

Tesis Doctoral

Modulación de la localización subcelular de factores nucleares por proteínas TPR

Mazaira, Gisela Ileana

2015-03-27

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Mazaira, Gisela Ileana. (2015-03-27). Modulación de la localización subcelular de factores nucleares por proteínas TPR. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Mazaira, Gisela Ileana. "Modulación de la localización subcelular de factores nucleares por proteínas TPR". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2015-03-27.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Química Biológica

Modulación de la localización subcelular de factores nucleares por proteínas TPR

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad
de Buenos Aires, Área Química Biológica

Autora: Lic. Gisela Ileana Mazaira

Director: Dr. Mario D. Galigniana
Consejera: Dra. María del Carmen Ríos de Molina
Buenos Aires, 2015

RESUMEN

Los dominios TPR están constituidos secuencias en tándem de 34 aminoácidos organizadas en α -hélices antiparalelas. Las proteínas TPR mejor caracterizadas son las que forman complejos con receptores de esteroides (REs) vía la *heat-shock protein* de 90-kDa, Hsp90, afectando su plegamiento y ensamblado. Nuestro laboratorio demostró que las inmunofilinas FKBP51 y FKBP52 son factores TPR que regulan antagónicamente la actividad transcripcional y localización subcelular de GR y MR. El objetivo de esta tesis fue estudiar el efecto de otras proteínas TPR como PP5, SGT1 α y 14-3-3 σ sobre GR y AR. Demostramos que PP5 favorece la retención nuclear de REs, 14-3-3 σ retrasa la importación y acelera la exportación, mientras que SGT1 α no afecta su distribución subcelular, aunque inhibe la actividad transcripcional de ambos receptores. En tal sentido, PP5 y 14-3-3 σ muestran una respuesta bifásica, es decir, un aumento leve de la expresión estimula la transcripción, pero se inhibe con niveles más altos. Por ende, el balance de expresión de estos factores TPR debería afectar casos como el cáncer prostático en donde estas proteínas aumenta su expresión pudiendo potencialmente afectar el balance de actividad entre AR y GR, lo que influirá en el desarrollo y progresión de la patología.

Al presente no existen drogas específicas para cada proteína TPR, por lo que realizamos un abordaje farmacológico que las afecte indirectamente usando como blanco a la chaperona Hsp90 con la que forman una unidad estructural y funcional. Estudiamos una serie de compuestos diseñados por modelado computacional como potenciales inhibidores de la actividad ATPasa de Hsp90, la que siempre se ha considerado clave para su función biológica. Algunos compuestos son bases de Schiff derivadas del 2,4-dihidroxibenzaldehído o del 5-cloro-2,4-dihidroxibenzaldehído, otros son derivados del resorcinol. Como control se usó geldanamicina, una benzoquinona ansamicina que es un conocido inhibidor de Hsp90. En contraste con el efecto de esta droga, la importación de REs no se vio afectada por las drogas sintéticas. No obstante, varias de ellas inhibieron la actividad de ATPasa de la chaperona y promovieron la pérdida de viabilidad de células tumorales prostáticas, mostrando en algunos casos efectos comparables al de geldanamicina. Ninguno de estos efectos guardó relación directa con la capacidad inhibitoria de ATPasa o la estructura química del compuesto. Nuestros resultados demuestran que tanto la localización subcelular como la actividad biológica de los REs se ve regulada por el balance de expresión de las proteínas TPR con las que interactúan. Además, se demuestra que, contrario al dogma dominante en la literatura, la actividad de ATPasa de Hsp90 no guarda correlación directa con tales efectos, a la vez que se describen nuevas drogas inhibitorias.

PALABRAS CLAVE: PROTEÍNAS TPR, SGT, PP5, 14-3-3, RECEPTORES DE ESTEROIDES, RECEPTOR DE GLUCOCORTICOIDES, RECEPTOR DE ANDRÓGENOS, HSP90, BASES DE SCHIFF, ATPasa.

ABSTRACT

Modulation of subcellular localization of nuclear factors by TPR Proteins

TPR domains consist of tandem arrangements of 34 amino acids organized in antiparallel α -helices. The best characterized TPR proteins are those able to form complexes with steroid receptors (SRs) via the heat-shock protein of 90 kDa, Hsp90, affecting their folding and assembly. Our laboratory showed that the immunophilins FKBP51 and FKBP52 are TPR factors that regulate transcriptional activity and subcellular localization of GR and MR in an antagonistic fashion. The aim of this thesis was to study the effect of other TPR proteins such as PP5, SGT1 α and 14-3-3 σ on GR and AR action. We demonstrate that PP5 promotes nuclear retention of SRs, 14-3-3 σ delayed both nuclear import and nuclear export rates of SRs, while SGT1 α shows no effect on the receptor subcellular distribution. Nonetheless, SGT1 α inhibits the transcriptional activity of both receptors. In this sense, PP5 and 14-3-3 σ show biphasic response, that is, a slight increase in expression stimulates transcription, but transcription is inhibited by higher levels of expression. Therefore, the expression balance between these TPR factors should influence cases like prostate cancer, where the balance of activity between AR and GR affects the development and progression of the pathology.

Because there are no specific drugs for each TPR protein, we performed a pharmacological approach to indirectly affect them using the Hsp90 chaperone partner as target.. We studied a series of compounds designed by computer modeling as potential inhibitors of the ATPase activity of Hsp90, which has always been considered key to the biological function of Hsp90. Some compounds are Schiff bases derived from 2,4-dihydroxybenzaldehyde and 5-chloro-2,4-dihydroxybenzaldehyde, others are resorcinol derivatives . Geldanamycin, a known benzoquinone ansamycin that inactivates Hsp90, was used as control. In contrast to geldanamycin, the import of SRs was not affected by the synthetic drugs. Nevertheless, they did affect tumor cell viability and inhibited the ATPase activity of the chaperone being as effective as geldanamycin itself. However, these effects were not directly related to their ATPase inhibitory activity. Our results demonstrate that both the subcellular localization and the biological activity of the SRs are regulated by the expression balance of their interacting TPR domain proteins. Furthermore, it is shown that the ATPase activity of Hsp90 is not directly related to these effects. A novel set of inhibitory compounds is also described.

KEYWORDS: TPR PROTEIN, SGT, PP5, 14-3-3, STEROID RECEPTORS, GLUCOCORTICOID RECEPTOR, ANDROGEN RECEPTOR, HSP90, SCHIFF BASES, ATPase

A mi madre, Ofelia

A mi amor, Pablo

A la memoria de quienes ya no están pero me siguen acompañando:

Mi padre, José.

Mis abuelos: David, Claudio, Josefa y Matilde

Mi abuelo científico: Dr. Carlos Lantos

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis es producto de los esfuerzos combinados de una innumerable cantidad de personas, y aprovecho este espacio para otorgarles el merecido reconocimiento. A todos muchas gracias, ojalá tenga la oportunidad de retribuirles aunque sea una parte de todo lo que me han brindado.

En primer lugar quiero agradecer a mi director, Mario. Gracias **POR TODO**. Por las oportunidades, la confianza, la paciencia, la generosidad, la crítica, la guía, la enseñanza y sobretodo el aguante. Llegué a tu laboratorio casi por casualidad y ahora, siete años después, sé que no podría haber pedido un mejor jefe.

Alejandra, vos te mereces tu propio **POR TODO**. Supiste ser mi jefa, compañera, amiga, confidente, abogada, terapeuta, docente y hasta mi cómplice. Tus consejos y generosidad me han permitido llegar hasta aquí, gracias por transitar el camino a mi lado.

A mis compañeros Ana, Belén, Fernanda, Fernando, Laura, Mariana, Moli, Nadia y Titi. Por hacer soportable tener seminarios un lunes a las 9 de la mañana. Pero sobre todo por estar siempre y hacer del trabajo un placer. Su apoyo y ayuda fueron, son y serán muy importantes para mí.

A Graciela y su grupo, por sus consejos, apoyo y permanente aliento.

Todos ustedes conforman una familia para mí, a la cual me siento honrada de pertenecer. Gracias por hacerme un lugar.

A Martín y su grupo, por los años de convivencia y experiencias compartidas. Me llevo los mejores recuerdos.

A María del Carmen, por ser una maravillosa tutora.

Al Dr. Sayan Dutta Gupta y su grupo por diseñar y sintetizar los compuestos con los cuales trabajé.

A Investigadores, becarios, pasantes y docentes de QB. No creo poder recordar un solo laboratorio en el que no me hayan ayudado con algo. Desde enseñarme a usar un equipo hasta cederme media hora de su turno de cultivo. Gracias por la generosidad y buena onda.

Al personal no docente de QB e IQUBICEN. A todos y cada uno de ellos que nos ayudan de manera inconmensurable. En particular a Martín, Ayelén y Dana, nunca jamás hubiera completado un trámite a tiempo si no fuera por ustedes.

Al Departamento de QB por proveerme el lugar al cual pertenecer y en donde conseguir mis metas.

A la Universidad de Buenos Aires, al CONICET y a la AGENCIA por confiar y financiar este proyecto.

Quisiera agradecer profundamente a mi otra familia, aquella que veo mucho menos pero me aguanta desde hace mucho más.

A mi familia política. Elvi, Fer, Mario y Carlos. Gracias por aceptarme, adoptarme y aguantarme.

A mi familia biológica. Chiche, Leo, Carlos, Delia, Ale y Dai. Gracias por estar siempre.

A mis amigos de siempre. Ale, Fer, Na, Mari, Julio, Gaby, Mery, Maxy, Lore, Martín, Coco, Her y Nico. No les tengo que decir porqué, ya lo saben.

A mis sobrinos. Noe, Martín, Cami, Agus, Luz, Luli, Valen, Pipo, Giuli, Luca y Mia. Por ser una luz en mi vida.

A mi mamá, por darme literalmente todo. Te debo más de lo que alguna vez pueda llegar a pagarte, y todo lo das sin esperar nunca nada a cambio. Ese amor me hace humilde. Gracias **POR TODO**.

A Pablo, por amarme y formar parte de mi vida. Por compartir cada alegría, celebrar cada logro, superar cada tristeza o fracaso. No hubiera llegado hasta este momento sin vos.

Los quiero mucho a todos.

Por último, pero no menos importante quiero agradecer a Dios. Incluso en los momentos más oscuros de mi vida, siempre hubo una luz al final del camino que me ayudó a no bajar los brazos. Por eso y por poner en mi camino a estas maravillosas personas que me dan lo mejor de sí cada día. Gracias.

INDICE

<i>PUBICACIONES</i>	- 1 -
<i>ABREVIATURAS</i>	- 4 -
<i>INTRODUCCIÓN</i>	- 7 -
RECEPTORES DE NUCLEARES	- 8 -
RECEPTORES DE ESTEROIDES.....	- 9 -
<i>RECEPTOR DE GLUCOCORTICOIDES</i>	- 10 -
<i>RECEPTOR DE ANDRÓGENOS</i>	- 12 -
MADURACIÓN DE LOS HETEROCOMPLEJOS DE RECEPTORES DE ESTEROIDES	- 13 -
CHAPERONAS MOLECULARES	- 15 -
HSP90	- 15 -
PROTEÍNAS CON DOMINIO TPR.....	- 19 -
INMUNOFILINAS.....	- 20 -
<i>OTRAS PROTEÍNAS TPR</i>	- 24 -
TRANSLOCACIÓN NUCLEAR DE RECEPTORES ESTEROIDALES	- 27 -
<i>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</i>	- 35 -
HIPÓTESIS:.....	- 36 -
OBJETIVO GENERAL:	- 36 -
<i>OBJETIVOS PARTICULARES:</i>	- 36 -
<i>MATERIALES Y MÉTODOS</i>	- 37 -
<i>MATERIALES</i>	- 38 -
1. LINEAS CELULARES.....	- 38 -
2. PLÁSMIDOS	- 38 -
3. ANTICUERPOS	- 39 -
<i>MÉTODOS</i>	- 40 -
1. PREPARACIÓN DE PLÁSMIDOS	- 40 -
1.1. <i>PREPARACIÓN DE BACTERIAS COMPETENTES</i>	- 40 -
1.2. <i>TRANSFORMACIÓN DE BACTERIAS COMPETENTES</i>	- 41 -
1.3. <i>PREPARACIÓN DE ADN PLASMIDICO A PEQUEÑA ESCALA</i>	- 41 -
1.4. <i>PREPARACIÓN DE ADN PLASMÍDICO EN MAYOR ESCALA</i>	- 42 -
2. PREPARACIÓN DE SUERO ADULTO BOVINO (SBA) DELIPIDADO	- 42 -
3. CULTIVO CELULAR.....	- 43 -
4. TRANSFECCIÓN	- 43 -
5. EVALUACIÓN DEL TRÁNSITO DE LOS RE.....	- 43 -
5.1. <i>ANÁLISIS DEL EFECTO DE PROTEÍNAS TPR SOBRE LA IMPORTACIÓN DE LOS RE.</i>	- 44 -

5.2. ANÁLISIS DEL EFECTO DE PROTEÍNAS TPR SOBRE LA EXPORTACIÓN DE LOS GR.	- 44 -
6. ANÁLISIS DEL EFECTO DE COMPUESTOS DE SÍNTESIS SOBRE LA IMPORTACIÓN DE GR Y AR.	- 44 -
7. INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA (IFI)	- 44 -
8. TINCIÓN DE FILAMENTOS DE ACTIVA	- 46 -
9. COINMUNOPRECIPITACIÓN	- 46 -
10. SEPARACIÓN DE PROTEÍNAS POR ELECTROFORESIS EN CONDICIONES DESNATURALIZANTES (SDS PAGE) Y POSTERIOR DETECCIÓN POR WESTERN BLOT (WB)	- 47 -
11. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD TRANSCRIPCIONAL DE LOS RE	- 48 -
11.1. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LUCIFERASA y β -GALACTOSIDASA	- 49 -
12. PURIFICACIÓN DE His-HSP90 β	- 49 -
13. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ATPasa de HSP90 β	- 50 -
14. EVALUACIÓN DE VIABILIDAD CELULAR	- 50 -
15. ENSAYO DE REPARACIÓN DE HERIDA	- 51 -
16. ZIMOGRFÍA	- 51 -
17. ESTRUCTURA DE LOS COMPUESTOS EVALUADOS	- 52 -
18. ANÁLISIS STADÍSTICO	- 57 -
RESULTADOS	- 58 -
CAPITULO 1	- 59 -
1 EFECTOS DE LAS PROTEÍNAS CON DOMINIO TPR SOBRE EL TRANSPORTE DE LOS RECEPTORES NUCLEARES	- 60 -
1.1 RECEPTOR DE GLUCOCORTICOIDES	- 60 -
1.2 RECEPTOR DE ANDRÓGENOS	- 74 -
DISCUSIÓN	- 80 -
CAPITULO 2	- 83 -
2 EFECTOS DE LAS PROTEÍNAS CON DOMINO TPR SOBRE LA ACTIVIDAD TRANSCRIPCIONAL DE RECEPTORES NUCLEARES	- 84 -
2.1 RECEPTOR DE GLUCOCORTICOIDES	- 84 -
2.2 RECEPTOR DE ANDRÓGENOS	- 87 -
DISCUSIÓN	- 92 -
CAPITULO 3	- 94 -
3 INHIBIDORES DE HSP90	- 95 -
3.1 EFECTO DE LOS COMPUESTOS SOBRE LA ACTIVIDAD ATPASA DE HSP90 β	- 98 -

3.2 EFECTO DE LOS COMPUESTOS SOBRE LA VIABILIDAD DE CÉLULAS DE CÁNCER DE PRÓSTATA	- 100 -
3.3 EFECTO DE LOS COMPUESTOS SOBRE LA CAPACIDAD MIGRATORIA DE CÉLULAS DE CÁNCER DE PRÓSTATA.	- 106 -
3.4 EFECTO DE LOS COMPUESTOS SOBRE LA TRANSLOCACIÓN DE LOS RECEPTORES DE GLUCOCORTICOIDES Y ANDRÓGENOS	- 112 -
DISCUSIÓN	- 114 -
<i>DISCUSIÓN GENERAL</i>	- 119 -
<i>BIBLIOGRAFÍA</i>	- 125 -

PUBICACIONES

TRABAJOS PUBLICADOS O EN PRENSA:

1. Echeverría PC, Mazaira G, Erlejman A, Gomez-Sanchez C, Piwien Pilipuk G, Galigniana MD. *Nuclear import of the glucocorticoid receptor-hsp90 complex through the nuclear pore complex is mediated by its interaction with Nup62 and importin beta.* **Molecular & Cellular Biology** (2009) 29: 4788-97.
2. Molinari AM, Machado-Rada MY, Mazaira GI, Erlejman AG, Galigniana MD. *Molecular basis of mineralocorticoid receptor action in the nervous system.* **CNS Neurological Disorders-Drug Targets** (2013) 12: 1163-74.
3. Dutta Gupta S, Snigdha D, Mazaira GI, Galigniana MD, Subrahmanyam CV, Gowrishankar NL, Raghavendra NM. *Molecular docking study, synthesis and biological evaluation of Schiff bases as Hsp90 inhibitors.* **Biomedicine & Pharmacotherapy** (2014) 68: 369-76.
4. Erlejman AG, De Leo SA, Mazaira GI, Molinari AM, Camisay MF, Fontana V, Cox MB, Piwien-Pilipuk G, Galigniana MD. *NF- κ B transcriptional activity is modulated by FK506-binding proteins FKBP51 and FKBP52: a role for peptidyl-prolyl isomerase activity.* **Journal of Biological Chemistry** (2014) 289: 26263-76.
5. Mazaira GI, Lagadari M, Erlejman AG, Galigniana MD. *The emerging role of TPR-domain immunophilins in the mechanism of action of steroid receptors.* **Nuclear Receptor Research** (2014) Vol. 1, ID 101094, 17 pages, doi:10.11131/2014/101094.
6. Dutta Gupta S, Revathi B, Mazaira GI, Galigniana MD, Subrahmanyam CV, Gowrishankar NL, Raghavendra NM. *2,4-dihydroxy benzaldehyde derived Schiff bases as small molecule Hsp90 inhibitors: Rational identification of a new anticancer lead.* **Bioorganic Chemistry** (2015) 59C: 97-105.

7. Mazaira GI, Erlejman AG, Galigniana MD (2015) *Molecular chaperones shape steroid receptor action and pharmacologic strategies*. **Journal of Cell & Molecular Biology**. En prensa.

8. Mazaira GI, Camisay MF, De Leo SA, Erlejman AG, Galigniana MD (2015) *Biological relevance of Hsp90-binding immunophilins in cancer development and treatment*. **International Journal of Cancer**. En prensa.

TRABAJOS EN PREPARACIÓN:

9. Echeverría PC*, Mazaira GI*, Galigniana MD. *Unraveling links of the GR•Hsp90•TPR complex and the nuclear import/export mechanism*. (*): Co-primeras autorías.

10. Mazaira GI*, Echeverría PC*, Erlejman AG, Galigniana MD. *Role of proteins containing tetratricopeptide motifs on steroid receptor subcellular localization*. (*): Co-primeras autorías.

ABREVIATURAS

11-OP: 11,19-oxidoprogesterona

β -Gal: β -galactosidasa

aa: aminoácido

ADN: Ácido Desoxiribonucleico

ADP: *Adenosine Diphosphate* (adenosina difosfato)

AhR: *Aryl hydrocarbon receptor* (receptor de dioxano)

Aldo: Aldosterona

AMPC: *Cyclic Adenosine Monophosphate* (adenosina monofosfato cíclico)

APC: *Anaphase Promoting Complex* (complejo promotor de anafase)

AR: *Androgen Receptor* (receptor de andrógenos)

ARE: *Androgen Response Elements* (elementos de respuesta a andrógenos)

ARN: Ácido Ribonucleico

ATP: *Adenosine Triphosphate* (adenosina trifosfato)

CPRC: Cáncer de Próstata Resistente a Castración

CS: CHORD – Containing protein of SGT

CTD: *C-terminal Domain* (domino C – terminal)

DBD: *DNA Binding Domain* (dominio de unión a ADN)

Dexa: Dexametasona

DHT: 5 α -Dihidrotestosterona

DO: Densidad Óptica

ER: *Estrogen Receptor* (receptor de estrógenos)

FKBP: *FK506 Binding Protein* (proteína que une la droga FK506)

GA: Geldanamicina

GFP: *Green Fluorescent Protein* (proteína fluorescente verde)

GR: *Glucocorticoid Receptor* (receptor de glucocorticoides)

GRE: *Glucocorticoid Response Elements* (elementos de respuesta a glucocorticoides)

HOP: *Heat-shock organizing protein* (proteína organizadora de Hsp)

HRE: *Hormone Response Elements* (elementos de respuesta a hormona)

Hsp: *Heat shock protein* (proteína de choque térmico)

IMM: Inmunofilina

Imp: Importina

KO: *Knock Out*

LBD: *Ligand Binding Domain* (dominio de unión al ligando)
LH: Luteinizing Hormone (hormona luteinizante)
Luc: Luciferasa
MD: *Middle Domain* (dominio medio)
MR: *Mineralocorticoid Receptor* (receptor de mineralocorticoides)
NF- κ B: *Nuclear Factor κ B* (factor nuclear κ B)
NLS: *Nuclear Localization Signal* (señal de localización nuclear)
NPC: *Nuclear Pore Complex* (complejo del poro nuclear)
NTD: *N-Terminal Domain* (domino N – terminal)
PP5: *Protein Phosphatase 5* (proteína fosfatasa 5)
PPIasa: Peptidil Prolil Isomerasa
PR: *Progesterone Receptor* (receptor de progesterona)
RAR: *Retinoic Acid Receptor* (receptor de ácido retinoico)
RE: Receptor de Esteroides
SGS: *SGT1 Specific Domain* (dominio específico de SGT1)
SGT: *Small Glutamine-rich Tetratricopeptide repeat containig protein*
TD: *Transactivation Domain* (dominio de transactivación)
TPR: *Tetratricopeptide Repeat*
U.A: Unidades Arbitrarias
UV: Ultravioleta
VDR: *Vitamin D Receptor* (receptor de vitamina D)

INTRODUCCIÓN

RECEPTORES DE NUCLEARES

Se denominan receptores nucleares a los miembros de una súperfamilia de proteínas cuya principal característica es actuar como factores de transcripción dependientes de ligando. Estos factores intracelulares actúan como intermediarios de la respuesta biológica de diversos ligandos, tales como las hormonas lipofílicas o las vitaminas entre otros. Algunos miembros de la familia no poseen un ligando específico conocido aún, por lo que se los subclasifica como “receptores huérfanos”. Los miembros de esta gran súperfamilia participan en la regulación de funciones esenciales como el desarrollo embrionario, la diferenciación, la reproducción, la división celular, la respuesta inmune, el metabolismo y la muerte celular [1-3]. Los receptores nucleares poseen una estructura básica que consiste en seis regiones (cinco en el caso de algunos receptores) nombradas de la A a la F, tal como se representa en la Figura 1.

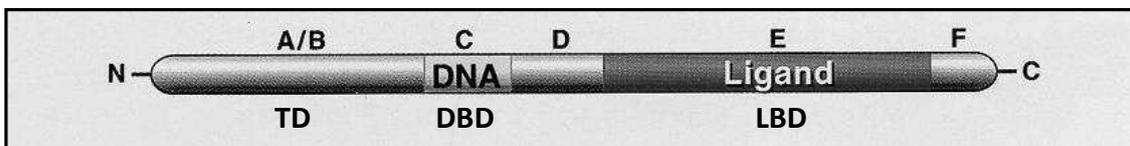


Figura 1: Arquetipo de Receptor Nuclear. TD: Dominio de transactivación (Transactivation Domain); DBD: Dominio de unión al ADN (DNA Binding Domain); LBD: dominio de unión al ligando (Ligand Binding Domain). (Adaptado de Mangelsdorf et.al. 1995)

En la región A/B se encuentra el dominio de transactivación (TD por su sigla en inglés, *Transactivation Domain*) o de activación independiente de ligando, también llamado AF-1. La región C consiste en el dominio responsable de la interacción con el ADN, llamado también DBD por su sigla en inglés, *DNA Binding Domain*. Consiste en dos motivos de dedos de Zn altamente conservados, razón por la cual la secuencia de este dominio es utilizada en el estudio de relaciones filogenéticas. El dominio D es el de bisagra y donde se encuentra parte de la señal de localización nuclear de varios receptores. En la región E se encuentra el dominio de interacción con el ligando (LBD por su sigla en inglés *Ligand Binding Domain*), en el cual se encuentra la secuencia que

permite la dimerización del receptor y una secuencia que confiere especificidad transcripcional correspondiente al ligando unido (AF-2). Se desconoce la función de la región F, pero se cree que podría conferirle especificidad de ligando y/o actividad transcripcional [2, 4, 5]

RECEPTORES DE ESTEROIDES

La subfamilia de los receptores de esteroides (RE) pertenece a la superfamilia de receptores nucleares [6]. En vertebrados se pueden encontrar seis genes evolutivamente relacionados que codifican la expresión de los receptores de estrógenos α y β (ER α y ER β), progestágenos (PR), mineralocorticoides (MR), glucocorticoides (GR) y andrógenos (AR). Estos factores de transcripción activables por ligando median la acción biológica de las hormonas esteroides en procesos tales como el desarrollo sexual, la reproducción, el comportamiento, el equilibrio hidroelectrolítico, el metabolismo energético, la inmunidad y la respuesta a estrés [6]. Las hormonas esteroides son compuestos lipofílicos derivados del colesterol. En la Figura 2 se representan las estructuras de las principales hormonas esteroides.

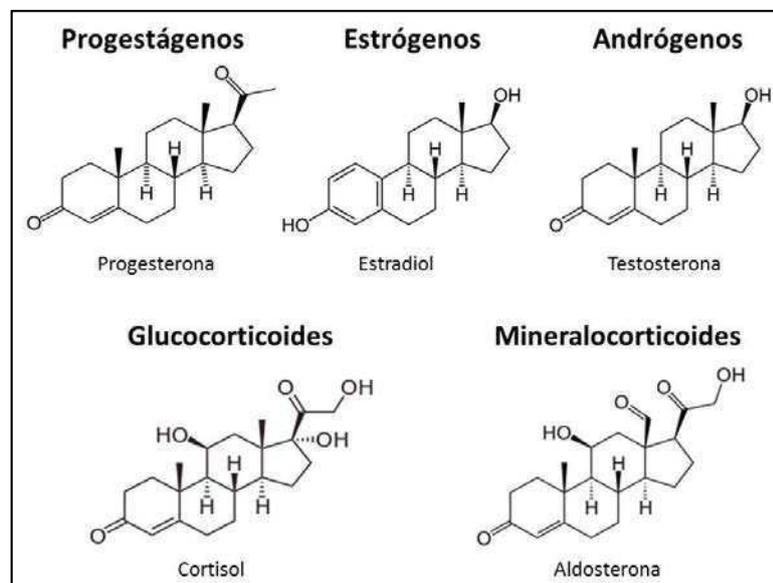


Figura 2: Estructuras planas de las principales hormonas esteroides.

Se cree que los RE aparecieron dentro del linaje de los cordados hace unos 500 millones de años, y evolucionaron a partir de la duplicación de un gen ancestral que codificaba para una proteína similar a ER [7, 8]. En consecuencia, existe gran similitud de secuencias entre los dominios de los diferentes miembros de la subfamilia [9].

En el transcurso de esta tesis se utilizará a los receptores GR y AR como modelo de RE. A continuación se presentarán las características particulares de cada uno.

RECEPTOR DE GLUCOCORTICOIDES

En humanos, los glucocorticoides regulan un amplio espectro de funciones fisiológicas esenciales para la vida, y juegan un rol clave en el mantenimiento de la homeostasis basal y la inducida por estrés [10, 11]. Aproximadamente el 20% de los genes expresados en leucocitos humanos son regulados positiva o negativamente por glucocorticoides. Éstos se encuentran involucrados en prácticamente todas las redes celulares, moleculares y fisiológicas de un organismo. Participan en procesos biológicos críticos como el crecimiento, la reproducción, el metabolismo intermedio, las reacciones inmunes e inflamatorias, así como también en funciones del sistema nervioso central y cardiovascular [12]. Cantidades fisiológicas de glucocorticoides son también esenciales para el normal funcionamiento de la función tubular renal, y por lo tanto para la homeostasis del agua y los electrolitos. Por otro lado, los glucocorticoides son extremadamente efectivos como agentes antiinflamatorios e inmunosupresores y por ende ampliamente utilizados en el tratamiento de diversas patologías.

Los glucocorticoides son sintetizados y secretados por las células fasciculares de la corteza adrenal, un fenómeno que se encuentra regulado por el eje hipotálamo-hipófiso-adrenal en el que la hormona adenocorticotropa (ACTH) es el principal estímulo para estas células de la glándula adrenal. El glucocorticoide que se encuentra en mayor concentración en plasma en los seres humanos es el cortisol, cuya estructura se representa en la Figura 2. En los roedores (a excepción del cobayo), el más abundante es la corticosterona (sin el C₁₇-OH presente en el cortisol) Por razones de mayor vida media al tener un metabolismo más lento y en algunos casos, dada su mayor afinidad y/o especificidad por GR, en la terapéutica se utilizan variados glucocorticoides sintéticos para el tratamiento farmacológico de procesos

inflamatorios, autoinmunidad, alergia, cáncer, trasplante de órganos, edema cerebral, etc. [13]. En la Figura 3 muestra la estructura de la dexametasona (Dexa), uno de los glucocorticoides sintéticos de mayor uso en la clínica.

