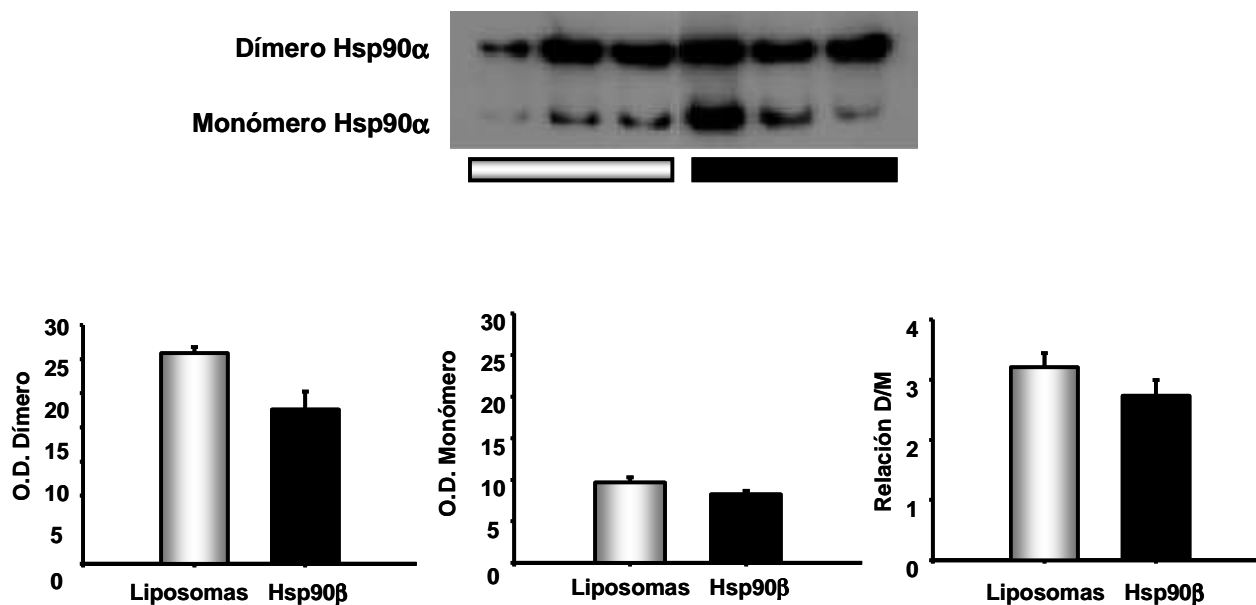


Figura 19. Efecto de la transfección de Hsp90 β sobre la relación dímero/monómero de Hsp90 α .

La sobre-expresión de Hsp90 β no modifico este patrón, por lo que la relación D/M no cambió.

De igual manera se evaluó la relación D/M de Hsp90 β en ambos grupos de células. Como podemos apreciar en la figura 20 tanto el dímero como el monómero de Hsp90 β , se incrementaron en el grupo de transfección de Hsp90 β respecto al grupo control, sin embargo la relación D/M se vió claramente disminuida al sobre-expresar Hsp90 β , efecto debido al claro aumento de Hsp90 β en su forma monomérica. Esto nos indica; por un lado que la isoforma Hsp90 β se encuentra en mayor proporción en forma monomérica y por el otro, sugiere que el monómero de Hsp90 β interactúa de alguna manera con la eNOS para promover su fosforilación en la T497 y el cambio en su actividad de producción de radicales libres. Recordando que la forma activa de Hsp90 es la dimérica, esto podría explicar que de alguna forma Hsp90 β no es capaz de activar a eNOS.

