

Significado funcional de las proteínas de choque térmico de 90 kDa

Carlo César Cortés-González,* Victoria Ramírez-González,* Ana Carolina Ariza,* Norma A. Bobadilla*

* Unidad de Fisiología Molecular, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México e Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.

Functional significance of heat shock protein 90

ABSTRACT

The heat shock protein 90 kDa (Hsp90) subfamily is constituted by five isoforms, among them Hsp90 α and Hsp90 β are the more abundant cytosolic proteins. These two proteins are molecular chaperons that participate in numerous cellular processes, through interacting with more than 100 proteins known as client proteins of Hsp90. These client proteins include: transcriptional factors, kinase proteins and other proteins that participate in transcriptional and transductional regulation such as steroid hormone receptors and nitric oxide synthases. This review offers a retrospective in the recent information about molecular and cellular functions of Hsp90 in the vascular physiology. In addition, the studies that evaluate Hsp90 role in the renal physiology and pathophysiology are discussed. Finally, the molecular tools developed to manipulate the Hsp90 expression in vitro and in vivo, through its inhibition or over-expression are reviewed. All these studies together have allowed increasing our knowledge regarding the role of Hsp90 during normal and pathophysiological conditions.

Key words. Vascular physiology. Endothelial nitric oxide synthase. Nitric oxide. Superoxide anion. Renal pathophysiology.

RESUMEN

La subfamilia de proteínas de choque térmico de 90 kDa (Hsp90) está compuesta por cinco isoformas, dentro de las cuales las dos isoformas citosólicas más abundantes se conocen como la Hsp90 α y la Hsp90 β . Estas proteínas son conocidas como chaperonas moleculares y regulan diferentes procesos celulares a través de interactuar con más de 100 proteínas conocidas como proteínas cliente de Hsp90. Dentro de las proteínas cliente destacan: factores de transcripción, proteínas cinasas y proteínas que participan en la regulación transcripcional y trasduccional de señales, tales como el receptor de hormonas esteroideas y las sintasas de óxido nítrico. Esta revisión ofrece una retrospectiva sobre el avance en el conocimiento de las funciones celulares y moleculares de Hsp90 en la fisiología vascular. También se describen los estudios que han intentado esclarecer la participación de Hsp90 en la fisiología y la fisiopatología renal. Al mismo tiempo, se revisan las herramientas moleculares alternativas que se han desarrollado con el fin de manipular la expresión de Hsp90 *in vitro* e *in vivo*, mediante su inhibición o su sobre-expresión, lo que ha permitido incrementar nuestro conocimiento sobre esta subfamilia de proteínas en condiciones normales y durante procesos fisiopatológicos.

Palabras clave. Fisiología vascular. Sintasa de óxido nítrico endotelial. Óxido nítrico. Anión superóxido. Fisiopatología renal.

INTRODUCCIÓN

Existen diferentes condiciones y factores externos que pueden desequilibrar la homeostasis como lo son: cambios en la temperatura, osmolaridad, pH, entre otros. De tal forma que cada célula está constantemente expuesta a diversas condiciones de estrés que se acentúan durante procesos fisiopatológicos. Ante estas condiciones, las células desarrollaron un mecanismo evolutivo para detectar, monitorear y responder a cambios extremos del

medio ambiente con el fin de mantener la homeostasis celular.¹⁻⁴

En situaciones de estrés celular, la síntesis proteica se ve afectada dando lugar a proteínas mal plegadas o con una conformación inadecuada, lo que puede propiciar la formación de agregados proteicos no funcionales y comprometer la viabilidad celular. En estas condiciones se activa la transcripción de genes que principalmente está dirigida hacia proteínas reparadoras conocidas como proteínas de choque térmico (Hsp), lo que inicia la reparación

proteica y la activación de vías de señalización que permiten una mejor adaptación al estado de estrés en el que se encuentra la célula.⁴

En la década de los sesenta, Ritossa, *et al.*⁵ demostraron por primera vez la presencia de las proteínas de choque térmico en las glándulas salivales de *Drosophila melanogaster*. En este estudio, se observó que un incremento súbito en la temperatura aumentaba la expresión de una familia de genes, que más tarde se denominó como proteínas de estrés. Durante los siguientes años, se demostró que esta respuesta al estrés se encuentra conservada desde las bacterias hasta los mamíferos. A partir de este momento se abrió un campo nuevo de estudio para la caracterización de las Hsp y de los procesos celulares en los que intervienen estas proteínas.

LAS PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO

Las proteínas de choque térmico pertenecen a una familia multigénica con un peso molecular que varía entre los 10 y los 150 kDa. Se han clasificado de acuerdo a su peso molecular en seis subfamilias: la Hsp de 100-110 kDa, la de 90 kDa, la de 70 kDa, la de 60 kDa, la de 40 kDa y la subfamilia de Hsp's con peso molecular de 18-30 kDa.^{6,7} Estas proteínas se encuentran tanto en organismos procariontes como eucariontes y presentan una alta homología a nivel de secuencia nucleotídica y de aminoácidos. Se encuentran principalmente en el citosol y su principal función es mantener la homeostasis celular y evitar el daño proteotóxico. Durante condiciones adversas la expresión de algunas subfamilias de Hsp aumenta con el fin de reparar las proteínas dañadas. En este proceso, las Hsp pueden ensamblar correctamente a las proteínas parcialmente dañadas y degradar a las que fueron dañadas irreversiblemente.

PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO DE 90 KDA (Hsp90)

Una de las subfamilias más abundantes son las proteínas de choque térmico de 90 kDa, objeto de nuestra revisión. Las Hsp90 comprenden de 1 a 2% de la proteína citosólica total y su expresión puede llegar a aumentar hasta 15% en condiciones de estrés celular. Hasta el momento, se han descrito cinco isoformas de Hsp90: la Grp94, la Hsp90N, la TRAP1, la Hsp90 α y la Hsp90 β que se diferencian básicamente por su localización intracelular. La Hsp90 α y la Hsp90 β se encuentran en el citosol, a diferencia de las otras isoformas que se encuentran asociadas a organelos. Estas dos isoformas com-

prenden 80% de esta subfamilia y son las encargadas de modular la mayoría de sus acciones intracelulares.^{8,9}

La Hsp90 α y la Hsp90 β mantienen hasta 85% de identidad a nivel de proteína. En condiciones fisiológicas, la proporción de Hsp90 α es menor en comparación con Hsp90 β , ya que mientras la primera constituye 40% de la proteína total citosólica de Hsp90, la segunda conforma 60%.¹⁰ Ambas isoformas pueden encontrarse en forma monomérica, dimérica o heterodimérica, como se ilustra en la figura 1A. La Hsp90 α se encuentra en mayor proporción en forma dimérica, mientras que la Hsp90 β principalmente en forma monomérica. Es importante mencionar que la conformación dimérica de Hsp90 es la forma funcional.¹¹