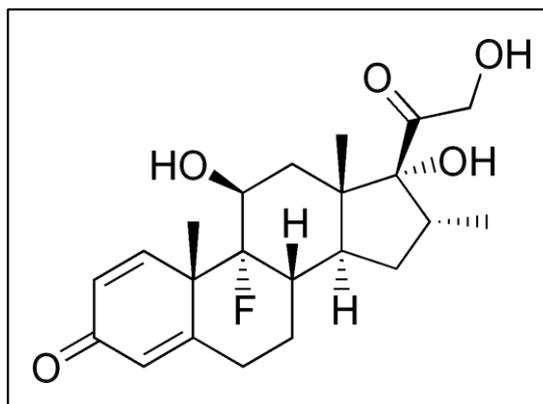


Figura 3: Estructura del glucocorticoide sintético Dexametasona

En el año 1985 Hollenberg reportó la secuencia de GR humano, primer miembro de la familia en ser clonado [14]. En humanos, el gen que codifica para GR se encuentra ubicado en el brazo largo del cromosoma 5, en la región 5q31-32, y produce dos variantes de *splicing*, las isoformas α y β , las que difieren en el extremo C-terminal. La primera es la forma considerada activa mientras que la isoforma β no posee los 50 aminoácidos terminales de la α y contiene 15 aminoácidos no homólogos adicionales. Como consecuencia, la isoforma β (que no es un esteroide) actúa como un inhibidor de la α , tal que la respuesta biológica final se puede ver afectada por el balance de expresión y/o estabilidad de ambas isoformas [15]. Existen además, otras tres isoformas denominadas GR γ , GR-A y GR-P. Sin embargo la respuesta a los glucocorticoides se lleva a cabo a través de la acción de GR α , ya que el resto de las isoformas son incapaces de unir el ligando o aumentar la expresión de genes blanco en respuesta al mismo. La expresión de estas isoformas se asocia con la resistencia al tratamiento con glucocorticoides de distintos tipos enfermedades inflamatorias [16].

A través del dominio DBD, el homodímero de GR reconoce las secuencias consenso GRE (*Glucocorticoid Response Elements*), las que consisten típicamente en dos secuencias altamente conservadas entre especies de seis nucleótidos separadas por bases no conservadas (5'-GGTACAnnnTGTTCT-3') [17]. Una vez unido a estos sitios,

GR sufre cambios conformacionales que permiten el reclutamiento de coreguladores y factores remodeladores de la cromatina. Se ha reportado también la existencia de sitios GRE negativos, menos definidos, que suprimen la actividad de la maquinaria de transcripción [18]. Por otro lado, la formación de heterodímeros entre GR y otros factores de transcripción tales como NF- κ B o AP-1 inhibe la actividad de los últimos y constituye otro mecanismo de acción de los glucocorticoides conocido como transrepresión [19, 20].

RECEPTOR DE ANDRÓGENOS

El receptor de andrógenos humano también posee los dominios estructurales mostrados en la Figura 1. En lisados celulares pueden apreciarse dos bandas correspondientes al AR-A de 87-kDa, minoritaria y el AR-B de 110-kDa. Con más de una década de retraso con respecto a GR, el AR humano fue clonado por primera vez en 1998 por Lubahn [21]. El gen se localiza en el cromosoma X en la posición Xq11-12 [22]. A partir del mismo se obtienen por splicing alternativo dos isoformas A y B [23, 24]. Los ligandos naturales de AR son los andrógenos como la testosterona (Figura 1). En realidad, el ligando activo es un derivado reducido de testosterona en el doble enlace C₄=C₅ del anillo A, la dihidrotestosterona (DHT). La testosterona posee cierta afinidad (aunque baja) por otros receptores de esteroides como PR y ER, en cambio DHT es un ligando específico de AR [25].

Aproximadamente el 95% de los andrógenos circulantes (testosterona, DHT y androstenediona) son producidos en las células de Leydig del testículo y se encuentran bajo el comando del eje hipofisario-hipotalámico-gonadal, donde la hormona luteinizante (LH) es el principal inductor de la síntesis y secreción de testosterona. Los andrógenos son esenciales para el normal funcionamiento de muchos sistemas de órganos en vertebrados, participan en la actividad reproductiva, la diferenciación, el crecimiento y el mantenimiento del sistema reproductivo, los que requieren de una señalización regulada por estos esteroides [26]. El desarrollo del fenotipo masculino se debe a la acción de los andrógenos sobre su tejido blanco (gónadas, cerebro, etc.). La señalización androgénica a través de AR es crítica para el normal desarrollo de la

glándula prostática y está claramente involucrada en el desarrollo aberrante en el cáncer de próstata [27], el cáncer de mayor incidencia en hombres [28]. Debe enfatizarse que si bien los efectos mejor caracterizados de AR son aquéllos que requieren su interacción con sitios de reconocimiento en el ADN, al igual que en el caso de GR, AR posee una gran variedad de acciones que son independientes de la acción genómica y por ende son respuestas rápidas. Se trata de efectos sobre la membrana que pueden darse por acción directa sobre canales iónicos, transportadores, o por modulación indirecta de segundos mensajeros convencionales como Ca^{2+} intracelular, PKA/PKC o MAPK [29].

MADURACIÓN DE LOS HETEROCOMPLEJOS DE RECEPTORES DE ESTEROIDES

La caracterización de la subfamilia de receptores de hormonas esteroideas ha incrementado nuestro entendimiento de la fisiología humana, ya que como se ha mencionado se encuentran relacionadas con funciones celulares y moleculares esenciales, influyen en el desarrollo y contribuyen al mantenimiento de la homeostasis [30]. Profundizar en la comprensión de estos mecanismos resulta indispensable para lograr desarrollar terapias focalizadas en el tratamiento de enfermedades relacionadas con el funcionamiento de estas hormonas, sus receptores y los complejos que intervienen en su señalización.

Los receptores de esteroides se encuentran formando heterocomplejos con chaperonas y co-chaperonas [31, 32]. La piedra angular de estos complejos es la proteína de choque térmico llamada Hsp90 (Heat Shock Protein 90-kDa), usualmente dimérica, quién media el correcto plegamiento de su proteína cliente y la correcta formación del complejo activo de manera ATP dependiente. En el caso de los receptores de esteroides permite que el “bolsillo” de unión de la hormona esté disponible para la unión de la misma [33]. El heterooligómero maduro está integrado, para cada molécula de receptor, por un dímero de Hsp90, una molécula de Hsp70, una de p23 y una proteína con dominios TPR.

La chaperona llamada Hop (*Heat-shock organizing protein*) es una proteína con dominios TPR que es integrante de complejos inmaduros o intermediarios. Es la responsable de estabilizar la interacción entre Hsp70 y el dímero de Hsp90; un complejo al que se ha llamado “foldosoma”. La chaperona Hsp40 siempre se encuentra asociada a Hsp70 y favorece el ensamblado de éste, que interactúa con el receptor de esteroides permitiéndole así la posibilidad de unir hormona [34, 35] (Figura 4). El ciclo de maduración continúa con la disociación de Hop, la que se disocia una vez que el complejo receptor•chaperonas se ha ensamblado en un proceso catalizado por la proteína BAG-1. Esta disociación de Hop deja libre el único sitio aceptor de proteínas TPR que posee el dímero de Hsp90 [36], el que es subsecuentemente ocupado por otra proteína con dominios TPR, usualmente una inmunofilina (IMM) de alto peso molecular. La pequeña cochaperona ácida p23 estabiliza el complejo, el que constituye la forma soluble madura del RE.

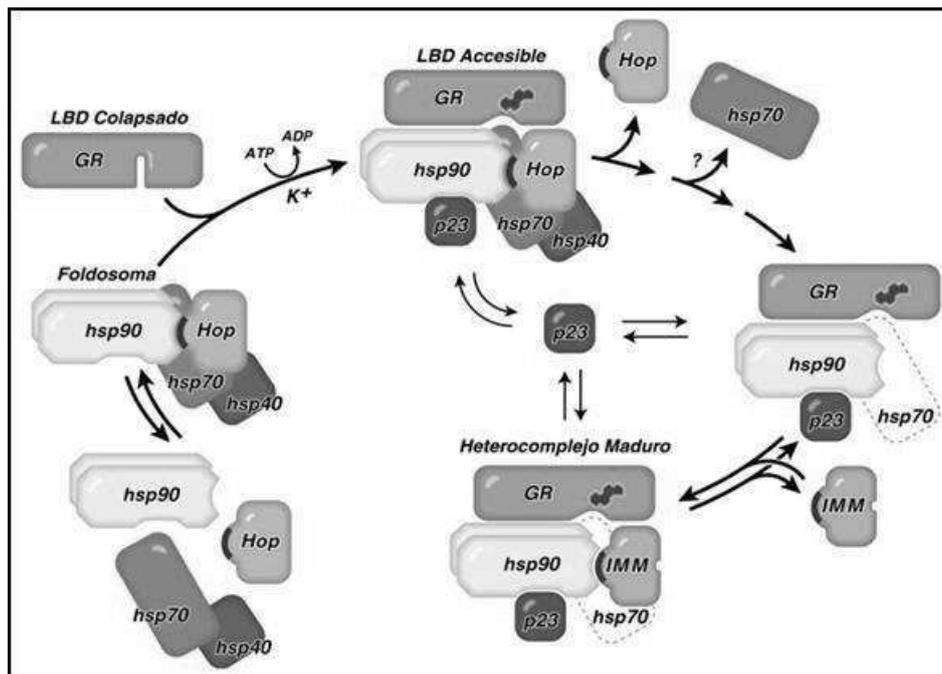


Figura 4: Ciclo de Maduración del Receptor de Glucocorticoides (GR).

La unión del ligando provoca un cambio conformacional del RE que le permite translocar del citoplasma al núcleo e interactuar con secuencias específicas de ADN las que genéricamente se denominan HRE (*Hormone Response Elements*). Para que ello ocurra, el heterocomplejo de Hsp90 debe disociarse del RE (un evento llamado

“transformación”) para permitir su dimerización y exposición del dominio DBD, el que se bloquea en presencia de Hsp90. Los HRE recibirán nombres específicos según la secuencia que reconozca a un RE dado, p.ej. será GRE para GR, ARE para AR, PRE para PR, etc. Al receptor dimerizado unido al HRE, se le asocian también los factores requeridos para la transactivación del gen en cuestión [37-39]. Debe enfatizarse que un RE no es meramente un receptor de una hormona sino un verdadero factor de transcripción regulado por la unión del ligando. Nuestro laboratorio ha demostrado que el proceso de transformación de RE es un evento nuclear (ver luego) [40, 41], pero no es aún claro si la dimerización ocurre antes de interactuar con la secuencia HRE por ser un requerimiento para ello (lo cual es lo más probable) o si la dimerización ocurre sobre el sitio de unión.

CHAPERONAS MOLECULARES

Desde una perspectiva social, el término chaperona se refiere a una persona, usualmente una matrona, quien tenía la responsabilidad de supervisar el comportamiento apropiado y decoroso de jóvenes, especialmente señoritas, cuando se encontraban en un entorno social en el que no estaban presentes sus padres. Esta práctica fue frecuente hasta la primera mitad del s. XX, especialmente en la sociedad aristocrática anglo-sajona. Por extrapolación, se llamaron *chaperonas moleculares* a aquéllas proteínas inducidas en situaciones de estrés y cuya función es preservar las propiedades de sus *proteínas-cliente*, es decir, aquéllas con las que interactúan. En situaciones normales, las chaperonas son responsables del plegamiento correcto de las proteínas celulares y de la estabilidad con que mantienen tal plegamiento en situaciones adversas. Notar que todas las proteínas de choque térmico (o *heat-shock proteins*) son chaperonas, pero no todas las chaperonas son necesariamente proteínas de choque térmico ya que no se son inducidas por calor u otro estímulo estresante (p.ej., survivin, CCT/TRiC, nucleoplasmina, etc.) [42].

HSP90

Hsp90 pertenece a la familia de proteínas de choque térmico cuya expresión se ve exacerbada no sólo por calor, sino más general aún, en condiciones de estrés [33, 43].

El rol esencial de este tipo de chaperonas moleculares es estabilizar o rescatar de la inactivación a proteínas desnaturalizadas o mal plegadas, producto de una situación desfavorable (aumento de la temperatura, variación de pH, radiación, desequilibrio osmótico, etc.), previniendo así su agregación y posterior degradación. Este rescate otorga el tiempo necesario a la célula para activar programas que reestablezcan la homeostasis en general y, muy en particular, la proteostasis. De no ser posible resolver la situación y recuperar la homeostasis, prevalecerán las señales que desencadenen la muerte celular. Sin embargo, comparada con otras chaperonas, Hsp90 posee un alto grado de reconocimiento de sus proteínas sustrato (o clientes) y generalmente una baja afinidad por proteínas desnaturalizadas [44-46]. El consenso actual respecto a la actividad de Hsp90 es que su función de chaperona está dirigida a proveer la conformación activa a proteínas clientes que ya poseen *per se* una estructura terciaria estable, actuando como un regulador de la actividad [32, 47]. Como ejemplo valga el caso de los receptores de esteroides antes mencionado.

Hsp90 es una proteína ubicua que se expresa en todos los organismos exceptuando a la mayoría de los miembros del dominio Arquea (*Archaea*) [48, 49]. La mayoría de los organismos muestran dos isoformas de Hsp90: la isoforma α , la que es fuertemente inducible por estrés, y la isoforma β , la que es constitutivamente expresada e inducible en ciertas situaciones por factores de crecimiento y no por situaciones de estrés convencionales que activan a la isoforma α [33, 50, 51].

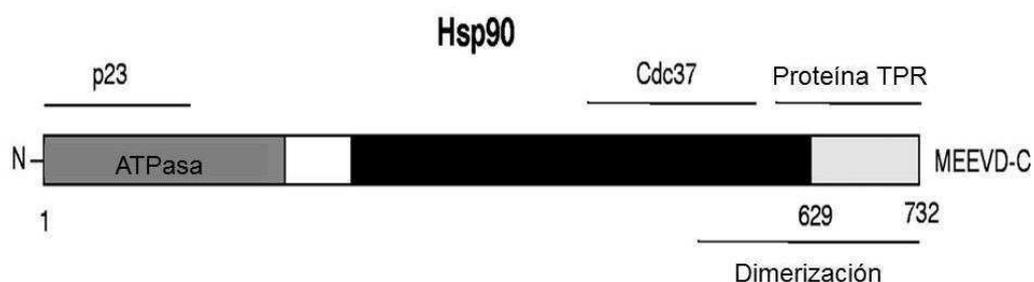


Figura 5: Dominios estructurales de Hsp90. Esquema adaptado de Nollen et. al. 2002.

En el monómero de Hsp90 se distinguen tres dominios (Figura 5): el N-terminal o NTD por sus siglas en inglés (*N-Terminal Domain*) que posee actividad intrínseca de ATPasa, el dominio central denominado MD por sus siglas en inglés (*Middle Domain*)

con sitios de unión para proteínas cliente y co-chaperonas, y el dominio C-terminal denominado CTD por sus siglas en inglés (*C-terminal Domain*), el que es clave para la dimerización de la chaperona y para su interacción vía la secuencia MEEVD con los dominios TPR de otros factores y co-chaperonas [52-54].

La actividad ATPasa es esencial para su función. Al unirse el ATP al NTD, sufre cambios conformacionales secuenciales conocidos como ciclo de ATPasa (Figura 6), a través de los cuales pasa de un estado abierto (sin ATP) a uno cerrado (unido a ATP).

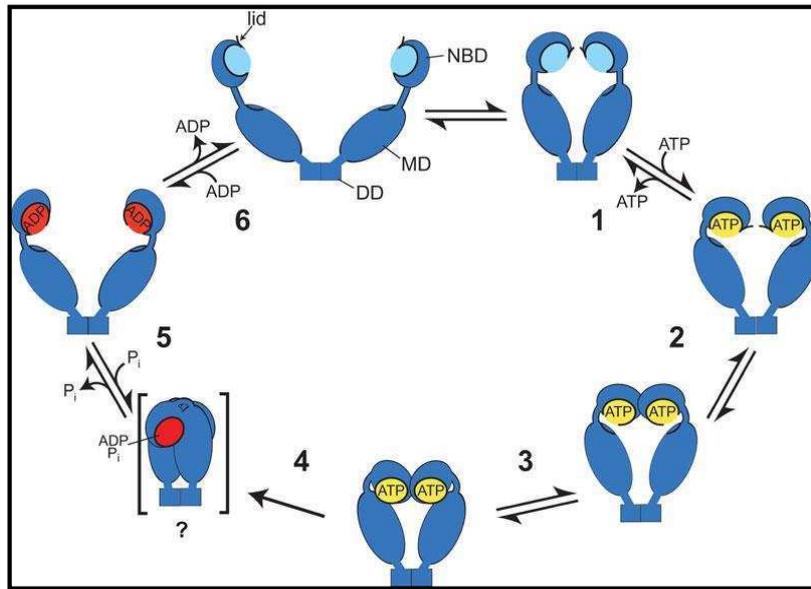


Figura 6. Esquema del ciclo de ATPasa de Hsp90. NBD: dominio de unión al nucleótido o NTD. MD: dominio medio. DD: dominio de dimerización o CTD. (Mayer et.al. 2009)

La actividad de ATPasa de Hsp90 se inhibe de manera altamente específica en presencia de drogas como geldanamicina (GA) o radicicol (Figura 7). Ambos compuestos naturales se unen al mismo sitio del ATP pero con mayor afinidad [55, 56], lo que impide que Hsp90 adquiera su conformación activa (cerrada) y por ende su interacción con proteínas-cliente [57].

Los primeros trabajos en proteínas-cliente de Hsp90 estuvieron centrados en proteína-quinasa y receptores nucleares [58-61]. Con el tiempo se sumaron proteínas involucradas de vías de señalización relacionadas con procesos como la infección viral,

inmunidad innata, transducción de señales, progresión del ciclo celular, apoptosis, regulación transcripcional, respuesta a estrés, replicación, transcripción, metabolismo y reparación del ADN, procesamiento del ARN y remodelación de cromatina [62-70]. Una lista actualizada de los clientes de Hsp90 puede consultarse en la página que mantiene el grupo del Dr. Didier Picard (<http://www.picard.ch>).

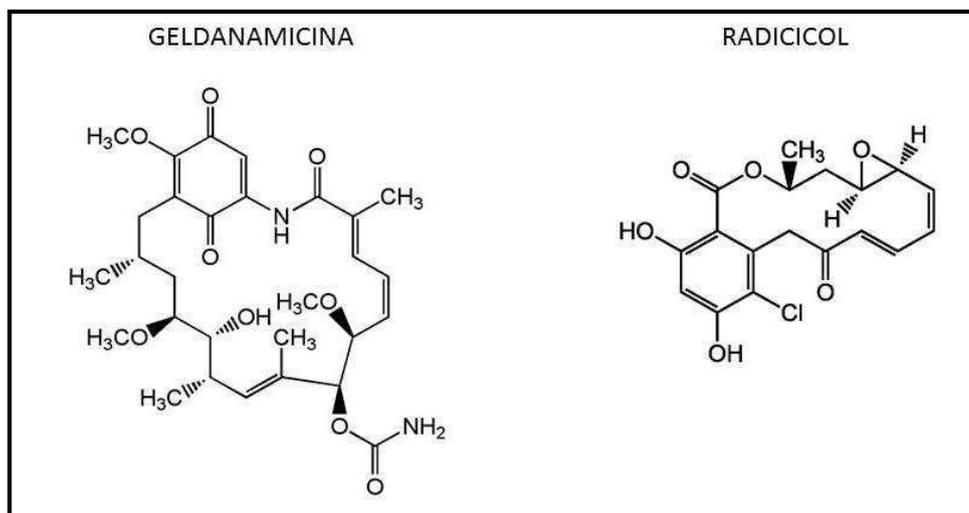


Figura 7: Inhibidores de la actividad ATPasa de Hsp90, Geldanamicina y Radicol.

La interacción de proteínas-cliente con la maquinaria de Hsp90 permite su correcta conformación, actividad, transporte y degradación [71-75]. De estos hechos, dada la abundancia de Hsp90, y la calidad y cantidad de proteínas-cliente a las que regula, se desprende claramente que la función de esta chaperona molecular es fundamental para el mantenimiento de la homeostasis celular [76, 77]. Hsp90 representa un 2-3% del total de las proteínas solubles de una célula normal, y representa más de un 10% en células estresadas. En células cancerosas el porcentaje de Hsp90 se encuentra entre 6-7% del total en ausencia de otros estímulos [78-82]. Este hecho sumado al número y esencialidad de factores clientes que están desregulados en distintos tipos de cáncer [83-85], han convertido a Hsp90 en un prometedor blanco de la terapia antitumoral.

Hsp90 funciona como un complejo multimérico, el cual involucra interacciones dinámicas con co-chaperonas y proteínas clientes. Se ha descrito que la regulación de

varias de sus proteínas-cliente es similar a la que veremos a continuación centrada en los receptores de esteroides.

PROTEÍNAS CON DOMINIO TPR

El dominio TPR (según su sigla en inglés *Tetratricopeptide Repeat*) media interacciones proteína-proteína. El mismo está formado por secuencias de 34 aminoácidos repetidas en tándem de 1 a 16 veces (según la proteína que lo porte). La longitud más frecuente es de tres repeticiones, y puede representar el mínimo de repeticiones necesarias para la unión con una proteína específica [86]. Cada una de las repeticiones forma un par de α -hélices que adquieren una disposición antiparalela (hélice-vuelta-hélice). Repeticiones adyacentes se disponen en forma paralela, formando así una superhélice dextrógira [87] (Figura 8).

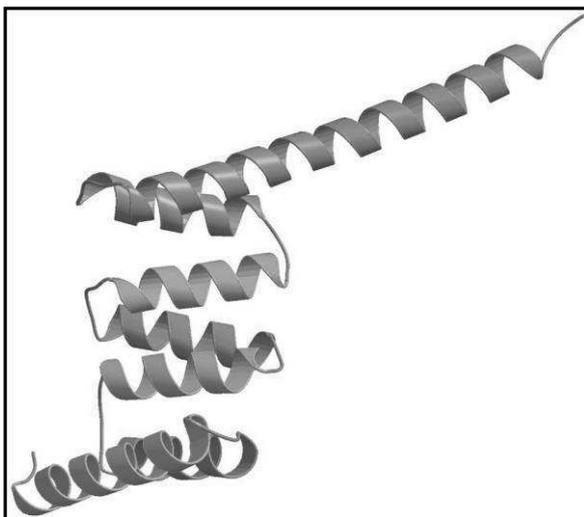


Figura 8: Diagrama del dominio TPR de PP5. Este dominio contiene tres repeticiones en tándem.

Se han encontrado proteínas con dominios TPR en organismos con distintos niveles de organización, interviniendo en múltiples procesos tales como regulación del ciclo celular, transducción de señales, transcripción y transporte de proteínas [88]. Estas proteínas además suelen poseer uno o más dominios funcionales [89], lo cual les permite adquirir una gran diversidad de funciones celulares (por ejemplo, el dominio con actividad fosfatasa de PP5, al que haremos referencia más adelante). Dentro del grupo de proteínas que poseen este dominio, se encuentran Cdc16p, Cdc23p y Cdc27p, las cuales forman parte del complejo promotor de anafase (APC por su sigla en inglés *Anaphase Promoting Complex*) [90-92]. TOM70 es una proteína involucrada en la

importación mitocondrial capaz de interactuar con Hsp90 y Hsp70 a través de su dominio TPR [74].

Las proteínas TPR potencialmente puede regular la actividad de Hsp90 a través de la unión al nucleótido (ADP/ATP), su hidrólisis o liberación. Pueden además regular la unión o liberación de la proteína cliente [89]. Si bien los motivos son altamente degenerados, se puede observar un patrón consistente de residuos que son clave para la integridad estructural. El patrón de consenso de los residuos conservados implica posiciones 4, 7, 8, 11, 20, 24, 27 y 32. Solamente se encuentran altamente conservadas las posiciones 8 (Gly o Ala), 20 (Ala) y 27 (Ala). En el resto de las posiciones se encuentran preferencias por una clase de aminoácido, en lugar de por un residuo específico [86]. Cabe destacar que la mera presencia del dominio TPR no asegura la unión con Hsp90, o determina las propiedades de la interacción. Las regiones circundantes al dominio TPR también son importantes en el reconocimiento de Hsp90 y en la interacción con la proteína cliente. Como ejemplo se puede considerar a dos proteínas TPR pertenecientes a la familia de las IMM, FKBP51 y FKBP52. Dichas proteínas se unen con distinta afinidad a Hsp90 y son reclutadas diferencialmente dentro de los complejos de varios RE [93, 94]

A pesar de la variedad de procesos en los que intervienen, es muy poco lo que se conoce acerca de las propiedades individuales de la mayoría de estas proteínas. Muchos de los estudios realizados fueron enfocados en su asociación con la chaperona Hsp90, con la que interactúa vía el péptido MEEVD del extremo C-terminal de Hsp90 [52] (Figura 5). De la gran variedad de proteínas TPR existentes, nos interesan en particular aquellas que a través de su interacción con Hsp90 forman parte de los heterocomplejos de RE. En tal sentido, nuestro laboratorio se ha abocado a estudiar el rol biológico de las IMM, campo en el cual mucho de lo que se sabe al presente fue aportado por nuestro grupo (ver [47, 95-97] para actualizaciones recientes).

INMUNOFILINAS

Las IMM son una familia de proteínas capaces de unir drogas inmunosupresoras a través de su dominio peptidilprolil isomerasa (PPIasa). Tal

interacción inhibe la actividad enzimática. A su vez, las IMM se dividen en dos subfamilias: FKBP (*FK506-Binding Protein*) y CyP (*Cyclophilin*), según su capacidad de unir FK506 o ciclosporina A respectivamente [98, 99].

Las IMM de bajo peso molecular como FKBP12 y CyP17 son las responsables del fenómeno de inmunosupresión al inhibir la actividad biológica de calcineurina/PP2B. Ello se traduce en la falta de desfosforilación de NFAT, factor que no puede entonces translocar al núcleo de los linfocitos y activar la producción de interferón- γ e interleuquinas [100]. Ello no ocurre con las de alto peso molecular aun siendo capaces de unir dichas drogas en su dominio PPIasa. Si bien la función de las IMM de alto peso molecular no está dilucidada, sabemos que varias de ellas tienen propiedades de chaperonas moleculares y varias de ellas se asocian a los RE. Sólo las IMM que poseen dominios TPR son capaces de interactuar con el complejo Hsp90•RE vía el sitio aceptor presente en el dímero de Hsp90 unido al RE. Además, poseen otras regiones que interactúan con la proteína cliente [101]. Algunas IMM como FKBP52, CyP40, PP5 y FKBP/WisP39 son capaces de interactuar con el complejo motor dineína/dinactina a través de su dominio PPIasa [102, 103].

Como ya se mencionó, de las 35 proteínas de la familia, sólo unas pocas se asocian a receptores nucleares (Figura 9). Cada receptor tiene preferencias particulares por cada una de las diferentes proteínas TPR. Por ejemplo, la IMM XAP2 es exclusiva del receptor de dioxano (AhR), el cual no se asocia con ninguna otra [104]. PP5 se encuentra en mayor proporción en complejos con GR [105]. Las IMM juegan un papel muy importante en la regulación de la actividad de RE. Con el fin de ejemplificarlo estudiaremos con un poco más de detalles los efectos de dos de las IMM que han sido mejor caracterizadas en los últimos años: FKBP51 y FKBP52.

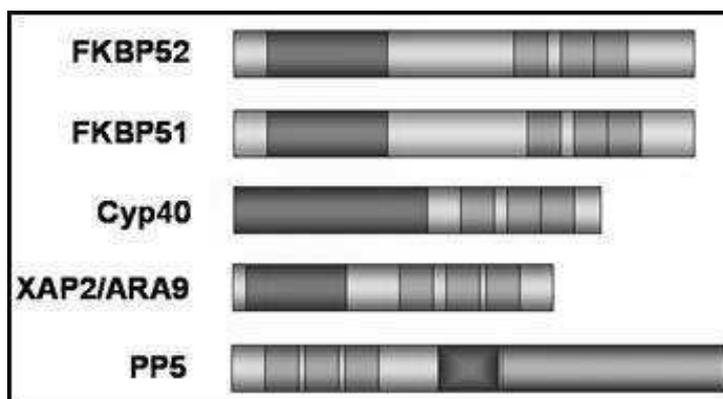


Figura 9: Inmunofilinas asociadas a receptores de esteroides.

FKBP51 Y FKBP52

Si bien estas IMM presentan 60% de homología y 75% de similitud en sus secuencias, sus dominios presentan orientaciones espaciales distintas (Figura 10)[106]. Estas diferencias estructurales son las que permiten la regulación diferencial sobre la maduración y la actividad de RE, y les confiere selectividad para interactuar con sus proteínas-cliente. El dominio con actividad enzimática de PPlasa es el que une FK506 y es llamado FK1 (Figura 10); el dominio denominado FK2 carece de la actividad enzimática y une nucleótidos trifosfato, y posee tres dominios TPR en serie a través de los cuales interactúan con Hsp90. FKBP51 y FKBP52 usualmente muestran funciones antagónicas en los tejidos en donde se expresan, tal que si una IMM estimula un proceso la otra la inhibe, quizás como un fenómeno de competencia dadas sus elevadas homología. Ello se atribuye a las diferencias entre sus dominios PPlasa ya que quimeras a las que se les intercambiaron el dominio PPlasa demostraron que los roles biológicos FKBP52 y FKBP51 se interconvirtieron entre sí [107].

