

El heterocomplejo hsp90•inmunofilina de alto peso molecular como maquinaria molecular de transporte de proteínas solubles

Dr. Mario D. Galigniana*

Instituto de Investigaciones Bioquímicas de Buenos Aires-Fundación Instituto Leloir
Av. Patricias Argentinas 435, Buenos Aires (C1405BWE), Argentina.
Tel. 54-11-5238 7500 (Ext. 3308); Fax 54-11-5238-7501
E-mail: mgali@leloir.org.ar

Recibido: 14/6/05

Aceptado: 28/6/05

RESUMEN

Es sabido que el movimiento de proteínas englobadas en vesículas utiliza al citoesqueleto como vía de transporte. Sin embargo, nada se sabe acerca del mecanismo de transporte de proteínas solubles no asociadas a vesículas. Factores relacionados a cascadas de señales como MAPKs, STATs, p53, NF κ B, receptores de esteroides, ciclinas, etc., no están confinados de manera estática a un compartimiento celular dado como el citoplasma o el núcleo, sino que se encuentran en equilibrio dinámico entre dichos compartimientos, aún cuando el factor en cuestión se encuentre mayoritariamente concentrado en uno de ellos. Siempre se ha asumido que la fuerza que genera el movimiento de proteínas solubles es la difusión simple. La deslocalización de proteínas produce grandes trastornos en la célula y es responsable de por lo menos doscientas patologías bien caracterizadas, entre ellas varios tipos de cáncer. En consecuencia, responder cómo las proteínas solubles se mueven es aún una asignatura pendiente muy importante para la Biología Celular, en particular cuando se trata de factores relacionados con las cascadas de señales. Los receptores de hormonas corticosteroides constituyen un excelente modelo experimental para el estudio del tránsito de proteínas solubles ya que la localización subcelular de los mismos puede ser manipulada por agregado o no de la hormona. Es así que estos receptores se localizarán mayoritariamente en el citoplasma en ausencia de ligando y serán nucleares en su presencia. El modelo clásico de activación de receptores esteroidales sostiene que, al unirse la hormona, el complejo formado por la chaperona hsp90 y las inmunofilinas de alto peso molecular (IMMs) debe disociarse del receptor (un paso conocido como "transformación"). Este modelo ha sido aceptado heurísticamente durante más de una década, aunque carece de sustento experimental. Nosotros proponemos un modelo para el mecanismo de acción de receptores esteroidales (el que también podría ser válido para otras proteínas solubles) en el cual el complejo hsp90•IMM asociado al receptor es requerido para el transporte retrógrado de éste sobre los filamentos del citoesqueleto, siendo la proteína motora dineína, la que provee la fuerza motriz para este movimiento. Como corolario, se debe inferir que la transformación debería ocurrir cuando el heterocomplejo receptor•hsp90•IMM es transferido a la maquinaria que lo translocará a través del poro nuclear o una vez que se encuentre en el nucleoplasma.

The hsp90•high molecular weight immunophilin heterocomplex as a molecular machinery for soluble protein trafficking

ABSTRACT

Although movement of proteins comprised in vesicles is known to occur on cytoskeletal tracts, the movement of non-vesicle associated proteins is unknown. Soluble proteins such as MAPKs, STATs, p53, NFkB, steroid receptors, cyclins, etc. are not confined to the cytoplasm or the nucleus in a static manner, but are capable of shuttling dynamically through the nuclear pore even when the number of molecules in a given compartment is overwhelmingly larger than the small number located in the other compartment. Moreover, it has always been posited that soluble proteins move by diffusion. Protein mistargeting has dire cellular consequences and leads to a large variety of pathologies, including cancer. In this regard, more than 200 diseases have been related with failures in the transport or mislocalization of proteins. Therefore, a major unsolved problem that pertains to all signaling pathways relates to how proteins move to their sites of action. Corticosteroid receptors constitute an excellent system for studying protein movement. They are primarily located in the cytoplasm in the absence of ligand and rapidly move towards the nucleus with ligand. A classical model proposed more than a decade ago posited the notion that, upon steroid binding, the hsp90•immunophilin (IMM)-heterocomplex must dissociate from the receptor (a process normally referred to as "transformation"), which in turn, permits its nuclear translocation. Although heuristic, the model has no substantial experimental support. Our experimental evidence shows that the hsp90•IMM complex is required for the retrograde movement of corticosteroid receptors (and perhaps, for others soluble factors), the motor protein dyenin being the responsible for powering this movement along cytoskeletal tracts. As a consequence, it may be inferred that transformation of the receptor•hsp90•IMM should take place when the heterocomplex is transferred to the translocation machinery responsible for its passage through the nuclear pore or when the receptor is nucleoplasmic.

Introducción

Durante los últimos años se ha evidenciado un incremento exponencial en el número de estudios que han relacionado a los factores involucrados en las cascadas de señales con su redistribución en los distintos compartimientos celulares como consecuencia de variados estímulos. Este inusitado interés por estudiar la distribución de proteínas solubles no es sorprendente si consideramos la importancia que poseen muchos de estos factores en el normal funcionamiento de la célula, tal que una redistribución incorrecta conlleva casi ineludiblemente a un desbalance funcional que **no sólo** se traduce en algún tipo de patología grave, sino irreversible.

Hoy resulta claro que la mayoría de las proteínas solubles no se encuentran estáticamente confinadas en un compartimiento celular dado sino que son transportadas de manera constante y dinámica entre ellos (1-4), lo que representa un paso esencial en el mecanismo molecular para que tales factores adquieran o repriman determinado tipo de funciones. Resulta un hecho indiscutido que proteínas englobadas en vesículas deben viajar a sus destinos finales (p.ej., el terminal axónico o la membrana plasmática) por un mecanismo activo de transporte en donde las vesículas requieren de proteínas motoras asociadas a componentes del citoesqueleto (5-8). Este concepto se encuentra muy arraigado para las proteínas vesiculares, pero no ocurre lo mismo con las proteínas solubles. En la mayoría de los casos, los investigadores nos hemos concentrado en analizar el transporte de estos factores solubles considerando desde y hacia dónde se produce tal tránsito, pero raramente nos hemos preguntado cómo se mueve tal factor desde y hacia sus sitios de acción. En este sentido, el concepto histórico que aún hoy persiste, es aceptar por omisión que las proteínas difunden y se concentran en sus sitios de acción según el equilibrio entre lo "libre" y lo "unido".

Podemos imaginar que una proteína soluble viaja por simple difusión y que, al colisionar de manera estocástica con otras proteínas estructuralmente complementarias o con determinadas estructuras celulares, podría quedar atrapada en su sitio de acción. Este modelo proveería una explicación simple para comprender la distribución intracelular de los factores solubles e implica la existencia de un primer paso en el que el factor en cuestión deba distribuirse por todos o casi todos los compartimientos a los que tiene acceso, para finalmente concentrarse en su sitio de acción al quedar “atrapado” en él por interacciones moleculares específicas.

A priori, esta explicación no se condice con la eficiencia, eficacia y especificidad con las que funcionan las proteínas relacionadas a las cascadas de señales. Además, eventos celulares críticos dependientes de un mecanismo de transporte basado exclusivamente en procesos fisicoquímicos que resultan en la colisión estocástica de factores solubles también se encuentra en inevitable colisión con dos conceptos biológicos elementales como son la especificidad de acción y el principio de compartimentalización celular.

Es un hecho fácilmente comprobable que una proteína soluble fácilmente visible, p.ej., por estar fusionada a GFP (*green fluorescent protein*), puede distribuirse en forma casi homogénea por todo el espacio citoplasmático o nuclear, según le corresponda a su localización primaria. En otras palabras, los procesos fisicoquímicos que rigen el modelo clásico tienen lugar y la difusión de proteínas solubles es un hecho. No obstante ello, cabe preguntarnos si este mecanismo de distribución de factores en la célula se condice con sus funciones biológicas ¿Cómo compatibilizar entonces el hecho de que una cascada de señales se active y no lo hagan otras que potencialmente se dispararían por el/los mismo/s intermediario/s?