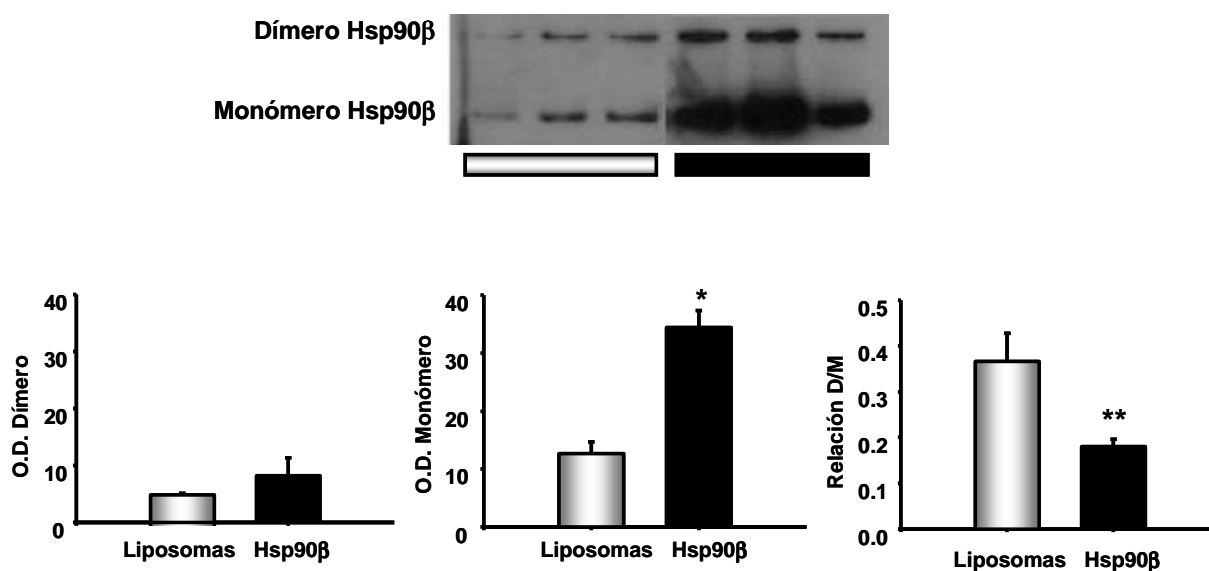


Figura 20. Efecto de la transfección de Hsp90 β sobre la relación dímero/monómero de Hsp90 β .

Estos resultados en conjunto sugieren que Hsp90 β regula de manera negativa la capacidad de eNOS para producir NO e induce un cambio en la actividad de eNOS, haciendo que ahora genere una mayor cantidad de anión superóxido. Esto a través de fosforilar a eNOS en el residuo de T497, el cual se ha reportado que inactiva a eNOS lo que además se asoció con un incremento en la generación de anión superóxido.

Discusión

Las proteínas citosólicas Hsp90 α y Hsp90 β modulan la actividad y estabilidad de un amplio rango de proteínas cliente, a través de interactuar con cada una de ellas, lo cual les confiere una importancia especial porque están involucradas en una gran variedad de procesos celulares. Se ha descrito que Hsp90 interactúa y estabiliza a más de 100 proteínas cliente (<http://www.picard.ch/downloads/Hsp90interactors>), entre éstas se encuentran: la familia de los receptores de hormonas esteroideas, factores de transcripción, cinasas de tirosina, subunidades de proteínas G y las sintasas de óxido nítrico neuronal (nNOS), inducible (iNOS) y endotelial (eNOS), ésta última de interés especial en la fisiología cardiovascular y renal.

La sintasa de óxido nítrico endotelial se expresa con abundancia en los capilares glomerulares y en el endotelio de las arteriolas aferente y eferente del glomerulo, allí se encarga de sintetizar el NO, un gas hidrofóbico con un potente efecto vasodilatador, el cual, a través de modificar las resistencias vasculares, regula la hemodinámica glomerular y por ende las presiones intraglomerulares que son un factor determinante en la filtración glomerular. La participación de Hsp90 en la regulación de la función renal por su interacción con eNOS se demostró en un estudio reciente de nuestro laboratorio⁶⁴, en el cual, al inhibir farmacológicamente a Hsp90 con radicicol, se observó hipoperfusión e hipofiltración renal asociado a una reducción en la excreción urinaria de nitritos y nitratos; los metabolitos estables de la síntesis del NO. Asimismo se observó que al inhibir Hsp90 incrementó la fosforilación de la T495 (sitio inactivante de eNOS), así como una reducción de la forma dimérica activa de eNOS.