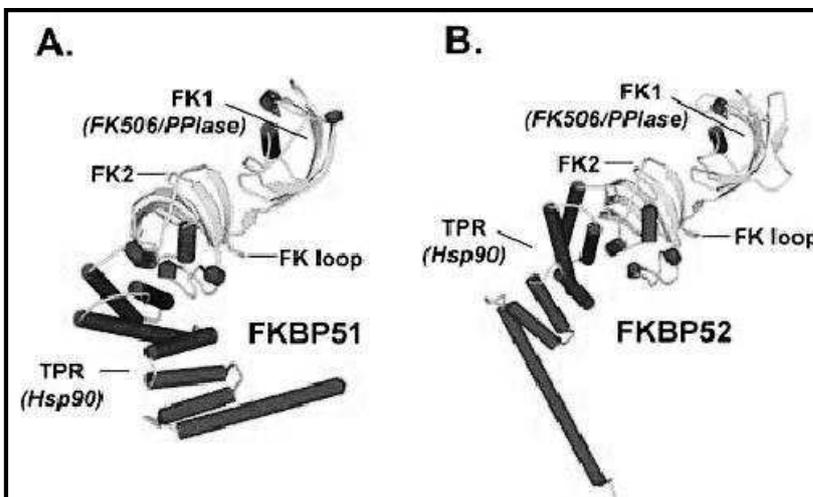


Figura 10: Diferencias en la orientación de los dominios de FKBP51 y FKBP52.

En ausencia de ligando, es principalmente FKBP51 quien forma parte de los heterocomplejos con RE. En presencia de hormona, es rápidamente desplazada por FKBP52 [108]. La expresión de FKBP52 es inducida por choque térmico [109], y la expresión de FKBP51 es inducida por glucocorticoides [94, 110, 111]. La relevancia de FKBP51 en la señalización de los RE fue elucidada en los monos ardilla. Estos primates presentan una alta concentración de cortisol en plasma, sin embargo no desarrollan

signos de hipercortisolismo (conocido en humanos como Síndrome de Cushing). Esta sorprendente resistencia a glucocorticoides se relacionó con una sobreexpresión de FKBP51 en los tejidos blanco [112-114], la cual es capaz de disminuir la afinidad de GR por la hormona [111]. Como la expresión de FKBP51 se encuentra directamente regulada por GR, ello indica un mecanismo de regulación negativa en la respuesta a los glucocorticoides.

Anteriormente, se mencionó que algunas IMM interactúan con dineína a través de su dominio PPlasa. Este es el caso de FKBP52 [115], pero no el de FKBP51 [107] la que muestra una asociación muy débil y casi inexistente con la proteína motora. Existen numerosas evidencias que apoyan la idea que el transporte de GR al núcleo es mediado por dineína siendo el complejo Hsp90•FKBP52 la cadena de tracción que conecta al receptor con la maquinaria de transporte [47, 99]. En cuanto a la actividad transcripcional de GR, estudios realizados en *S. cerevisiae* (carente de ambas IMM y de GR) evidenciaron que FKBP52 favorece la transcripción dependiente de esteroide, mientras que la expresión de FKBP51 tiene efectos inhibitorios [116]. En suma, se sugiere un mecanismo de retroalimentación negativa que modula la respuesta celular a esteroides, donde FKBP51 revierte o previene las acciones de FKBP52.

Las proteínas TPR FKBP52 y FKBP51 también interactúan con AR en células de cáncer de próstata, sugiriendo ello que también podrían ejercer un rol en la transcripción génica y crecimiento celular mediado por AR. Ha sido reportado que FKBP51, pero no FKBP52, se encuentra en niveles significativamente elevados en tejidos de cáncer de próstata y en líneas celulares dependientes e independientes de andrógenos [117], y a diferencia de lo que ocurre con los otros miembros de la familia de RE, FKBP51 posee una función potenciadora de la actividad de AR en vez de ser inhibitoria [117]. La sobreexpresión de la IMM provoca un aumento en la actividad transcripcional de AR, mientras que su silenciamiento reduce la expresión de genes blanco y la proliferación celular en células de cáncer de próstata [117-119]. Estas observaciones cobran importancia porque FKBP51 está sobreexpresada en células tumorales y posee acciones antiapoptóticas [95, 120], mientras que AR es considerado tener acciones oncogénicas en células prostáticas.

A continuación, describiremos con un poco más de detalle a otras tres proteínas TPR, con las cuales hemos trabajado en esta tesis.

PP5 (Protein Phosphatase 5)

PP5 es una Serina/Treonina Fosfatasa [121-123], presenta tres dominios TPR y un dominio tipo PPlasa que une con baja afinidad la droga FK506 [105]. Posee una baja actividad basal de fosfatasa en comparación con otros miembros de la familia (PP1, PP2A y PP2B) la que se atribuye a la inhibición ejercida por el dominio TPR, ya que ésta aumenta cuando dicho dominio es removido o forma parte de una interacción [124]. Fisiológicamente, este efecto es ejercido por la asociación de Hsp90 con los dominios TPR de PP5, lo que estimula su actividad de fosfatasa. Curiosamente, el ácido araquidónico es un activador de PP5 [125, 126]. Se acepta que PP5, más que tener una actividad de fosfatasa esencial, actúa fundamentalmente regulando procesos de fosforilación de proteínas [127].

A través de la Hsp90 unido a su dominio TPR, PP5 interactúa con RE. El primer reporte se dio para GR [128]. Hoy se acepta que PP5 aumenta la afinidad de GR por el esteroide [129] y cambia su estado de fosforilación, lo que afecta la habilidad del receptor de interactuar con reguladores de la transcripción [130].

Se ha descrito que al utilizar una mutante de PP5 como dominante negativo disminuye la actividad transcripcional de GR [128], mientras que al utilizar un oligonucleótido antisentido para PP5 aumenta la actividad transcripcional inducida por glucocorticoides [131]. Estos efectos a simple vista contradictorios, ejemplifican cuán complejo es el papel de este factor en la regulación de la respuesta a esteroides.

Además PP5 está asociada a proteínas del poro nuclear (Nups), involucradas en el transporte a través del mismo [41]. Interactúa con dineína a través de su dominio tipo PPlasa [102], de lo que se infiere que podría tener un rol en la translocación del receptor al núcleo.

OTRAS PROTEÍNAS TPR

FAMILIA DE PROTEÍNAS 14-3-3

Las proteínas pertenecientes a la familia 14-3-3 recibieron este nombre tan particular en base al perfil de elución de una columna de DEAE-celulosa. Están presentes en todas las células eucariotas, incluyendo las del reino vegetal. Existen siete

isoformas altamente homólogas con un $PM \sim 30$ kDa, y son capaces de formar homo y heterodímeros que se encuentran en equilibrio dinámico con sus monómeros [132, 133]. Se las identifica con letras del alfabeto griego. Regulan una gran cantidad de procesos biológicos tales como apoptosis, transcripción, transporte, y están involucradas en la patogénesis de numerosas enfermedades. Interactúan directamente con otras proteínas que forman parte de cascadas de señales (quinasas, fosfatasas, factores de transcripción y receptores de transmembrana), alterando así su localización subcelular y/o estabilidad. Se han reportado más de 200 proteínas-cliente de proteínas 14-3-3 [134, 135]. Las diferentes isoformas se diferencian por su localización subcelular, el tipo de proteínas que unen, y la estructura que adoptan [136-138]. Reconocen residuos fosforilados de serina y treonina que se encuentran en una secuencia de aminoácidos específica (RSXpSXP) de la proteína-cliente [139]. Adoptan una estructura que contiene nueve α -hélices anti-paralelas [140] con reminiscencia al dominio TPR de PP5 [141] (Figura 11).

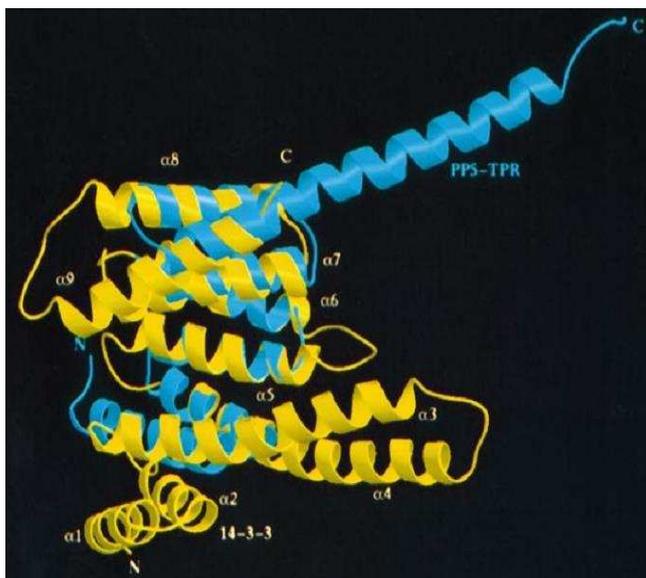


Figura 11: Comparación de la estructura del dominio TPR de PP5 (Celeste) con la estructura de 14-3-3 (Amarillo). Adaptado de Das et.al. 1998.

LA PROTEÍNA 14-3-3 σ

Esta isoforma usualmente genera homodímeros [142]. Se ha postulado que la sobreexpresión de 14-3-3 σ provocaría que GR sea más citoplasmático e inhibiría su actividad transcripcional [143]. También se ha reportado que 14-3-3 σ aumentaría la actividad transcripcional de AR, incluso en ausencia de hormona [144]. Sin embargo,

aún no se conocen las razones que expliquen dichas observaciones y por otra parte, también se ha demostrado que 14-3-3 σ es un blanco transcripcional de p53 [145] comportándose como regulador del tipo *check-point* del ciclo celular en G2-M [146]. Se ha encontrado que su gen está silenciado por hipermetilación en casos de cáncer gástrico y de mama, evitándose así sus acciones como supresor tumoral [147, 148]. Estudios muy recientes de proteómica en células de cáncer prostático andrógeno-dependientes e independientes demostraron la presencia de 14-3-3 σ asociadas a glicoproteínas tumorales en cánceres hormona-dependientes pero no en los independientes [149]. En otras palabras, tomados en su conjunto, los reportes en la literatura no brindan una respuesta clara al rol de 14-3-3 σ y en algunos casos, son hasta contradictorios.

LA PROTEÍNA SGT1 α

SGT1 α (*Small Glutamine-Rich Tetratricopeptide Repeat Containing Protein 1 α*) fue identificada como una subunidad del cinetocoro de los cromosomas. Presenta un alto grado de conservación a lo largo de la evolución en todas las células eucariotas. Se la relaciona con los procesos de división celular favoreciendo el proceso de ensamblado del cinetocoro, y se demostró que reprime a Skp1, un factor importante en la transición de dos pasos del ciclo celular, G1/S y G2/M [150]. SGT1 α participa en procesos de apoptosis, ubiquitinización de proteínas, activación de la vía del AMPc, la estabilización de Poloquinasas, etc. [150-154]. Tiene el potencial de afectar el movimiento, la localización y la respuesta funcional de una importante cantidad de moléculas de la célula o de origen viral. Posee tres dominios claramente definidos (Figura 12): el TPR, el SGS (*SGT1 specific domain*), y conectando a ambos el CS (*CHORD-containing protein of SGT1*). Hacia el extremo C-terminal, se encuentra la región rica en glutamina, la cual es capaz de interactuar con regiones hidrofóbicas, y hacia el extremo N-terminal se encuentra la porción responsable de la dimerización de la proteína [155, 156]. Como la secuencia MEEVD del extremo C-terminal de Hsp90 interacciona con dominios TPR se postuló que SGT1 α debería interactuar con esta chaperona, y ambas proteínas coimmunoprecipitaron. Sin embargo, la delección de la secuencia C-terminal de Hsp90 no abolió esta asociación, demostrando que la unión de la proteína

tenía lugar en otro sitio. Los estudios demostraron que el dominio interactuante con Hsp90 es el CS y no el TPR [157], y que SGT1 α interactúa con el dominio NTD de ambas isoformas de Hsp90 (α y β) [156, 158-160]. SGT1 α es ejemplo de una proteína TPR, cuyo dominio no necesariamente está asociado a Hsp90.

El dominio CS de SGT1 α posee alta homología con la co-chaperona p23, pero no compete con ella por Hsp90, demostrando que ambas proteínas, SGT1 α y p23, interactúan simultáneamente con la chaperona pero en dominios diferentes.

La fracción citoplasmática de SGT1 α se asocia a microtúbulos y microfilamentos [161], por lo que se ha propuesto que las proteínas con las que interactúa podrían quedar parcialmente retenidas en el citoplasma inhibiéndose entonces la actividad transcripcional al no poder concentrarse en el núcleo [162].



Figura 12: Dominios de interacción entre SGT1 y Hsp90.

TRANSLOCACIÓN NUCLEAR DE RECEPTORES ESTEROIDALES

Varios miembros de la familia de los receptores nucleares son en general mayoritariamente citoplasmáticos en ausencia de ligando (GR, MR, AR, VDR, AhR, etc.), mientras que otros son eminentemente nucleares (PR, ER, RAR, etc.). Si bien esta es la distribución subcelular más frecuentemente encontrada, el grado de partición núcleo-citoplasmático puede variar grandemente según el tipo celular y el momento del ciclo en el que se lo estudie. Es así que MR se muestra casi totalmente citoplasmático en células tubulares renales [163], más equitativamente distribuido entre citoplasma y núcleo en células COS-7 [40] o casi totalmente nuclear en cardiomiocitos [164], y PR es citoplasmático antes que nuclear en células tumorales endometriales [165].

Independientemente de su localización primaria, todos ellos se concentran en áreas nucleares determinadas cuando une al 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 celulares.

Como ya se explicó, en ausencia de hormona GR es citoplasmático, y en su presencia migra rápidamente al núcleo ($t_{1/2}$ = 5 min.). Si el estímulo es retirado (p.ej., se lavan las células y se reincuban sin esteroide), GR retorna al citoplasma lentamente ($t_{1/2}$ = 15 hs.) [115, 166, 167]. Para explicar este transporte existen dos modelos (Figura 13). El clásico presupone que una vez unida la hormona, el heterocomplejo de Hsp90 se disocia (el receptor se “*transforma*”), lo que permite que el receptor sea capaz de translocar al núcleo estocásticamente por difusión simple. Este modelo que dominó heurísticamente el mercado de ideas por décadas no cuenta con evidencia que lo sustente, y además no es compatible con la rápida translocación de GR en presencia de hormona. Si el movimiento fuera azaroso, el receptor debería moverse de manera no dirigida (lo que le quitaría eficiencia) y se diseminaría por todo el espacio citoplasmático antes de alcanzar el núcleo, siendo el pasaje a través del poro nuclear un proceso lento y por ende limitante que depende de factores citoplasmáticos, asociados al poro, nucleares, y gasto de energía.

Nuestro laboratorio planteó un modelo alternativo que le adjudica al complejo Hsp90•proteína-TPR una función esencial en el retrotransporte del receptor. Al inmunoprecipitar GR se recupera no sólo Hsp90 e IMM, sino que además co-inmunoprecipita dineína [115] (proteína motora responsable del movimiento retrógrado a través de microtúbulos). Cuando las células se tratan con el inhibidor de Hsp90 geldanamicina, dineína deja de coimmunoprecipitar con el receptor [40, 115], sugiriendo que Hsp90 debe estar involucrada y que la asociación no es directa vía GR.

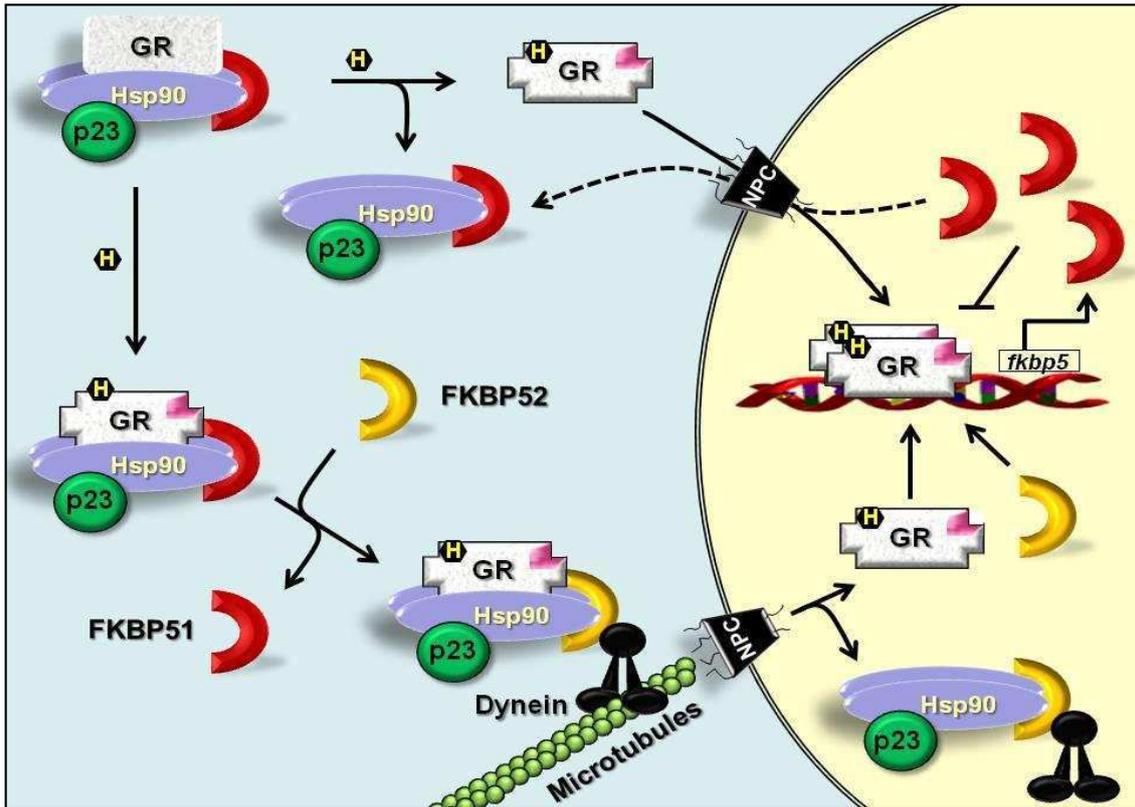


Figura 13: Esquema representativo de los modelos existentes sobre la translocación nuclear de GR. El esquema superior representa al modelo clásico de disociación de Hsp90 por hormona (H), y el inferior, el Hsp90•FKBP52•dineína-dependiente propuesto por nuestro laboratorio. El rectángulo rosado de GR representa su señal de localización nuclear.

El mismo efecto se observó en presencia de un exceso de péptido TPR, lo cual indica que dineína no se une directamente ni al receptor ni a Hsp90, sino a algún factor asociado a Hsp90 vía TPR. Al sobreexpresar el dominio PPlasa en el precipitado se recuperó el complejo GR•Hsp90•FKBP52, pero no dineína, señalando que la proteína motora está asociada entonces al dominio PPlasa de FKBP52. Con posterioridad, se demostró que esta propiedad es compartida por CyP-40 y PP5 [102]. Al complejo RE•Hsp90•IMM•Dineína se lo llamó transportosoma (Figura 14).

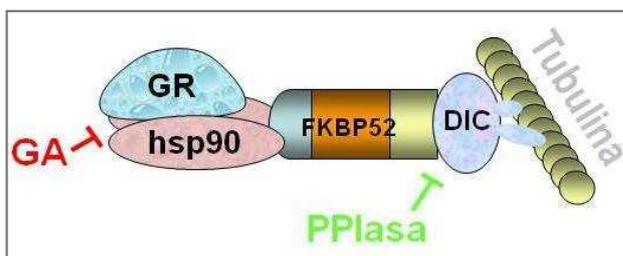


Figura 14: Modelo de ensamblado del transportosoma. GA= geldanamicina. DIC= cadena intermedia de dineína.

Debe enfatizarse que si bien GR alcanza el compartimento nuclear cuando el transportosoma es disfuncional, lo hace mucho más lentamente (el $t_{1/2}$ de translocación se retrasa un orden de magnitud, de 5 min a 45-50 min), lo que trae consecuencias funcionales en especial frente a situaciones de estrés, y que además GR es rápidamente degradado por el proteosoma [168]. Ello demuestra la importancia funcional de este sistema de transporte activo.

Cabe aclarar que la actividad motora del complejo motor de dineína requiere de su asociación con otro complejo multiproteico: el de dinactina. Es decir, se debería hablar del complejo dineína/dinactina como un todo [169, 170]. 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 [171]. Aun cuando dineína todavía conserva la capacidad de unirse a las vesículas del Golgi, no genera por sí misma la fuerza motriz necesaria para que éstas sean transportadas a lo largo del citoesqueleto. Es entonces razonable predecir que la sobreexpresión de p50/dinamitina inhibe la translocación de los RE, tal como lo hemos demostrado experimentalmente [40, 172].

Resultados similares a los arriba descritos originalmente para GR se reportaron luego para MR [40], el factor proapoptótico p53 [173], el complejo entre factor de transcripción RAC3 y el factor proapoptótico AIF [174], el AAV-2 (adeno-associated virus-2) [175], la proteína específica del cerebro PAHX-AP1 [176], el factor de arresto del ciclo celular p21 [177], proteínas poliglutaminadas que forman agregados en la enfermedad de Kennedy [178], el receptor de ecdisoma en insectos [179], la proteína moduladora del receptor de estrógenos inducible por radioterapia WisP39, etc. Tomados en su conjunto, estos hallazgos demuestran que el complejo Hsp90•IMM es un componente esencial de la maquinaria de transporte general de factores solubles y no sólo de los receptores de esteroides.

Por otra parte, FKBP51 es una IMM que se encuentra presente en los heterocomplejos de GR y MR, y es intercambiada por FKBP52 (o PP5 según el ligando) rápidamente en presencia de hormona (Figura 15) [108, 180]. Tanto ambas FKBP5 como PP5 forman parte de los complejos de MR en ausencia de ligando. Sin embargo, el tratamiento con aldosterona o el ligando sintético 11,19-oxidoprogesterona (11-OP,

compuesto que actúa como agonista para MR) provoca una disminución en las cantidades de FKBP51 presentes en el complejo. A su vez, la presencia de ambos ligandos provoca un aumento en los niveles de FKBP52 reclutado, siendo éste mucho más marcado en el caso de aldosterona. La diferencia se debe a que al utilizar 11-OP como ligando, PP5 es reclutado al complejo en mayor proporción. Estas observaciones se adjudican al hecho de que cada ligando provoca que el receptor adopte una conformación diferente [180]. Sin embargo, en presencia de ambos ligandos se recupera dineína en los complejos, pero esto no ocurre en ausencia de ligando. FKBP51 es incapaz de unir dineína [107] y su sobreexpresión promueve la exclusión de MR en el núcleo, de la misma manera que en el caso de sobreexpresión del péptido TPR, o en ausencia de FKBP52. Lo que lleva a postular que la distribución subcelular de MR depende del balance entre FKBP51 y FKBP52 [40].

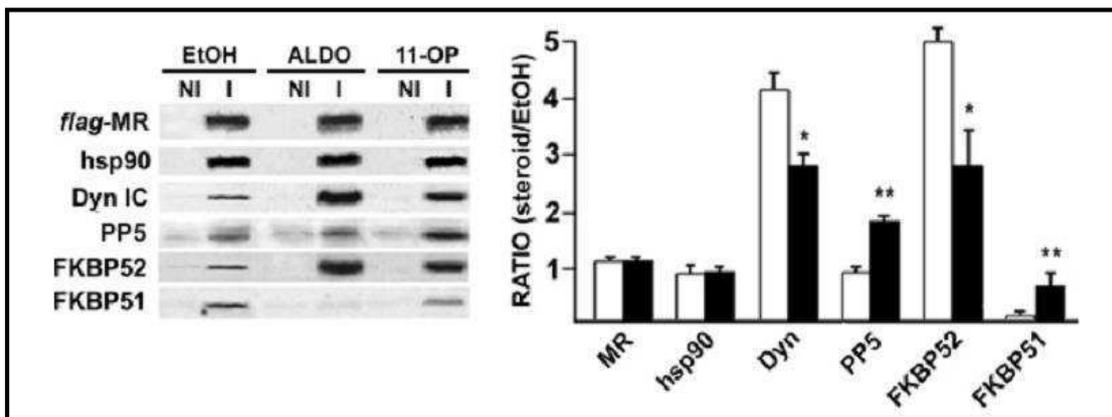


Figura 15: Intercambio de inmunofilinas en el heterocomplejo de MR. Células E82.A3 transfectadas con *flag-MR* se incubaron en frío con aldosterona (Aldo) o con 11,19-oxidoprogestero (11-OP) a fin de evitar la translocación al núcleo del receptor. MR fue inmunoprecipitado y las chaperonas asociadas se revelaron por Western blot. El gráfico de la derecha muestra la semicuantificación de las bandas (barras blancas: aldosterona; barras negras: 11-OP) correspondientes a tres experimentos ($media \pm SEM$, * $p \leq 0.001$, ** $p \leq 0.01$) versus complejos MR-Aldo. (Gallo et.al. 2007)

Podríamos resumir para un receptor de esteroides genérico, la siguiente secuencia de eventos: en ausencia de ligando FKBP51, forma parte del heterocomplejo que mantiene al receptor localizado en el citoplasma. La unión de la hormona provoca el intercambio entre FKBP51 y FKBP52, el cual pasa a ocupar el sitio aceptor de

dominios TPR de Hsp90. A través del dominio PPIasa, FKBP52 actúa de puente entre el heterocomplejo y dineína; y así el conjunto es transportado hacia el núcleo (Figura 13).

Hasta el momento, hemos aportado evidencia que apoya el absoluto requerimiento del heterocomplejo Hsp90•FKBP52 para que el RE viaje a través del citoplasma hacia el núcleo. Sin embargo queda aún por analizar si la disociación del mismo se requiere para el ingreso. El complejo del poro nuclear (NPC, por su sigla en inglés *Nuclear Pore Complex*) es una estructura macromolecular embebida en la membrana nuclear. A través de ella difunden moléculas pequeñas; cuando el peso molecular sobrepasa los 40/50-kDa se requiere de un transporte activo [181, 182] mediado por importina α (Imp α). Ésta reconoce señales de localización nuclear (NLS por su sigla en inglés *Nuclear Localization Signal*) en las proteínas que son su sustrato. Imp α forma complejos con importina β (Imp β), la cual favorece el transporte a través del poro. Si bien GR es capaz de interactuar con Imp α a través de su NLS, el hecho que Hsp90 haya sido recuperado unido al receptor inmediatamente después de su ingreso al núcleo, sugiere que el complejo podría pasar intacto a través del poro [183]. Estudios recientes de nuestro laboratorio demostraron que ése es el caso tanto para GR [41] como para MR [40]. GR interactúa con Imp β y con proteínas estructurales del poro (nucleoporinas) tales como Nup62 [41], las que a su vez se asocian en un complejo en el cual Hsp90 se encuentra presente. FKBP52 y PP5 también se asocian con Nup62 en un complejo que también integran Hsp70 y p23 [41]. Cuando a estos receptores se les realizó un cross-linking con las chaperonas del complejo, todas ellas (receptor y chaperonas) translocaron juntas al núcleo como un único complejo y de manera esteroide-dependiente, indicando que el proceso de transformación del RE debe ser nuclear. Ello fue confirmado por co-inmunoprecipitación de Hsp90 con el RE nuclear tan pronto como este ingresó a la organela, a tiempos en los que aún se halla en la fracción nucleoplásmica sin haberse unido a la cromatina (Figura 16).

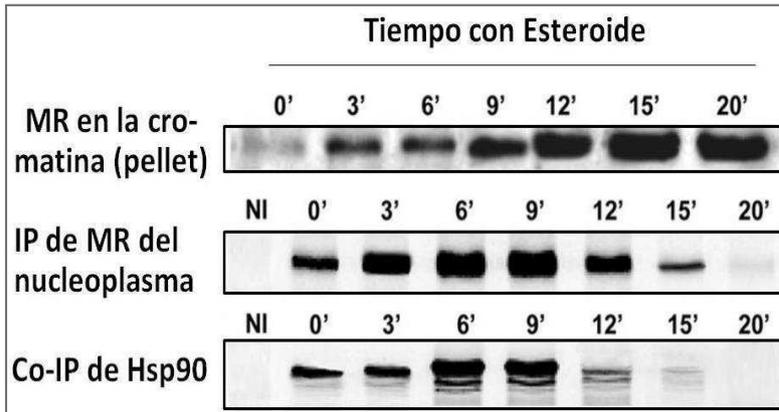


Figura 16: MR fue inmunoprecipitado (IP) de la fracción nucleoplásmica (soluble) de las células a los tiempos indicados en presencia de hormona. Se muestra la IP de MR, la co-IP de Hsp90, y el MR asociado a la fracción insoluble cromatina). NI: IgG no-inmune.

Tomando en su conjunto todas las evidencias experimentales descritas hasta aquí, podemos afirmar que el retrotransporte de los receptores de esteroides ocurre de manera activa gracias al complejo Hsp90•IMM. Este complejo actúa como puente entre la carga y la proteína motora. Hsp90 no debe disociarse inmediatamente después que la hormona se ha unido al receptor, puesto que el heterocomplejo es aún necesario para el transporte citoplasmático y para atravesar el poro nuclear. Esto refuerza la idea que el heterocomplejo atraviesa intacto el poro. Luego, el proceso de transformación de los receptores de esteroides debe ocurrir en un paso subsiguiente al retrotransporte, aunque previo a la unión del receptor a sus secuencias específicas en el ADN ya que la presencia de Hsp90 bloquea al DBD del RE. En un estudio reciente del grupo de la Dra. Claudia Grossmann de Alemania en donde se repitieron estos ensayos con idénticos resultados, se demostró experimentalmente la hipótesis que el modelo extrapola: los RE se transforman y dimerizan en el núcleo y no en el citoplasma [184].