Los efectos biológicos requieren de la activación de moléculas específicas, localizadas en dominios determinados y, fundamentalmente, en un tiempo de activación apropiado, requisitos todos ellos que no se explican con el modelo antes descrito. Es más razonable imaginar un modelo en el que las proteínas se focalicen en forma rápida y eficiente a sus sitios de acción tal que éstos y no otros se activen en primer término, permitiendo que al mismo tiempo se activen (o no, según la conveniencia biológica de hacerlo) los mecanismos de represión para silenciar o modular a aquéllas cascadas que también podrían activarse *a posteriori*, es decir, cuando el factor ha difundido por todo el compartimiento.

Podría entonces plantearse un modelo que compatibilice el modelo “clásico” basado en el movimiento estocástico de los factores solubles y el “focalizado” hacia sus sitios de acción si imagináramos cierta vecindad entre los componentes de la maquinaria molecular de activación de un proceso biológico, lo que proveería cierto grado de especificidad de la respuesta dentro de un marco de tiempo adecuado ¿Qué ocurre entonces cuando los componentes no están tan próximos y la señal debe viajar? Para focalizarla hacia un sitio dado podríamos asignarle un rol a los filamentos del citoesqueleto, los que están altamente cargados y delimitan callejones polianiónicos capaces de interaccionar con los grupos cargados de las proteínas en movimiento. Si éstas poseyeran sitios ricos en aminoácidos básicos como arginina y lisina, los que estarán protonados a pH fisiológico, se restringiría la difusión de la proteína soluble debido a interacciones electrostáticas con los filamentos, mientras que aquéllas que fueran más aniónicas verían restringidas tales interacciones por repulsiones electrostáticas que “dirigirían” la difusión en una trayectoria más restringida. Además, la velocidad de la difusión se podría regular por cambios en la arquitectura y composición de los filamentos del citoesqueleto, aunque estos cambios, si bien dinámicos y rápidos, serían aún lentos comparados con la velocidad de migración de las proteínas solubles. Además, si bien este modelo otorga cierta direccionalidad al movimiento así como cierto grado de regulación de la velocidad de migración del factor soluble, sigue delegando la responsabilidad de procesos biológicos básicos a una migración estocástica y no del todo regulable en los cortos tiempos requeridos para ciertos procesos. También se puede argüir que complejos macromoleculares como los

formados por los SRs con las chaperonas, co-chaperonas, IMMs y proteínas regulatorias (9), se verían limitadas grandemente en cuanto a su velocidad de difusión "dirigida". Se ha determinado que la velocidad de difusión en las zonas adyacentes a los filamentos se encuentra grandemente retardada debido al alto grado de compactación de complejos que tornan el medio sumamente viscoso (10, 11).

Un mecanismo alternativo para el movimiento de proteínas solubles y que haría compatible tal transporte con la eficacia, eficiencia y especificidad con las que ocurren en la célula implicaría el uso de la maquinaria molecular de transporte de vesículas ya existente en la célula para el transporte de los factores solubles. Recientemente, la visualización del interior celular por tomografía crioelectrónica evidenció que el citoplasma se encuentra altamente compactado con filamentos del citoesqueleto y macromoléculas solubles que parecieran asociarse a esos filamentos (11), lo que sería más compatible con la existencia de unidades funcionales que con un transporte mediado por simple difusión. Para estudiar este posible mecanismo, hemos utilizado a los receptores de esteroides (SRs) como modelo. Esto es porque es muy simple regular la localización subcelular de los mismos por parte del operador. El receptor de glucocorticoides (GR) o el de mineralocorticoides (MR) será primariamente citoplasmático en ausencia de ligando, mientras que translocará rápidamente al núcleo por agregado de la hormona. Cuando ésta es retirada del medio, el receptor recicla al citoplasma y queda a la espera de un nuevo estímulo para migrar nuevamente al núcleo (12, 13).

El complejo SR•hsp90•IMM

Para comprender mejor cómo se mueven los SRs en la célula, primero debemos explicar sus propiedades. Los SRs son factores de transcripción que se activan por ligando y que forman una subfamilia dentro de la superfamilia de receptores nucleares (14). Varios miembros de esta familia presentan la propiedad de ser mayoritariamente citoplasmáticos en ausencia de ligando (GR, MR, AR, VDR, AhR, CAR, etc.), mientras que otros son constitutivamente nucleares (PR, ER, ERR, TR, RAR, etc.). Todos ellos se concentran en áreas nucleares determinadas cuando unen ligando. Ya sea que el equilibrio se desplace hacia el citoplasma o hacia el núcleo, todos los factores se encuentran sujetos al tránsito dinámico entre ambos compartimientos.

La estructura básica de un receptor nuclear se muestra en la Fig.1 y consiste en cinco ó seis regiones (según el receptor) nombradas con letras (de la A a la E-F). No obstante esta nomenclatura moderna (15), las diferentes regiones continúan siendo llamadas por sus nombres convencionales, los que se utilizarán en este artículo. La región central (o C) es la mejor conservada, por lo que se la utiliza como patrón de comparación filogenético. La región C es la responsable de la unión del receptor a las secuencias específicas en el ADN, por lo que convencionalmente nos referimos a ella como región DBD (*DNA-binding domain*). La misma incluye a dos regiones adyacentes plegadas como un rulo alrededor de un catión Zn^{2+} y que delimitan las dos áreas del tipo "Zn-fingers" (dedos de Zn) responsables de la interacción directa con la doble hélice del ADN. La región E-F que se encuentra hacia el extremo C-terminal del receptor tiene un moderado grado de conservación que varía según los receptores que se comparen entre sí, y que es responsable del reconocimiento de la hormona. Su nombre convencional es LBD (*ligand-binding domain*). El LBD está separado del aminoácido N-terminal por una secuencia pequeña y no conservada (región F) cuya función no se encuentra bien definida, pero que podría conferirle al SR especificidad de ligando y/o de actividad transcripcional. En el LBD se identifican la secuencia responsable de la dimerización de los SRs y una secuencia llamada AF-2 (*activation function-2*) que confiere la especificidad transcripcional según el ligando unido. Finalmente, en la mitad N-terminal del receptor se encuentra una región hipervariable (A-B) que se asocia a la actividad transcripcional relativamente independiente de ligando, es el dominio TD (*transactivation domain*). Aunque el dominio TD es muy variable entre los miembros de la subfamilia, se encuentra muy conservado evolutivamente para un receptor dado (16).

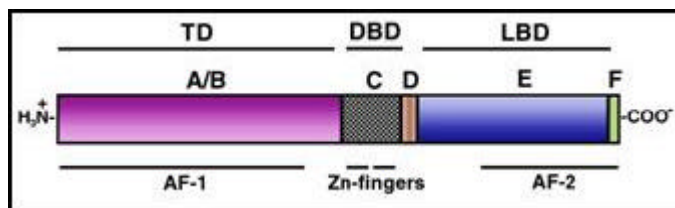


Figura 1. Arquétipo de receptor nuclear

En el caso de la subfamilia de SRs, sus miembros no existen aislados sino en forma de heterocomplejos con chaperonas y co-chaperonas. Las chaperonas constituyen una familia de proteínas altamente conservadas en la evolución que participan en el correcto plegado y ensamble de las proteínas, un proceso en el que frecuentemente se requiere la hidrólisis del ATP mediada por la actividad de ATPasa de la chaperona (17). Por otra parte, las co-chaperonas asociadas a la chaperona primaria las “asisten” en su función. La mayoría de las chaperonas (cuyo arquétipo es hsp70), poseen la propiedad de plegar a las proteínas desnaturalizadas tanto *in vitro* como *in vivo*. Hay otras chaperonas las que, si bien poseen la capacidad de recuperar el correcto plegado de proteínas desnaturalizadas en un sistema libre de células, en células intactas interaccionan con aquellas proteínas celulares que ya poseen cierto grado de organización en su estructura terciaria, lo que favorece entonces la maduración de la estructura de la proteína “cliente” antes que el plegamiento terciario elemental y, consecuentemente, les confieren funcionalidad (18, 19). El típico ejemplo es hsp90, la chaperona esencial que constituye el centro de gravedad del heterocomplejo asociado a SRs.