Se ha descrito que la interacción entre Hsp90 y eNOS es un paso crítico para la producción de NO y por lo tanto para la regulación del tono vascular, esto a través de al menos dos mecanismos diferentes: por reclutar a la cinasa Akt, que fosforila la S1177 (sitio activante) de eNOS, y por permitir que eNOS se dimerice, ésta conformación permite el flujo adecuado de electrones para la síntesis de NO y también propicia que el calcio y la calmodulina se unan y estabilicen a esta enzima. Por otro lado, se conoce también que el desacople de la interacción Hsp90-eNOS mediante el uso de geldanamicina no sólo disminuye la producción de NO sino que se acompaña de una mayor generación de $O_2^{\bullet-}$ por parte de eNOS. Por lo que, la interacción de Hsp90 con eNOS es esencial para mantener una adecuada función renal, pues tanto el NO como el $O_2^{\bullet-}$ juegan papeles opuestos en la fisiología vascular renal, mientras que el NO favorece el mantenimiento de la función renal, a través de mantener las resistencias arteriolas disminuidas; el anión $O_2^{\bullet-}$ favorece el estrés oxidativo y reduce los efectos de NO propiciando daño y muerte celular, por lo tanto, alteraciones en la formación del complejo eNOS-Hsp90 pueden tener implicación importante en la vía de señalización de NO y por ende en procesos fisiopatológicos.

A pesar de que una de las interacciones más estudiadas de Hsp90, es la que establece con eNOS, la mayoría de los estudios se realizan utilizando inhibidores farmacológicos como la geldanamicina y el radicicol; Inhibidores que actúan sobre las dos isoformas citosólicas de Hsp90: Hsp90 α y Hsp90 β , por lo que, poco se conoce acerca del papel específico de cada isoforma en la regulación de la vía de NO/eNOS.

En este estudio decidimos evaluar el papel específico que tiene Hsp90 β sobre la regulación de la vía de NO/eNOS. Para lograr este objetivo, decidimos comenzar desde su clonación. Se clonó el cDNA de Hsp90 β (Hsp84) de corteza renal de rata en el vector de expresión en mamíferos pcDNA3.1(+). Mediante transfección transitoria en células epiteliales de riñón humano (HEK-293) logramos su sobre-expresión, que no afectó los niveles endógenos de Hsp90 α , lo que nos permite estudiar específicamente que ocurre con la síntesis de NO al sobre-expresarse Hsp90 β . Como se mencionó previamente a Hsp90 se le atribuye la estabilización de eNOS y con ello un incremento en la producción de NO, sin embargo, al determinar la producción de NO a través de los nitritos y nitratos en lisados celulares totales, observamos una menor concentración de estos metabolitos cuando las células fueron transfectadas con Hsp90 β respecto al grupo control, lo que nos indica una menor síntesis de NO en las células con sobre-expresión de Hsp90 β .

Esta observación nos sugirió que de alguna manera Hsp90 β funciona como un regulador negativo de la síntesis de NO, por lo que, decidimos estudiar que pasaba con la vía de NO a diferentes niveles. Primero decidimos estudiar si esta reducción en la producción de NO se debía a cambios en los niveles de proteína de eNOS. No encontramos diferencia en la expresión de eNOS en los grupos de células transfectadas con Hsp90 β respecto a las células no tratadas.