Dado el modelo según el cual las IMM formen parte de la maquinaria molecular responsable del movimiento de variados factores, se abre la posibilidad de desarrollar agentes que inhiban la función de las IMM en el transporte. Resulta interesante remarcar que una alta relación FKBP51/FKBP52 desfavorece el tránsito de los receptores de esteroides así como el de NF- κ B, un factor transcripcional que no se asocia a Hsp90 [185]. Nuestro laboratorio también ha demostrado que FKBP52 favorece el proceso de regeneración nerviosa inducido por glucocorticoides y FK506, mientras que FKBP51 lo inhibe [186, 187]. En tal sentido, drogas específicas para las IMM serían deseables, pero no existen al presente. Alternativamente, como las IMM

forman complejos con Hsp90, esta chaperona podría ser un blanco alternativo del complejo. En esta tesis se han ensayado varios derivados sintéticos con tal fin. También planteamos que otras proteínas TPR también podrían regular la localización subcelular y actividad de factores nucleares, y fue por ello que en esta tesis se estudiaron las proteínas seleccionadas. Si pudiésemos regular estos procesos se abriría la posibilidad de estudiar las variadas patologías relacionadas con desequilibrios hormono-dependientes, infecciones virales, cáncer o regeneración nerviosa; aliviar o prevenir algunas de las más de 300 patologías descritas hasta hoy que ocurren por fallas en los mecanismos de transporte.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS:

En función de los antecedentes presentados, la hipótesis general de este trabajo es que distintas proteínas TPR podrían afectar de manera diferencial el transporte de los receptores de esteroides y su actividad transcripcional.

Con el fin de poner a prueba dicha hipótesis hemos planteado los siguientes objetivos.

OBJETIVO GENERAL:

El objetivo general de este trabajo es ampliar el conocimiento existente sobre el rol de las proteínas con dominio TPR en la regulación y el transporte de factores nucleares.

OBJETIVOS PARTICULARES:

- Evaluar el efecto de las proteínas TPR sobre el transporte de receptores nucleares
- Evaluar el efecto de las proteínas TPR sobre la actividad transcripcional de esos receptores nucleares.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES

A lo largo de esta tesis se utilizaron los siguientes materiales

1. LINEAS CELULARES

- a) HEK 293T: células embrionarias de riñón humanos que contienen el antígeno T del SV40.
- b) COS – 7: células de riñón de mono verde africano que contienen el antígeno T del SV40.
- c) C4-2: línea celular de adenocarcinoma pancreático humano, derivada de tumores generados por inyección de LNCaP en ratones inmunodeficientes castrados. Gentilmente cedida por la Dra. Elba Vázquez, IQIBICEN-CONICET,.
- d) C4-2B: línea celular derivada de tumores óseos generados por inyección de C4-2 en ratones inmunodeficientes castrados. Gentilmente cedida por la Dra. Adriana De Siervi, IByME-CONICET.
- e) PC3: línea celular derivada de metástasis óseas de adenocarcinoma pancreático. Gentilmente cedida por la Dra. Adriana De Siervi, IByME-CONICET.

2. PLÁSMIDOS

- a) **GR** → pSV2Wrec-GR: plásmido de expresión para el GR de ratón.
- b) **MMTV-Luc** → pMMTV-Luciferasa: plásmido reportero que posee al ORF de la enzima luciferasa río abajo del promotor del virus de tumor de mama murino MMTV.
- c) **β -Gal** → pRSV-LacZ: plásmido reportero conteniendo el gen de la β -galactosidasa bajo el promotor del citomegalovirus. Este plásmido fue utilizado para normalizar los datos de unidades arbitrarias obtenidas en la medición de la actividad luciferasa.
- d) **GFP-GR** → pEGFPGR: plásmido de expresión construido a partir del plásmido pEGFP C3 (Clontech), donde el GR de ratón se fusionó hacia el C-terminal de la EGFP.

- e) **AR** → pCVM5-hAR: plásmido de expresión para el AR humano.
- f) **PSA-Luc** → pPSA-Luciferasa: plásmido reportero que posee al ORF de la enzima luciferasa río abajo del promotor del antígeno prostático específico.
- g) **TPR** → pCMV6-flag-TPR: expresa el dominio TPR de la proteína PP5, fusionado al péptido-señal flag (DYKDDDDK), brindado por Dr. Michel Chinkers, Universidad de South Alabama, EEUU.
- h) **PP5** → pCMV6-flag-PP5p: plásmido de expresión para la proteína PP5 fusionada al péptido-señal flag.
- i) **14-3-3** → pCMV2-flag-14-3-3 σ : plásmido de expresión para la proteína 14-3-3 σ fusionada al péptido-señal flag, brindado por el Dr. Martín Monte, IQUIBICEN-CONICET.
- j) **SGT** → pCIneo-hSGT α : plásmido de expresión para la proteína SGT 1 α humana, brindado por el Dr. Marc Cox de la Universidad de Texas, EEUU.
- k) **Vector** → pCDNA3: plásmido vacío. Este plásmido se utilizó para equiparar la masa de ADN transfectada.
- l) **His-Hsp90** → pRSETA-hHSP90 β : plásmido de expresión procariota para la proteína Hsp90 β humana fusionada a un péptido señal polihistidina (His), brindado por el Dr. Prodromou, Universidad de Sussex, UK.
- m) **PPIasa** → pSG5PL-dominio PPIasa: plásmido de expresión para el dominio PPIasa de FKBP52, brindado por el Dr. Renoir, Faculté de Pharmacie, Châtenay-Malabry Cedex, Francia.

3. ANTICUERPOS

Anticuerpos primarios

- a) FKBP52, UP30, conejo policlonal, provisto por Dr. K. Leach (Pharmacia and Upjohn Inc., Kalamazoo, MI)
- b) PP5, policlonal de conejo, provisto por Dr. M. Chinkers (University of South Alabama, Mobile, AL)
- c) FiGR, monoclonal provisto por Dr. Jack Bodwell (Dartmouth Medical School)
- d) Flag, SIGMA, M2 F1804, ratón.

- e) GFP, suero de conejo provisto por el Dr. M. Monte (IQUIBICEN-CONICET)
- f) Hsp90, STRESSGEN, ratón.
- g) SGT1 α , PROTEINTECH, conejo.
- h) AR, SANTA CRUZ, sc-816, conejo.
- i) AR, SANTA CRUZ, sc-7305, ratón.
- j) Dineína, CHEMICON INTERNATIONAL, MAB1618, ratón.

Anticuerpos secundarios:

- a) Acoplados con fluoróforos:
 - a. anti-IgG de conejo-fluoróforo excitable a 488 nm (MOLECULAR PORBES)
 - b. anti-IgG de conejo-fluoróforo excitable a 568 nm (MOLECULAR PORBES)
 - c. anti-IgG de ratón-fluoróforo excitable a 488 nm (MOLECULAR PORBES)
 - d. anti-IgG de ratón-fluoróforo excitable a 568 nm (MOLECULAR PORBES)

- b) Acoplados con peroxidasa (HRP):
 - a. anti-IgG de conejo-HRP, PIERCE.
 - b. anti-IgG de ratón-HRP, SIGMA.
 - c. proteína A, CALBIOCHEM.

MÉTODOS

1. PREPARACIÓN DE PLÁSMIDOS

1.1. PREPARACIÓN DE BACTERIAS COMPETENTES

A partir de un glicerol stock de bacterias *Escherichia coli* DH5 α o *Escherichia coli* BL21 se inocularon 2 ml de medio de cultivo SOB (triptona bacteriológica 2% p/v – extracto de levadura 0,5% p/v – NaCl 0,01 M – KCl 2,5 mM) y se incubaron a 37°C durante toda la noche, con agitación constante. Se realizó una dilución 1/100 de este precultivo (volumen final 100 ml de medio SOB) y se incubó a 37°C en agitación constante hasta alcanzar una densidad óptica (DO) de 0,5 (cultivo en fase exponencial). Luego de alcanzar esa DO se centrifugó el cultivo a 3.000 x *g*, por 10 min a 4°C, se

resuspendió el precipitado resultante en 40 ml de solución CCMB 80 (CaCl₂ 80 mM – MnCl₂ 20 mM) y se incubó por 20 min a 4° C. A continuación se cosecharon las bacterias por centrifugación, en mismas condiciones que el paso anterior y se resuspendió el precipitado en 8 ml de CCMB 80 frío. Luego de una incubación de 10 min a 4° C, la suspensión bacteriana se fraccionó en alícuotas, las que se sumergieron inmediatamente en nitrógeno líquido, y luego se las almacenó a -80°C.

1.2. TRANSFORMACIÓN DE BACTERIAS COMPETENTES

La transformación se realizó incubando una alícuota de 100 µl de bacterias competentes (*Escherichia coli* DH5α o BL21) con 1 µg del plásmido de interés durante 20 min a 4° C. A continuación, se incubó por 90 segundos a 42°C (*shock* térmico), y luego a 4°C durante 5 min. La recuperación de las bacterias competentes se llevó a cabo adicionando 100 µl de medio de cultivo SOC (triptona 2% p/v -extracto de levadura 0,5% p/v – NaCl 0,05% p/v –KCl 2,5 mM) e incubando durante una hora a 37°C. La selección de las bacterias transformadas se realizó en un cultivo de medio sólido de LB Agar (agar 1,2 p/v –triptona 1% p/v –extracto de levadura 0,5% p/v –NaCl 0,5% p/v) suplementado con el antibiótico para el cual el plásmido confiere resistencia. Las placas se incubaron a 37°C durante 16 hs. En paralelo, se sembró una alícuota de bacterias en placas sin antibiótico como control de viabilidad, y otra alícuota en LB Agar suplementado con antibiótico como control de contaminación.

Las colonias obtenidas se repicaron en 3 ml de medio LB (triptona 1% p/v – extracto de levadura 0,5% p/v –NaCl 0,5% p/v) con antibiótico, se incubaron a 37°C durante 16 hs., con agitación constante. A partir de estos cultivos, se purificó el ADN plasmídico en pequeña escala para identificar las colonias transformadas positivamente.

1.3. PREPARACIÓN DE ADN PLASMIDICO A PEQUEÑA ESCALA

El cultivo proveniente de cada colonia se centrifugó a 6.000 x g por 5 min, y se resuspendió el precipitado resultante en 200 µl de solución de resuspensión (Tris-HCl 50 mM –ácido etilendiaminotetra-acético (EDTA) 10 mM, pH 7.5), luego se adicionaron 200 µl de solución de lisis (NaOH 200 mM –SDS 1 % p/v) mezclando por inversión, y se

incubaron por 5 min a 4°C. A continuación se agregaron 200 µl de solución de neutralización (acetato de potasio 2,55 M pH 4.8) mezclando por inversión se incubó otros 10 minutos a 4°C. Luego de una centrifugación a 20000 x g durante 8 min, se agregaron al sobrenadante 800 µl de resina (tierra de diatomeas 1,2 % p/v en cloruro de guanidinio 7M). Se utilizó un vortex para homogeneizar la solución y luego se filtró aplicando vacío. Luego de dos lavados con solución de lavado (NaCl 200 mM – Tris-HCl 20 mM pH 7.5 – EDTA 5 mM – Etanol 50 % v/v), se eluyó el ADN de la resina con 50 µl de agua estéril calidad miliQ a 37°C.

El análisis del ADN plasmídico obtenido se realizó por electroforesis en gel de agarosa, preparado en solución TAE (Tris base 0,8 mM –acético glacial 0,114 % p/v – EDTA 2 µM, pH 8) al 1 % p/v con 0,5 µg/ml de bromuro de etidio. Cada muestra se preparó por adición de solución de siembra para DNA (30% v/v glicerol - azul de bromofenol). Las condiciones de la corrida electroforética fueron: voltaje constante (60 V) por 30 min. Revelamos la presencia de DNA plasmídico por exposición a luz UV en un transiluminador (GBOX Syngene), determinando así los clones positivos.

1.4. PREPARACIÓN DE ADN PLASMÍDICO EN MAYOR ESCALA

Se inocularon 50 ml de medio LB con bacterias *Escherichia coli* DH5α, previamente transformadas con el plásmido de interés, y se cultivaron durante 16 hs a 37°C. A partir del mismo se purificó el ADN plasmídico utilizando el kit comercial *Wizard® Plus Midipreps DNA Purification System* (Promega, catálogo A7640) siguiendo el protocolo de adjunto al mismo. Cuantificamos el ADN plasmídico por espectrofotometría (absorbancia medida a 260 nm). La concentración de ADN obtenida se calculó como:

$$\mu\text{g de ADN}/\mu\text{l} = (\text{Absorbancia}_{260\text{ nm}} \times 50 \times \text{Factor de dilución})/1000$$

2. PREPARACIÓN DE SUERO ADULTO BOVINO (SBA) DELIPIDADO

Se Incubó el precipitado resultante de la centrifugación (8.000 x g, 4 °C durante 15 minutos) de 40 ml de una solución 10X de carbón dextrano activado (carbón activado 2,5 %p/v – dextrano 0,25 %p/v – Tris 0,01 M, pH 7.4), con 200 ml de SBA a 56°C, durante 30 min en agitación constante. A continuación se centrifugó la solución a 15.000 x g, a 4°C durante 10 min, y se repitió el proceso con sobrenadante. Se

esterilizó el suero resultante (libre de lípidos) mediante el uso de filtros estériles con poros de 0,22 μm .

3. CULTIVO CELULAR

Para el cultivo de células HEK 293T o COS-7 se utilizó medio DMEM (*Dulbeccos's Modified Eagles's Medium*) suplementado con suero fetal bovino 10 % v/v, penicilina 0,1 U/ml y estreptomicina 10 $\mu\text{g/ml}$ a 37°C y 5% CO₂. Se realizaron los repiques cuando los cultivos alcanzaron el 70 % de confluencia.

Para el cultivo de las líneas celulares de cáncer de próstata (C4-2, C4-2B y PC3) se utilizó medio RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*) suplementado con suero fetal bovino 10 % v/v, penicilina 0,1 U/ml y estreptomicina 10 $\mu\text{g/ml}$ a 37°C y 5% CO₂. Se realizaron los repiques cuando los cultivos alcanzaron el 70 % de confluencia.

Los medios de cultivo DMEM, RPMI 1640 y la tripsina se adquirieron a través de la empresa Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). El suero fetal bovino (SFB) y suero bovino adulto (SBA) se adquirieron a través de la empresa Internegocios S.A. (Mercedes, Argentina).

4. TRANSFECCIÓN

La transfección de las líneas celulares HEK 293T y COS-7 se realizó según el método de precipitación con fosfato de calcio. Una solución de CaCl₂ (0,25 M) conteniendo el ADN se adicionó con igual volumen de solución HBS 2X (Hepes 50 mM - Na₂HPO₄ 1,5 mM - NaCl 280 mM), se homogenizó por vortex y se incubó en hielo por 20 min. Luego la mezcla se adicionó al medio de cultivo celular.

5. EVALUACIÓN DEL TRÁNSITO DE LOS RE.

Se sembraron células HEK 293T sobre cubreobjetos previamente tratados durante 40 min con una solución de polilisina 1 % p/v. La transfección se realizó cuando las células se encontraban en un 30% de confluencia.

En todos los estudios de translocación de los receptores las células crecidas sobre cada vidrio se transfectaron con 1 μg del plásmido GFP-GR o AR, según el receptor evaluado. En el estudio del efecto de las proteínas TPR se co-transfectaron

con 1 µg del plásmido de expresión para la proteína TPR en cuestión o vector vacío. Luego de 4 horas se reemplazó el medio de cultivo por DMEM suplementado con SBA delipidado 10 % v/v, penicilina 0,1 U/ml y estreptomycinina 10 µg/ml (MSD) y se incubó en estufa durante 16-20 hs.

5.1. ANÁLISIS DEL EFECTO DE PROTEÍNAS TPR SOBRE LA IMPORTACIÓN DE LOS RE.

Se incubaron las células con dexametasona (Dexa) o con 5α-dihidrotestosterona (DHT), según se evaluara a GR o AR respectivamente. La concentración final que se utilizó fue de 10 nM y se realizó la incubación durante distintos tiempos (0, 5, 10, 15, 30, 45 ó 60 min.).

5.2. ANÁLISIS DEL EFECTO DE PROTEÍNAS TPR SOBRE LA EXPORTACIÓN DE LOS GR.

Se incubaron de las células con Dexa (concentración final 10 nM) durante 60 min. A continuación se retiró el estímulo (mediante tres lavados con PBS y un lavado de 10 min con MSD) y se incubó con MSD durante distintos tiempos: 0, 2, 4, 6, 8, 16 y 20 horas.

6. ANÁLISIS DEL EFECTO DE COMPUESTOS DE SÍNTESIS SOBRE LA IMPORTACIÓN DE GR Y AR.

Las células se preincubaron con el compuesto a estudiar (1 µM) o el volumen equivalente de DMSO (dimetilsulfóxido) en el caso control durante 30 minutos a 37 °C. A continuación se incubó con 10 nM de la hormona durante 0 ó 30 minutos a 37°C.

7. INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA (IFI)

Luego del tratamiento correspondiente se realizaron tres lavados con PBS (NaCl 137 mM - KCl 2,7 mM - Na₂HPO₄ 4,2 mM - KH₂PO₄ 1,4 mM, pH 7,4) y se fijó con metanol, durante 16 hs. a -20°C. A continuación se realizaron tres lavados con PBS, seguido de un bloqueo de 40 min con una solución BSA 1 % p/v en PBS. Posteriormente se incubó con la solución de anticuerpo primario durante 16 hs. a 4°C. Luego de tres lavados con PBS se realizó un nuevo bloqueo de 20 min y se incubó con

la solución del anticuerpo anti-especie conjugado con un fluoróforo durante 60 min a 37°C. La dilución de los anticuerpos se llevó a cabo en una solución de BSA 1 % p/v en PBS. Por último se realizó una tinción nuclear incubando los cubreobjetos durante 10 min con una solución 1 mg/ml de DAPI (4',6-diamidino-2-phenilindol) en PBS. Luego de tres lavados con PBS los cubreobjetos fueron montados sobre portaobjetos.

Tabla 1: Anticuerpos utilizados en la IFI de GR y proteínas TPR

IMPORTACIÓN/EXPORTACIÓN de GFP-GR		
	Anticuerpo Primario	Anticuerpo Secundario
CONTROL	--	--
PP5/14-3-3/TPR	anti-Flag (ratón) - 1/100	anti ratón – Alexa 568 nm - 1/200
SGT	anti-SGT1 α (conejo) - 1/200	anti conejo – Alexa 568 nm - 1/200

Tabla 2: Anticuerpos utilizados en la IFI de AR y proteínas TPR

IMPORTACIÓN de AR		
	Anticuerpo Primario	Anticuerpo Secundario
CONTROL	anti-AR (conejo) - 1/200	anti conejo – Alexa 488 nm - 1/200
PP5/14-3-3/TPR	Anti-AR (conejo) - 1/200 anti-Flag (ratón) - 1/100	anti conejo – Alexa 488 nm - 1/200 anti ratón – Alexa 568 nm - 1/200
SGT	Anti-AR (ratón) - 1/200 anti-SGT1 α (conejo) - 1/200	anti ratón – Alexa 488 nm - 1/200 anti conejo – Alexa 568 nm - 1/200

Las IFIs se realizaron con un microscopio confocal Olympus Fluoview 1100, un microscopio confocal Zeiss LSM Pascal 5 (LSCM) o microscopio de epifluorescencia Olympus IX71. Para el tratamiento de las imágenes utilizamos el programa informático *Image J* (v.1.45) del NIH. La cuantificación se realizó contando las células y clasificándolas según la localización del receptor en 5 categorías: 1 – Completamente citoplasmático, 2 – Mayoritariamente citoplasmático, 3 – distribución homogénea, 4 – Mayoritariamente nuclear, 5 – Completamente nuclear. Los resultados expresan el porcentaje de células con respecto al total de las categorías 4 y 5. En cada experimento se contaron, al menos, entre 70 y 100 células.

8. TINCIÓN DE FILAMENTOS DE ACTIVA

Las células se preincubaron con el compuesto a estudiar (5 μ M) o el volumen equivalente de DMSO en el caso control durante 48 hs. Luego del tratamiento, las células fueron lavadas con PBS y fijadas con una solución de 3% p/v de PFA (paraformaldehído) en PBS durante 20 min. Luego se realizó una incubación con 1 % p/v Glicina en PBS, durante 5 min y seguida de tres lavados con PBS. Las células se permeabilizaron 0,1 % v/v Tritón X-100 en PBS durante 5 min, y se bloqueó durante 40 min. con una solución BSA 1 % p/v en PBS. La tinción de los filamentos de actina se llevó a cabo por incubación con una solución 1/20 de faloidina acoplada al fluoróforo excitable a 633 nm (INVITROGEN, A22284), durante 20 min a 37°C. Luego se procedió como se describe en la sección 7 de Métodos.

9. COINMUNOPRECIPITACIÓN

Las células fueron sembradas en placas de cultivo de 150 mm, y se transfectaron cuando alcanzaron ~40 % de confluencia 10 μ g totales de ADN. Luego de 24 horas se removió el medio de cultivo y se realizaron 2 lavados con PBS. Las células procedentes de dos placas se cosecharon utilizando una escobilla plástica (*scraper*), se centrifugaron a 6.000 x g por 10 min a 4°C, y se resuspendieron en 600 μ l de solución lisis para inmunoprecipitaciones (molibdato de sodio 20 mM – EDTA 1 mM – Hepes 10 mM pH 7.4). A continuación se homogeneizaron con un *potter* del tipo Douncer. Durante todo el proceso, las células se mantuvieron en hielo. Se centrifugó el homogenato (extracto total) a 12.000 x g, 10 min a 4°C y se fraccionó el sobrenadante obtenido en dos alícuotas: fracción inmune (I) y fracción no inmune (NI). A la inmunoprecipitación específica (I) se la suplementó con 2 μ g el anticuerpo; mientras que al control no específico (NI) se lo suplementó con 2 μ g de IgG de la misma especie que el anticuerpo utilizado en I. Se adicionaron ambas fracciones con 50 μ l de una solución 50% p/v de proteína-A Sefarosa (SIGMA, P3391) y se incubaron durante 3 horas a 4°C con rotación constante. Posteriormente se centrifugaron las fracciones a 10.000 x g por 5 min. Luego se lavó el precipitado tres veces con solución lisis para inmunoprecipitación, se resuspendió en 40 μ l de solución de siembra para proteínas (Tris-HCl 100 mM pH 6.8 – 2-mercaptoetanol 2% – lauril sulfato de sodio (SDS) 4% –

glicerol 20% – azul de bromofenol 0,2%) y se incubó a 95°C por 5 min. Se tomaron alícuotas del extracto total y de los sobrenadantes a las cuales se les agregó el mismo volumen de solución de siembra para proteínas, y se las incubó a 95°C por 5 min.

10.SEPARACIÓN DE PROTEÍNAS POR ELECTROFORESIS EN CONDICIONES DESNATURALIZANTES (SDS PAGE) Y POSTERIOR DETECCIÓN POR WESTERN BLOT (WB)

Para resolver las muestras obtenidas por inmunoprecipitación se realizó una corrida electroforética en gel de poliacrilamida desnaturalizante (acrilamida/bis-acrilamida 10 % p/v - Tris-HCl 375 mM pH 8.7 - SDS 0,1% p/v), de 0,75 mm de espesor. Las condiciones de la corrida que utilizadas fueron: voltaje constante (80 V) hasta que las muestras atravesaron el gel concentrador (acrilamida/bis-acrilamida 4% p/v - Tris-HCl 125 mM pH 6.8 - SDS 0,1% p/v), y luego se aumentó el voltaje a 130 V hasta alcanzar la resolución necesaria. La corrida se llevó a cabo en solución de corrida (glicina 1,92 M – SDS 1 % p/v - Tris base 250 mM).

Las proteínas resueltas se transfirieron desde el gel a una membrana PVDF (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), previamente humectada en metanol por 30 seg. e hidratada en solución de transferencia semiseca (glicina 39 mM– SDS 0,04 % p/v - Tris base 48 mM– metanol 20 % v/v) durante 20 min. Para ello se utilizó un equipo de transferencia semiseca (Bio Rad, Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell). Las condiciones de transferencia utilizadas fueron voltaje constante (15 V) durante 50 min.

Se incubaron las membranas en Solución de Bloqueo (albúmina sérica bovina 0,1% p/v – Tween 20 0,4% v/v – EDTA 1 mM - Azida sódica 2% p/v – Tris-HCl 10 mM pH 7.5 – NaCl 100 mM) durante 60 min a temperatura ambiente (T.A) en agitación constante, y luego con el correspondiente anticuerpo primario a 4°C, durante 16 hs. Se realizaron 3 lavados de 10 min con solución de bloqueo (5 ml). A continuación se incubó con el correspondiente anticuerpo secundario durante 60 min a temperatura ambiente y con agitación constante. Se realizaron dos lavados de 10 min con TBS-Tween y un lavado con PBS. Ver Tabla 3.

Para el revelado de la membrana se incubó durante 1 min. con solución de revelado (Tris HCl 40 mM pH 8.6 – luminol 2,5 mM – ácido p-cumárico 0,4 mM– H₂O₂

0,02% v/v). La imagen se obtuvo utilizando el equipo de fluorescencia y quimioluminiscencia (FUJIFILM intelligent dark box 2).

Tabla 3: Anticuerpos utilizados en los WB

<i>Blanco</i>	<i>Anticuerpo 1°</i>	<i>Anticuerpo 2° conjugado a peroxidasa (HRP)</i>
14-3-3 /PP5	anti-Flag (ratón) - 1/1000	IgG ratón - 1/1000
GR	Anti-GFP (conejo) - 1/2000	anti IgG conejo - 1/1000
Hsp90	Anti-hsp 90 (ratón) - 1/1000	anti IgG ratón - 1/1000
FKBP52	Anti-FKBP52 (conejo) - 1/10000	proteína A - 1/1000
PP5	Anti-PP5 (conejo) -1/1000	anti IgG conejo - 1/1000
SGT1 α	Anti-SGT1 α (conejo) - 1/1000	anti IgG conejo - 1/1000
Dineína	Anti-dineína (ratón) – 1/1000	anti IgG ratón - 1/1000

11. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD TRANSCRIPCIONAL DE LOS RE

Células HEK 293T fueron transfectadas con GR o AR, MMTV-Luc o PSA-Luc, β -Gal y la proteína TPR si correspondiese. En cada pocillo de una placa de 12 pocillos, se transfectaron 0,5 μ g de GR, 0,5 μ g de β -gal, 1 μ g de MMTV-Luc o 0,5 μ g de AR, 1 μ g de PSA-Luc (reportero), 0,5 μ g de β -Gal, según correspondiera. Luego de 4 hs se cambió el medio de cultivo por MSD y se incubó a 37°C, 5% CO₂, durante 16 hs.

En el estudio de proteínas TPR las células se co-transfectaron con distintas cantidades al plásmido que las codifica. En cambio en el estudio de los compuestos se preincubó durante 30 min con una concentración final de 1 μ M de cada compuesto, o el volumen equivalente de DMSO en el caso de los controles.

La inducción se realizó por incubación con Dexa o DHT, en una concentración final de 10 nM, durante 20 horas. Luego del lavado con PBS, se trataron las células con 100 μ l de solución lisis para luciferasa (K₂HPO₄ 100 mM pH 7.8 – Tritón X100 0,2% v/v - DTT 1mM) por pocillo, y las placas se dejaron a -20°C durante 16 hs. Se colectaron las muestras y se centrifugaron a 3.000 xg durante 10 min. En el sobrenadante se midió la actividad de las enzimas luciferasa y β -galactosidasa como se describe abajo.

11.1. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LUCIFERASA y β -GALACTOSIDASA

En una placa blanca de 96 pocillos, fueron sembrados 25 μ l de cada una de las muestras, 36 μ l de solución 1 (glicinglicina 25 mM – MgSO₄ 15 mM – EGTA 4 mM– Tritón x-100 0,27% v/v – K₂HPO₄ 15 mM – ATP 0,2 mM – DTT 1 mM) y 9 μ l de solución 2 (glicilglicina 25 mM – MgSO₄ 15 mM– EGTA 4 mM – DTT 2 mM– luciferina 0,1 mM). Se midió la actividad de la enzima luciferasa utilizando un luminómetro (Glomax Multi Detetion System).

En una placa transparente, se incubaron 25 μ l de cada muestra junto a 100 μ l de una solución de *orto*-nitrofenilgalactopiranosido (ONPG) 1mg/ml en solución PM2 (Na₂HPO₄ 60 mM - NaH₂PO₄ 40 mM – KCl 10 mM – MgSO₄ 1 mM – β -mercaptoetanol 1 μ l/ml) a temperatura ambiente hasta el desarrollo de color. Se midió absorbancia a 415 nm (lector de microplaca RAYTO RT-6000). La actividad transcripcional del receptor en cada muestra se expresó como el cociente entre la actividad de luciferasa y la actividad de β -galactosidasa de la misma en unidades arbitrarias.