Si bien los complejos SR•hsp90 son fácilmente aislados de extractos citosólicos, hsp90 purificada no se une a GR. No fue sino hasta cuando se tradujo a GR en lisados de reticulocitos que se pudo estudiar cada paso del ensamblado del heterocomplejo en extractos libres de células, lo que llevó al relativamente reciente modelo que se esquematiza en la Fig.2 (17). El apo-GR (no asociado a chaperonas) no tiene capacidad de unir ligando debido a que el LBD se encuentra colapsado impidiendo el acceso del esteroide a su sitio de unión. El complejo hsp90•hsp70 preexiste en el citosol gracias a la acción de la chaperona Hop (*heat-shock-organizing protein*), antiguamente conocida como p60, la que actúa de puente entre el dímero de hsp90 y una molécula de hsp70 (el nombre Hop alude a su función de proteína “organizadora”). Normalmente, hsp40 siempre se encuentra asociada a hsp70 y es requerida en cantidades subestequiométricas para favorecer este proceso de ensamblado.

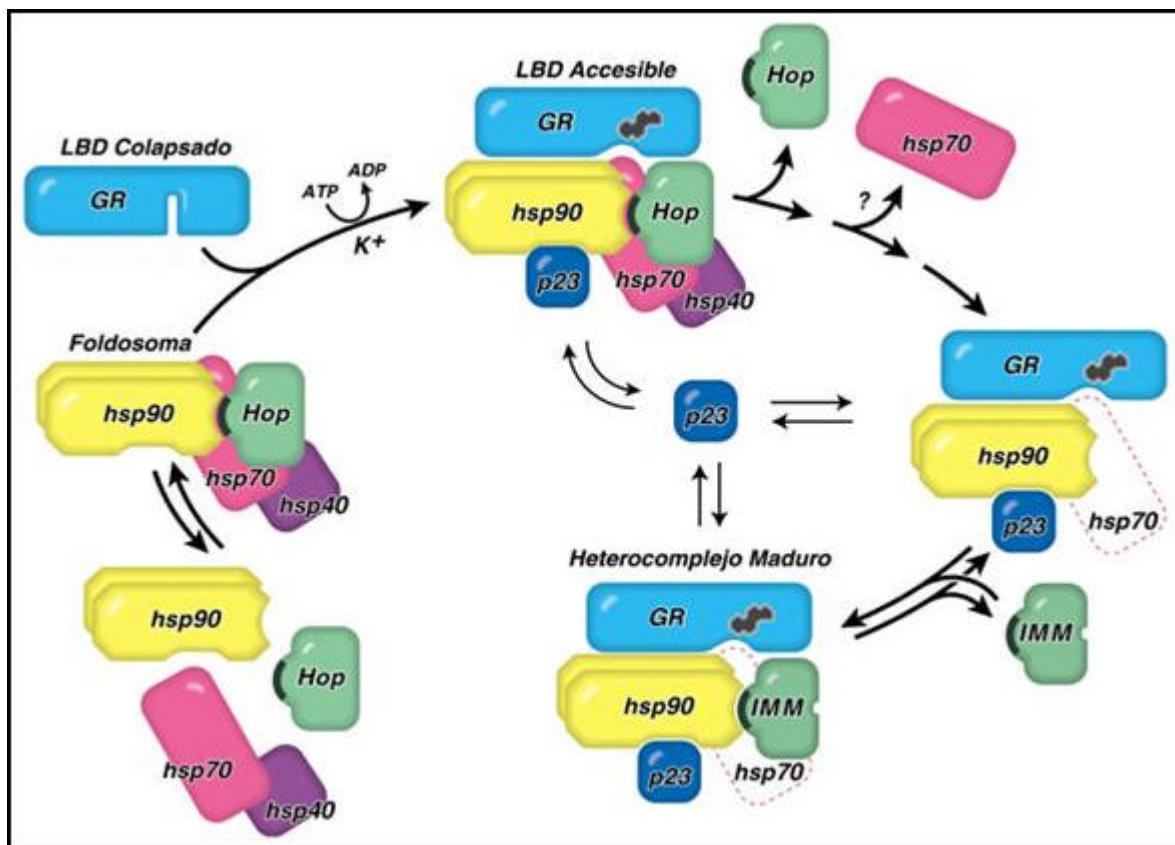


Figura 2. Ciclo de maduración de GR

Luego, el complejo $(hsp90)_2 \cdot Hop \cdot hsp70/hsp40$, al que hemos llamado "foldosoma", se transfiere de manera ATP/Mg^{2+} y K^+ dependiente al aporreceptor, tal que favorece la "apertura" del LBD y por ende, la entrada del ligando. En consecuencia, la principal diferencia de este complejo intermedio GR-chaperonas con respecto al aporreceptor es que GR será ahora capaz de unir hormona (20, 21). Una vez que el complejo se ha formado, la pequeña co-chaperona ácida p23 se asocia dinámicamente al dímero de hsp90 estabilizando el complejo. Tal función estabilizante puede ser reemplazada por agregado de molibdato de sodio al *buffer* de homogenización.

Resulta importante enfatizar que Hop es una proteína que presenta secuencias TPR (*tetratricopeptide repeats*), es decir, secuencias de 34 aminoácidos que se repiten en tándem y que son importantes para las interacciones proteína-proteína (22). Hop se une al sitio aceptor para proteínas TPR presente en el dímero de hsp90 de manera mutuamente excluyente con otras proteínas TPR, tal que cada dímero de hsp90 poseerá asociado sólo una proteína TPR dada (23).

Una vez que se ha formado el heterocomplejo entre las chaperonas y el receptor, Hop se disocia del mismo dejando un intermediario que posee el sitio aceptor TPR vacante. Dependiendo del tipo celular y las condiciones de estrés a las que se las somete, hsp70 puede o no abandonar al heterocomplejo en este paso. El sitio TPR que queda vacante se completa en el estadio final con otras proteínas que poseen secuencias TPR y que resultarán esenciales para la estructura final del complejo maduro, son las inmunofilinas de alto peso molecular (IMM).

Inmunofilinas

Las inmunofilinas constituyen una familia de por lo menos 35 proteínas codificadas en diferentes genes y que presentan la particularidad de unirse o bien a la

drogas inmunosupresoras rapamicina y FK506 (subfamilia FKBP, por *FK506-binding protein*) o a la droga ciclosporina-A (subfamilia CyP, por *cyclosporin-binding protein*) (24, 25). Los arquetipos de IMMs asociadas a la inmunosupresión son las IMMs de bajo peso molecular FKBP12 (12-kDa) y CyP-A (17-kDa). El efecto inmunosupresor se debe a que el complejo droga-IMM actúa como inhibidor de la subunidad catalítica de la calcineurina (o fosfatasa PP2B dependiente de Ca^{2+} /calmodulina), la que no desfosforila entonces al factor transcripcional NF-AT (*nuclear factor of activated T-cells*) de los linfocitos T, éste no migra al núcleo y consecuentemente se inhibe la producción de interferón- γ e interleuquinas (26).