También evaluamos los niveles de dos sitios de fosforilación de eNOS que se conoce regulan su actividad. Observamos un aumento considerable en la fosforilación de la T497 en el grupo transfectado con Hsp90 β , sin detectar cambios

en la fosforilación de la S1177. Esto nos indica que la sobre-expresión de Hsp90 β regula de manera negativa la síntesis de NO, a través de incrementar la fosforilación del residuo inactivante de eNOS. En estudios previos se sugirió que la fosforilación de la T497 podría estar implicada en el desacople de la forma dimérica de eNOS y por ende con una mayor generación de O $^{2\bullet-}$. La fosforilación de la T497 por PKC produce un cambio conformacional en la enzima capaz de interrumpir el flujo de electrones, desacoplando a eNOS y provocando que se genere O $^{2\bullet-}$. En este estudio decidimos determinar que ocurría con la producción de O $^{2\bullet-}$ en respuesta a la sobre-expresión de Hsp90 β , a través de determinar la concentración de péroxido de hidrógeno presente en los lisados celulares. Sorprendentemente encontramos un aumento importante en el peróxido de hidrógeno detectado en el grupo de transfección respecto al control. Esto nos sugirió que Hsp90 β modifica la capacidad de eNOS para producir radicales libres, promoviendo la generación del O $^{2\bullet-}$ en lugar de generar NO. Para corroborarlo, se determinaron los niveles intracelulares de O $^{2\bullet-}$, mediante su tinción directa con hidroetidina. Los resultados indicaron que efectivamente la transfección de Hsp90 β altera la actividad de eNOS promoviendo una mayor generación de O $^{2\bullet-}$ dependiente de esta enzima.

Finalmente, es conocido que la forma funcional de Hsp90 es la forma dimérica, a este respecto decidimos evaluar el efecto de sobre-expresar Hsp90 β sobre la relación dímero/monómero. Como era de esperarse en el grupo control encontramos que Hsp90 α se encuentra en mayor proporción en forma dimérica y que Hsp90 β en forma monomérica. En el grupo de células transfectadas con Hsp90 β la relación D/M de Hsp90 α no se modificó. En cambio, la sobre-expresión

de Hsp90 β acentuó la forma monómerica de Hsp90 β . Nuestros resultados sugieren que para una adecuada síntesis de NO, el homodímero de Hsp90 α es esencial para la activación de eNOS y se produzca NO; en cambio, cuando se produce un desbalance en la expresión de Hsp90 α y Hsp90 β , se puede incrementar la formación de heterodímeros, o si es el caso aumentar la forma monomérica de Hsp90 β sugiriendo que estas conformaciones de Hsp90 son incapaces de activar a eNOS para que produzca NO, por el contrario, se estimula la generación de O $^{2\cdot-}$ por eNOS. Estos hallazgos pueden tener una implicación importante en la fisiología vascular anormal en donde la generación del anión superóxido y una disponibilidad reducida de NO se ven involucradas. Sin embargo más estudios son requeridos para evaluar que modificaciones postraduccionales pueden sufrir tanto Hsp90 α , Hsp90 β o eNOS para que ante un desbalance en la expresión de las isoformas de Hsp90 (en este caso sobre-expresión de Hsp90 β) pueden generar que eNOS modifique su capacidad para producir radicales libres.

Una posibilidad es que el monómero de Hsp90 β establezca una interacción directa con eNOS, manteniéndola en su conformación monomérica inactiva e impidiendo que esta interactúe con Hsp90 α , la cual promovería su activación y/o que el monómero de Hsp90 β interactúe con mayor afinidad con la enzima encargada de fosforilar a la eNOS en la T497, conduciéndola a su inactivación

Existe evidencia de que alteraciones en la regulación de la vía de Hsp90-eNOS/NO se ven involucradas en diferentes patologías. Un ejemplo claro es un estudio realizado por Lei H y col. en el que se muestra como la ausencia de interacción entre Hsp90 y eNOS esta relacionada con el desarrollo de la nefropatía

diabética, enfermedad caracterizada por daño endotelial asociado con una reducción en la síntesis de NO y un incremento en la generación de radicales libres⁶⁵.