El gene para Hsp90 α consta de 10 exones que codifican para un transcrito de 5.3 Kb, lo que da lugar a una proteína de 733 aminoácidos con un peso molecular de 86 kDa. A pesar de que el gene de Hsp90 β consta de 11 exones y el transcrito es de 6.8 Kb, la proteína resultante es más pequeña, formada por 726 aminoácidos con un peso molecular de 84 kDa.² Los genes que codifican para estas proteínas se localizan en distintos cromosomas dentro del genoma. El primer exón en ambas isoformas no se traduce, pero aún se desconoce la razón de esta omisión en la transcripción. Se ha observado que la región promotora juega un papel importante en las diferencias de expresión de cada una de las isoformas, por lo que se ha propuesto que son reguladas de manera diferente. Esto se apoya por el hecho de que Hsp90 α contiene cinco elementos de respuesta a estrés térmico (HSE) en la región promotora, mientras que Hsp90 β sólo contiene dos, lo que podría explicar por qué Hsp90 α es conocida como la isoforma inducible.^{12,13}

La figura 1B muestra la estructura general de la Hsp90 α y de la Hsp90 β en donde se puede apreciar que es similar para ambas isoformas y que está compuesta principalmente por un dominio carboxilo terminal (C-terminal), un dominio medio, un dominio de carga y un dominio amino terminal (N-terminal). El dominio C-terminal, junto con el dominio medio, son importantes para la dimerización de Hsp90, siendo el estado dimérico crítico para su activación. En el dominio de carga abundan aminoácidos con carga negativa (de ahí su nombre) y hasta la fecha no se conoce su función. El dominio medio es el responsable de la actividad de chaperona de las Hsp90, debido a que está implicado en la unión a diversas proteínas. Finalmente, el dominio N-terminal es el encargado de la unión e hidrólisis de ATP y es el sitio de unión a algunos fármacos como la geldanamici-

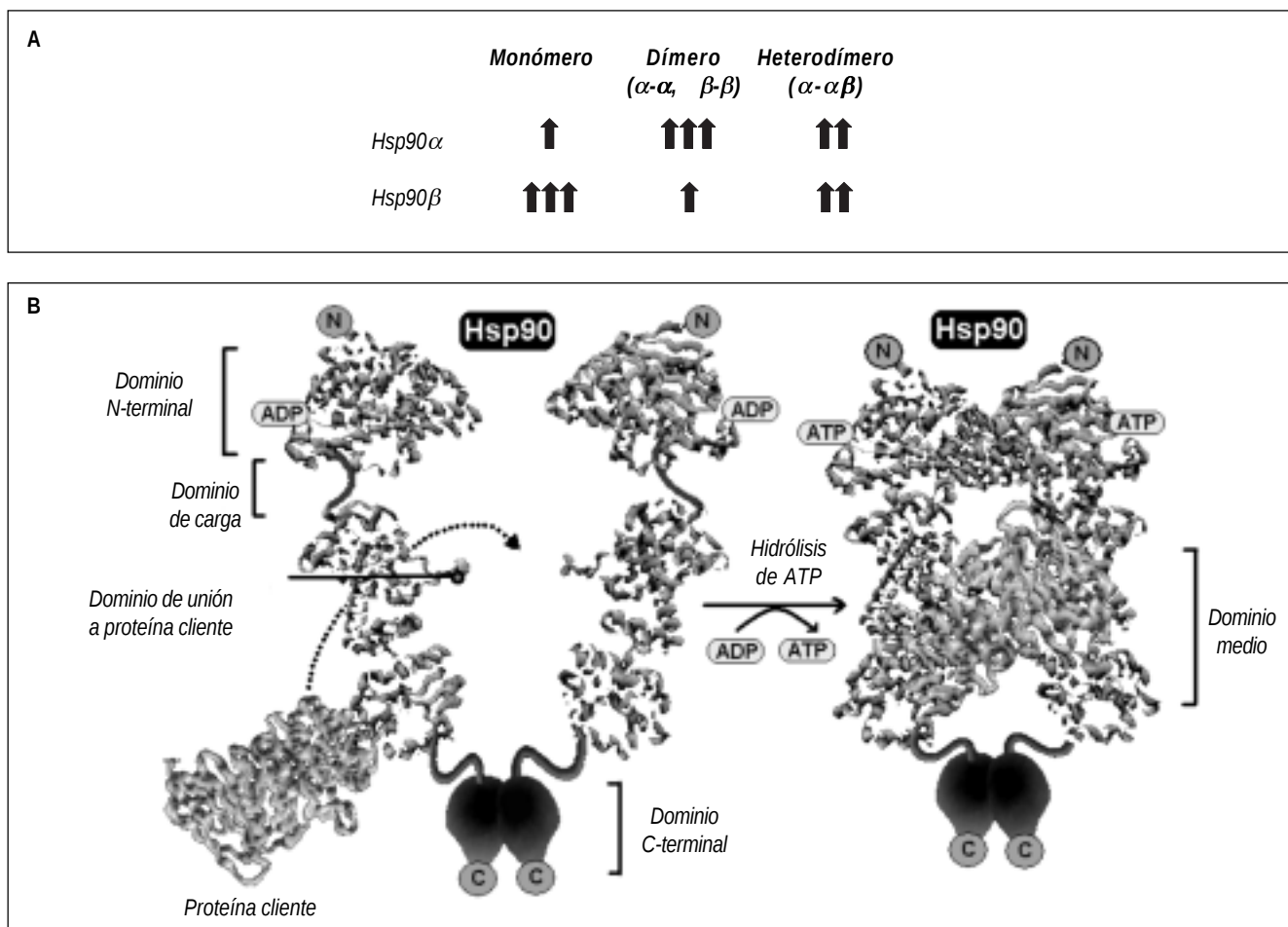


Figura 1. A. Comparación de la conformación y abundancia citoplásmica entre la Hsp90 α y la Hsp90 β en condiciones normales. **B.** Estructura general de la subfamilia de las Hsp90 α y Hsp90 β . La estructura está compuesta por cuatro dominios: dominio N-terminal, dominio de carga, dominio medio y dominio C-terminal, así como la unión con sus proteínas cliente, siendo este paso dependiente de la hidrólisis de ATP. (Modificada del sitio: www.ulyse.u-bordeaux.fr/atelier/ikramer/biocell_diffusion/gbb.cel.fa.107.b3/content/access.htm).