12. PURIFICACIÓN DE His-HSP90 β

El protocolo utilizado se adaptó a partir de lo descrito por Vaughan *et. al.*, 2009 [188]. A partir de 800 ml de cultivo de bacterias *E. Coli* BL21, transformadas con His-Hsp90, cuya DO a 600 nm se encontraba entre 0,8 y 0,9 se realizó la inducción por incubación con isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) en una concentración final de 1 mM a 20° C, durante 16 hs. Las bacterias se cosecharon por centrifugación a 8.000 x g a 4 °C, durante 10 min. El pellet se resuspendió en 5 ml de solución de lisis (Tris HCl 20 mM pH 8 – NaCl 500 mM – tergitol-type NP-40 (NP40) 0,2% - β -mercaptoetanol 0,1% - Imidazol 5 mM). El proceso de lisis se llevó a cabo por sonicación, realizando 10 ciclos de 30 seg. de sonicado seguido por 1 min. de reposo. Todo el proceso fue realizado en hielo. El sobrenadante obtenido por centrifugación a 12.000 xg a 4 °C, fue incubado con 800 μ l de Ni-NTA Agarosa (QUIAGEN) durante 3 hs a 4°C, con rotación constante. Se recuperó la resina por centrifugación a 1.000 x g durante 7 min y se realizaron dos lavados con la solución de lisis. La elución se realizó por incubación con 300 μ l de solución de elución (Tris HCl 20 mM pH 8 - NaCl 500 mM– imidazol 250 mM)

durante 1 h a 4 °C, con rotación constante. Luego se eluyó una segunda vez con 200 μ l de la solución de elución, en las mismas condiciones. La cantidad de proteína se cuantificó por el método de Bradford ajustado a la medición en microplaca.

13. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ATPasa de HSP90 β

El protocolo utilizado fue adaptado a partir del descrito por Scheibel *et. al.* 1997 y Rowlands *et. al.* 2010. [189, 190]. La reacción se llevó a cabo en placa de 96 pocillos donde se incubaron 10 μ g de proteína purificada con 0,1 - 5 μ M del compuesto a ensayar en el Solución de incubación (Hepes 50 mM pH 7.5 – MgCl₂ 6 mM – KCl 20 mM – ATP 1 mM) durante 10 min a temperatura ambiente. La reacción se detuvo por el agregado de dos volúmenes del reactivo verde de malaquita (preparado a partir de tres partes de una solución de verde de malaquita 0,045% p/v y una parte de una solución (NH₄)₆MO₂₄ 4,2% p/v en HCl 4M. Luego de mezclar por 30 min la solución se filtró en un filtro de 0,22 μ m. A continuación se incubó durante 20 min a temperatura ambiente y se midió la absorbancia a 630 nm (lector de microplaca RAYTO RT-6000). La masa de fosfato inorgánico se determinó por extrapolación en una curva de calibración realizada con KH₂PO₄.

14. EVALUACIÓN DE VIABILIDAD CELULAR

Este protocolo está basado en el ensayo de proliferación celular descrito por Scudiero *et. al.* 1988 y Silvester *et. al.* 2011 [191, 192]. Las células PC3, C4-2 fueron sembradas en placas de 96 pocillos en una densidad de 7 x 10³ células por pocillo. Luego de 24 hs, las células fueron tratadas con los compuestos a analizar en las siguientes concentraciones finales: 0,1 , 0,5 , 1 , 2,5 , 5 μ M o el volumen equivalente de solvente durante 48 hs. Para determinar la viabilidad celular se incubaron con MTT Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (MTT – SIGMA M2128) en una concentración final de 125 μ g/ml, durante 1 h. a 37° C. Luego de remover el medio de cultivo se resuspendieron los cristales formados en 100 μ l de DMSO por pocillo y se midió su absorbancia a 562 nm (la que se corrigió restando la absorbancia a 630 nm (lector de microplaca RAYTO RT-6000). Se asignó al grupo de células no tratadas el 100% de viabilidad y el resto de las condiciones fueron referidas a ésta. Los tratamientos se

realizaron por sextuplicado y fueron realizados al menos tres experimentos independientes.

15. ENSAYO DE REPARACIÓN DE HERIDA

Las células PC3 y C4-2B se sembraron en placas de 24 pocillos. Transcurridas 24 hs de haber alcanzado el 100% de confluencia, se removió la monocapa por acción mecánica. Las células se lavaron con PBS y se repuso el medio de cultivo, incubándose las con cantidades equimolares (5 μ M) de los compuestos a analizar o con un volumen equivalente de DMSO en el caso del control no tratado. La cinética de la reparación de la herida se evaluó tomando fotos cada 2 hs. Para ello se utilizó un microscopio de epifluorescencia Olympus IX71. La cuantificación de la reparación se calculó como:

$$\frac{d0-dX}{d0} * 100 = \text{Porcentaje de reparación de la herida}$$

Donde $d0$ es la distancia entre los bordes de la herida en el tiempo 0 y dX la distancia entre los bordes de la herida en el tiempo evaluado. Las distancias se midieron utilizando el programa informático *Image J* (v.1.45) del NIH.

16. ZIMOGRAFÍA

El presente protocolo fue adaptado de Fontana *et. al.* 2012 [193]. Las células PC3 fueron sembradas en placa de 6 pocillos. Luego de alcanzar el 100% de confluencia el medio de cultivo se reemplazó por DMEM. Se incubó durante 48 hs. con el compuesto analizado (5 μ M). Al medio condicionado por las células se le adicionó una cuarta parte de su volumen con solución de siembra (Tris-HCl 0,5 M pH 6.8 – SDS 4% p/v – glicerol 10% – azul de bromofenol 0,05% p/v). Las proteínas de las muestras se resolvieron realizando una corrida electroforética en gel de poliacrilamida desnaturalizante copolimerizado con gelatina (acrilamida/bisacrilamida 10 % p/v – gelatina 0,1% p/v – Tris-HCl 375 mM pH 8.7 - SDS 0,1% p/v), de 0,75 mm de espesor. Las condiciones de la corrida fueron: voltaje constante (80 V) hasta que las muestras atravesaron el gel concentrador (acrilamida/bisacrilamida 4% p/v - Tris-HCl 125 mM pH 6.8 - SDS 0,1% p/v), y luego se aumentó el voltaje a 130 V hasta alcanzar la resolución necesaria. La corrida se llevó a cabo en solución de corrida (glicina 1,92 M – SDS 1 % - Tris base 0,25

M). Luego los geles fueron lavados dos veces con una solución de Tritón- X 100 2,5% p/v en PBS, durante 15 min. Luego se incubaron en solución de recuperación (Tris-HCl 50 mM pH 7.5 - CaCl₂ 30 mM – NaCl 0,15 mM) durante 16 hs a 37° C. Los geles se incubaron con solución de tinción (azul de Coomassie brillante R-250 0,5% p/v – metanol 30% v/v – ácido acético 10% v/v) durante 30 min, a temperatura ambiente. Luego se destiñeron los geles realizando dos lavados de 20 min con solución decolorante (metanol 30% v/v – ácido acético 10% v/v). La imagen se obtuvo utilizando el equipo *FUJIFILM intelligent dark box 2*, y se cuantificaron las bandas de degradación de gelatina utilizando el programa informático *Image J* (v.1.45) del NIH.

17. ESTRUCTURA DE LOS COMPUESTOS EVALUADOS

Los compuestos estudiados en esta tesis fueron diseñados y sintetizados por el grupo del Dr. Sayan Dutta Gupta de la Universidad de Osmania, Hyderabad, India. La gran mayoría de estos compuestos son bases de Schiff derivadas del 2,4- dihidroxi-benzaldehído y del 5-cloro-2,4- dihidroxi-benzaldehído. Se los denominó de manera arbitraria del S1 al S48 en función de su orden de síntesis. Las soluciones concentradas a partir de las cuales realizamos las diluciones de trabajo, se hicieron en DMSO a una concentración 1 mM. Se las almacenó protegidas de la luz a -80°C.

A continuación, se representan las estructuras planas de los compuestos evaluados, clasificados en función del efecto ejercido sobre la actividad ATPasa de Hsp90β (Resultados, Capítulo 3, sección 3.1). En las Figuras 17, 18 y 19, se encuentran representados los compuestos que provocaron una inhibición fuerte sobre la actividad enzimática de la chaperona. En la Figura 20, 21 y 22 se encuentran representados los compuestos con efecto estimulante, inhibidor débil y sin efecto respectivamente.

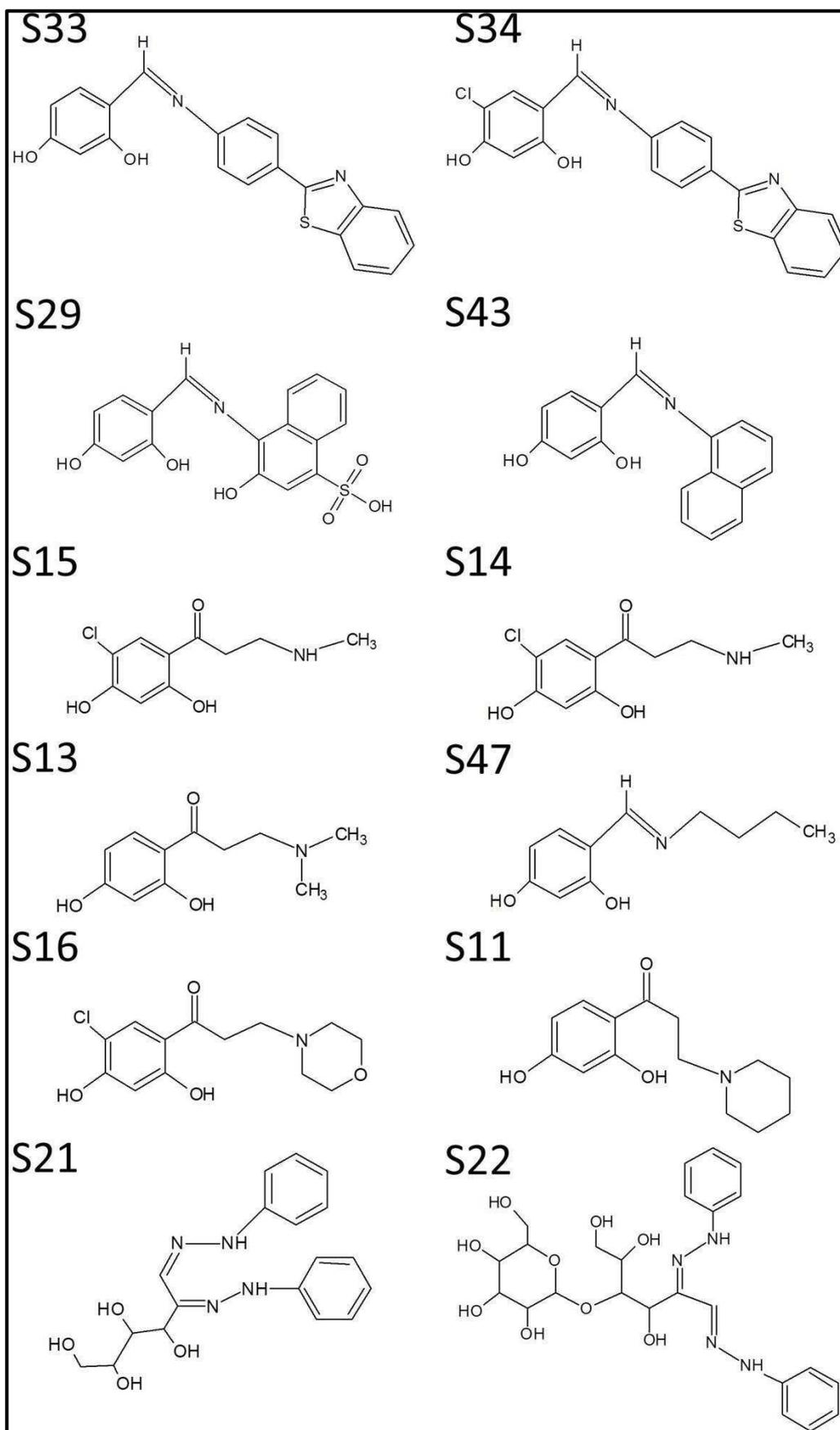


Figura 17. Estructuras planas de compuestos con efecto inhibitorio fuerte sobre la actividad ATPasa de Hsp90B

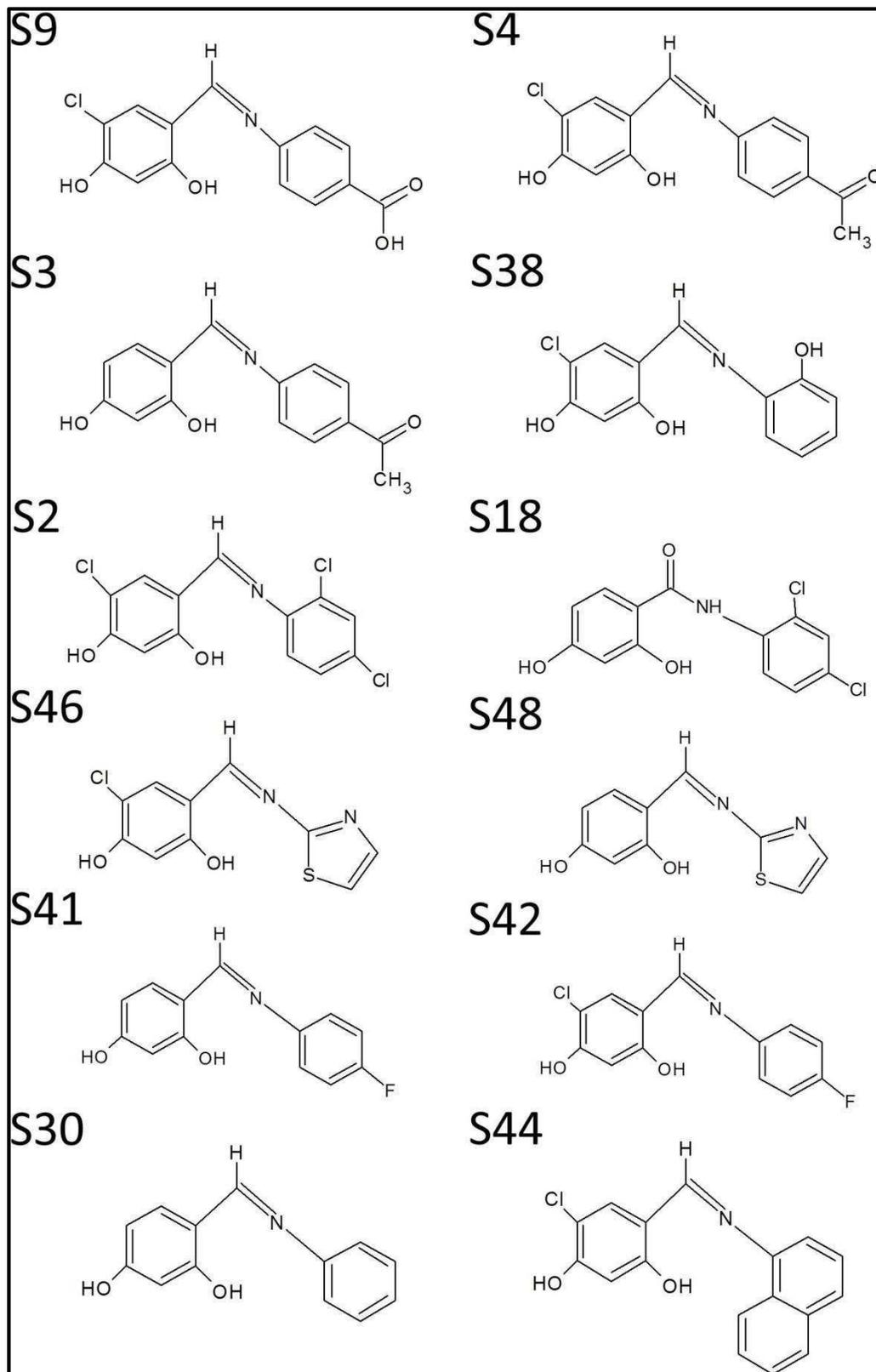


Figura 18. Estructuras planas de compuestos con efecto inhibitorio fuerte sobre la actividad ATPasa de Hsp90B

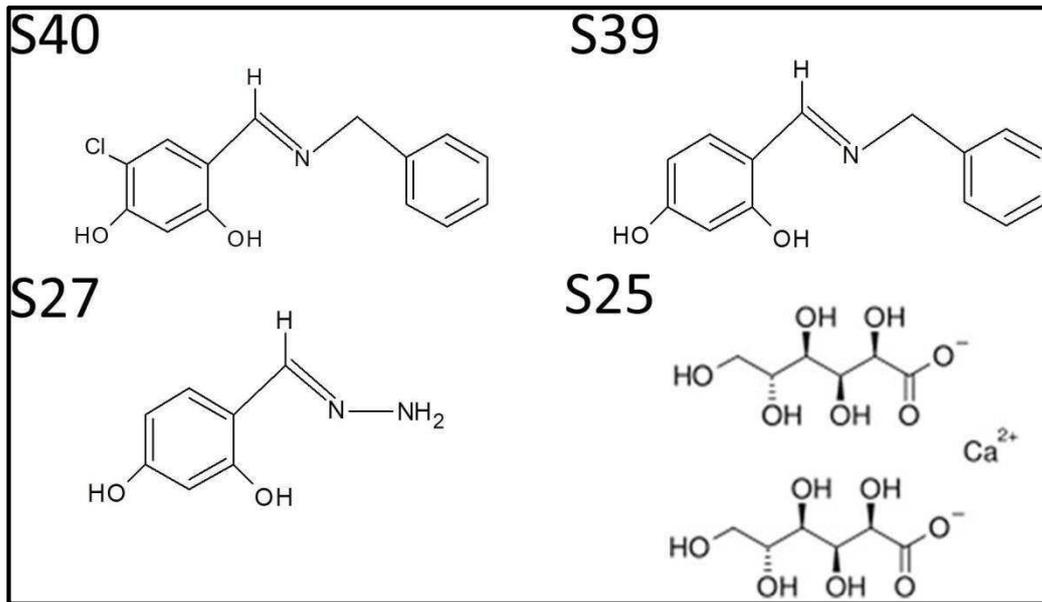


Figura 19. Estructuras planas de compuestos con efecto inhibitorio fuerte sobre la actividad ATPasa de Hsp90B

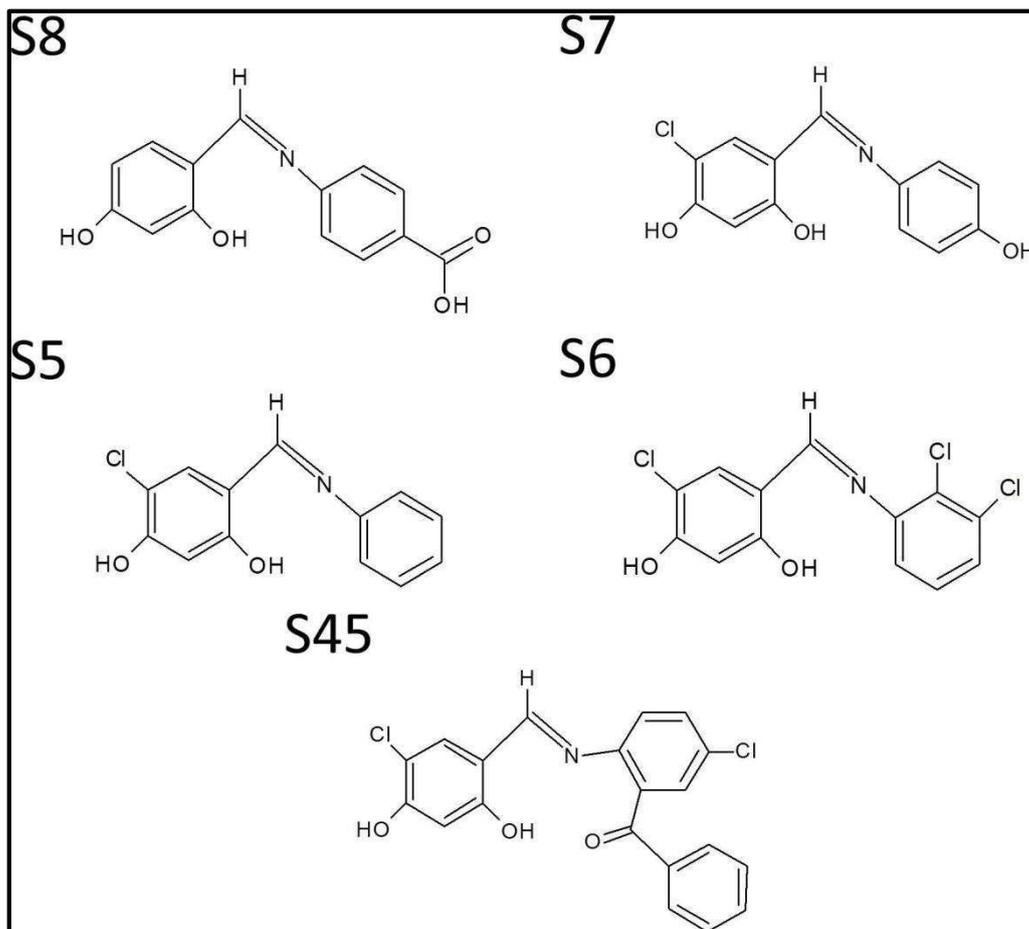


Figura 20. Estructuras planas de compuestos con efecto estimulante sobre la actividad ATPasa de Hsp90B

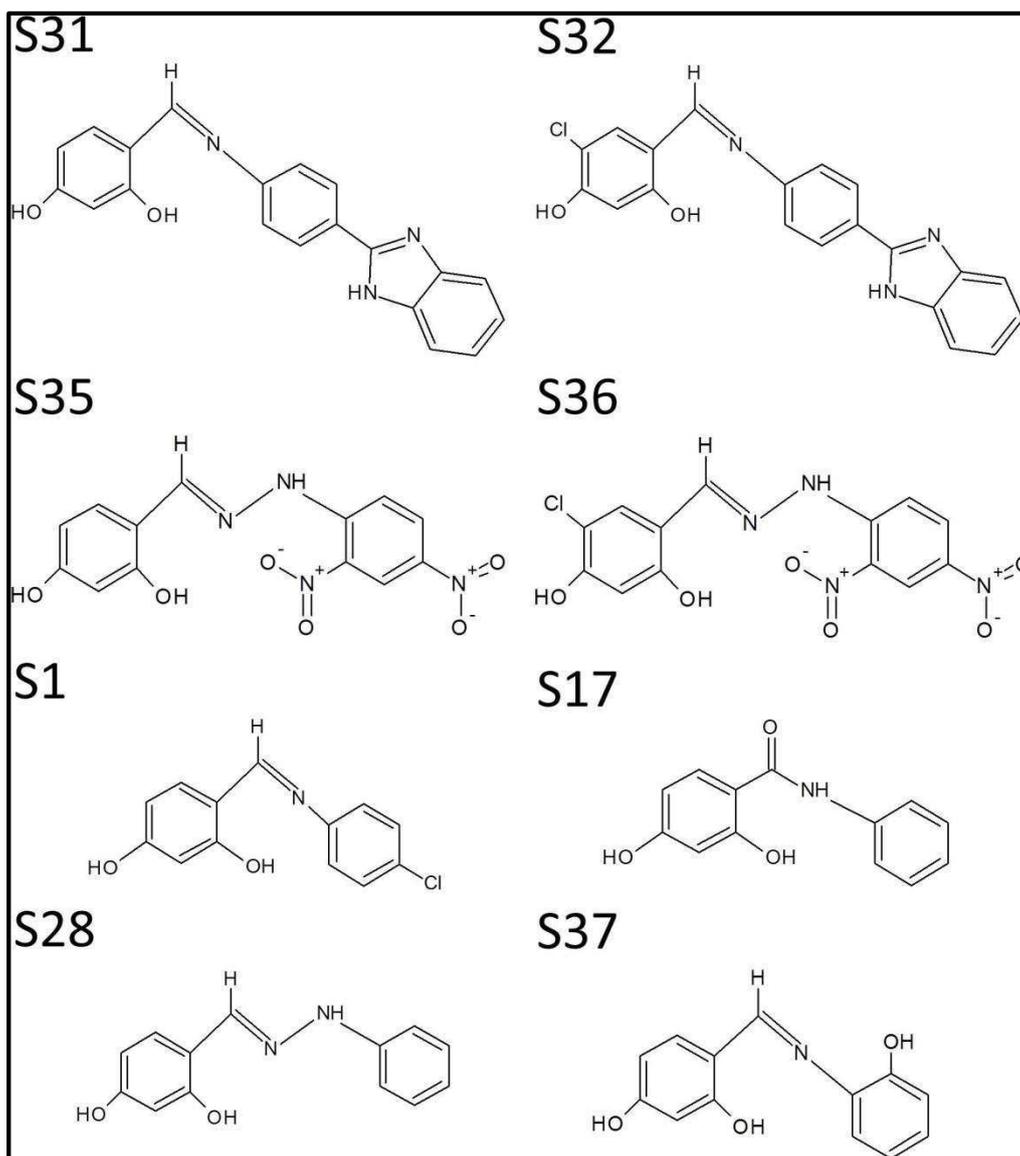


Figura 21. Estructuras planas de compuestos con efecto inhibitorio débil sobre la actividad ATPasa de Hsp90B

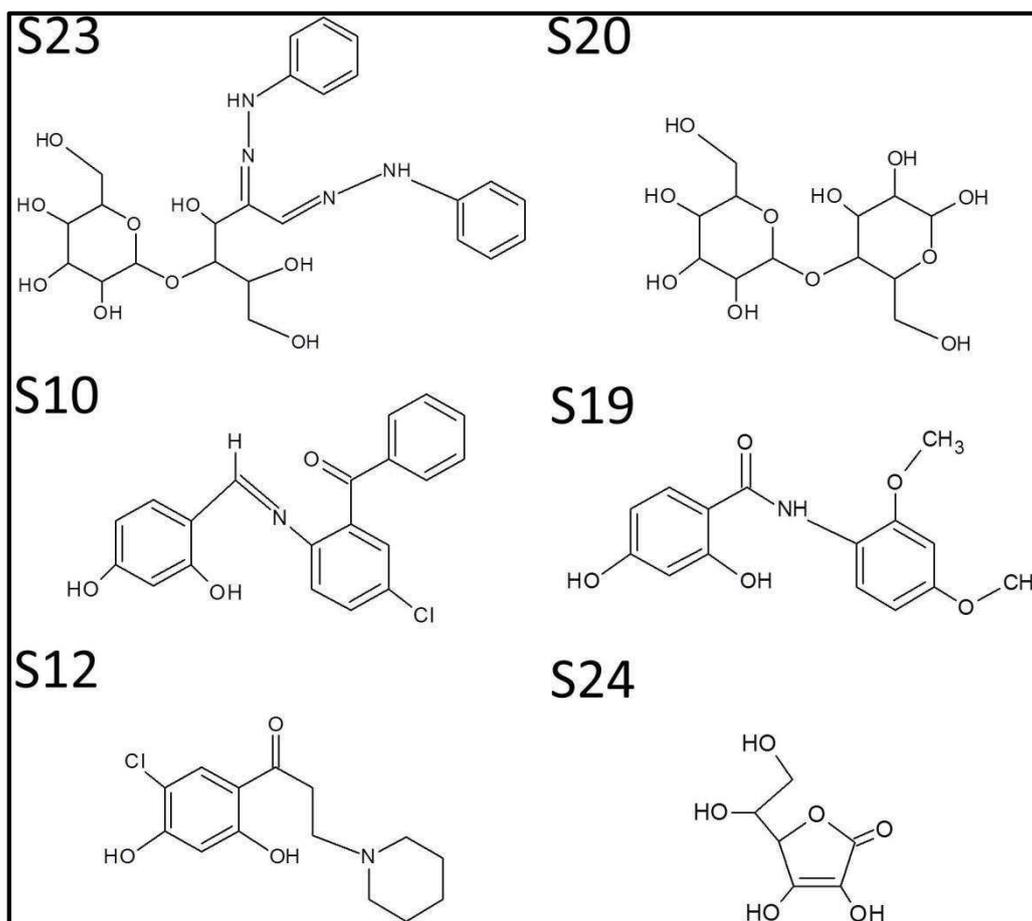


Figura 22. Estructuras planas de compuestos sin efecto sobre la actividad ATPasa de Hsp90B

18. ANÁLISIS STATÍSTICO

Los resultados fueron analizados por el test de análisis de varianza (ANOVA) de un factor usando el programa Statview 5.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA), seguido por el test de Fisher para examinar las diferencias entre los grupos. Se consideró como una diferencia significativa un valor de $p < 0,05$. Los resultados se expresaron como la media \pm el error estándar (SEM).

RESULTADOS

CAPITULO 1

Efecto de las Proteínas con dominio TPR sobre el transporte de los Receptores Nucleares

1 EFECTOS DE LAS PROTEÍNAS CON DOMINIO TPR SOBRE EL TRANSPORTE DE LOS RECEPTORES NUCLEARES

1.1 RECEPTOR DE GLUCOCORTICOIDES

En ausencia de ligando, los receptores de esteroides realizan un intercambio constante entre los compartimientos citosólico y nuclear, a este proceso se lo denomina *shuttling* [194]. La localización subcelular predominante de un receptor se encuentra determinada por un equilibrio dinámico, el cual es el resultado de la convergencia de múltiples factores que favorecen el movimiento hacia uno u otro compartimiento. En el caso de GR, dicho equilibrio le confiere una localización subcelular principalmente citoplasmática, mientras que la presencia de la hormona provoca que el receptor se relocalice en el núcleo [166, 195-197].