En concordancia con lo anterior en el año 2006 se publicó un estudio en el cual se resalta la importancia de la interacción de Hsp90 con eNOS en el síndrome hepatopulmonar, síndrome caracterizado por una sobre-producción de NO en los pulmones y una insuficiencia de NO en el hígado. En este estudio, los autores evaluaron la regulación de la actividad de eNOS por Hsp90 en un modelo de cirrosis biliar en la rata. Mediante inmunoprecipitación se determinó que la sobre-producción de NO observada en el pulmón es debida a un incremento en la asociación entre Hsp90 y eNOS, mientras que la baja biodisponibilidad de NO en el hígado es debida a que eNOS interactúa mayormente con caveolina-1 lo que mantiene a eNOS unida a la membrana de la célula en su forma inactiva y en consecuencia eNOS no puede interactuar con Hsp90⁶⁶.

Conclusiones

- ✓ Se clonó el cDNA de Hsp90 β (Hsp84) de la corteza renal de la rata, el cual al ser transfectado en células HEK-293 es transcripcionalmente activo.

- ✓ La sobre-expresión de Hsp90 β redujo de manera significativa la producción de NO e incrementó la producción de H₂O₂ y de anión superóxido.

- ✓ Los cambios en la producción de radicales libres al sobre-expresar Hsp90 β se asociaron con un aumento en la fosforilación inactivante de eNOS (Tre-497), sin cambios en los niveles de proteína de eNOS ni en la fosforilación del residuo S1177.

- ✓ La sobre-expresión de Hsp90 β indujo una tendencia al aumento en la conformación dimérica de Hsp90 α y Hsp90 β , así como un incremento claro en la conformación monomérica de Hsp90 β ; efecto que puede asociarse con la forma activa de Hsp90 y su efecto sobre sus proteínas cliente.

Bibliografia

1. Ritossa FA: New puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia* 18:571-573, 1962
2. Dörthe M: On Heat and Cells and Proteins. *News Physiol. Sci.* 19:11-15, 2004
3. Jaattela M: Heat shock proteins as cellular lifeguards. *Ann.Med.* 31:261-271, 1999
4. Borkan SC and Gullans SR: Molecular Chaperones in the kidney. *Annu. Rev. Physiol.* 64:503-527, 2002
5. Saibil Helen R: Chaperone machines in action. *Curr. Opin. in Struc. Biol.* 18:35-42, 2008
6. Narberhaus F: Alpha-crystallin-type heat shock proteins: socializing minichaperones in the context of a multichaperone network. *Microbiol Mol Biol Rev* 66:64-93, 2002
7. Benjamin IJ, McMillan DR: Stress (heat shock) proteins: molecular chaperones in cardiovascular biology and disease. *Circ Res.* 83:117-132, 1998
8. Sreedhar AS, Kalmar E, Csermely P, Shen YF: Hsp90 isoforms: functions, expression and clinical importance. *FEBS Lett.* 562:11-15, 2004
9. Richter K, Buchner J: Hsp90: chaperoning signal transduction. *J Cell Physiol.* 188:281-290, 2001
10. Chiosis G, Vilenchik M, Kim J, Solit D: Hsp90: the vulnerable chaperone. *Drug Discov Today.* 9:881-888, 2004
11. Grammatikakis N, Vultur A, Ramana CV, Sigano A, Schweinfest CW, Watson DK, Raptis L: The role of Hsp90N, a new member of the Hsp90 family, in signal transduction and neoplastic transformation. *J Biol Chem.* 277:8312-8320, 2002
12. Moore SK, Kozak C, Robinson EA, Ullrich SJ, Appella E: Murine 86- and 84-kDa heat shock proteins, cDNA sequences, chromosome assignments, and evolutionary origins. *J Bio Chem.* 264:5343-5351, 1989
13. Rebbe NF, Ware J, Bertina RM, Modrich P, Stafford DW: Nucleotide sequence of a cDNA for a member of the human 90-kDa heat- shock protein family. *Gene* 53:235-245, 1987
14. Ullrich SJ, Moore SK, Appella E: Transcriptional and translational analysis of the murine 84- and 86-kDa heat shock proteins. *J Biol Chem.* 264:6810-6816, 1989
15. Shen Y, Liu J, Wang X, Cheng X, Wang Y, Wu N: Essential role of the first intron in the transcription of hsp90beta gene. *FEBS Lett.* 413:92-98, 1997