na (GA) y el radicicol (RA) que inhiben la actividad de chaperona de las Hsp90.¹⁴⁻¹⁷

PRINCIPALES FUNCIONES CELULARES DE Hsp90

La función celular más estudiada y conocida de las Hsp90 es que actúan como moduladoras alostéricas de varias proteínas denominadas “proteínas cliente de Hsp90”, lo que les confiere su función como chaperonas moleculares. En la última década, la lista de proteínas cliente de Hsp90 ha aumentado sustancialmente y en ella se encuentran (<http://www.picard.ch/downloads/Hsp90interactors>): factores transcripcionales,^{18,19} proteínas cinasas²⁰⁻²² y proteínas que participan en la regulación transcripcional y trasduccional de señales, tales como el re-

ceptor de hormonas esteroideas^{23,24} y las sintasas de óxido nítrico.²⁵⁻²⁸ Asimismo, recientemente se describió que la Hsp90 α también puede prolongar la vida media de sus proteínas cliente, a través de estabilizar y prevenir la degradación proteosomal de las proteínas a las que se une.²⁹

Dentro de las principales funciones celulares de Hsp90 se encuentran:

1. Asistir en el plegamiento de proteínas inmaduras, lo que proporciona la conformación adecuada y evita la agregación proteica.
2. Favorecer la translocación de sus proteínas cliente a organelos o a las membranas celular y nuclear.
3. Activar a las proteínas cliente a través de facilitar su fosforilación y/o dimerización.

4. Degradar proteínas dañadas irreversiblemente mediante ubiquitinación.³⁰
5. Mediar procesos anti-apoptóticos, 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, así como de inhibir al activador de la caspasa derivado de la mitocondria conocido como SMAC/DIABLO (second mitochondria-derived activator of caspase-direct IAP binding protein with low pl).³¹
6. Participar en el desarrollo y diferenciación celular, mediante la regulación del ciclo celular.³²

MECANISMOS DE REGULACIÓN E INDUCCIÓN DE LAS Hsp90

En condiciones normales, la inducción de las Hsp90 se inicia con la liberación del factor de respuesta a estrés térmico (HSF1), que comúnmente se encuentra asociado a Hsp90 en el citosol. Una vez liberado, el HSF1 se transloca al núcleo en donde se une a elementos de respuesta a estrés térmico (HSE), dando lugar a la activación de la transcripción de proteínas de choque térmico, la aparición de nuevos mensajeros de Hsp90 y el subsecuente aumento en la expresión de estas proteínas.³³ A su vez, las Hsp90 son reguladas por proteínas cinasas y/o fosfatasa.^{6,34} A este respecto, se conoce que Hsp90 β contiene cinco sitios potenciales de fosforilación por la familia de proteínas cinasas PKA, mientras que Hsp90 α sólo contiene tres. Asimismo, se ha reportado que Hsp90 es regulada de forma positiva por la proteína fosfatasa PP1, la cual favorece la maduración de sus proteínas cliente, previniendo la hiperfosforilación de Hsp90.³⁵

Hsp90 EN LA FISIOLÓGÍA VASCULAR

En 1998 García-Cardena, *et al.*²⁵ mostraron por primera vez que Hsp90 es capaz de interactuar con la sintasa de óxido nítrico endotelial (eNOS). La trascendencia de este hallazgo en la fisiología vascular fue demostrada por el hecho de que esta interacción activa a eNOS, lo que produce un aumento en la generación de óxido nítrico (NO), que es un compuesto vasodilatador que regula el tono vascular y la presión arterial. En este estudio también se demostró que el desacople entre eNOS y Hsp90, que fue inducido por un inhibidor selectivo de Hsp90, produjo vasoconstricción en los anillos de aorta aislados, lo que se asoció con una reducción de los niveles de GMPc, el segundo mensajero de óxido nítrico. Años más tarde, Pritchard, *et al.*³⁶ confirmaron que el desacople entre

eNOS y Hsp90 reducía la síntesis de NO, pero además demostraron que eNOS en ausencia de Hsp90 era capaz de sintetizar al anión superóxido (O²⁻). El impacto de la activación de eNOS por Hsp90 en condiciones fisiopatológicas fue documentado por Kupatt, *et al.*³⁷ quienes reportaron que la sobre-expresión de Hsp90 mediante transfección *in vivo* reduce el daño cardiovascular inducido por isquemia/reperfusión cardiaca. La inducción de la expresión de Hsp90 en los cardiomiocitos promovió una mayor asociación de eNOS a Hsp90, aumentó la fosforilación activante de eNOS por Akt (S1177) y redujo la fosforilación inactivante de eNOS (T497), por lo que la protección conferida resultó en un aumento en la formación de NO. Estos estudios apoyan la idea de que el efecto dual que parece ejercer eNOS en la generación de los radicales de NO y del O²⁻ en la fisiología vascular es regulado por Hsp90.

Otra evidencia que muestra la participación de Hsp90 en la regulación de la actividad de eNOS se ha observado durante la angiogénesis. Durante este proceso, el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) ejerce sus efectos angiogénicos a través de la activación de eNOS. En esta vía, se ha documentado que el VEGF induce la asociación temprana de Ca²⁺ con la calmodulina, lo que promueve la liberación de eNOS de la caveolina I, la cual mantiene a eNOS unida a la membrana en un estado inactivo. El complejo Ca²⁺/calmodulina también promueve la asociación entre eNOS y Hsp90, donde finalmente Hsp90 recluta a la proteína cinasa B/Akt para mediar la activación de eNOS, a través de su fosforilación en el residuo de la serina 1177 con la consecuente mayor síntesis de NO.³⁸ Lo anterior establece una secuencia crítica temporal en la vía de la angiogénesis mediada por NO, en donde la señalización por VEGF activa la vía eNOS-Hsp90-Akt. En apoyo a esto, Sun, *et al.*³⁹ reportaron que Hsp90 no sólo activa la fosforilación de eNOS vía Akt, sino que también regula la transcripción génica y la estabilidad de eNOS.