En el caso de las IMMs de alto peso molecular, la función no está del todo definida. Como ocurre con la mayoría de los miembros de la familia, estas IMMs unen a las drogas inmunosupresoras, pero no están relacionadas de modo alguno con la inmunosupresión. Varias de estas IMMs de alto peso molecular son chaperonas y se recuperan asociadas a los receptores de esteroides. La Fig. 3 muestra la estructura comparativa de las cinco IMM hasta hoy descriptas como partes del heterocomplejo SR•hsp90 (25). El dominio característico de las IMMs es el dominio PPIasa (celeste), lugar en donde se une la droga inmunosupresora y reside la actividad enzimática de rotamasa o peptidil-prolil isomera (PPIasa), lo que significa que una IMM puede transformar uniones peptídicas X-Pro de *cis* a *trans* y viceversa. Esta actividad enzimática es muy evidente en ensayos *in vitro* con oligopéptidos, pero los resultados no son aún contundentes para afirmar fehacientemente que afecta la estructura terciaria de las proteínas en el entorno celular, aunque es muy probable que así sea.

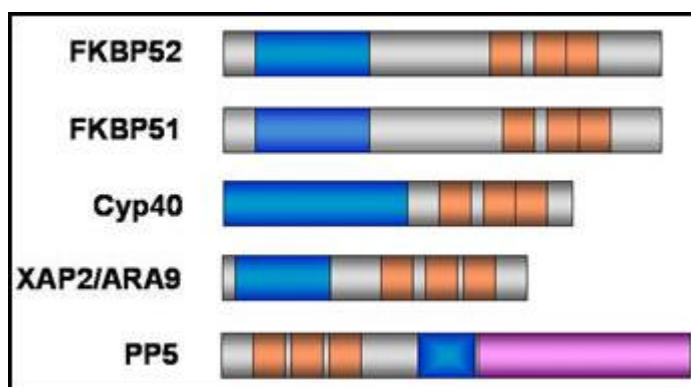


Figura 3. Estructura de IMMs asociadas a SRs

Los dominios TPR de estas IMMs son representados en anaranjado y son los responsables de su asociación con hsp90.

Comparativamente, las IMMs de bajo PM CyP-A y FKBP12 equivalen sólo al dominio PPIasa de las de alto PM (entre los cuales hay una homología significativa), pero carecen de dominios TPR por lo que no se asocian al sitio aceptor presente en el dímero de hsp90.

FKBP52, FKBP51 y CyP-40 se encuentran en cantidades significativas en los complejos con SRs. La IMM XAP2 (también conocida como ARA9 ó AIP) es exclusiva del receptor AhR (receptor de aril-hidrocarbano o receptor de dioxano), el que tiene la propiedad de no asociar a las otras IMMs, sino sólo a XAP2 (27).

Recíprocamente, aquéllos SRs que sí unen a las otras IMMs, no interaccionan con XAP2. Finalmente, PP5 es una Ser/Thr fosfatasa que posee un dominio "IMM-like" que une FK506 (aunque carece de actividad enzimática) y que es un componente mayoritario del heterocomplejo (12, 28, 29), aunque se desconoce al presente si su actividad de fosfatasa afecta la fisiología del receptor al que está unido.

Las IMMs de alto PM unen dineína

Una propiedad interesante de las IMM de alto PM es que se unen a la proteína motora dineína (30), la que es responsable del transporte retrógrado de vesículas. Por otra parte, a una parte de la fracción citoplasmática de las IMM de alto PM se las visualiza asociadas a los microtúbulos (31). Además, como las IMM son parte del heterocomplejo de los SRs, se puede inferir que éstos se mueven hacia el núcleo sobre los filamentos del citoesqueleto utilizando a la dineína como fuerza motora. Esta hipótesis se vió potenciada cuando al inmunoprecipitar a GR no sólo se co-inmunoprecipitó a hsp90 y a las IMM, sino también a dineína (30).

Con el objeto de analizar cómo son las interacciones en el heterocomplejo, se inmunoprecipitó a GR, luego se disociaron las proteínas endógenas co-inmunoprecipitadas por incubación en un buffer de alta fuerza iónica y, finalmente, se reincubó a GR "desnudo" con lisado de reticulocitos (RL) más un sistema regenerador de ATP a fin de reconstituir el complejo sobre el receptor en varias condiciones (30). Cabe aclarar que en el RL no expresa GR, pero sí posee todas las proteínas del heterocomplejo. Los resultados se muestran en la Fig.4.

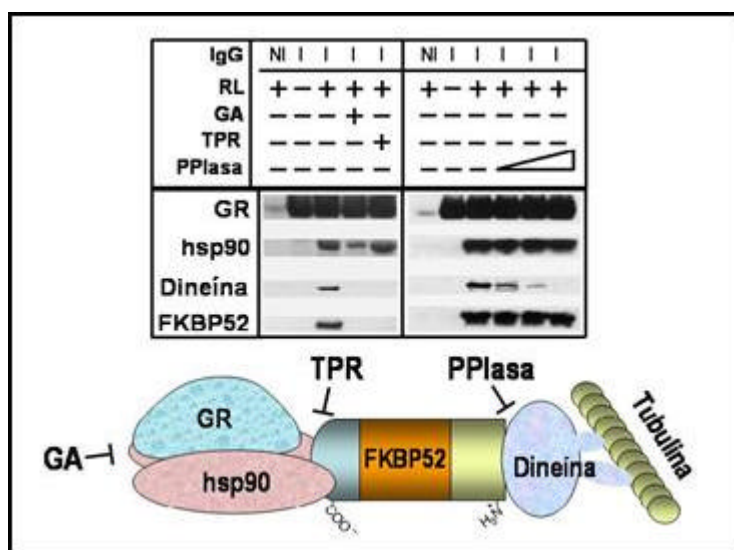


Figura 4. Modelo de ensamblado del transportosoma. El receptor de glucocorticoides (GR) fue inmunoprecipitado con una IgG específica o in-mune (I) o un control no inmune (NI). Las proteínas endógenas fueron disociadas con fuerza iónica y el GR "desnudo" fue incubado con lisado de reticulocitos (RL) suplementado con el inhibidor de hsp90 geldanamicina (GA), el péptido recombinante correspondiente al dominio TPR de la IMM, o el péptido correspondiente al dominio PPIasa. El complejo reconstituido fue revelado por *Western blotting*. El modelo inferido a partir de estos resultados se esquematiza en la parte inferior de la figura.

El control no incubado con RL muestra que el tratamiento con alta fuerza iónica ha disociado a todas las proteínas unidas a GR, las que se reensamblan al reincubar con RL, incluyendo a la proteína motora dineína. En este experimento se muestra sólo a la cadena intermedia de dineína (responsable de interactuar con la "carga"), pero también se co-inmunoprecipitan las cadenas livianas y pesadas de la proteína motora. Tubulina sigue el mismo patrón que dineína si la homogenización se realiza en un *buffer* que preserva el grado de polimerización de los microtúbulos.

Cuando la incubación con RL se realizó en presencia del inhibidor de hsp90 geldanamicina (GA) (32) no se reconstituyó el complejo, indicando que dineína no se une en forma directa al receptor. Cuando se saturó al RL con el péptido TPR a fin de inhibir la unión de la IMM FKBP52 al complejo GR•hsp90, no se recuperó dineína. Ello indicó que la misma tampoco se une al dímero de hsp90. Al saturar el sistema de reconstitución con el dominio PPIasa de la IMM, se restaura eficientemente el complejo

GR•hsp90•FKBP52, pero la dineína es competida de manera dependiente de la concentración de PPIasa sin que se afecten las otras proteínas del complejo, lo que nos indicó claramente que la proteína motora se une al dominio PPIasa de la IMM. Con posterioridad, se demostró que esta propiedad es compartida por CyP-40 y PP5 (31). El modelo diagramado en la parte inferior de la Fig.4 representa al complejo SR•hsp90•IMM•proteína motora (o “transportosoma”) inferido a partir de estos experimentos.