16. Zhang SL, Yu J, Cheng XK, Ding L, Heng FY, Wu NH, Shen YF: Regulation of human hsp90alpha gene expression. *FEBS Lett.* 444:130-135, 1999
17. Bharadwaj S, Ali A, Ovsenek N: Multiple components of the HSP90 chaperone complex function in regulation of heat shock factor 1 In vivo. *Mol Cell Biol.* 19:8033-9041, 1999
18. Morimoto RI: Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators. *Genes Dev.* 12: 3788-3796, 1998
19. Shi Y, Mosser DD, Morimoto RI: Molecular chaperones as HSF1-specific transcriptional repressors. *Genes Dev.* 12:654-666, 1998
20. Gupta RS: Phylogenetic analysis of the 90 kD heat shock family of protein sequences and an examination of the relationship among animals, plants, and fungi species. *Mol Biol Evol.* 12:1063-1073, 1995
21. Minami Y, Kawasaki H, Miyata Y: Analysis of native forms and isoform compositions of the mouse 90-kDa heat shock protein, HSP90. *J Biol Chem.* 266:10099-10103, 1991
22. Cortés Gonzales CC, Ramírez V, Ariza AC, Bobadilla NA: Significado Funcional de las proteínas de choque térmico de 90 kDa. *Rev Invest Clin.* 60:311-320, 2008
23. Buchner J: Hsp90 & Co. - a holding for folding. *Trends Biochem Sci.* 24:136-141, 1999
24. Richter K, Soroka J, Skalniak L, Leskovar A, Hessling M, Reinstein J, Buchner J: Conserved conformational changes in the ATPase cycle of human Hsp90. *J Biol Chem.* 283:17757-17765, 2008
25. Hessling M, Richter K, Buchner J: Dissection of the ATP-induced conformational cycle of the molecular chaperone Hsp90. *Nat Struct Mol Biol.* 16:287-293, 2009
26. Prodromou C, Roe SM, O'Brien R, Ladbury JE, Piper PW, Pearl LH: Identification and structural characterization of the ATP/ADP-binding site in the Hsp90 molecular chaperone. *Cell.* 90: 65-75, 1997
27. Meyer P, Prodromou C, Hu B, Vaughan C, Roe SM, Panaretou B, Piper PW, Pearl LH: Structural and functional analysis of the middle segment of hsp90: implications for ATP hydrolysis and client protein and cochaperone interactions. *Mol Cell.* 11:647-658, 2003
28. Prodromou C, Panaretou B, Chohan S, Siligardi G, O'Brien R, Ladbury JE, Roe SM, Piper PW, Pearl LH: The ATPase cycle of Hsp90 drives a molecular 'clamp' via transient dimerization of the N-terminal domains. *EMBO J.* 19:4383-4392, 2000