Estudios recientes han mostrado que las estatinas poseen acciones protectoras adicionales a su propiedad hipocolesterolemizante. En este contexto y de forma interesante, se ha demostrado que las estatinas regulan en forma indirecta la activación de Hsp90, aumentando su fosforilación en los residuos de tirosina,⁴⁰ lo que promueve una mayor síntesis de NO y neovascularización mediada por eNOS y Akt.³⁸

El efecto de Hsp90 en la vía de eNOS/NO no sólo radica en la activación de esta enzima, sino también se ha demostrado que Hsp90 estabiliza a la guanilato ciclasa (GCs) que es una proteína clave en la señalización del NO. Esto fue demostrado en

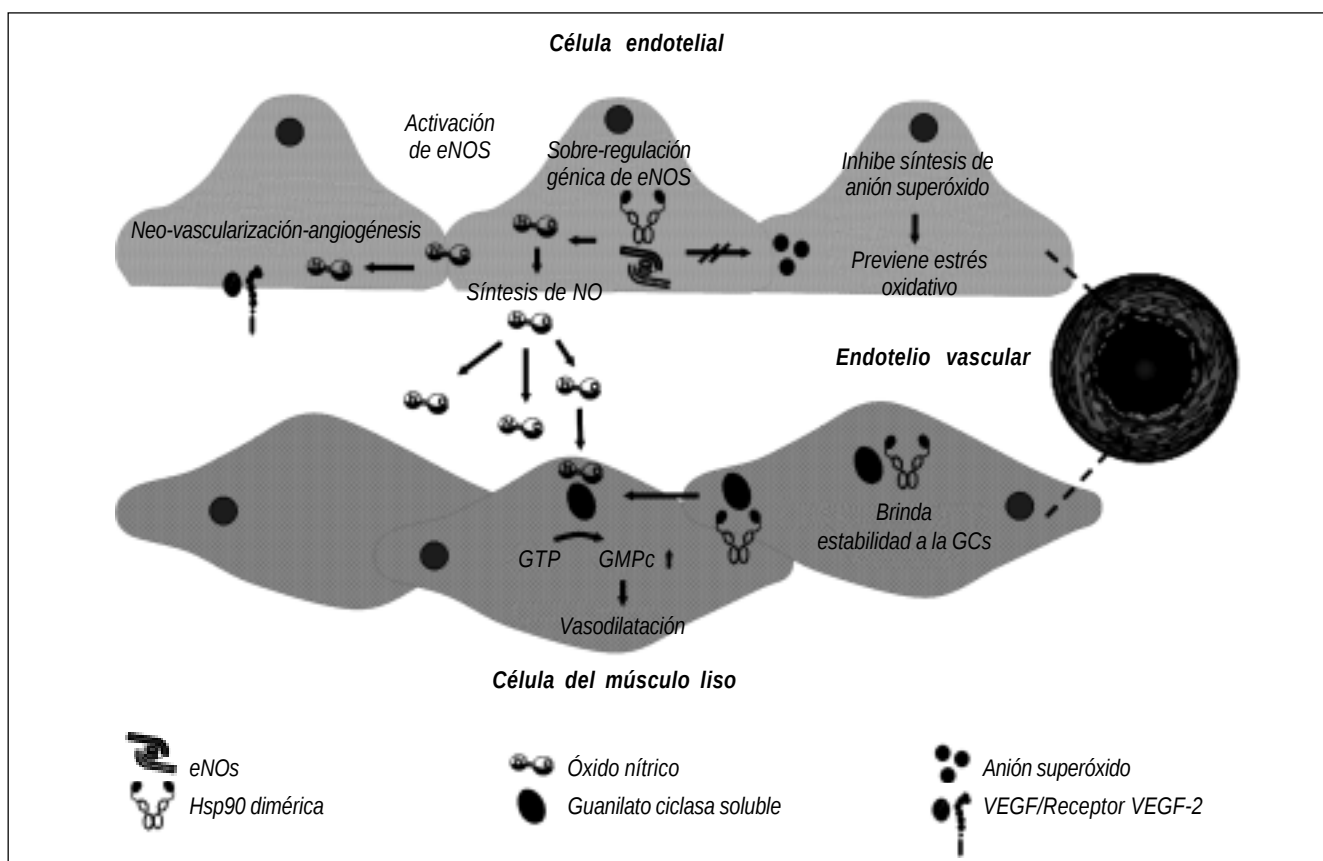


Figura 2. Significado fisiológico vascular de la Hsp90 y las vías que regula para el mantenimiento del tono vascular y angiogénesis.

condiciones de citotoxicidad por grandes cantidades de NO, donde el daño endotelial se asoció con una reducción en la estabilidad de la GCs por Hsp90.⁴¹

La relevancia del desacople entre eNOS y Hsp90 ha sido también documentada en procesos fisiopatológicos, como la diabetes mellitus que se caracteriza por una deficiencia en la biodisponibilidad de NO. Estudios recientes conducidos *in vitro* e *in vivo* demostraron que concentraciones elevadas de glucosa en el medio del cultivo celular y en un modelo de diabetes tipo I en la rata, la Hsp90 α es fosforilada en la treonina 89 por la proteína cinasa A (PKA) dependiente de AMPc, lo que induce su translocación hacia el exterior de las células endoteliales y reduce la actividad de eNOS y, por lo tanto, la producción de NO. Este fenómeno es revertido cuando se previene la translocación de Hsp90, lo cual se consiguió por un cambio en la treonina 89 por alanina de la Hsp90 α , evitando así que PKA pueda fosforilar a Hsp90 y transportarla a la membrana.⁴²

Lo anterior sugiere que Hsp90 puede ser un nuevo blanco terapéutico para prevenir el daño endote-

lial observado en diversas enfermedades en las cuales se requiera aumentar la producción de NO, o bien, prevenir o favorecer la formación de vasos sanguíneos *de novo*. Los efectos de Hsp90 en la fisiología vascular se resumen en la figura 2.

Hsp90 EN PROCESOS NEOPLÁSICOS

A diferencia de los tratamientos iniciales que fueron usados en la terapia anti-cáncer en los que se utilizaban agentes citotóxicos, la tendencia actual se ha enfocado en blancos terapéuticos que participan en las vías de señalización que conllevan a la enfermedad. Estudios recientes han mostrado que la sobre-expresión de Hsp90 juega un papel fundamental en la adaptación, proliferación y sobrevivencia de las células tumorales. Es por esta razón, que la inhibición de Hsp90 se ha considerado como una maniobra terapéutica para evitar o reducir la carcinogénesis. Como se detalla en la figura 3, la importancia de Hsp90 radica en promover la estabilidad y la actividad de pro-oncogenes y de oncogenes, dentro de los cuales destacan: ERBB2, el factor de creci-