El complejo hsp90•IMM•dineína es esencial para el retrotransporte de SRs

Estos resultados fueron obtenidos en un sistema libre de células, por lo que aún quedaba la duda de si el transportosoma cumple la función de transportar al receptor en una célula intacta. Siguiendo el mismo razonamiento que el de estos ensayos, se postuló entonces que los mismos tratamientos deberían inhibir el movimiento retrógrado de GR en una célula. Fibroblastos NIH 3T3 fueron transfectados con la proteína de fusión GFP-GR (*green fluorescent protein-GR*) y crecidos en un medio libre de esteroide (Fig.5-A); luego de 20 min de agregada la hormona, GFP-GR se concentró en el núcleo (Fig.5-B), mientras que el tratamiento de las células con GA (Fig.5-C) o la sobreexpresión del dominio PPIasa (Fig. 5-D) inhibieron parcialmente su translocación nuclear (30).

Para nuestra sorpresa, cuando la incubación con hormona se extendió a una hora, la fluorescencia se concentró en el núcleo en las células en donde se había visto inhibición (aquellas mostradas en los paneles 5C y 5D). Estos resultados indicaron que si bien el transportosoma es requerido para el transporte rápido y eficaz de GR al núcleo, existiría un mecanismo alternativo de movimiento que es claramente independiente del complejo hsp90•IMM (¿simple difusión?). Cabe destacar que si se tratan células transfectadas con dominio PPIasa con GA, la curva de translocación no es diferente de aquellas observadas para cada tratamiento individual, indicando que la maquinaria molecular que se afecta es la misma.

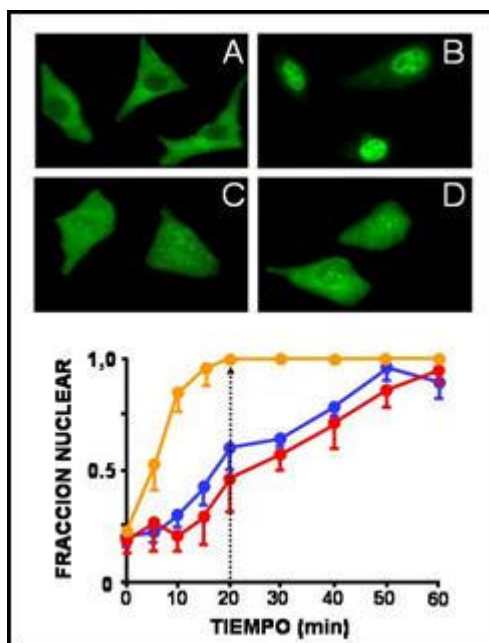


Figura 5. Translocación nuclear de GR. Células NIH-3T3 transfectadas con GFP-GR fueron crecidas en un medio libre de esteroide y tratadas por 20 min con vehículo (A) ó 100 nM dexametasona (B,C y D). Las células del panel C fueron preincubadas con hormona durante 1 h sobre hielo para favorecer la unión de esteroide y evitar la translocación de GR al núcleo. Luego fueron incubadas con el inhibidor de hsp90 GA durante 20 min adicionales. El tiempo cero en el gráfico representa el momento en el que las células se llevaron a 37°C. Las células del panel D sobreexpresan al dominio PPIasa. El gráfico inferior muestra la velocidad de translocación a núcleo en células

control (anaranjado), tratadas con GA (azul) y las que sobreexpresan el dominio PPIasa. La flecha negra marca el tiempo en el que se tomaron las fotografías de los paneles A-D.

Si fuera correcto el modelo que surge de estas observaciones y que sostiene que el complejo hsp90•IMM actúa como “puente” entre el factor a ser transportado y la proteína motora dineína, es lógico predecir que la disrupción de los componentes moleculares de dicha maquinaria de transporte debería afectar la movilidad del factor en cuestión. Que éste es el caso lo prueban los tratamientos en los cuales se afectó la función de la hsp90 (con GA) y la interacción entre la IMM y dineína (por competencia del sitio de interacción con el dominio PPIasa).

En este punto tendríamos que aclarar que la actividad motora de dineína requiere de su asociación a un complejo multiproteico llamado dinactina tal que, para ser más precisos, se debería hablar del complejo dineína/dinactina como un todo (33, 34). En trabajos realizados sobre el transporte de vesículas del Golgi se describió que la sobreexpresión de una de las once subunidades que componen la dinactina, la proteína p50/dinamitina, produce el desensamble de todo el complejo (35), tal que aún cuando dineína todavía conserva la capacidad de unirse a las vesículas del Golgi, no genera la fuerza motriz necesaria para que éstas sean transportadas a lo largo del citoesqueleto. Análogamente, se puede postular que la sobreexpresión de p50/dinamitina debería afectar el movimiento retrógrado de SRs.

La Figura 6 muestra una inmunofluorescencia indirecta para MR en un cultivo primario de células del ducto colector renal que fueron transfectadas con *myc-p50/dinamitina*, depri-vadas de esteroide y tratadas con 10 nM aldosterona durante 20 min. Las flechas indican a aquéllas células en las que la translocación de MR se vió inhibida por la sobreexpresión de p50/dinamitina. Similares resultados fueron obtenidos para GR en fibroblastos NIH-3T3 (36). No obstante, la curva de tiempo para la translocación de MR al núcleo demostró que al cabo de 1 h de incubación con aldosterona, MR es totalmente nuclear. Este efecto es indistinguible de aquél descrito en la Fig.5 con GA y la sobreexpresión del dominio PPIasa. En conclusión, el complejo dineína/dinactina es responsable del movimiento retrógrado de los receptores de corticosteroides, aunque el transporte puede ocurrir de manera más ineficiente en ausencia de la maquinaria molecular aquí descrita.

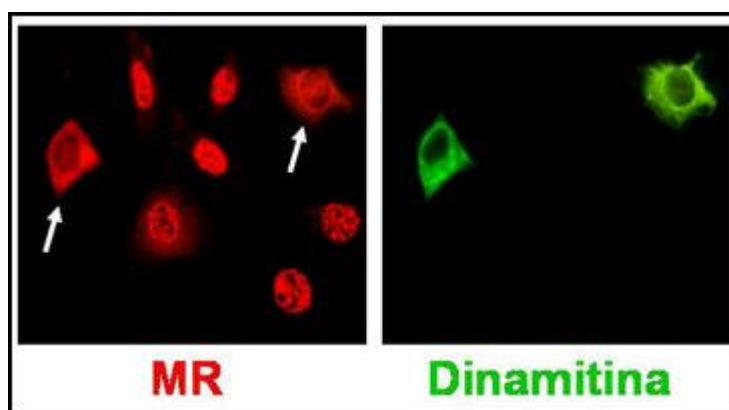


Figura 6. Efecto inhibitorio de dinamitina sobre MR

En este punto cabe preguntarnos ¿para qué posee la célula un mecanismo de transporte tan complejo si cuando éste falla la proteína igualmente alcanza su sitio de acción? Una primera respuesta se obtiene al rescatar aquél concepto que mencionamos en la Introducción: el tiempo de activación de una cascada de señales es crítico para obtener la respuesta biológica necesaria o deseada. Desde un punto de vista funcional, claramente no es lo mismo que el factor alcance su sitio de acción con una $t_{0,5}$ para la translocación nuclear de 4-5 min (como ocurre fisiológicamente con los SRs) a que lo haga con un $t_{0,5}$ de 30-40 min, tal como se observa al desacoplar a los

componentes del transportosoma (*id est*, inhibiendo a hsp90 o desacoplando el complejo con el péptido PPlase o con p50/dinamitina).