En el transcurso de los últimos años, se han acumulado numerosas evidencias que le otorgan un rol clave a ciertas proteínas con dominio TPR en la localización del receptor y su transporte al núcleo. Tal es el caso de FKBP51 y FKBP52 que cumplen roles antagónicos en la regulación del retrotransporte de los receptores. FKBP51 es la inmunofilina (IMM) predominante en los heterocomplejos de GR en ausencia de hormona, mientras que en su presencia, FKBP51 se intercambia rápidamente por FKBP52 [108]. Gracias a la capacidad de interactuar con la proteína motora dineína, FKBP52 favorece el retrotransporte eficiente de los RE, el que de otra manera se movería por simple difusión incrementando en un orden de magnitud el tiempo medio de traslado [41, 47, 99, 115]. En contraposición, FKBP51 retrasa tal retrotransporte al presentar esta IMM muy baja afinidad, si alguna, por el complejo motor dineína/dinactina [107]. Como ya se comentó en la Introducción, aquella competencia entre ambas IMM ocurre sobre el sitio aceptor TPR de Hsp90 que las reconoce. En consecuencia, se decidió evaluar el posible efecto de otras proteínas con dominio TPR sobre la importación de GR. Para ello, se co-transfectaron células HEK 293T con los plásmidos de expresión para GFP-GR y la proteína TPR correspondiente, o vector vacío; luego de 20 hs post-transfección se incubaron con 10 nM Dexa durante distintos tiempos. Las células se fijaron y se evaluaron por microscopía de fluorescencia. En

ausencia de esteroide (0 min), GR presenta una localización mayoritariamente citoplasmática, mientras que luego de la incubación con esteroide transloca rápidamente al núcleo excluyéndose de los nucleolos (Figura 23).

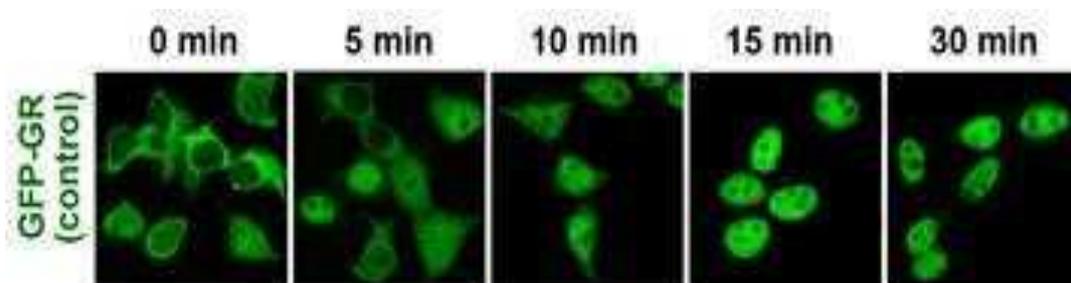


Figura 23. Importación nuclear de GFP-GR. Células HEK 293T transfectadas con el plásmido de expresión para la proteína de fusión GFP-GR e incubadas con 10 nM Dexa durante distintos intervalos de tiempo. Las fotos son representativas de campos en las que al menos 100 células fueron cuantificadas por experimento en tres experimentos independientes (ver Figura 29).

A continuación, se evaluó el efecto de la sobreexpresión de la Ser/Thr fosfatasa PP5 sobre la importación de GR. Como se ha mencionado previamente, PP5 posee dominios TPR a través del cual interactúa con Hsp90 y forma parte de los complejos de GR [128]. En la Figura 25 se observa que, a diferencia de las células control transfectadas con el vector vacío, aquellas que sobreexpresan a PP5 muestran un significativo aumento en la localización nuclear de GR aún en ausencia de hormona (0 min). Este resultado podría deberse a un mayor anclaje nuclear de GR por parte de PP5 o a alguna deficiencia del mecanismo que utiliza el receptor para retornar al citoplasma. Descartamos que sea por aceleración de la importación basal durante el *shuttling* porque: a) el paso limitante es siempre la translocación a través del poro nuclear, el que lleva al menos un orden de magnitud mayor tiempo que el transporte citoplasmático más eficiente (en distancias cortas como las de un fibroblasto), y b) no hay reportes de que existan mecanismo que aceleren el transporte de factores solubles más allá de lo que permite el transporte activo mediado por proteínas motoras. Debe comentarse que Hinds *et al* [198] reportaron recientemente que PP5 no afecta el tránsito de GR, pero estos autores evaluaron la translocación de GR realizando una incubación única de 60 min con Dexa, una condición en la que los RE son siempre nucleares sea cual fuere el mecanismo por el que transloquen (ver el

gráfico de la Figura 29). La conclusión errónea a la que llegaron aquellos autores fue la consecuencia de un diseño experimental inapropiado.

La Ser/Thr-fosfatasa PP5 posee tres dominios funcionalmente relevantes: el TPR, a través del cual se asocia a Hsp90; el PPlasa, razón por la que PP5 pertenece a la categoría de proteínas tipo “IMM-like”, y el de proteína fosfatasa, cuya actividad enzimática es sensible al ácido okadaico. Con el fin de evaluar si las actividades enzimáticas asociadas a los dominios PPlasa y de fosfatasa son relevantes para las propiedades de transporte al núcleo de GR, la velocidad de acumulación nuclear de GFP-GR que se muestra en la Figura 23 y cuyo gráfico se ve en la Figura 29, se repitió en presencia de 1 μ M FK506 (macrólido inhibidor de la actividad PPlasa de las IMMs) o bien en presencia de 50 nM ácido okadaico. En ninguno de los dos casos se observaron cambios significativos (datos no mostrados) respecto del control sin la droga, confirmando datos previos de nuestro laboratorio [115, 166] en los que ya se había sugerido que la actividad enzimática de estos dominios no parecía estar involucrada. Por otra parte, la inmunoprecipitación de PP5 de células COS-7 transfectadas con flag-PP5 (Figura 24) se tradujo en la co-inmunoprecipitación de Hsp90 (como era de esperar) y de dineína endógenas. La presencia de dineína fue competida por co-transfección del péptido PPlasa, sin afectarse Hsp90, y se preservó luego de la co-transfección del péptido TPR, el que desplazó a Hsp90 de su unión con PP5. Es decir, PP5 es redundante con FKBP52 en el rol de asociarse a la proteína motora.

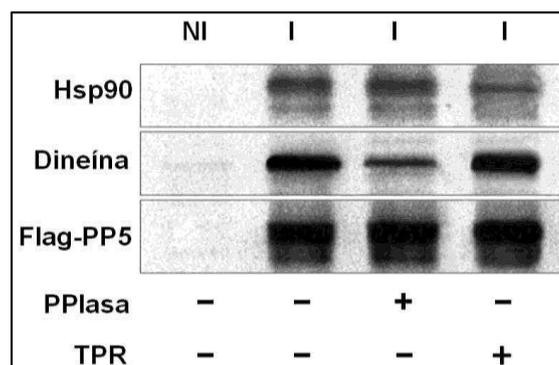


Figura 24. Dineína se asocia a PP5 vía su dominio PPlasa-like. Células COS-7 fueron co-transfectadas con flag-PP5 y el dominio PPlasa o el dominio TPR. PP5 fue inmunoprecipitado con un anticuerpo anti-flag y revelado por WB junto a Hsp90 y la cadena intermedia de dineína. NI= IgG no inmune. I= IgG anti-PP5. Notar la menor cantidad de dineína recuperada por la presencia del péptido PPlasa sin que se modifique la presencia de Hsp90 en el complejo con PP5, el que se une vía su dominio TPR. La sobreexpresión de TPR disocia a PP5 de Hsp90, pero no de dineína.

En contraposición a la falta de efecto de la actividad enzimática de los dominios de fosfatasa y PPIasa sobre la velocidad de acumulación nuclear de GFP-GR antes comentada, la sobreexpresión del dominio TPR de PP5 provocó un aumento de la localización citoplasmática ya en ausencia de hormona (0 min) (Figura 26). Comparado con controles co-transfectados con el vector vacío, la sobreexpresión de PP5 o de su dominio TPR provocaron una mayor localización citoplasmática de GFP-GR a los distintos tiempos de incubación con Dexa. Esto es particularmente notable a los 10 minutos si se compara la señal citoplasmática de las células transfectadas (rojas al revelarse con anti-flag seguido de anticuerpo secundario marcado con Alexa 568 nm) versus las no transfectadas en el mismo campo (GFP-GR enteramente nuclear).

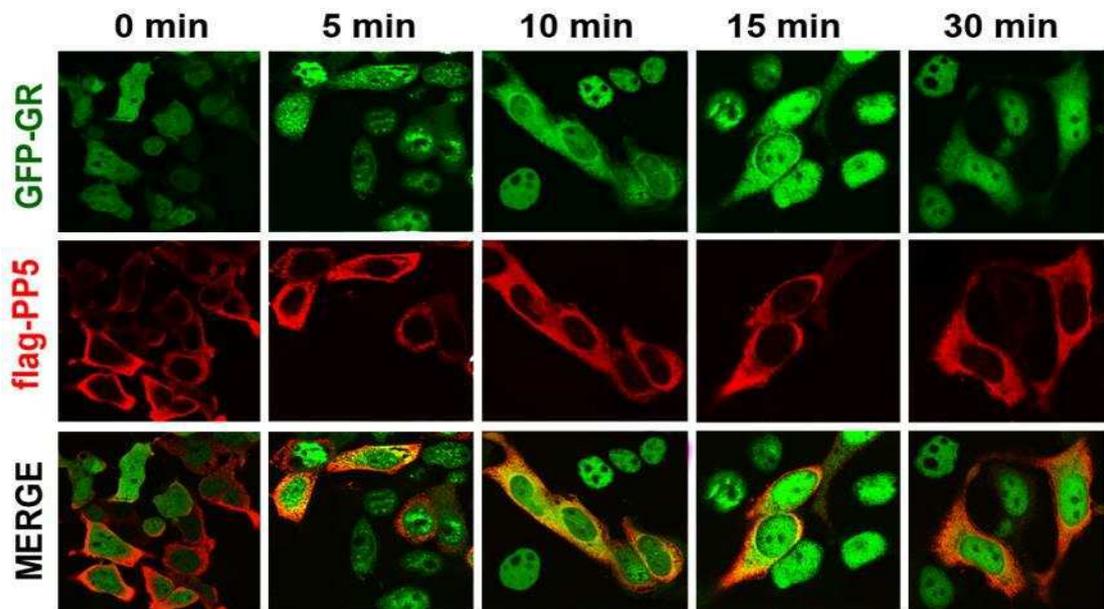


Figura 25. Importación nuclear de GFP-GR en presencia de PP5. Células HEK 293T co-transfectadas con los plásmidos de expresión para la proteína de fusión GFP-GR y flag-PP5 e incubadas con Dexa (10 nM) durante distintos intervalos de tiempo. Las fotos son representativas de al menos 100 células analizadas en tres experimentos independientes.

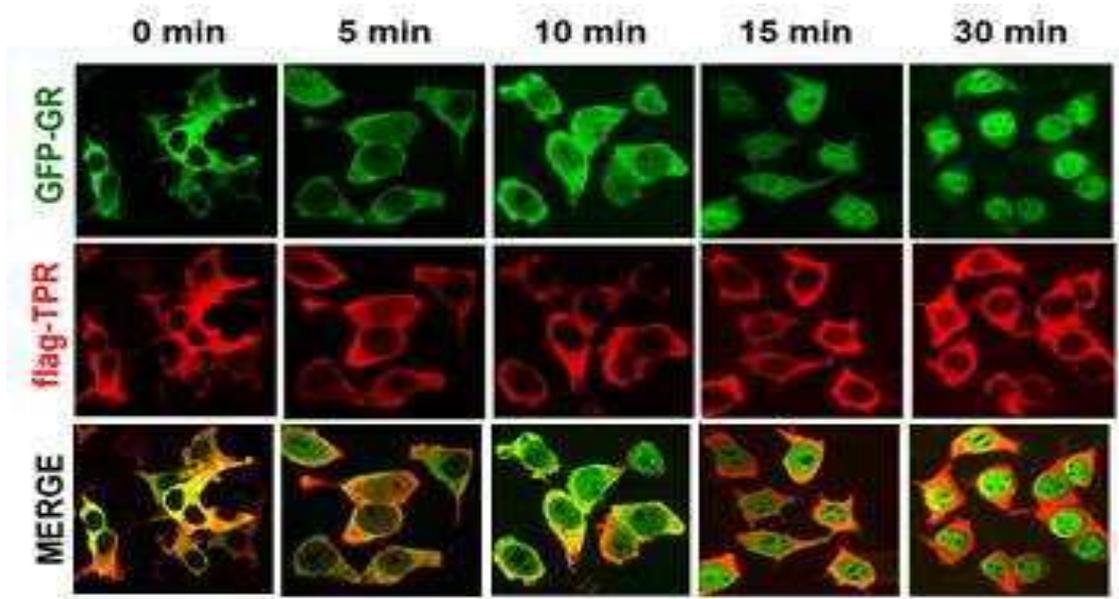


Figura 26. Importación nuclear de GFP-GR en presencia de un exceso de dominio TPR. Células HEK 293T co-transfectadas con los plásmidos de expresión para la proteína de fusión GFP-GR y flag-TPR e incubadas con Dexa (10 nM) durante distintos intervalos de tiempo. Las fotos son representativas de al menos 100 células analizadas en tres experimentos independientes.

El aumento de la localización citoplasmática de GR podría deberse a que el péptido TPR compite como dominante negativo con otros factores TPR que son responsables de la retención nuclear de GR, entre los cuáles bien podríamos incluir hasta a PP5 misma. Esta hipótesis se fundamenta en estudios realizados en paralelo en la tesis de la Dr. Luciana Gallo en los que se demostró que FKBP52 co-purifica por métodos convencionales de fraccionamiento nuclear con GR y proteínas asociadas al nucleoesqueleto como NuMA (*Nuclear Matrix-Associated Protein*) de manera TPR-dependiente. En otras palabras, la población nuclear de FKBP52 favorecería el anclaje de GR al nucleoesqueleto. Por lo tanto, la sobreexpresión del dominio TPR compite y desplaza a FKBP52, liberando al receptor de sus sitios de anclaje nuclear y favoreciendo su localización citosólica.

Debido a que el péptido TPR aislado no existe como tal en la naturaleza, se decidió estudiar si existen proteínas nativas con capacidad potencial de emular tales efectos. A continuación, se describen los motivos por los cuales se decidió estudiar a 14-3-3 σ . Como ya se mencionó en la Introducción, las proteínas de la familia 14-3-3 no

son proteínas TPR propiamente dichas, pero adquieren una conformación similar a la del dominio TPR de PP5 [141] (Figura 11). Además, ensayos de cromatografía de afinidad mostraron que son recuperadas junto a Hsp90 y Hsp70, con las que también co-inmunoprecipita [199]. Kino *et al.* [143] reportaron que 14-3-3 σ favorece la localización citoplasmática de GR en ausencia de hormona, y especularon que serviría para el anclado de GR al citoplasma. Teniendo en cuenta además que 14-3-3 σ no interactúa con dineína, a diferencia de PP5 y FKBP52, postulamos que 14-3-3 σ quizás reproduciría los efectos observados con el dominio TPR. En la Figura 27 se puede observar que 14-3-3 σ también provocó una mayor localización citoplasmática de GR en ausencia de hormona (0 min) similar a lo que ya mostramos por sobreexpresión del dominio TPR en la Figura 26. También se vio retrasado el tiempo de importación nuclear de GR de manera equivalente a la que lo hace el dominio TPR (ver las curvas de importación comparativas en la Figura 29). Si analizamos la señal de GFP-GR en las células incubadas por 10 min con esteroide, nuevamente vemos que GFP-GR conserva señal citoplasmática remanente sólo en las células que sobreexpresan a 14-3-3 σ . Las células del mismo campo que no fueron transfectadas (por ende, no teñidas de rojo con el anticuerpo anti-flag, ver el grupo de tres núcleos señalados por la flecha blanca), muestran a GR enteramente nuclear.

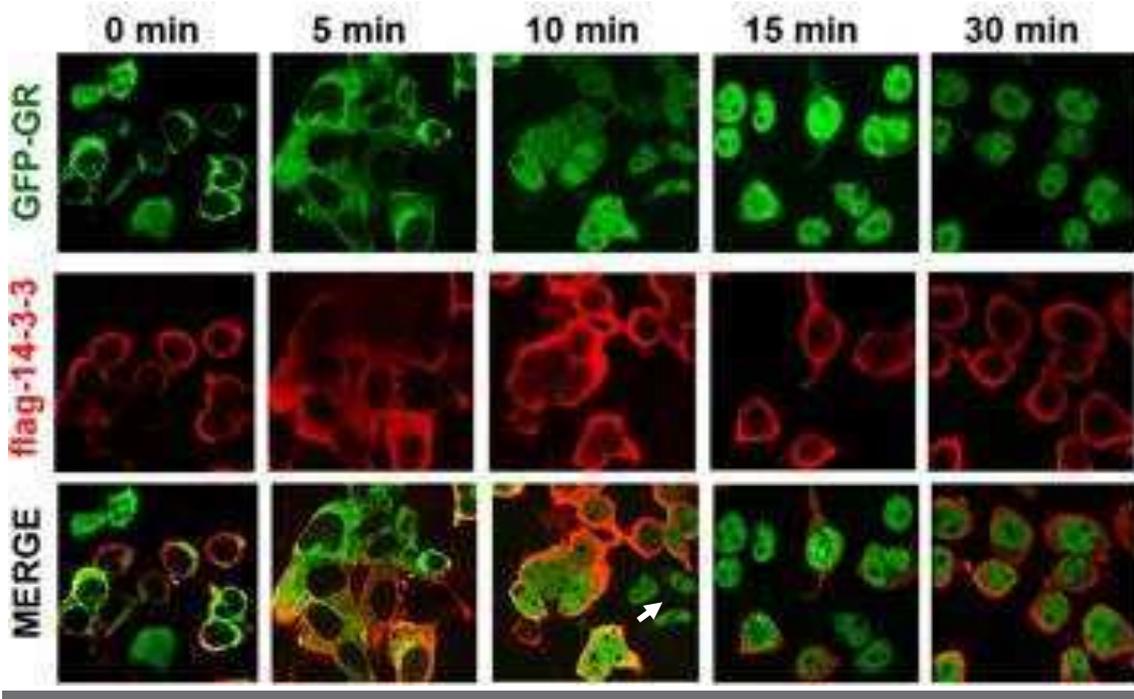


Figura 27. Importación nuclear de GFP-GR en presencia del 14-3-3 σ . Células HEK 293T co-transfectadas con los plásmidos de expresión para la proteína de fusión GFP-GR y flag-14-3-3 σ e incubadas con Dexa (10 nM) durante distintos intervalos de tiempo. Las fotos son representativas de al menos 100 células analizadas en tres experimentos independientes.

Luego se evaluó el efecto de la sobreexpresión de SGT1 α sobre la importación de GR. Como se detalla en la sección Introducción, se ha descrito a SGT1 α como una proteína con dominios TPR [155, 156] capaz de interactuar con ambas isoformas de Hsp90 y regular a AR [156, 158-160, 162]. Sin embargo, como ya se adelantó en la Introducción, SGT1 α no compromete su dominio TPR para unirse a Hsp90 sino al dominio CS. En consecuencia, esta proteína se postuló como objeto de estudio del presente trabajo completando una triada de proteínas TPR con propiedades diferenciales entre ellas. En la Figura 28 se puede observar que, en contraposición a los comportamientos de PP5, el péptido TPR y 14-3-3 σ , SGT1 α no produce efecto alguno sobre la importación del receptor, siendo el patrón de distribución núcleo-citoplasmático idéntico al del control co-transfectado con el vector vacío, demostrándose así que la mera existencia de un dominio TPR o TPR-like (como es el caso de 14-3-3 σ) no necesariamente asegura los efectos que sobre el transporte retrógrado y la distribución subcelular de los RE ejercen otras proteínas TPR que

forman complejos con los mismos vía Hsp90 como las IMMs de la subfamilia FKBP ó PP5.

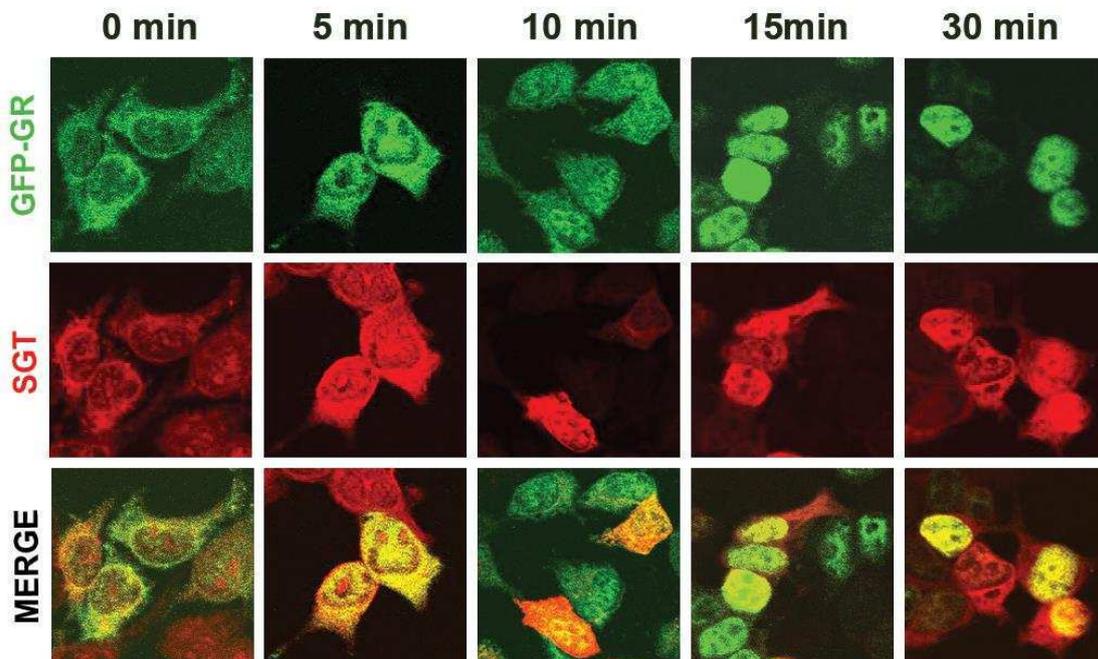


Figura 28. Importación nuclear de GFP-GR en presencia del SGT-1 α . Células HEK 293T co-transfectadas con los plásmidos de expresión para la proteína de fusión GFP-GR y SGT1 α e incubadas con Dexa (10 nM) durante distintos intervalos de tiempo. Las fotos son representativas de al menos 100 células analizadas en tres experimentos independientes.

Con el fin de facilitar la comparación de los resultados presentados hasta aquí, se ha confeccionado la curva de porcentaje de células con fluorescencia nuclear en función del tiempo de incubación con Dexa. En la Figura 29 se puede observar que los efectos de la sobreexpresión del PP5 no son comparables a los obtenidos al sobreexpresar únicamente su dominio TPR, en cuyo caso el comportamiento es similar al observado con 14-3-3 σ . Mientras que al sobreexpresar SGT1 α los resultados obtenidos son similares al control, por lo que concluimos que SGT1 α no tendría efecto sobre GR a nivel de su retrotransporte. Considerando que PP5 es capaz de interactuar con la proteína motora dineína (Figura 24) de manera similar a FKBP52 [102] postulamos que PP5 podría competir con FKBP52 por el único sitio aceptor de dominio TPR que posee el dímero de Hsp90 [36] llevando al receptor a un nuevo equilibrio de

distribución no obstante el cual, no le impediría a GR ser transportado activamente al núcleo por el complejo motor.

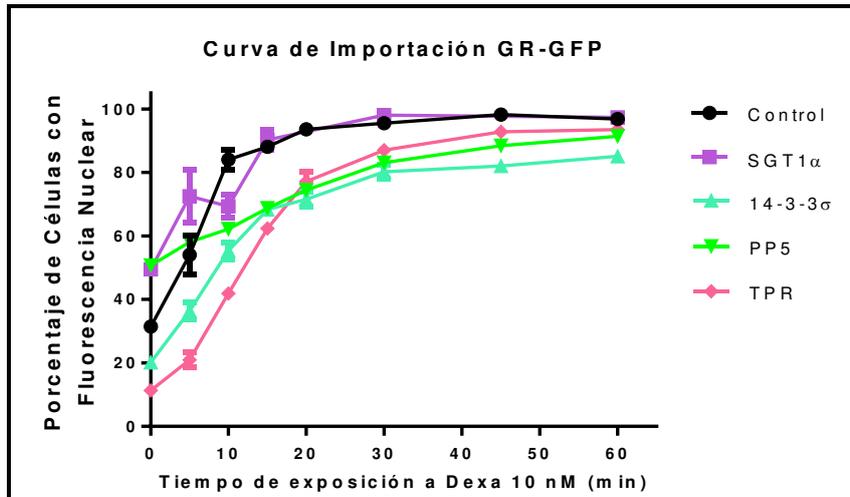


Figura 29. Curva de importación de GFP-GR (●) en presencia SGT1α (■), 14-3-3σ (▲), PP5 (▼) o del dominio TPR de PP5 (◆). Los resultados se muestran como el promedio ± SEM (n=3).

El dominio TPR ó 14-3-3σ tendrían la capacidad de desplazar a FKBP52 del sitio aceptor de TPR de Hsp90, pero al no unir dineína se imposibilita la interacción con la maquinaria de transporte. En el caso de SGT1α, este efecto no se evidencia porque no compite por el sitio aceptor TPR de Hsp90 dentro del heterocomplejo de GR. Para corroborar estas ideas, se analizó por co-inmunoprecipitación si 14-3-3σ y SGT1α forman parte del complejo GR-Hsp90. En la Figura 30-A se evidencia que 14-3-3σ co-inmunoprecipita con GR y Hsp90 y por ende es un factor de sus heterocomplejos. Por el contrario, no pudo determinarse la presencia de SGT1α en los mismos (Figura 30-B).

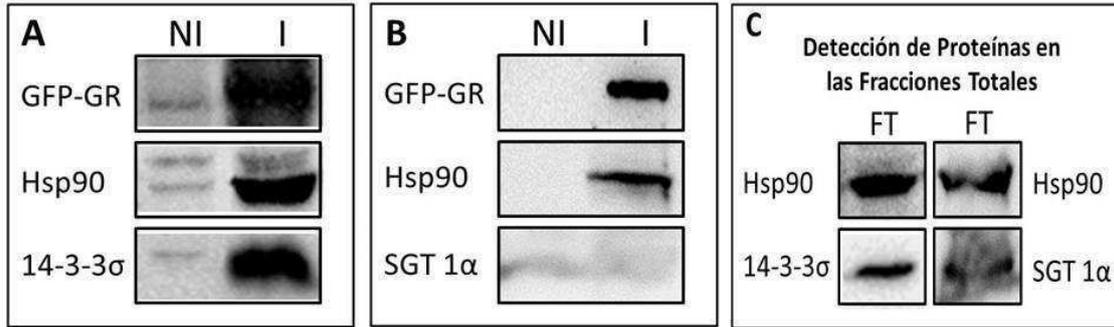


Figura 30. Co-inmunoprecipitación de GFP-GR junto a Flag-14-3-3σ (A) ó SGT1α (B). Células HEK 293T co-transfectadas con los plásmidos de expresión de GFP-GR y Flag-14-3-3σ o SGT1α en medio con suero completo. La inmunoprecipitación se realizó utilizando suero anti-GFP (I) o suero normal (NI). Las muestras fueron resueltas por Western blot y reveladas utilizando anticuerpos anti-Hsp90, anti-SGT1α o anti-flag en el caso de flag-14-3-3σ. (C) Detección de proteínas en las fracciones totales.

Como se ha mencionado con anterioridad, la localización subcelular que observamos de un receptor dado es el resultado del equilibrio alcanzado entre las fuerzas que favorecen su importación al núcleo y otras que favorecen su exportación. Fue así que se decidió estudiar consecuentemente el efecto de PP5, 14-3-3σ y SGT1α sobre la exportación nuclear de GR. Las células se incubaron con 10 nM Dexa durante 60 min para asegurar la localización nuclear del receptor, luego se retiró el esteroide y las células se fijaron a distintos tiempos. En la Figura 31 se puede observar que, en las células control (sin co-transfección de proteína TPR sino su vector vacío), GR retorna al citoplasma lentamente al remover la hormona alcanzando una distribución similar a la de células no expuestas a esteroide recién después de 16 horas. Los primeros cambios significativos en el patrón de exportación comenzaron a evidenciarse luego de 4 h.

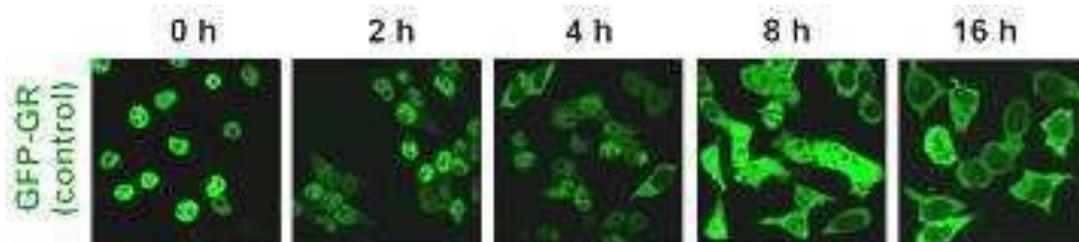


Figura 31. Exportación nuclear de GFP-GR. Células HEK 293T transfectadas con GFP-GR se incubaron con 10 nM Dexa durante 60 min, luego se lavó la hormona y se fijaron las células a distintos tiempos.

La Figura 32 muestra los resultados en células co-transfectadas con flag-PP5. Notar que hay una ligera tendencia a mayor velocidad de exportación (ver el gráfico de la Figura 36 a las 2 h), pero la característica más notable es que el sistema llegó a un nuevo equilibrio luego de 16 h, en el que el receptor se encuentra más o menos equitativamente distribuido entre citoplasma y núcleo (comparar con las 16 h de la Figura 31).