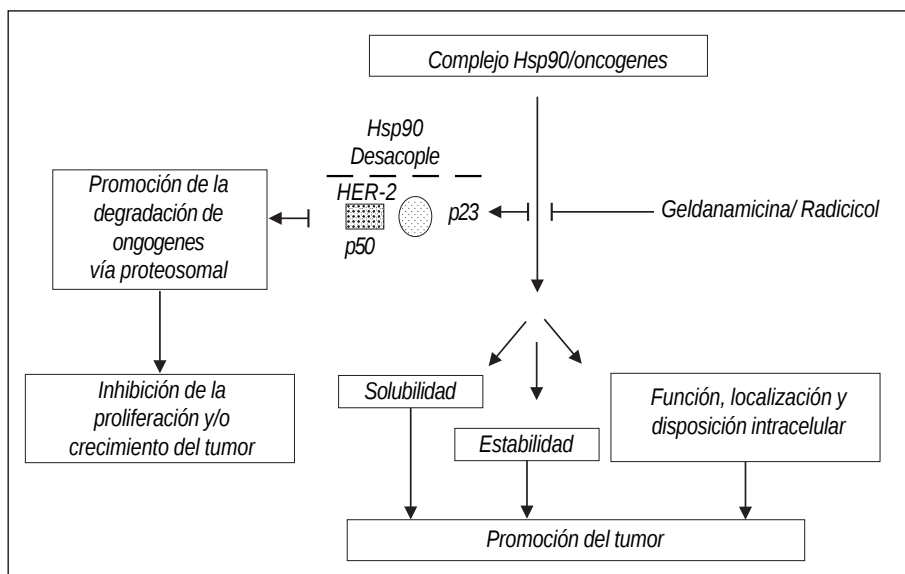


Figura 3. Modelo que describe el efecto citoprotector y anti-tumoral de los inhibidores de Hsp90, geldanamicina y radicicol, como blancos terapéuticos en el tratamiento contra el cáncer.

miento epidermal humano (HER-2), la proteína cinasa B/Akt, la cinasa dependiente de ciclina (CDK4), el gene supresor de tumor (p53) y el factor inducible por hipoxia (HIF1).⁴³⁻⁴⁶

Si bien la geldanamicina fue el primer inhibidor de Hsp90 utilizado en la clínica con buenos resultados sobre la reducción del crecimiento tumoral, la razón de la declinación en su uso se debió a la hepatotoxicidad reportada. Actualmente existen diferentes moléculas inhibidoras de Hsp90 dentro de las cuales se encuentran análogos de la geldanamicina, tales como el 17-alilamino-17- dimetoxigeldanamicina (17-AAG), que se utilizan solos o en combinación con agentes quimioterapéuticos en el tratamiento contra el cáncer. El uso terapéutico de 17-AAG se encuentra actualmente en fase clínica II.⁴³

Hsp90 EN LA FISIOLÓGÍA RENAL

A pesar de la implicación de las proteínas de choque térmico de 90 kDa en múltiples procesos celulares, poco se conoce del papel que juegan en la fisiología y fisiopatología renal. En 1990, Matsubara, *et al.*⁴⁷ desarrollaron un anticuerpo dirigido contra Hsp90 de la rata y observaron la presencia de inmunotinción en el citoplasma de las células de los túbulos proximales y distales de la corteza renal. Sin embargo, se desconocía cuál isoforma de Hsp90 se expresaba en el riñón y menos aún el patrón de expresión de cada isoforma. Por lo tanto, en un trabajo reciente de nuestro laboratorio caracterizamos la expresión y localización de la Hsp90 α y de la Hsp90 β en la nefrona.⁴⁸ Primero nos dimos a la ta-

rea de evaluar la expresión de cada isoforma y encontramos que los niveles de RNAm y de proteína fueron más abundantes en la medula renal que en la corteza. El análisis de inmunohistoquímica mostró que la Hsp90 α y la Hsp90 β se localizaban desde el glomérulo hasta la punta de la papila y que el patrón de expresión fue muy similar entre ambas isoformas. Específicamente, observamos que en la corteza la Hsp90 α y la Hsp90 β se localizan en los capilares glomerulares, en las células mesangiales y en la cápsula de Bowman. También se detectó la presencia de ambas proteínas en el citoplasma de células epiteliales de los túbulos proximales y distales, con una importante inmunotinción en la membrana apical. La presencia de Hsp90 en el borde en cepillo del túbulo proximal no parece ser exclusiva de la subfamilia de Hsp90, ya que en dos trabajos anteriores al nuestro, Aufrich, *et al.*⁴⁹ y Schober, *et al.*⁵⁰ observaron el mismo patrón de localización para la Hsp25, que fue su presencia en el glomérulo y en menor proporción en la vasculatura con una fuerte inmunotinción en la membrana apical de las células del túbulo proximal y una ligera inmunotinción en el citoplasma y núcleo de este epitelio. En este estudio también observamos que en la medula externa, la Hsp90 α y la Hsp90 β están localizadas en el citoplasma de las células del asa gruesa ascendente de Henle, mientras que en la medula interna estas proteínas se localizaron principalmente en la membrana basolateral de las células del asa delgada de Henle, en los túbulos colectores y en la pelvis renal.⁴⁸ La distribución y la expresión específica de la Hsp90 α y de la Hsp90 β observada a lo largo de la nefrona, su-

gieren que estas proteínas podrían estar involucradas en la regulación de la filtración glomerular, así como en la reabsorción y la secreción tubular, funciones características de la nefrona.

Dentro de las funciones de Hsp90 en la fisiología renal, la más conocida, es su participación en la estabilización, activación y translocación del receptor de mineralocorticoide, a través de formar un heterocomplejo con Hsp70, Hip (p48), Hop (p56) y Hsp40. Una vez que la aldosterona se une al complejo receptor mineralocorticoide/Hsp90/cochaperonas, el complejo hormona/receptor es trasladado al núcleo donde se une a los elementos de respuesta a aldosterona, lo que a su vez activa la transcripción de diversos genes que responden a esta hormona como lo son: el canal epitelial de sodio (ENaC), el cotransportador de sodio-cloro (NCC), el canal de potasio (ROMK) y la bomba Na-K ATPasa,⁵¹⁻⁵³ con lo que la aldosterona ejerce su acción clásica que es promover la reabsorción de sodio y la excreción de potasio.

Además del papel de Hsp90 en la reabsorción de sodio en el túbulo distal y colector, Ortiz, *et al.*⁵⁴ mostraron que esta proteína también está implicada en regular la actividad del cotransportador de $\text{Na}^+\text{K}^+2\text{Cl}^-$ en el asa de Henle. Estos autores observaron que cuando eNOS está en el citoplasma de estas células epiteliales, el NO producido por esta isoforma inhibe al cotransportador, pero cuando eNOS se transloca a la membrana basolateral y no produce NO, esto activa al cotransportador. Interesantemente, también demostraron que Hsp90 es la responsable de transportar a eNOS, ya que cuando incubaron las asas de Henle aisladas y perfundidas con geldanamicina se evitó que eNOS fuera trasladada a la membrana basolateral y por lo tanto la actividad del cotransportador se redujo.⁵⁵ Estos resultados sugieren que Hsp90 participa también en la reabsorción de sodio en el asa de Henle.