29. Waza M, Adachi H, Katsuno M, Minamiyama M, Sang C, Tanaka F, Inukai A, Doyu M, Sobue G: 17-AAG, an Hsp90 inhibitor, ameliorates polyglutamine-mediated motor neuron degeneration. *Nat Med.* 11:1088-1095, 2005
30. Wei Q, Xia Y: Roles of 3-phosphoinositide-dependent kinase 1 in the regulation of endothelial nitric-oxide synthase phosphorylation and function by heat shock protein 90. *J Biol Chem.* 280:18081-18086, 2005
31. Zhang L, Nephew KP, Gallagher PJ: Regulation of death-associated protein kinase. Stabilization by HSP90 heterocomplexes. *J Biol Chem.* 282:11795-11804, 2007
32. Jiang B, Xiao W, Shi Y: Heat shock pretreatment inhibited the release of Smac/DIABLO from mitochondria and apoptosis induced by hydrogen peroxide in cardiomyocytes and C2C12 myogenic cells. *Cell Stress Chaperones.* 10:252-262, 2005
33. Sangster TA, Queitsch C, Lindquist S: Hsp90 and chromatin: where is the link? *Cell Cycle.* 2:166-168, 2003
34. Garcia-Cardena G, Fan R, Shah V, Sorrentino R, Cirino G, Papapetropoulos A, Sessa WC: Dynamic activation of endothelial nitric oxide synthase by Hsp90. *Nature* 392:821-824, 1998
35. Bender AT, Silverstein AM, Demady DR et al. Neuronal nitric-oxide synthase is regulated by the Hsp90-based chaperone system in vivo. *J Biol Chem.* 274:1472-1478, 1999
36. Yoshida M, Xia Y: Heat shock protein 90 as an endogenous protein enhancer of inducible nitric-oxide synthase. *J Biol Chem.* 278:36953-36958, 2003
37. Gologorsky MS, Gross SS: *Nitric Oxide and the Kidney; Physiology and pathophysiology.* 1997
38. Kone C. Bruce: Nitric Oxide Synthesis in the Kidney: Isoforms, Biosynthesis and Functions in Health. *Seminars in Nephrology.* 4: 299-315, 2004
39. Kone BC, Kuncewicz T, Zhang W, Yu ZY: Protein interactions with nitric oxide synthases: controlling the right time, the right place, and the right amount of nitric oxide. *Am.J.Physiol Renal Physiol* 285:F178-F190, 2003
40. Goligorsky MS, Brodsky SV, Noiri E. NO Bioavailability, Endothelial dysfunction and acute renal failure: New insights into pathophysiology. *Seminars in Nephrology.* 4:316-323, 2004
41. Fulton D, Gratton JP, McCabe TJ, Fontana J, Fujio Y, Walsh K, Franke TF, Papapetropoulos A, Sessa WC: Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature* 399:597-601, 1999

42. Fulton D, Gratton JP, Sessa WC: Post-translational control of endothelial nitric oxide synthase: why isn't calcium/calmodulin enough? *J Pharmacol Exp Ther.* 299:818-824, 2001
43. Garcia-Cardena G, Oh P, Liu J, Schnitzer JE, Sessa WC: Targeting of nitric oxide synthase to endothelial cell caveolae via palmitoylation: implications for nitric oxide signaling. *PNAS USA* 93:6448-6453, 1996
44. Gratton JP, Fontana J, O'Connor DS, Garcia-Cardena G, McCabe TJ, Sessa WC: Reconstitution of an endothelial nitric-oxide synthase (eNOS), hsp90, and caveolin-1 complex in vitro. Evidence that hsp90 facilitates calmodulin stimulated displacement of eNOS from caveolin-1. *J Biol Chem.* 275:22268-22272, 2000
45. Papapetropoulos A, Fulton D, Lin MI, Fontana J, McCabe TJ, Zoellner S, Garcia-Cardena G, Zhou Z, Gratton JP, Sessa WC: Vanadate is a potent activator of endothelial nitric-oxide synthase: evidence for the role of the serine/threonine kinase Akt and the 90-kDa heat shock protein. *Mol Pharmacol.* 65:407-415, 2004
46. Harris MB, Blackstone MA, Ju H, Venema VJ, Venema RC: Heat-induced increases in endothelial NO synthase expression and activity and endothelial NO release. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* 285:H333-H340, 2003
47. Kupatt C, Dessy C, Hinkel R, Raake P, Daneau G, Bouzin C, Boekstegers P, Feron O: Heat shock protein 90 transfection reduces ischemia-reperfusion-induced myocardial dysfunction via reciprocal endothelial NO synthase serine 1177 phosphorylation and threonine 495 dephosphorylation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 24:1435-1441, 2004
48. Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG: Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J.* 357:593-615, 2001
49. Harris MB, Blackstone MA, Ju H, Venema VJ, Venema RC: Heat-induced increases in endothelial NO synthase expression and activity and endothelial NO release. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* 285:H333-H340, 2003.
50. Brouet A, Sonveaux P, Dessy C et al. Hsp90 ensures the transition from the early Ca²⁺-dependent to the late phosphorylation-dependent activation of the endothelial nitric-oxide synthase in vascular endothelial growth factor-exposed endothelial cells. *J Biol Chem.* 276:32663-32669, 2001
51. Sun J, Liao JK: Induction of angiogenesis by heat shock protein 90 mediated by protein kinase Akt and endothelial nitric oxide synthase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 24:2238-2244, 2004
52. Sessa WC: eNOS at a glance. *J Cell Sci.* 117:2427-2429, 2004
53. Fleming I, Busse R: Signal Transduction of eNOS activation. *Cardiovasc Res.* 43:532-541, 1999