Una segunda pregunta que surge de este modelo es si los factores solubles ven impedido su movimiento cuando las distancias que deben recorrer son más grandes que las que separan a cualquier punto del citoplasma de una célula convencional de su núcleo. Un ejemplo de este caso son las neuronas, cuyos axones pueden alcanzar hasta un metro de longitud y en los que, consecuentemente, la eficiencia de un proceso de difusión (o del mecanismo alternativo que sea responsable del movimiento de los SRs) sería incompatible con la vida.

Para responder a este interrogante, se transfectaron neuronas humanas NT2 con GFP-GR y se analizó la localización del receptor por estímulo con dexametasona en células tratadas con GA, es decir, la misma condición descrita en la Fig.5-C (37). Los resultados se muestran en la Fig.7.

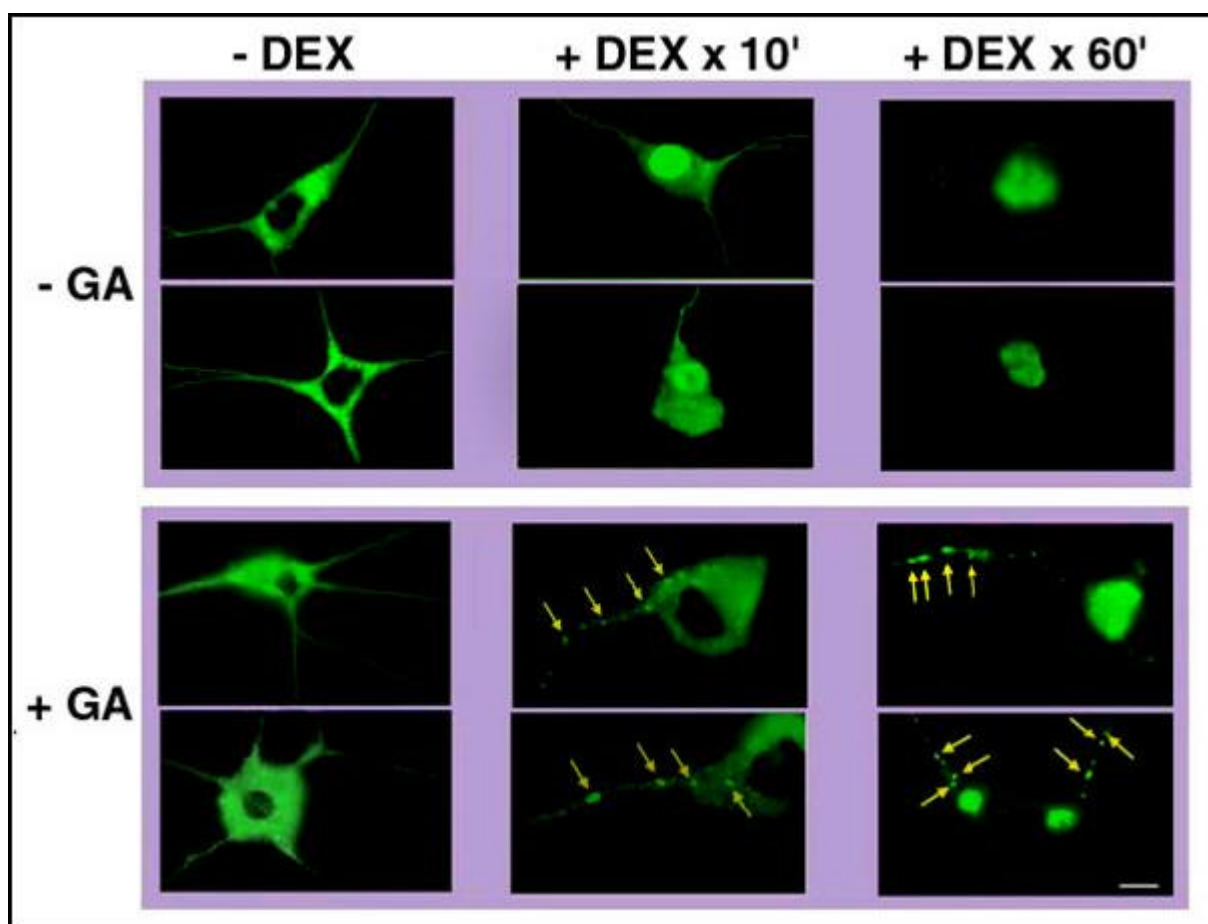


Figura 7. Geldanamicina produce la agregación de GR activado por dexametasona (DEX).

GFP-GR se visualizó diseminado tanto en el cuerpo celular como en las neuritas y migró rápidamente al núcleo por agregado de dexametasona. Sin embargo, aún pudo apreciarse fluorescencia en las neuritas y fue necesario aguardar una hora para que toda la población de receptores se concentre en el compartimiento nuclear. Como ocurrió con los fibroblastos (Fig.5), GA no afectó la distribución del receptor *per se* e inhibió la translocación al núcleo en presencia de hormona. Sin embargo, GFP-GR se agregó tanto en el cuerpo celular como en las dendritas (flechas amarillas), siendo este agregado dependiente de ambos, GA y esteroide, ya que no se lo observó con cada uno de ellos individualmente. Al cabo de 1 h, el receptor se concentró en el

núcleo, pero aún pudieron verse agregados de GFP-GR en las neuritas. Estos agregados desaparecieron cuando el medio fue reemplazado por uno conteniendo el esteroide pero no GA, lo que indicó que el proceso es reversible. No obstante, al cabo de 4 h con esteroide y GA la fluorescencia desapareció de las neuronas, un evento que se inhibió en presencia de inhibidores del proteasoma. Estos resultados indicaron que el movimiento alternativo (¿difusión?) no dependiente del complejo hsp90•IMM es tan ineficiente que el receptor se acumula en ciertas partes de su trayectoria (¿puntos de control de calidad del sistema de transporte?) y finalmente, se degrada. En otras palabras, el mecanismo alternativo de movimiento podría resultar relativamente útil para distancias cortas como las que hay en el cuerpo celular respecto del núcleo, pero es totalmente ineficaz para distancias mayores como las que debe recorrer un factor soluble en las neuritas. La interpretación de que los agregados que se muestran en la Fig.7 son centros de degradación del proteasoma fue confirmado por la visualización de las chaperonas hsp70 y CHIP que colocalizan con estos gránulos. El reclutamiento de hsp70 al proteasoma es una condición *sine qua non* para la degradación de GR y CHIP actúa como la E3 ubiquitina ligasa de GR (38).

Tomadas en su conjunto, las evidencias experimentales descritas hasta acá permiten afirmar que el retrotransporte de SRs ocurre de manera activa gracias al complejo hsp90•IMM, el que actúa como puente entre la carga y la proteína motora. El modelo presupone que hsp90 no debe disociarse inmediatamente después que la hormona se ha unido al receptor puesto que su asociación con hsp90 es aún necesaria para el transporte. Luego, el proceso de transformación de SRs debería ocurrir en un paso subsiguiente al retrotransporte, aunque previo a la unión del receptor a sus secuencias específicas en el ADN.

El complejo hsp90•IMM•dineína en el factor proapoptótico p53

La pregunta que surge es si otros factores que están asociadas a hsp90 también requieren del complejo hsp90•IMM para su movimiento hacia el núcleo. El factor proapoptótico p53 constituye un caso interesante ya que en el 50-60% de los procesos tumorales, p53 se deslocaliza del núcleo hacia el citoplasma, en donde permanece asociado a hsp90 (39, 40). El primer paso fue determinar si los componentes del heterocomplejo que habían sido descritos para SRs también se hallaban presentes en p53 (además de hsp90). La inmunoprecipitación de p53 de extractos de células DLD-1 (carcinoma de colon humano) demostró que todas las proteínas descritas en los complejos maduros de GR también forman parte de p53 (41). Como hallazgo muy importante, cabe mencionar que las IMM y dineína fueron co-inmunoprecipitadas con p53, y que la asociación de las primeras al factor proapoptótico sigue las reglas generales de interacción antes descritas en los experimentos de reconstitución con GR. Efectivamente, la incubación de p53 inmuopurificada con RL brindó los mismos resultados que aquellos observados en la Fig.4 con GR.