Otra función recientemente descrita de Hsp90 es su participación en la adaptación a la hiperosmolaridad. La osmolaridad de la medula renal es de cuatro a cinco veces mayor que la encontrada en la corteza y en otros tejidos y está continuamente expuesta a cambios en la concentración de osmolitos que son finamente sensados por una proteína conocida como TonEBP (Tonicity-responsive Enhancer Binding Protein), la cual pertenece a la familia de factores nucleares NFAT (por sus siglas en inglés: Nuclear Factor of Activated T cell). El TonEBP protege a las células epiteliales del estrés hiperosmótico activando la transcripción de genes como: el cotransportador $\text{Na}^+/\text{mio-inositol}$, el cotransportador $\text{Na}^+/\text{Cl}^-/\text{betaina}$, $\text{Na}^+/\text{Cl}^-/\text{taurina}$ y aldosa reductasa. A este res-

pecto, Chen, *et al.*⁵⁶ utilizando células embrionarias de epitelio renal de humano (HEK-293) transfectadas con TonEBP, mostraron por co-inmunoprecipitación que este factor forma un complejo con proteínas de estrés, dentro de las cuales destacan primordialmente la Hsp90 α y la Hsp90 β . En condiciones de hiperosmolaridad, la inhibición de Hsp90 por geldanamicina disminuyó tanto la expresión de TonEBP, como su actividad transcripcional. Estos resultados sugieren que en la medula renal, la citoprotección necesaria frente al estrés producido por hiperosmolaridad es mediada por Hsp90.

Los estudios realizados hasta el momento sobre el papel fisiológico de Hsp90 son muy escasos y menos aún se conoce el papel específico de Hsp90 α y de Hsp90 β . De forma general podemos resumir que Hsp90 participa en la regulación de la reabsorción de sodio y en reducir el estrés osmótico en la medula renal. Asimismo, estudios muy recientes de nuestro laboratorio sugieren que Hsp90 está implicada también en el mantenimiento de la función renal. Considerando que el NO producido por eNOS en el endotelio de los capilares glomerulares regula el tono vascular renal y la filtración glomerular, hemos observado que la inhibición de Hsp90 produce vasoconstricción renal y disminución de la filtración glomerular, lo que se asocia con una reducción en la producción de NO, que resultó por cambios en la fosforilación y en la dimerización de eNOS.⁵⁷

Hsp90 EN LA FISIOPATOLOGÍA RENAL

En cuanto a condiciones fisiopatológicas renales, se ha encontrado que la intoxicación con metales pesados como mercurio, zinc, cobalto, hierro y arsénico, así como fármacos nefrotóxicos, como gentamicina y cisplatino producen un aumento de la expresión de Hsp90 en los túbulos renales, principalmente en el segmento S3 del túbulo proximal.⁵⁸ Aunado a esto, Morita, *et al.*⁵⁹ demostraron mediante Western blot e inmunohistoquímica un aumento en la expresión de la Hsp73 y la Hsp90 después de 60 min de isquemia renal unilateral en la rata. En otro estudio, se observó que la inducción de estas proteínas, durante el daño renal por isquemia/reperfusión, se localizó en el túbulo proximal y en células de asa de Henle, comprobando que el aumento de estas proteínas persiste en la regiones de regeneración celular.⁶⁰ De manera similar, Komatsuda, *et al.*⁶¹ reportaron un caso clínico de un paciente con insuficiencia renal aguda, oliguria e hipertensión severa, en donde la biopsia renal reveló un aumento en la expresión de Hsp90 en el citoplasma de

las células del segmento S3 del túbulo proximal en la etapa de recuperación y regeneración tubular.

En la fisiopatología de la isquemia renal, el daño tubular observado se asocia con una pérdida de la polaridad de la membrana celular de las células del epitelio tubular. A este respecto Bidmon, *et al.*,⁶² usando el modelo de isquemia bilateral en la rata, mostraron mediante análisis de Western blot que la bomba de sodio potasio ATPasa se relocaliza de la membrana basolateral al citoplasma y que es indispensable la presencia de Hsp90 para trasladar y estabilizar a la bomba del citoplasma hacia la membrana basolateral y con ello nuevamente restaurar la polaridad de la membrana celular.

CONCLUSIONES

La evidencia descrita hasta el momento muestra que Hsp90 participa en diversas funciones en el tejido renal, dentro de las que destacan:

- Regular la reabsorción de sodio, a través de estabilizar y activar al receptor de mineralocorticoides y regular la actividad del cotransportador $\text{Na}^+\text{K}^+2\text{Cl}^-$.
- Mantener el gradiente electroquímico, al estabilizar la bomba de sodio potasio ATPasa.
- Regular la producción de NO mediante la interacción con eNOS y favorecer su activación por Akt.

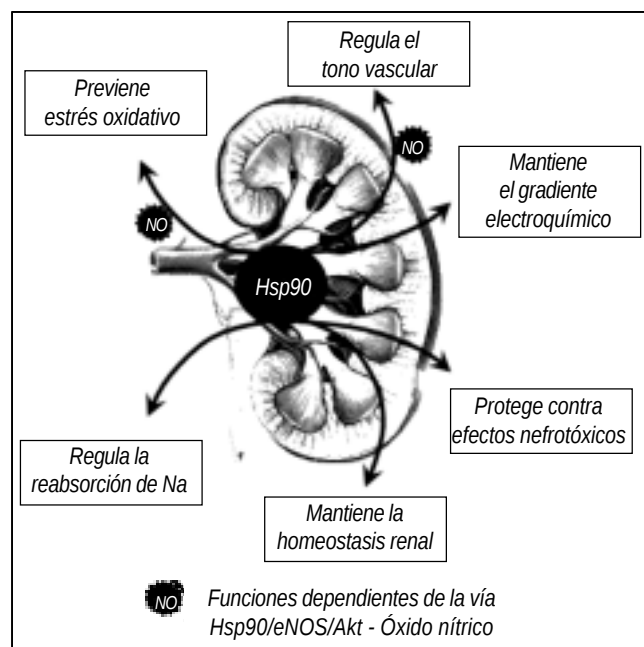


Figura 4. Un esquema de la participación de Hsp90 en procesos que regulan la fisiología renal.