54. Pritchard KA, Jr., Ackerman AW, Gross ER et al. Heat shock protein 90 mediates the balance of nitric oxide and superoxide anion from endothelial nitric-oxide synthase. *J Biol Chem.* 276:17621-17624, 2001
55. Fleming I, Fisslthaler B, Dimmeler S, Kemp BE, Busse R: Phosphorylation of Thr(495) regulates Ca(2+)/calmodulin-dependent endothelial nitric oxide synthase activity. *Circ Res.* 88:68-75, 2001
56. Lin MI, Fulton D, Babbitt R, Fleming I, Busse R, Pritchard KA Jr, Sessa WC. Phosphorylation of threonine 497 in endothelial nitric-oxide synthase coordinates the coupling of L-arginine metabolism to efficient nitric oxide production. *J Biol Chem.* 278:44719-44726, 2003
57. Zhang X, Jin Y, Xia L, Tao X, Bai M, Zhang J: Hsp90 mediates the balance of nitric oxide and superoxide anion in the lungs of rats with acute pulmonary thromboembolism. *Int Immunopharmacol* 9:43-48, 2009
58. Takahashi S, Mendelsohn ME: Synergistic activation of endothelial nitric-oxide synthase (eNOS) by HSP90 and Akt: calcium-independent eNOS activation involves formation of an HSP90-Akt-CaM-bound eNOS complex. *J Biol Chem.* 278:30821-30827, 2003
59. Papapetropoulos A, Fulton D, Lin MI, Fontana J, McCabe TJ, Zoellner S, Garcia-Cardena G, Zhou Z, Gratton JP, Sessa WC: Vanadate is a potent activator of endothelial nitric-oxide synthase: evidence for the role of the serine/threonine kinase Akt and the 90-kDa heat shock protein. *Mol. Pharmacol.* 65:407-415, 2004
60. Takahashi S, Mendelsohn ME. Calmodulin-dependent and -independent activation of endothelial nitric-oxide synthase by heat shock protein 90. *J Biol Chem.* 278:9339-9334, 2003
61. Xu H, Shi Y, Wang J, Jones D, Weilrauch D, Ying R, Wakim B, Pritchard KA Jr. A heat shock protein 90 binding domain in endothelial nitric-oxide synthase influences enzyme function. *J Bio, Chem.* 282:37567-37574, 2007
62. Devarajan P: Update on mechanisms of ischemic acute kidney injury. *J Am Soc Nephrol.* 17:1503-1520, 2006
63. Lameire N, Van Biesen W, Vanholder R. Acute Renal Failure. *Lancet.* 365:417-430, 2005
64. Ramírez V, Mejía-Vilet JM, Hernandez D, Gamba G, Bobadilla NA: Radicicol, a heat shock protein 90 inhibitor, reduces glomerular filtration rate. *Am J physiol Renal Physiol.* 295:1044-1051, 2008
65. Lei H, Venkatakrisnan A, Yu S, Kazlauskas A: Protein kinase A-dependent translocation of Hsp90 alpha impairs endothelial nitric-oxide synthase activity in high glucose and diabetes. *J Biol Chem.* 282:9364-9371, 2007

66. Frossard JL, Schiffer E, Cikirikcioglu B, Bourquin J, Morel DR, Pastor CM: Opposite regulation of endothelial NO synthase by HSP90 and caveolin in liver and lungs of rats with hepatopulmonary syndrome. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 293:864-870, 2007