Con el fin de demostrar que luego de su activación p53 utiliza la misma maquinaria de transporte que los SRs, se utilizaron células HT29-tsp53, las que sobreexpresan establemente una mutante termosensible de p53 de ratón. Esta mutante permanece en el citoplasma cuando las células crecen a la temperatura no permisiva de 39°C (Fig.8). Cuando la temperatura se cambió a 32°C, p53 translocó al núcleo a menos que las células hubieran sido transfectadas con el dominio PPIasa de la IMM o con la subunidad p50/dinamitina de dinactina (41). Estos resultados pueban que la maquinaria molecular de transporte para p53 es la misma que la descrita para SRs. La diferencia notable en ambos sistemas es que en el caso de p53, el factor permanece en el citoplasma y no continúa moviéndose hacia el núcleo como sí lo hacen los SRs. Aquella propiedad de p53, que es la que esperábamos observar y no vimos con los SRs, podría deberse a diferencias en el tipo de señal de localización nuclear que posee respecto de los SRs, lo que hace que éstos y no el factor proapoptótico igualmente transloquen al núcleo cuando se desensambla el transportosoma. La misma especulación es válida para el efecto inhibitorio sobre el

movimiento de SRs y p53 que hemos observado cuando utilizamos drogas que desagregan el citoesqueleto (20).

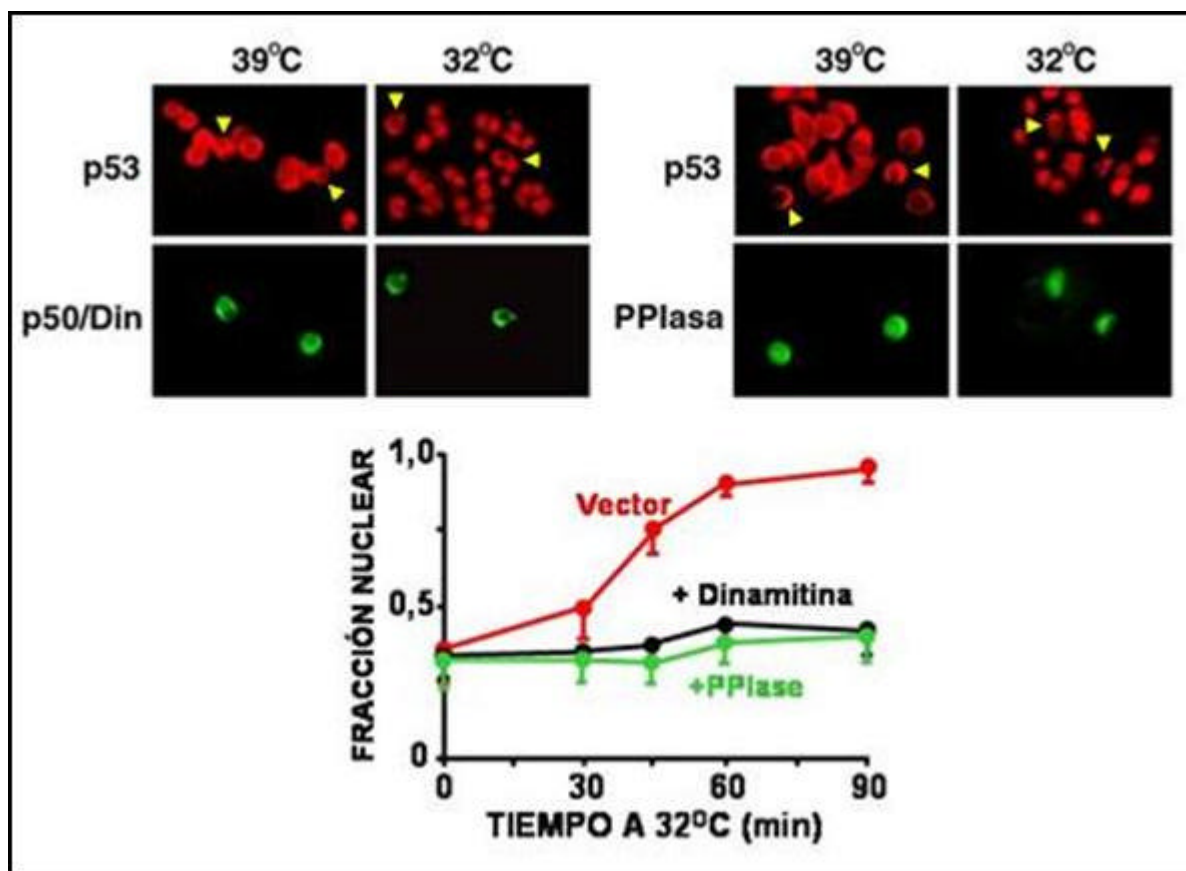


Figura 8. Inhibición de la translocación nuclear de p53

Consideraciones finales

Los resultados experimentales aquí descritos demuestran claramente que el complejo hsp90•IMM es un componente esencial de la maquinaria de transporte de factores solubles como los SRs y p53, y que dicho transporte requiere de la acción motora de dineína. Es muy probable que esta maquinaria de transporte sea utilizada por la mayoría de las proteínas que se asocian a hsp90 y/o las IMM de alto PM, pero el interrogante que aún debemos explorar es cómo se transportan aquellas proteínas que no se asocian a hsp90 y/o IMM. En estos casos ¿es la difusión una alternativa válida?

Ya hemos visto que la difusión (o el mecanismo de transporte alternativo que sea) no es ni siquiera una alternativa posible para el transporte cuando las distancias a recorrer por la proteína son grandes (Fig.7). Además, no es aún claro si el mecanismo no asistido por hsp90•IMM en células distintas a las nerviosas es relevante desde el punto de vista fisiológico.

Como expresamos anteriormente, la principal extrapolación que puede hacerse del modelo asistido de transporte aquí descrito para SRs es que, en contra de lo que se ha aceptado *à bouche ouverte* desde siempre, la unión de hormona no debería promover la inmediata disociación de hsp90 puesto que ésta es requerida para el transporte. Cuando realizamos una inmunoprecipitación de GR a partir de la fracción nuclear soluble (GR aún no asociado al ADN), encontramos que a los 10 min de incubación de las células con hormona (cuando GR es >95% nuclear), hsp90 fue recuperada con esa fracción de GR nuclear a un nivel equivalente al que se observa

hsp90 cuando se inmunoprecipita al receptor citoplasmático. Luego de 15 min ya no se recupera GR soluble en el núcleo sino unido a la cromatina, lo que sugiere que el proceso de transformación debería ocurrir en el nucleoplasma entre los 10 y 15 min de agregado el ligando.

Si poco se sabe acerca de cómo las proteínas solubles se mueven en el citoplasma, nuestro conocimiento sobre el mecanismo de movimiento de las mismas en el núcleo es casi inexistente, y hacia ese objetivo hemos dirigido una de nuestras líneas de trabajo actuales.

Agradecimientos

Los experimentos descriptos en este artículo fueron financiados en parte por subsidios otorgados por la Fundación Antorchas, la Fundación Instituto Leloir, el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, y la Agencia de Promoción Científica y Tecnológica (PICT 01-14123).