- Sin menospreciar su principal función de chaperona que consiste en estabilizar o aumentar la actividad de diversas proteínas que parecen conservar la homeostasis renal, como se muestra en la figura 4.

Sin embargo, se requieren más estudios que permitan dilucidar la función individual de Hsp90 α y de Hsp90 β en diversas vías de señalización, no sólo en la fisiología renal, sino también en diversas condiciones fisiopatológicas que hasta ahora no han sido exploradas.

AGRADECIMIENTOS

Se reconoce la entusiasta participación y colaboración de los miembros de la Unidad de Fisiología Molecular. Los trabajos citados de nuestro laboratorio fueron apoyados por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (208602-3) y por la Universidad Nacional Autónoma de México (DGAPA IN228206). Carlo César Cortés-González y Victoria Ramírez-González son alumnos de posgrado y becarios del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

REFERENCIAS

1. 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* 1998; 12: 3788-96.
2. Csermely P, Schnaider T, Soti C, et al. The 90-Kda Molecular Chaperone Family: Structure, Function, and Clinical Applications. A Comprehensive Review. *Pharmacol Ther* 1998; 79: 129-68.
3. Csermely P, Soti C, Blatch GL. Chaperones as Parts of Cellular Networks. *Adv Exp Med Biol* 2007; 594: 55-63.
4. Sangster TA, Bahrami A, Wilczek A, et al. Phenotypic Diversity and Altered Environmental Plasticity in Arabidopsis Thaliana with Reduced Hsp90 Levels. *Plos ONE* 2007; 2: E648.
5. Ritossa FA. New Puffing Pattern Induced by Temperature Shock and DNP in Drosophila. *Experientia* 1962; 18: 571-3.
6. Richter K, Buchner J. Hsp90: Chaperoning Signal Transduction. *J Cell Physiol* 2001; 188: 281-90.
7. Sreedhar AS, Kalmar E, Csermely P, et al. Hsp90 Isoforms: Functions, Expression and Clinical Importance. *FEBS Lett* 2004; 562: 11-15.
8. Lindquist S, Craig EA. The Heat-Shock Proteins. *Annu Rev Genet* 1988; 22: 631-77.
9. Welch WJ. The Role of Heat-Shock Proteins as Molecular Chaperones. *Curr Opin Cell Biol* 1991; 3: 1033-8.
10. 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* 1995; 12: 1063-73.
11. Minami Y, Kawasaki H, Miyata Y, et al. Analysis of Native Forms and Isoform Compositions of the Mouse 90-Kda Heat Shock Protein, HSP90. *J Biol Chem* 1991; 266: 10099-103.
12. Zhang SL, Yu J, Cheng XK, et al. Regulation of Human Hsp90alpha Gene Expression. *FEBS Lett* 1999; 444: 130-5.