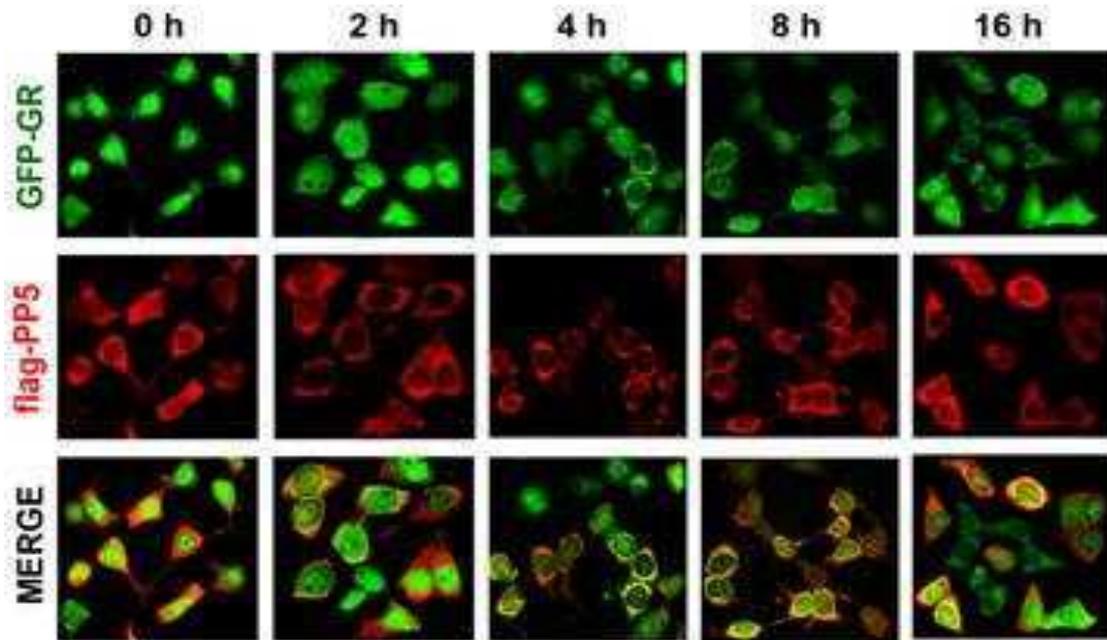


Figura 32. Exportación nuclear de GFP-GR en presencia de PP5. Células HEK 293T co-transfectadas con los plásmidos de expresión para la proteína de fusión GFP-GR y flag-PP5 e incubadas con 10 nM Dexa durante 60 min, luego se retiró la hormona y se tomaron muestras a distintos tiempos. Las fotos son representativas de aquellos campos que luego fueron semicuantificados (al menos 100 células en tres experimentos independientes.).

Por el contrario, al sobreexpresar el dominio TPR de PP5, GR aceleró su retorno al citoplasma (Figura 33) de manera análoga a cuando se sobreexpresó 14-3-3 σ (Figura 34). Coincidente con su efecto sobre la importación, la sobreexpresión de SGT1 α no muestra un efecto apreciable respecto al control (Figura 35).

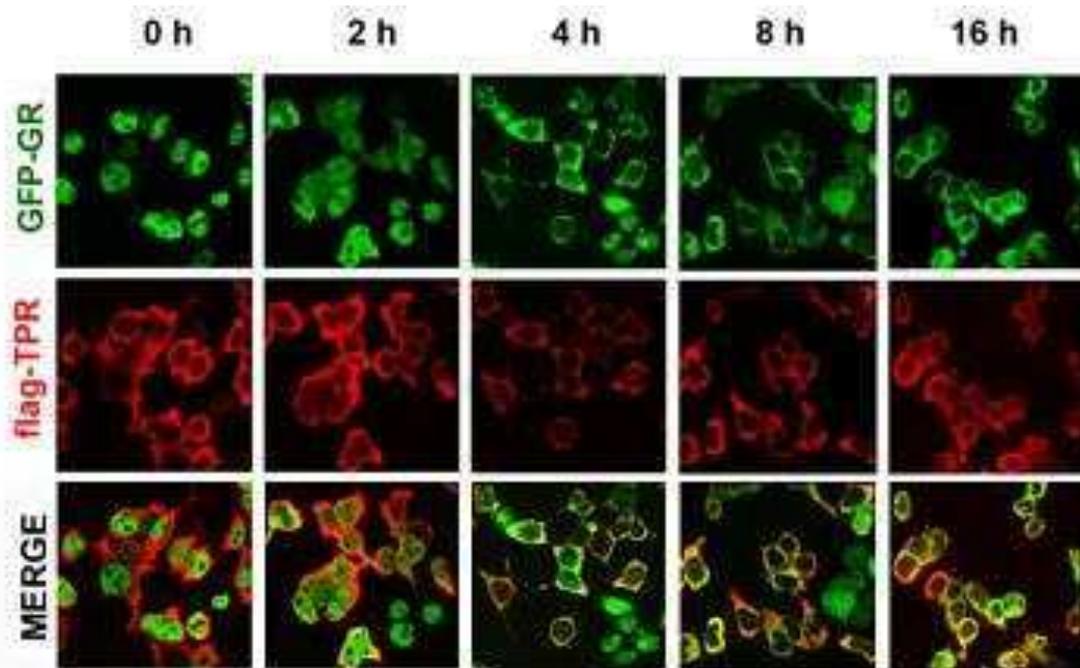


Figura 33. Exportación nuclear de GFP-GR en presencia de dominio TPR de PP5. Células HEK 293T co-transfectadas con GFP-GR y flag-TPR, se incubaron con 10 nM Dexa durante 60 min, luego se retiró la hormona y se tomaron muestras a distintos tiempos. En rojo se observa el revelado con anti-flag.

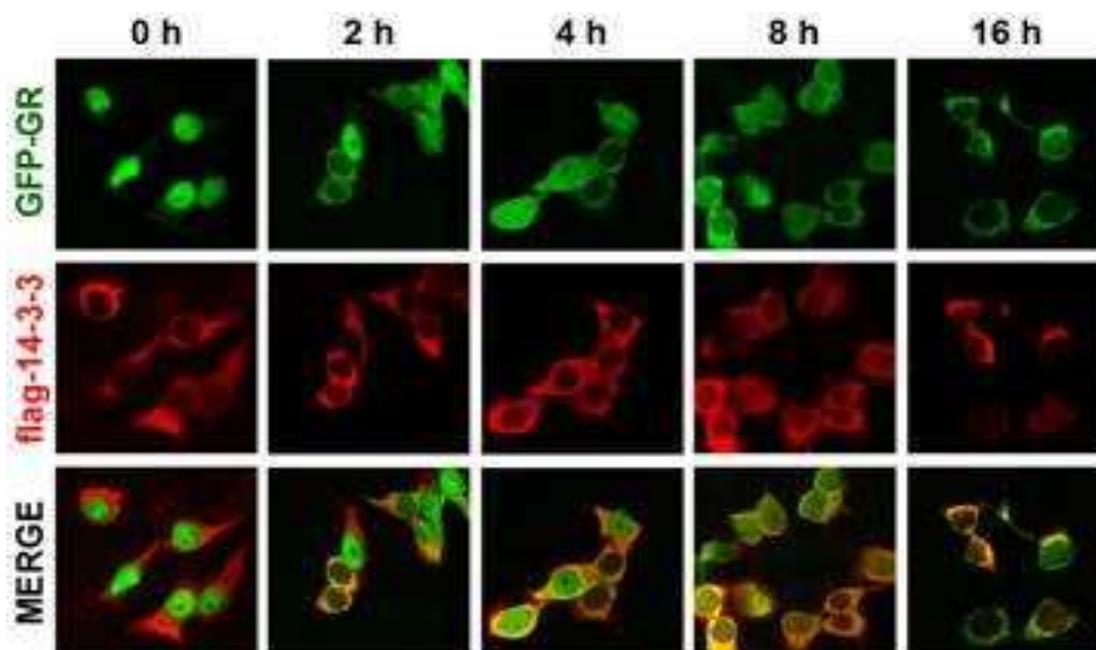


Figura 34. Exportación nuclear de GFP-GR en presencia de 14-3-3 σ . Células HEK 293T co-transfectadas con GFP-GR y flag-14-3-3 σ , se incubaron con 10 nM Dexa durante 60 min, luego se retiró la hormona y se tomaron muestras a distintos tiempos. En rojo se observa el revelado con anti-flag.

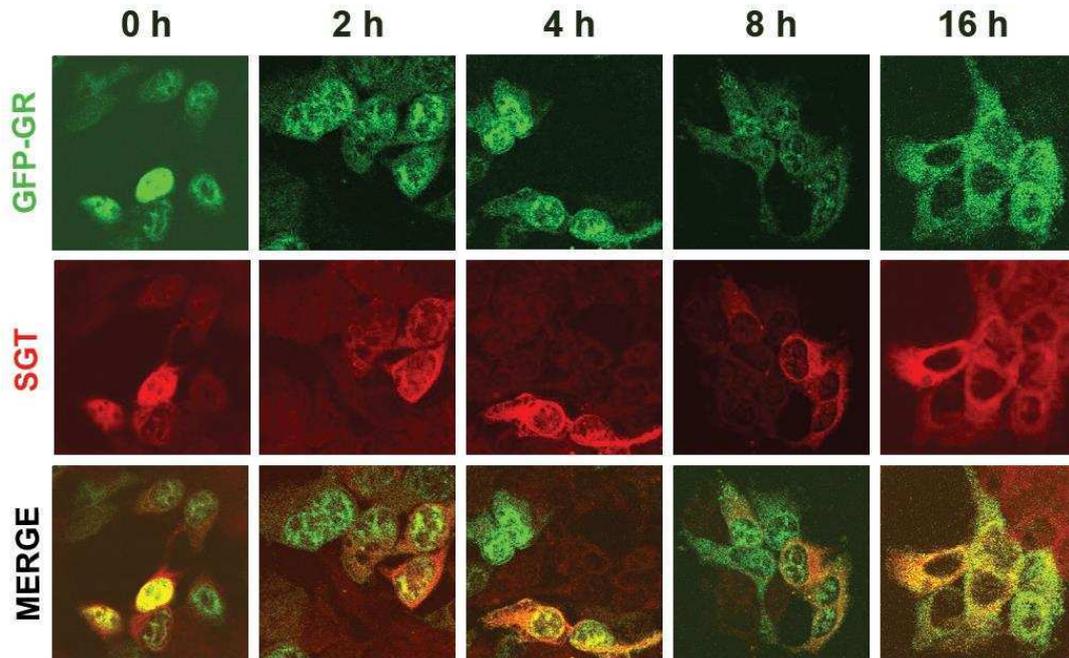


Figura 35. Exportación nuclear de GFP-GR en presencia de SGT1 α . Células HEK 293T co-transfectadas con GFP-GR y SGT1 α se incubaron con 10 nM Dexa durante 60 min, luego se retiró la hormona y se tomaron muestras a distintos tiempos. En rojo se observa el revelado con anti-SGT1 α .

En la Figura 36 se muestra la cuantificación del porcentaje de células con fluorescencia nuclear en función del tiempo de incubación post-remoción de la hormona para cada condición. Una vez más se puede apreciar que el efecto de PP5 no es exclusivamente atribuible a su dominio TPR, ya que este dominio per se provoca un efecto similar al observado con 14-3-3 σ . Los resultados concuerdan con la predicción según la cual, tanto el dominio TPR como 14-3-3 σ desplazarían a FKBP52 del complejo dejando al receptor disponible para ser exportado. Notar la particular distribución del receptor cuando se alcanza el equilibrio en células que sobreexpresan a PP5 (comparar con los tiempos iniciales en el gráfico de importación de la Figura 29).

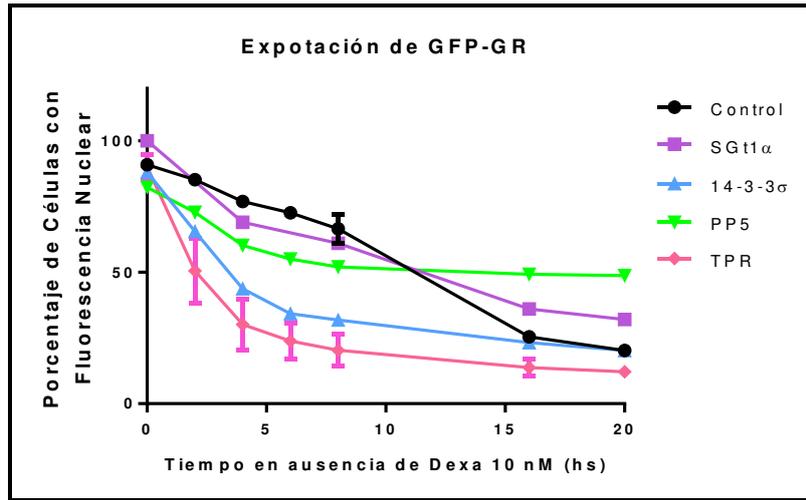


Figura 36. Curva de Exportación de GFP-GR (●) en presencia SGT1α (■), 14-3-3σ (▲), PP5 (▼) o del dominio TPR de PP5 (◆). Los resultados se expresan como el promedio de células con fluorescencia nuclear ± SEM.

Para corroborar que en la célula realmente ocurre la competencia entre PP5 y FKBP52 por su sitio de anclaje a Hsp90 en los heterocomplejos de GR, se inmunoprecipitó a GR de células co-transfectadas con GFP-GR y flag-PP5 (Figura 37). Efectivamente, la recuperación de FKBP52 endógena fue mayor que en aquellas células que sobreexpresan a PP5, siendo a su vez la cantidad de PP5 asociada al complejo GR-Hsp90 mucho mayor en éstas al haberse incrementado la oferta intracelular de la proteína-fosfatasa.

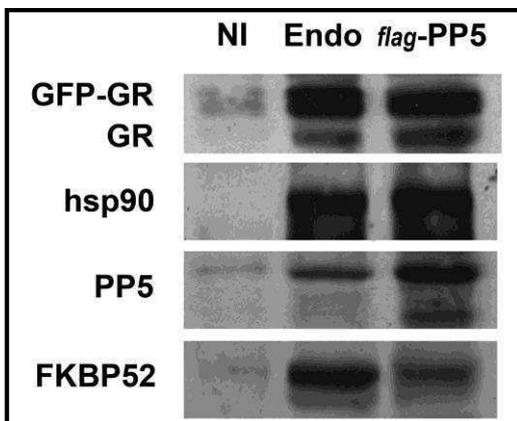


Figura 37. Coimmunoprecipitación de GFP-GR con PP5. Células COS-7 fueron co-transfectadas con GFP-GR y vector (Endo) o GFP-GR y flag-PP5. La inmunoprecipitación se realizó utilizando una IgG anti-GR o una IgG no inmune (NI). Las muestras fueron resueltas por Western blot y reveladas por Western blot para Hsp90, FKBP52 o PP5.

1.2 RECEPTOR DE ANDRÓGENOS

AR también integra el grupo de RE cuya localización subcelular es mayoritariamente citoplasmática en ausencia de hormona [200]. Teniendo en cuenta que inhibidores de Hsp90 tales como geldanamicina (GA) y su derivado 17-AAG interfieren con este proceso, se considera que la importación de AR se encuentra regulada de manera semejante a la del resto de los RE más estudiados [201, 202]. Cabe mencionar que si bien Hsp90 forma heterocomplejos con AR, este receptor presenta la particularidad de tener una asociación muy débil con la chaperona, tal que resulta muy difícil preservar la integridad del heterocomplejo en extractos libres de células a menos que se preserve por cross-linking [203]. En consecuencia, comparando a AR con GR, al cual se puede inmunoprecipitar junto a sus chaperonas y co-chaperonas de manera estable, muchos de los ensayos de AR deben realizarse por competencia funcional entre co-chaperonas, como haremos aquí, por el uso de drogas tales como MJC13 para interferir en la interacción Hsp90-FKBP52 [204] o bien GA para inhibir a Hsp90 (lo que también desestabiliza a AR y éste se degrada por el proteasoma [205])

En vista de los resultados obtenidos al estudiar el transporte de GR, se decidió evaluar si los efectos de las proteínas TPR aquí estudiadas se circunscriben a este receptor, o presentan una acción regulatoria más general. La razón de nuestro interés particular por AR se basa en el hecho de que AR es considerado un factor oncogénico en casos de cáncer de próstata, siendo sus efectos contrarrestados por la activación de GR [206]. La cascada de señales de AR ha sido blanco de estudios farmacológicos desde hace tiempo, y muestra un alto grado de resistencia a estos procedimientos como lo demuestran los “*clinical trials*” de derivados de geldanamicina [205, 207]. Ello lleva a intentar terapias combinadas, costosas y con efectos secundarios importantes [208]. Contrariamente a otros receptores, AR es activado por FKBP51 [118], la que se induce por ROS, generando así un círculo vicioso en la progresión tumoral. Aun cuando la privación de andrógenos puede paliar inicialmente el cuadro, por razones aún desconocidas AR sigue afectando el ciclo celular de animales castrados y hasta es activo transcripcionalmente. Comenzamos entonces a analizar su relocalización al núcleo utilizándose la misma estrategia que en la sección de Resultados 1.1.

La Figura 38 muestra que en ausencia de esteroide, AR tiene una distribución mayoritariamente citoplasmática, y que también migra rápidamente al núcleo en respuesta a su ligando natural DHT. Sin embargo, a diferencia de GR (Figura 25), la sobreexpresión de PP5 no tuvo efecto alguno sobre la importación de AR (Figura 39).

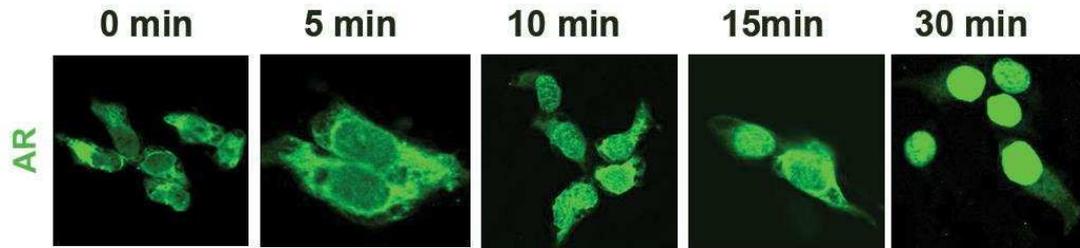


Figura 38. Importación nuclear de AR. Células HEK 293T transfectadas con el plásmido de expresión para AR e incubadas con 10 nM DHT durante distintos tiempos.

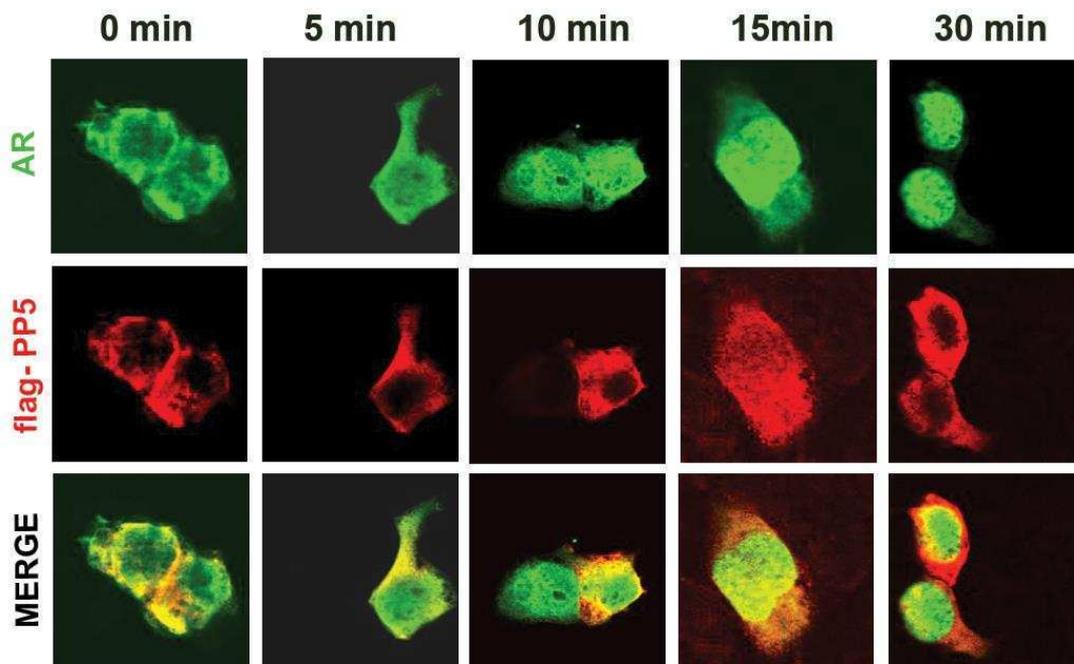


Figura 39. Importación nuclear de AR en presencia del PP5. Células HEK 293T fueron co-transfectadas con los plásmidos de expresión para AR y flag-PP5, e incubadas con 10 nM DHT durante distintos tiempos. PP5 fue revelado con un anticuerpo anti-flag seguido de un anticuerpo secundario marcado en rojo.

La falta de efecto de PP5 se repitió cuando se sobreexpresó a 14-3-3 σ (Figura 40). Ello llevaría a pensar que ni PP5 ni 14-3-3 σ forman complejos directos con AR. Para evaluar esta hipótesis, se realizaron ensayos de inmunoprecipitación de AR,

pero luego de numerosos intentos, no se pudieron recuperar complejos de Hsp90. Ello puede deberse a la inestabilidad de los mismos en sistemas libres de células o bien porque no participan del transporte. Los ensayos funcionales de competencia por sobreexpresión de factores TPR sugieren que este último podría ser el caso ya que al haberse realizado con células intactas, son independientes de la inestabilidad de los complejos en sistemas libres de células.

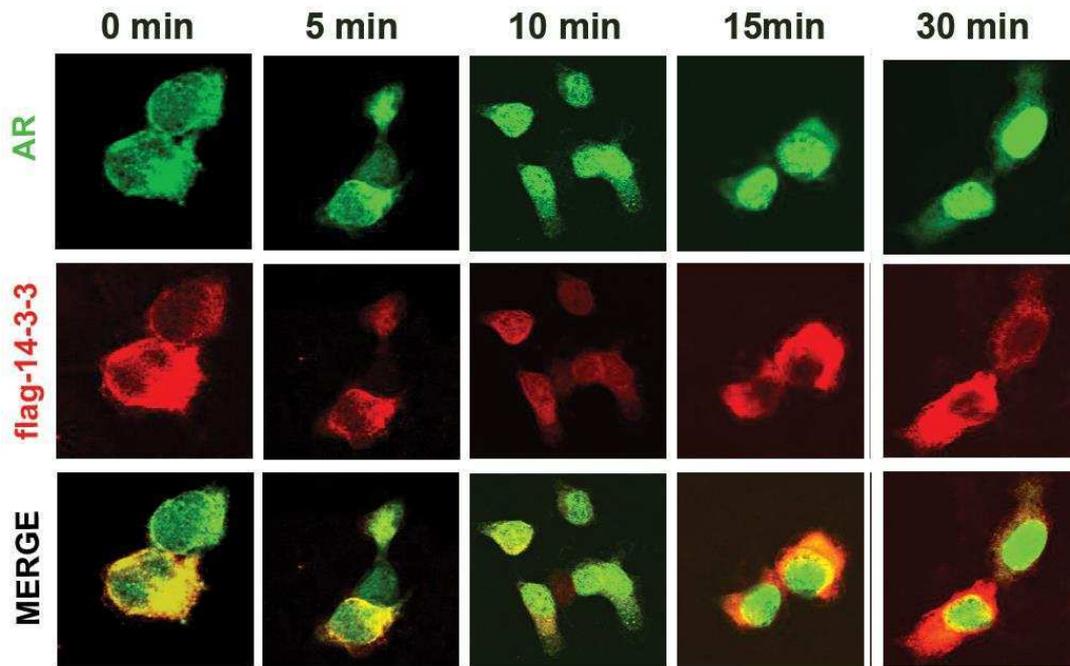


Figura 40. Importación nuclear de AR en presencia del 14-3-3 σ . Células HEK 293T co-transfectadas con los plásmidos de expresión para AR y flag-14-3-3 σ fueron incubadas con 10 nM DHT durante distintos tiempos. 14-3-3 fue evidenciado con un anticuerpo anti-flag seguido de un secundario marcado en rojo.

Al evaluarse el efecto de SGT1 α se encontró que, al igual que con PP5 y 14-3-3 σ tampoco afecta la importación de AR (Figura 41), lo que se condice con el caso de GR. Si bien en la bibliografía se describe la interacción de SGT1 α con AR [162] tanto como con Hsp90 β [159], no se consiguió co-inmunoprecipitar complejos donde las tres proteínas se encuentren presentes; al igual que con PP5 y 14-3-3 σ . La razón que puede explicar esta diferencia es que en estos antecedentes bibliográficos, los estudios se basaron en ensayos de doble híbrido y en interacciones entre proteínas purificadas.

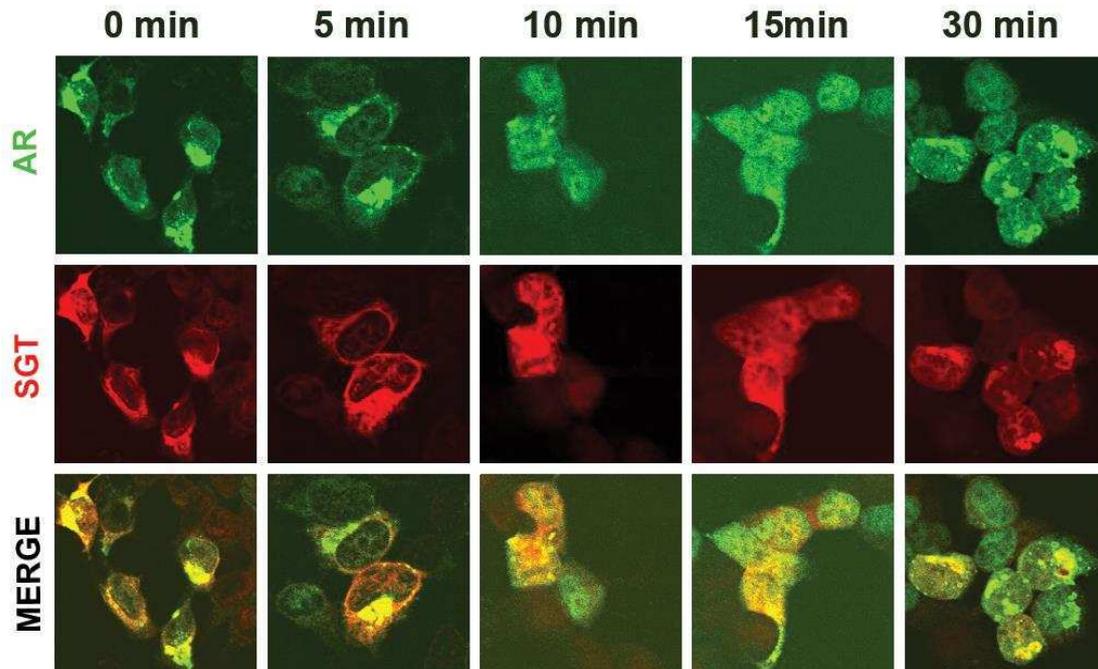


Figura 41. Importación nuclear de AR en presencia del SGT1 α . Células HEK 293T co-transfectadas con los plásmidos de expresión para AR y SGT1 α se incubadas con 10 nM DHT durante distintos tiempos. SGT1 α fue evidenciado con un anticuerpo anti-SGT1 seguido de un secundario marcado en rojo.

En base a los resultados obtenidos con GR para estas mismas proteínas TPR, y al hecho de que los ensayos funcionales por sobreexpresión de las mismas son independientes de la posibilidad de preservar complejos inestables, permiten sugerir que en lo que a transporte retrógrado se refiere, ninguna de las proteínas TPR estudiadas (PP5, 14-3-3 σ y SGT1 α) participaría de los complejos de AR ocupando el sitio de la proteína TPR requerida para el retrotransporte, i.e. FKBP52.

Por último, en la Figura 42 se muestran los resultados al sobreexpresar el dominio TPR de PP5. En amplia contraposición a lo esperado acorde a lo observado con GR, y previamente [40] con MR, no se afectó la importación de AR.