Bibliografía

1. Fabbro M, Henderson BR, 2003. Regulation of tumor suppressors by nuclear-cytoplasmic shuttling. *Exp Cell Res* 282:59-69.
2. DeFranco DB, 2002. Navigating steroid hormone receptors through the nuclear compartment. *Mol Endocrinol* 16:1449-1455.
3. Vicent GP, Pecci A, Ghini A, Piwien-Pilipuk G, Galigniana MD, 2002. Differences in nuclear retention characteristics of agonist-activated glucocorticoid receptor may determine specific responses. *Exp Cell Res* 276:142-154.
4. Black BE, Holaska JM, Rastinejad F, Paschal BM, 2001. DNA binding domains in diverse nuclear receptors function as nuclear export signals. *Curr Biol* 11:1749-1758.
5. Goldstein LS, Yang Z, 2000. Microtubule-based transport systems in neurons: the roles of kinesins and dyneins. *Annu Rev Neurosci* 23:39-71.
6. Toonen RF, Verhage M, 2003. Vesicle trafficking: pleasure and pain from SM genes. *Trends Cell Biol* 13:177-186.
7. Lee MC, Miller EA, Goldberg J, Orci L, Schekman R, 2004. Bi-directional protein transport between the ER and Golgi. *Annu Rev Cell Dev Biol* 20:87-123.
8. Rodriguez-Boulan E, Kreitzer G, Musch A, 2005. Organization of vesicular trafficking in epithelia. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6:233-247.
9. Pratt WB, Toft DO, 1997. Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones. *Endocr Rev* 18:306-360.
10. Hall D, Minton AP, 2003. Macromolecular crowding: qualitative and semiquantitative successes, quantitative challenges. *Biochim Biophys Acta* 1649:127-139.
11. Ellis RJ, Minton AP, 2003. Cell biology: join the crowd. *Nature* 425:27-8.
12. Galigniana MD, Housley PR, DeFranco DB, Pratt WB, 1999. Inhibition of glucocorticoid receptor nucleocytoplasmic shuttling by okadaic acid requires intact cytoskeleton. *J Biol Chem* 274:16222-16227.
13. Galigniana MD, 2000. Functional regulation of corticosteroid receptors by phosphorylation and redox potential. *Current Topics in Steroid Research* 3:1-22.
14. Evans RM, 1988. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 240:889-895.
15. Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, et al., 1995. The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 83:835-839.
16. Escriva H, Bertrand S, Laudet V, 2004. The evolution of the nuclear receptor superfamily. *Essays Biochem* 40:11-26.
17. Pratt WB, Galigniana MD, Morishima Y, Murphy PJ, 2004. Role of molecular chaperones in steroid receptor action. *Essays Biochem* 40:41-58.

18. Prodromou C, Pearl LH, 2003. Structure and functional relationships of Hsp90. *Curr Cancer Drug Targets* 3:301-323.
19. Csermely P, Schnaider T, Soti C, Prohaszka Z, Nardai G, 1998. The 90-kDa molecular chaperone family: structure, function, and clinical applications. A comprehensive review. *Pharmacol Ther* 79:129-168.
20. Galigniana MD, Scruggs JL, Herrington J, et al., 1998. Heat shock protein 90-dependent (geldanamycin-inhibited) movement of the glucocorticoid receptor through the cytoplasm to the nucleus requires intact cytoskeleton. *Mol Endocrinol* 12:1903-1913.
21. Galigniana MD, Piwien-Pilipuk G, 1999. Comparative inhibition by hard and soft metal ions of steroid-binding capacity of renal mineralocorticoid receptor cross-linked to the 90-kDa heat-shock protein heterocomplex. *Biochem J* 341 (Pt 3):585-592.
22. Smith DF, 2004. Tetratricopeptide repeat cochaperones in steroid receptor complexes. *Cell Stress Chaperones* 9:109-121.
23. Silverstein AM, Galigniana MD, Kanelakis KC, Radanyi C, Renoir JM, Pratt WB, 1999. Different regions of the immunophilin FKBP52 determine its association with the glucocorticoid receptor, hsp90, and cytoplasmic dynein. *J Biol Chem* 274:36980-36986.
24. Davies TH, Sanchez ER, 2005. Fkbp52. *Int J Biochem Cell Biol* 37:42-47.
25. Pratt WB, Galigniana MD, Harrell JM, DeFranco DB, 2004. Role of hsp90 and the hsp90-binding immunophilins in signalling protein movement. *Cell Signal* 16:857-872.
26. Liu J, 1993. FK506 and cyclosporin, molecular probes for studying intracellular signal transduction. *Immunol Today* 14:290-295.
27. Berg P, Pongratz I, 2002. Two parallel pathways mediate cytoplasmic localization of the dioxin (aryl hydrocarbon) receptor. *J Biol Chem* 277:32310-32319.
28. Galigniana MD, 1998. Native rat kidney mineralocorticoid receptor is a phosphoprotein whose transformation to a DNA-binding form is induced by phosphatases. *Biochem J* 333 (Pt 3):555-563.
29. Silverstein AM, Galigniana MD, Chen MS, Owens-Grillo JK, Chinkers M, Pratt WB, 1997. Protein phosphatase 5 is a major component of glucocorticoid receptor.hsp90 complexes with properties of an FK506-binding immunophilin. *J Biol Chem* 272:16224-16230.
30. Galigniana MD, Radanyi C, Renoir JM, Housley PR, Pratt WB, 2001. Evidence that the peptidylprolyl isomerase domain of the hsp90-binding immunophilin FKBP52 is involved in both dynein interaction and glucocorticoid receptor movement to the nucleus. *J Biol Chem* 276:14884-14889.
31. Galigniana MD, Harrell JM, Murphy PJ, et al., 2002. Binding of hsp90-associated immunophilins to cytoplasmic dynein: direct binding and in vivo evidence that the peptidylprolyl isomerase domain is a dynein interaction domain. *Biochemistry* 41:13602-13610.
32. Neckers L, 2002. Hsp90 inhibitors as novel cancer chemotherapeutic agents. *Trends Mol Med* 8:S55-S61.
33. Vallee RB, Williams JC, Varma D, Barnhart LE, 2004. Dynein: An ancient motor protein involved in multiple modes of transport. *J Neurobiol* 58:189-200.
34. Schroer TA, 2004. Dynactin. *Annu Rev Cell Dev Biol* 20:759-779.
35. Burkhardt JK, Echeverri CJ, Nilsson T, Vallee RB, 1997. Overexpression of the dynamitin (p50) subunit of the dynactin complex disrupts dynein-dependent maintenance of membrane organelle distribution. *J Cell Biol* 139:469-484.
36. Harrell JM, Murphy PJ, Morishima Y, et al., 2004. Evidence for glucocorticoid receptor transport on microtubules by dynein. *J Biol Chem* 279:54647-54654.
37. Galigniana MD, Harrell JM, Housley PR, Patterson C, Fisher SK, Pratt WB, 2004. Retrograde transport of the glucocorticoid receptor in neurites requires dynamic assembly of complexes with the protein chaperone hsp90 and is linked to the CHIP component of the machinery for proteasomal degradation. *Brain Res Mol Brain Res* 123:27-36.
38. McDonough H, Patterson C, 2003. CHIP: a link between the chaperone and proteasome systems. *Cell Stress Chaperones* 8:303-308.

39. Walerych D, Kudla G, Gutkowska M, et al., 2004. Hsp90 chaperones wild-type p53 tumor suppressor protein. J Biol Chem 279:48836-48845.
40. Muller L, Schaupp A, Walerych D, Wegele H, Buchner J, 2004. Hsp90 regulates the activity of wild type p53 under physiological and elevated temperatures. J Biol Chem 279:48846-48854.
41. Galigniana MD, Harrell JM, O'Hagen HM, Ljungman M, Pratt WB, 2004. Hsp90-binding immunophilins link p53 to dynein during p53 transport to the nucleus. J Biol Chem 279:22483-22489.

*Dr. Mario Galigniana,
Investigador Independiente de CONICET



Revista **QuímicaViva**
Número 2, año 4, septiembre 2005
quimicaviva@qb.fcen.uba.ar