13. Shen Y, Liu J, Wang X, et al. Essential Role of the First Intron in the Transcription of Hsp90 β Gene. *FEBS Lett* 1997; 413: 92-8.
14. Prodromou C, Roe SM, O'Brien R, et al. Identification and Structural Characterization of the ATP/ADP-Binding Site in the Hsp90 Molecular Chaperone. *Cell* 1997; 90: 65-75.
15. Waza M, Adachi H, Katsuno M, et al. 17-AAG, an Hsp90 Inhibitor, Ameliorates Polyglutamine-Mediated Motor Neuron Degeneration. *Nat Med* 2005; 11: 1088-95.
16. 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* 2005; 280: 18081-6.
17. Ou J, Fontana JT, Ou Z, et al. Heat Shock Protein 90 and Tyrosine Kinase Regulate Enos NO* Generation But Not NO* Bioactivity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004; 286: H561-H569.
18. Xu W, Yu F, Yan M, et al. Geldanamycin, a Heat Shock Protein 90-Binding Agent, Disrupts Stat5 Activation in IL-2-Stimulated Cells. *J Cell Physiol* 2004; 198: 188-96.
19. Zou J, Guo Y, Guettouche T, et al. Repression of Heat Shock Transcription Factor HSF1 Activation by HSP90 (HSP90 Complex) that Forms a Stress-Sensitive Complex with HSF1. *Cell* 1998; 94: 471-80.
20. Buchner J. Hsp90 & Co. - A Holding for Folding. *Trends Biochem Sci* 1999; 24: 136-41.
21. Caplan AJ. Hsp90's Secrets Unfold: New Insights from Structural and Functional Studies. *Trends Cell Biol* 1999; 9: 262-8.
22. Mayer MP, Bukau B. Molecular Chaperones: The Busy Life of Hsp90. *Curr Biol* 1999; 9: R322-R325.
23. Cadepond F, Schweizer-Groyer G, Segard-Maurel I, et al. Heat Shock Protein 90 as a Critical Factor in Maintaining Glucocorticosteroid Receptor in a Nonfunctional State. *J Biol Chem* 1991; 266: 5834-41.
24. Pratt WB, Toft DO. Regulation of Signaling Protein Function and Trafficking by the Hsp90/Hsp70-Based Chaperone Machinery. *Exp Biol Med (Maywood)* 2003; 228: 111-33.
25. Garcia-Cardena G, Fan R, Shah V, et al. Dynamic Activation of Endothelial Nitric Oxide Synthase by Hsp90. *Nature* 1998; 392: 821-4.
26. Balligand JL. Heat Shock Protein 90 in Endothelial Nitric Oxide Synthase Signaling: Following the Lead(Er)? *Circ Res* 2002; 90: 838-41.
27. 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* 1999; 274: 1472-8.
28. Yoshida M, Xia Y. Heat Shock Protein 90 as an Endogenous Protein Enhancer of Inducible Nitric-Oxide Synthase. *J Biol Chem* 2003; 278: 36953-8.
29. Lu C, Chen D, Zhang Z, et al. Heat Shock Protein 90 Regulates the Stability of C-Jun in HEK293 Cells. *Mol Cells* 2007; 24: 210-14.
30. Zhang L, Nephew KP, Gallagher PJ. Regulation of Death-Associated Protein Kinase. Stabilization by HSP90 Heterocomplexes. *J Biol Chem* 2007; 282: 11795-804.
31. Jiang B, Xiao W, Shi Y, et al. 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* 2005; 10: 252-62.
32. Sangster TA, Queitsch C, Lindquist S. Hsp90 and Chromatin: Where Is the Link? *Cell Cycle* 2003; 2: 166-8.
33. Soti C, Pal C, Papp B, et al. Molecular Chaperones as Regulatory Elements of Cellular Networks. *Curr Opin Cell Biol* 2005; 17: 210-5.
34. Sud N, Sharma S, Wiseman DA, et al. Nitric Oxide and Superoxide Generation from Endothelial NOS: Modulation by HSP90. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007; 293: L1444-L1453.
35. Wandinger SK, Suhre MH, Wegele H, et al. The Phosphatase Ppt1 Is a Dedicated Regulator of the Molecular Chaperone Hsp90. *EMBO J* 2006; 25: 367-76.
36. 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* 2001; 276: 17621-4.
37. Kupatt C, Dessy C, Hinkel R, et al. Heat Shock Protein 90 Transfection Reduces Ischemia-Reperfusion-Induced Myocardial Dysfunction Via Reciprocal Endothelial NO Synthase Serine 1177 Phosphorylation and Threonine 495 Dephosphorylation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24: 1435-41.
38. 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* 2001; 276: 32663-9.
39. 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* 2004; 24: 2238-44.
40. Brouet A, Sonveaux P, Dessy C, et al. Hsp90 and Caveolin Are Key Targets for the Proangiogenic Nitric Oxide- Mediated Effects of Statins. *Circ Res* 2001; 89: 866-73.
41. Antonova G, Lichtenbeld H, Xia T, et al. Functional Significance of Hsp90 Complexes with NOS and Sgc in Endothelial Cells. *Clin Hemorheol Microcirc* 2007; 37: 19-35.
42. Lei H, Venkatakrishnan A, Yu S, et al. Protein Kinase A-Dependent Translocation of Hsp90 Alpha Impairs Endothelial Nitric-Oxide Synthase Activity in High Glucose and Diabetes. *J Biol Chem* 2007; 282: 9364-71.
43. Tsutsumi S, Neckers L. Extracellular Heat Shock Protein 90: A Role for a Molecular Chaperone in Cell Motility and Cancer Metastasis. *Cancer Sci* 2007; 98: 1536-9.
44. Neckers L. Heat Shock Protein 90: The Cancer Chaperone. *J Biosci* 2007; 32: 517-30.
45. Xu W, Neckers L. Targeting the Molecular Chaperone Heat Shock Protein 90 Provides a Multifaceted Effect on Diverse Cell Signaling Pathways of Cancer Cells. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 1625-9.
46. Bagatell R, Whitesell L. Altered Hsp90 Function in Cancer: A Unique Therapeutic Opportunity. *Mol Cancer Ther* 2004; 3: 1021-30.
47. Matsubara O, Kasuga T, Marumo F, et al. Localization of 90-Kda Heat Shock Protein in the Kidney. *Kidney Int* 1990; 38: 830-4.
48. Ramirez V, Uribe N, Garcia-Torres R, et al. Upregulation and Intrarenal Redistribution of Heat Shock Proteins 90alpha And 90beta by Low-Sodium Diet In the Rat. *Cell Stress Chaperones* 2004; 9: 198-206.
49. Aufricht C, Ardito T, Thulin G, et al. Heat-Shock Protein 25 Induction and Redistribution During Actin Reorganization after Renal Ischemia. *Am J Physiol* 1998; 274: F215-F222.
50. Schober A, Burger-Kentscher A, Muller E, et al. Effect of Ischemia on Localization of Heat Shock Protein 25 in Kidney. *Kidney Int Suppl* 1998; 67: S174-S176.
51. Kim GH, Masilamani S, Turner R, et al. The Thiazide-Sensitive Na-Cl Cotransporter Is an Aldosterone-Induced Protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 14552-7.
52. Masilamani S, Kim GH, Mitchell C, et al. Aldosterone-Mediated Regulation of Enac Alpha, Beta, and Gamma Subunit Proteins in Rat Kidney. *J Clin Invest* 1999; 104: R19-R23.
53. Seok JH, Hong JH, Jeon JR, et al. Aldosterone Directly Induces Na, K-ATPase Alpha 1-Subunit Mrna in the Renal Cortex of Rat. *Biochem Mol Biol Int* 1999; 47: 251-4.
54. Ortiz PA, Hong NJ, Garvin JL. Luminal Flow Induces Enos Activation and Translocation in the Rat Thick Ascending Limb. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004; 287: F274-F280.

55. Ortiz PA, Hong NJ, Garvin JL. Luminal Flow Induces Enos Activation and Translocation in the Rat Thick Ascending Limb. II. Role of PI3-Kinase and Hsp90. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004; 287: F281-F288.
56. Chen Y, Schnetz MP, Irarrazabal CE, et al. Proteomic Identification of Proteins Associated with the Osmoregulatory Transcription Factor TonEBP/OREBP: Functional Effects of Hsp90 and PARP-1. *Am J Physiol Renal Physiol* 2007; 292: F981-F992.
57. Ramírez V, Mejía-Vilet JM, Hernández D, Gamba G, Bobadilla NA. Radicol, a heat shock protein 90 (Hsp90) inhibitor reduces glomerular filtration rate. *Am J Physiol* (En prensa).
58. Borkan SC, Gullans SR. Molecular Chaperones in the Kidney. *Annu Rev Physiol* 2002; 64: 503-27.
59. Morita K, Wakui H, Komatsuda A, et al. Induction of Heat-Shock Proteins HSP73 and HSP90 in Rat Kidneys after Ischemia. *Ren Fail* 1995; 17: 405-19.
60. Wakui H, Komatsuda A, Miura AB. Heat-Shock Proteins in Animal Models for Acute Renal Failure. *Ren Fail* 1995; 17: 641-9.
61. Komatsuda A, Wakui H, Imai H, et al. Expression of 90-Kda Heat Shock Protein within Regenerative Tubular Cells in a Patient with Acute Oliguric Renal Failure Due to Malignant Hypertension. *Ren Fail* 1999; 21: 113-7.
62. Bidmon B, Endemann M, Muller T, et al. HSP-25 and HSP-90 Stabilize Na,K-ATPase in Cytoskeletal Fractions of Ischemic Rat Renal Cortex. *Kidney Int* 2002; 62: 1620-7.

Reimpresos:

Dra. Norma A. Bobadilla

Unidad de Fisiología Molecular
 Instituto de Investigaciones Biomédicas,
 Universidad Nacional Autónoma de México
 Instituto Nacional de Ciencias Médicas
 y Nutrición Salvador Zubirán
 Vasco de Quiroga No. 15, Tlalpan
 Col. Sección XVI
 14080, México, D.F.
 Tel.: 525-485-2676, fax: 525-655-0382
 Correo electrónico: nab@biomedicas.unam.mx
 nabs@quetzal.innsz.mx

Recibido el 19 de febrero de 2008.

Aceptado el 21 de julio de 2008.