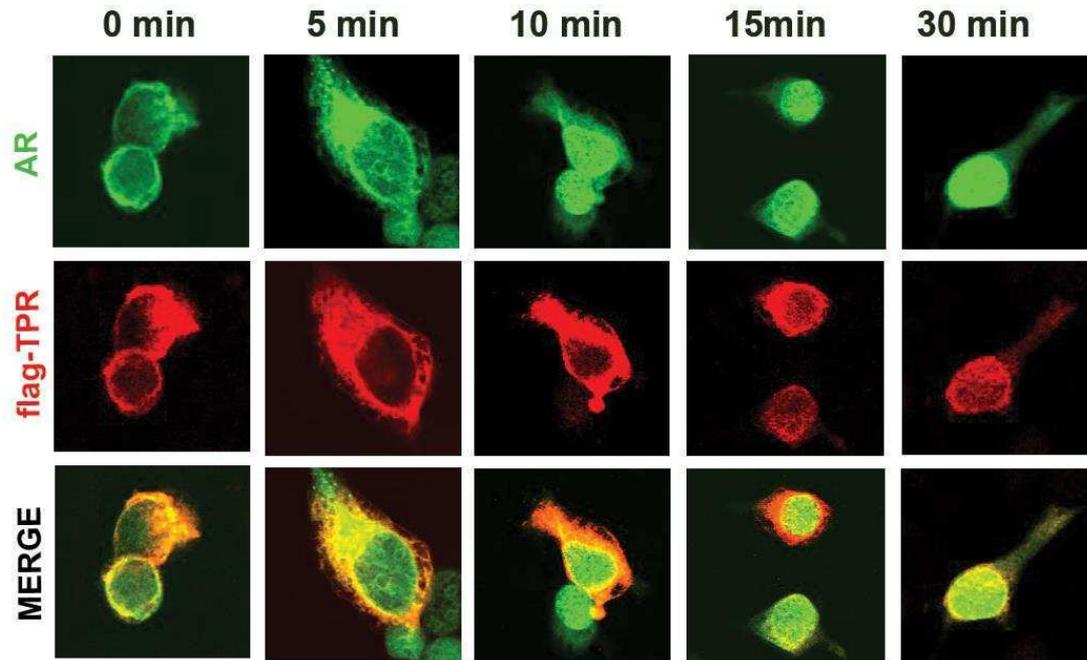


Figura 42. Importación nuclear de AR en presencia del dominio TPR de PP5. Células HEK 293T co-transfectadas con los plásmidos de expresión para AR y flag-TPR fueron incubadas con 10 nM DHT durante distintos tiempos. TPR fue evidenciado con un anticuerpo anti-flag seguido de un secundario marcado en rojo

En la Figura 43 se graficó el grado de acumulación nuclear de AR en función del tiempo de incubación con DHT. Se aprecia que las distintas proteínas TPR no afectaron la localización de AR, sugiriendo que la regulación del tránsito de AR no es enteramente equivalente al descrito para GR. Sin embargo, dado el efecto inhibitorio sobre el transporte de AR de drogas que afectan a Hsp90, tal como es el caso de GA (Figura 42), el mecanismo de transporte no debe ser totalmente independiente de Hsp90.

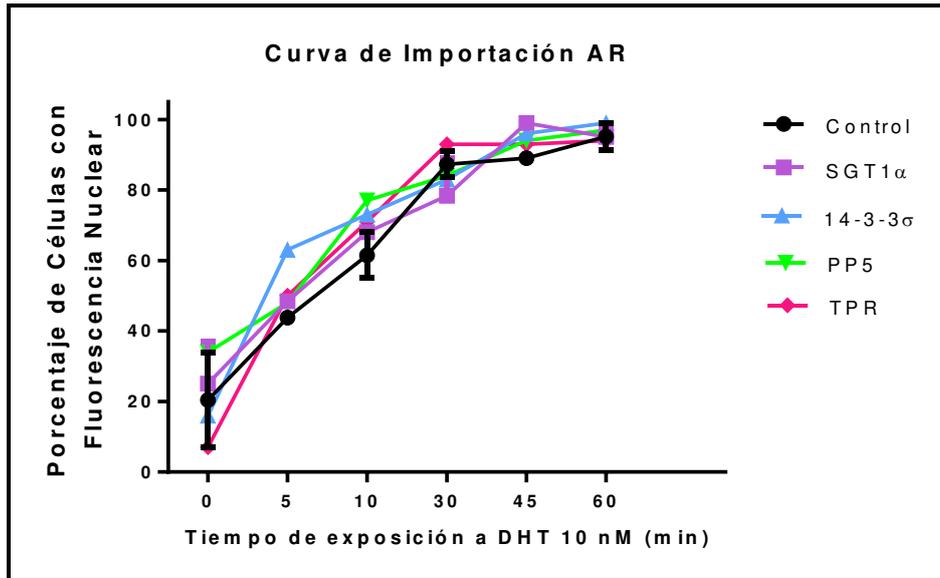


Figura 43. Curva de importación de AR (●) en presencia SGT1α (■), 14-3-3σ (▲), PP5 (▼) o del dominio TPR de PP5 (◆). Los resultados se expresan como el promedio de células con fluorescencia nuclear ± SEM (n=3) habiéndose contado 100 células en cada experimento.

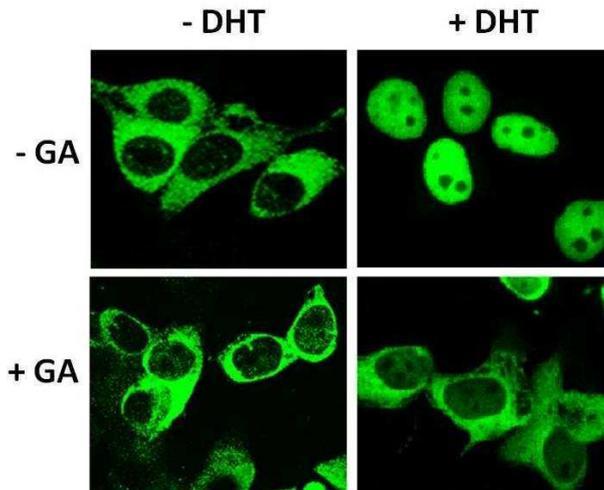


Figura 44. Efecto inhibitorio de geldanamicina (GA) sobre la capacidad de AR de translocar al núcleo. Células HEK 293T se transfectaron con AR y se mantuvieron en un medio libre de esteroide (suero adsorbido con carbón-dextrano). Luego se incubaron con 1 μM GA o solvente y 10 nM DHT durante 30 min. Las células se fijaron y se observaron por microscopía de fluorescencia luego de realizar una IFI para AR.

DISCUSIÓN

El transporte de proteínas solubles es un mecanismo fundamental para la célula. A través del mismo, se regula la localización y la función de una gran cantidad de factores relacionados con la transducción de señales, el desarrollo y la progresión tumoral, la muerte celular, etc. Existen numerosas patologías directamente relacionadas a la incorrecta localización de proteínas clave [209-212]. En este sentido, los RE son una excelente herramienta debido a la regulación de su localización celular de manera dependiente de ligando.

Los RE forman complejos multiproteicos con un grupo de chaperonas moleculares, entre ellas Hsp90 e IMM de alto peso molecular. Históricamente se consideró que la función de las chaperonas asociadas se restringía sólo a asegurar que el receptor se encontrara en un estado receptivo para la hormona e inactivo en el citoplasma. Por lo tanto al proceso de transformación (disociación del heterocomplejo) se lo consideró una condición *sine qua non* para que el receptor desnudo translocara, dimerizara y actuara como factor de transcripción. Durante más de 20 años estos conceptos se mantuvieron vigentes de manera heurística. Sin embargo, varios miembros de nuestro grupo contribuyeron con estudios pioneros en la elucidación de un modelo alternativo. El mismo sostiene que distintas proteínas del complejo juegan un rol clave en el transporte activo, la asociación y el paso a través del poro nuclear, e incluso el anclado del receptor al nucleoesqueleto. En particular, FKBP52 tiene un rol protagónico en cada uno de éstos procesos, siendo antagonizado por FKBP51. En consecuencia, es el balance relativo entre estas proteínas TPR lo que determinará si el proceso se encuentra favorecido o no.

Los resultados que se expusieron en el presente capítulo demuestran que la mera presencia del dominio TPR en la estructura de una proteína no es suficiente para asegurar su participación en el complejo que regula a los receptores de esteroides. Sea el caso de SGT1 α , que contando con tres dominios TPR [155, 156] y siendo capaz de interactuar con Hsp90 [156, 158], no reguló la importación ni la exportación de GR (Figuras 29 y 36) o la importación de AR (Figura 43) . Tampoco co-inmunoprecipitó junto a GR (Figura 30). Mientras que 14-3-3 σ , cuya estructura no posee un dominio TPR propiamente dicho sino que adquiere una conformación espacial equivalente

[141], reguló la importación y exportación de GR (Figuras 29 y 36) y se recuperó al co-immunoprecipitarlo (Figura 30). En cambio, no reguló de manera alguna la importación de AR (Figura 43). En este sentido se debe remarcar la importancia del ángulo que adquiere el dominio TPR y su curvatura en la interacción con otras proteínas. Sin embargo, no se han reportado estudios profundos sobre el tema. Lamentablemente las restricciones impuestas por los métodos de cristalografía actuales permiten una mirada cercana pero incompleta de las interacciones proteicas. Quizás en el futuro emerjan nuevas metodologías que permitan comprender mejor la interacción entre las proteínas TPR y Hsp90, y predecir tal vez su capacidad para regular el tráfico de proteínas solubles.

En suma, los resultados obtenidos en cuanto a la regulación de GR apoyan el modelo alternativo de translocación de RE vía proteínas TPR. Aquellas proteínas capaces de formar parte de los complejos, pero incapaces de unir dineína (como p.ej. 14-3-3 σ) tornan menos eficiente la localización nuclear de GR dependiente de ligando. El desplazamiento de FKBP52 del único dominio aceptor de TPR que posee Hsp90, disocia al heterocomplejo de la maquinaria necesaria para su transporte rápido. Sin embargo, en modo alguno se abolió la capacidad de receptor de llegar finalmente al núcleo, lo cual reafirma el concepto de la existencia de un mecanismo alternativo de transporte, lento e independiente de los participantes del heterocomplejo, el cual pensamos es la simple difusión a través del citosol.

La sobreexpresión del péptido TPR así como 14-3-3 σ favorecen la exportación nuclear del receptor. Este efecto se debería al desplazamiento del factor responsable de anclar al GR a la matriz nuclear: nuevamente FKBP52. Por otra parte PP5, al ser capaz de interactuar con dineína y con proteínas del poro nuclear por su propia cuenta no antagonizó a FKBP52, con la cual parece presentar redundancia funcional, aunque es menos eficiente. De hecho, su sobreexpresión provocó un aumento de la localización nuclear de GR de manera ligando independiente. Por último, SGT no parece integrar los heterocomplejos de GR a juzgar por el hecho que no afectó el retrotransporte del receptor ni su exportación. Esto indicaría su incapacidad de competir por el sitio aceptor de TPR de Hsp90.

En contraposición a lo esperado, los resultados obtenidos permiten cuestionar que el modelo de translocación sea el mismo para la regulación de la translocación de

AR. Ninguna de las proteínas ensayadas afectó la importación o la exportación (datos no mostrados) de AR. Sin embargo, inhibidores de Hsp90 como GA (Figura 44) o radicicol (no mostrado) impiden a tiempos cortos la acumulación nuclear de AR; el receptor sí logra acumularse en el núcleo a tiempos largos, > 1 h (no mostrado), presumiblemente porque el tránsito sigue el mecanismo alternativo de difusión. Por ende, no podemos asegurar que el proceso sea independiente de Hsp90.

Si bien estos experimentos se focalizaron en el transporte de RE exclusivamente vía la asociación de Hsp90•FKBP52 con dineína, dada la gran cantidad de proteínas clientes de Hsp90, los resultados obtenidos adquieren una relevancia más amplia. Recordemos que de manera similar a los RE, Hsp90 regula la actividad de proteínas relacionadas con la infección viral, inmunidad innata, transducción de señales, progresión del ciclo celular, apoptosis, regulación transcripcional, respuesta a estrés, replicación, transcripción, metabolismo y reparación del ADN, procesamiento del ARN, remodelación de la cromatina y el desarrollo y progresión tumoral [58-70]. Un estudio reciente en el que se estudió el proteoma de Hsp90 demostró la existencia de más de 400 proteínas que son reguladas por Hsp90 [213], lo que representa el 61% de las proteína-quinasas, el 7% de los factores de transcripción y el 31% de las ubiquitina-ligasas de la célula.

CAPITULO 2

Efecto de las Proteínas con dominio TPR sobre Actividad Transcripcional de los Receptores Nucleares

2 EFECTOS DE LAS PROTEÍNAS CON DOMINO TPR SOBRE LA ACTIVIDAD TRANSCRIPCIONAL DE RECEPTORES NUCLEARES

2.1 RECEPTOR DE GLUCOCORTICOIDES

Como el resto de los RE, GR es un factor de transcripción dependiente de ligando. Esto permite que actúe como intermediario entre el medio externo y la respuesta celular, a través de la regulación de la expresión de una gran cantidad de genes. Sin embargo, no todas las células responden de igual manera ante el mismo estímulo, y eso depende de los mecanismos de regulación de la vía que posea cada célula. Como ejemplo se puede mencionar a las IMMs FKBP51 y FKBP52 que ejercen efectos contrarios sobre la actividad de GR, como ya se detalló profusamente. Mientras que FKBP51 ejerce un efecto inhibitorio, FKBP52 potencia la actividad de GR [116]. La relación de expresión de ambas proteínas puede modificar la sensibilidad de la célula ante el estímulo. En consecuencia, se decidió evaluar la capacidad de otras proteínas TPR de regular la actividad transcripcional de GR.

Existen ciertas controversias respecto al efecto que PP5 ejerce sobre la regulación de GR. Chen *et al.* [128] han reportado que al utilizar una mutante de PP5 que actúa como dominante negativo, la actividad transcripcional de GR se inhibe; estos resultados sugieren que PP5 es un regulador positivo. Por otra parte, según Zuo *et al.* [131] demostraron que al silenciar la expresión de PP5 con un oligonucleótido anti-sentido se obtuvo un aumento de la actividad de GR, confiriéndosele entonces a PP5 un efecto negativo sobre la regulación de GR. Sin embargo, con el mismo abordaje experimental, Wang *et al.* [130] reportaron resultados opuestos.

En esta sección de nuestros estudios nos valimos de los ensayos de gen reportero descritos en la sección Métodos 11.- con el fin de dilucidar el rol de PP5 en la regulación transcripcional del receptor. Los resultados representados en la Figura 45 muestran que la actividad transcripcional de GR modulada por PP5 es de naturaleza bifásica. Es decir, a bajos niveles de sobreexpresión de PP5 se observa un incremento sobre la actividad transcripcional de GR inducida por Dexa; dicho incremento se revierte a concentraciones mayores de PP5. Especulamos que en esta segunda parte de la curva, el exceso de PP5 provocaría la “titulación” de otros factores necesarios

que se verían secuestrados ante la sobreexpresión de PP5, impidiendo así la formación de una correcta unidad funcional. Se podría entonces concluir que PP5 tendría un efecto estimulante sobre la actividad de GR, el cual parece estar autorregulado por retroalimentación frente la sobreexpresión de PP5.

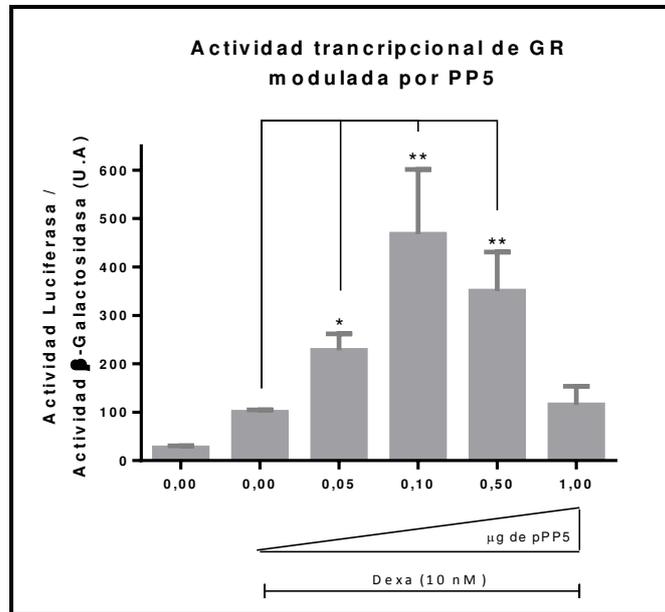


Figura 45. Efectos de PP5 sobre la actividad transcripcional de GR. Células HEK 293T fueron co-transfectadas con plásmidos de expresión para GR, MMTV-Luc, β -Gal, PP5 y pCDNA3. La inducción se llevó a cabo por incubación con 10 nM Dexa. Los resultados se expresan en unidades arbitrarias (U.A) como la media \pm ES, de al menos tres experimentos independientes realizados cada uno por cuadruplicado. * Diferencia significativa ($p = 0.018$). ** Diferencia significativa ($p < 0.001$).

Kino *et al.* [143] reportaron previamente que en células deficientes en 14-3-3 σ la actividad de GR se ve incrementada, lo que se revierte de manera parcial al transfectarlas con un plásmido de expresión para 14-3-3 σ . Sin embargo, 14-3-3 σ puede sufrir amplias variaciones en su nivel de expresión acorde al tipo celular considerado, a las condiciones de crecimiento, o al momento del ciclo celular en el que esas células se encuentren; fue por estos motivos que se decidió evaluar de manera más integral si la actividad biológica es dependiente del grado de expresión. En la Figura 46 se muestra que 14-3-3 σ también muestra un comportamiento similar al de PP5. La sobreexpresión de pequeñas cantidades de 14-3-3 σ ejerce un efecto positivo sobre la actividad del receptor inducida por hormona, el cual se pierde al aumentar concentración de 14-3-3 σ hasta volverse inhibitorio.

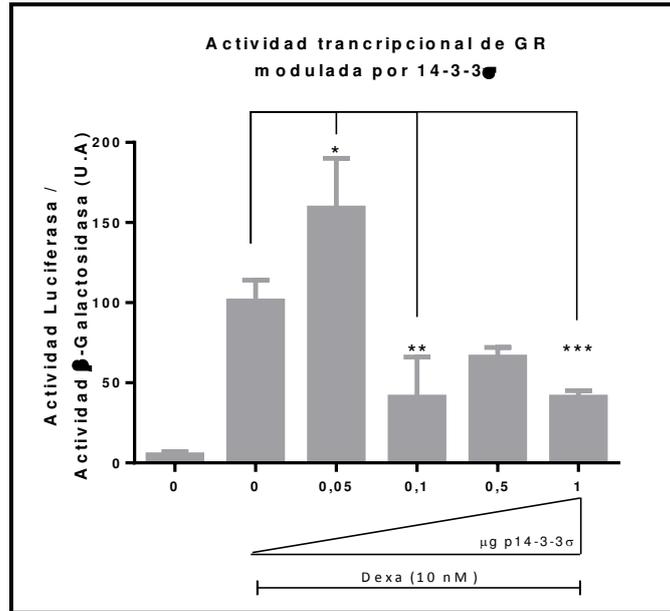


Figura 46. Efectos de 14-3-3σ sobre la actividad transcripcional de GR. Se procedió como en la Figura 45 pero co-transfectando con 14-3-3σ. Los resultados expresan la media ± ES, de al menos tres experimentos independientes realizados cada uno por cuadruplicado. * Diferencia significativa ($p = 0.040$). . ** Diferencia significativa ($p = 0.036$). . *** Diferencia significativa ($p = 0.042$).

Al analizar la influencia de SGT1α sobre la actividad transcripcional de GR, se observó un efecto inhibitorio que es concentración dependiente (Figura 47). Estos resultados son consistentes con los que se obtuvieron en modelos de levaduras y células de mamífero, recientemente publicados [214]. Teniendo en cuenta que SGT1α no fue recuperado como parte del complejo GR-Hsp90 en los ensayos de inmunoprecipitación, y que no afecta el transporte del receptor hacia o desde el núcleo, se infiere entonces que SGT1α regula la respuesta de GR a nivel de la maquinaria transcripcional

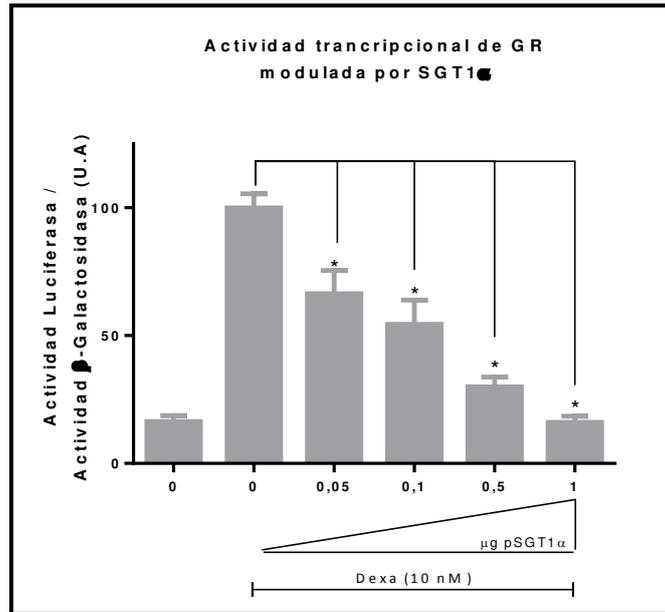


Figura 47. Efectos de SGT1 α sobre la actividad transcripcional de GR. Se procedió como en la Figura 45 pero co-transfectando con SGT1 α . Los resultados expresan la media \pm ES, de al menos tres experimentos independientes realizados cada uno por cuadruplicad. * Diferencia significativa ($p < 0.001$).

2.2 RECEPTOR DE ANDRÓGENOS

El receptor de andrógenos (AR) es otro miembro de la familia de receptores de esteroides que juega un rol importante en el desarrollo del cáncer de próstata (CP) y en la transición a cáncer de próstata resistente a castración (CPRC) [215-217]. Existen numerosos trabajos cuyo objetivo se enfoca en el estudio de la vía de señalización de AR y los factores que la integran. Quayle *et al.* [144] han publicado que 14-3-3 σ , en ausencia de hormona, estimula la actividad transcripcional de AR de manera concentración-dependiente; sin embargo, no ejerce ningún efecto al estimular con el agonista R1881. En la Figura 48 se muestra que 14-3-3 σ ejerce un efecto inhibitorio sobre la actividad transcripcional de AR hormono-dependiente, al ensayar las mayores concentraciones. Cabe remarcar que no observamos diferencias en las mediciones basales en ausencia de DHT. Adjudicamos las diferencias, entre los resultados obtenidos y lo descrito en la literatura, al diseño experimental empleado. La mayor concentración de plásmido utilizada por Quayle en su trabajo equivale a un punto de nuestra curva en donde no se observa efecto respecto del control no transfectado con 14-3-3 σ . Los resultados obtenidos sugieren un efecto inhibitorio de 14-3-3 σ sobre la

regulación de AR, siendo consistentes con el silenciamiento epigenético del promotor de 14-3-3 σ que caracteriza a las células de CP (tanto líneas celulares como muestras de pacientes) [218].

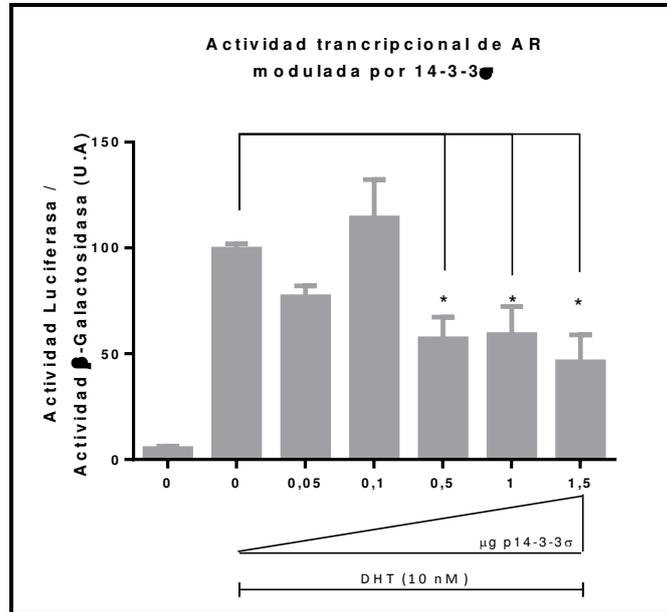


Figura 48. Efectos de 14-3-3 σ sobre la actividad transcripcional de AR. Células HEK 293T fueron co-transfectadas con plásmidos de expresión para AR, PSA-Luc, β -Gal, 14-3-3 σ y pCDNA3. La inducción se llevó a cabo por incubación con 10 nM de DHT. Los resultados se expresan en unidades arbitrarias (U.A.) como la media \pm ES, de al menos tres experimentos independiente realizados cada uno por cuadruplica. * Diferencia significativa ($p < 0.001$).

En el caso de SGT1 α , los efectos que se le atribuyen en la bibliografía sobre la actividad de AR son variables. A través de ensayos de genes reporteros, tanto en células de mamífero como en levaduras, se obtuvo como resultado una inhibición sobre la actividad de AR al sobreexpresar SGT1 α [162, 214, 219]. Consistentemente con estos resultados, Buchanan ha descrito una disminución en la expresión de esta proteína TPR durante la progresión del CP [162]. Sin embargo, en el trabajo de Trotta se observó que el silenciamiento de SGT en una línea celular de CP suprime la proliferación celular y la expresión de genes de respuesta a andrógenos [220]. En la Figura 49 se observa que, en el modelo y las condiciones experimentales con el que trabajamos, SGT1 α ejerció un leve efecto inhibitorio sobre la actividad del receptor a lo largo de todo el rango de concentraciones ensayadas.

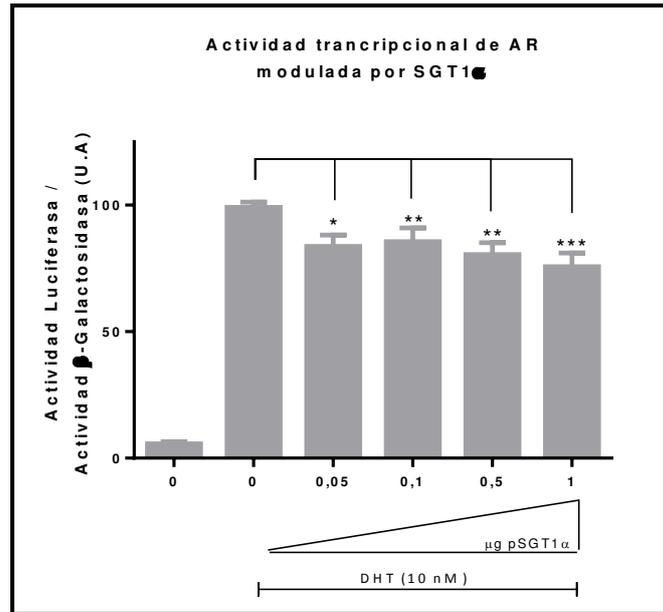


Figura 49. Efectos de SGT1α sobre la actividad transcripcional de AR. Se procedió como en la Figura 48 pero co-transfectando con SGT1α. Los resultados expresan la media ± ES, de al menos tres experimentos independientes realizados cada uno por cuadruplicado. * Diferencia significativa ($p = 0.009$). ** Diferencia significativa ($p = 0.020$). * Diferencia significativa ($p < 0.001$).**

Como los datos de la literatura son controvertidos para ambas proteínas TPR, y con el fin de evaluar la posible modulación conjunta sobre la actividad de AR por estos dos factores realizamos un nuevo ensayo de gen reportero transfectando de manera simultánea 14-3-3σ y SGT1α con una cantidad constante del plásmido de expresión de una otra proteína TPR y variable de la otra. Para 14-3-3σ se escogió una cantidad de plásmido de 0,05 μg que provoca una ligera inhibición del 25% con el fin de tener margen de detección por posibles efectos inhibitorios potenciadores en presencia de SGT1α. La Figura 50 muestra que el efecto de 14-3-3σ sobre la actividad de AR no se ve significativamente modulada por SGT1α en todo el rango de concentraciones ensayado. A su vez, si comparamos con la curva de SGT1α sola de la Figura 46, ese nivel de expresión de 14-3-3σ tampoco influye sobre SGT1α.

En el experimento inverso, se fijó la cantidad de plásmido de SGT1α en 0,1 μg por pocillo, y se varió la cantidad de 14-3-3σ, no observándose nuevamente un efecto apreciable sobre la actividad transcripcional de AR si se lo compara con lo mostrado en la Figura 48. En conclusión, estas dos proteínas sobre las que existen reportes confusos y hasta contradictorios no parecen influir significativamente sobre la actividad

transcripcional de AR de manera conjunta. Dadas las características particulares presentadas por ellas, en particular el hecho de que 14-3-3 σ muestre un comportamiento bifásico con GR, podría explicar las razones por las que en la literatura existe tal variedad de datos discordantes, los que se podrían atribuir a las condiciones experimentales ensayadas en cada trabajo individual. Debe destacarse que en ninguno de ellos se realizaron las curvas concentración-respuesta que se muestran aquí sino que siempre se trabajó a valores de expresión fijos.

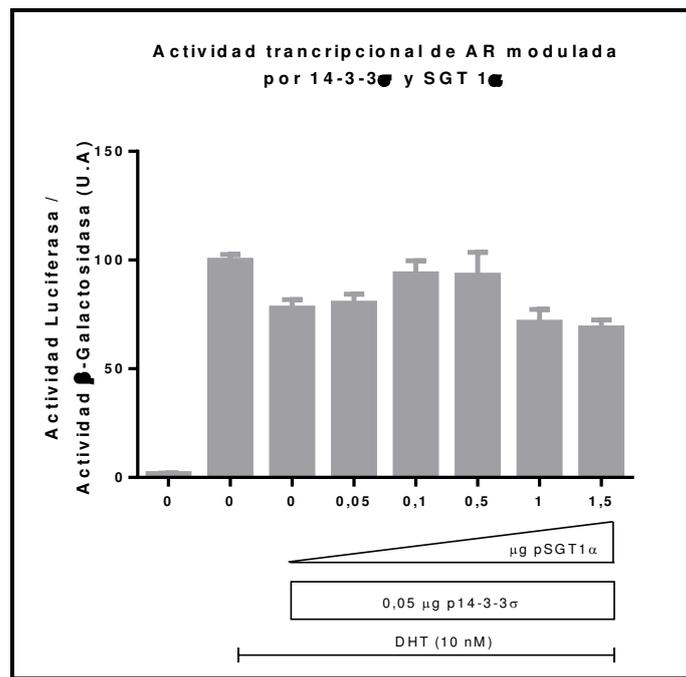


Figura 50. Efectos de SGT1 α sobre la actividad transcripcional de AR modulada por 14-3-3 σ . Células HEK 293T fueron co-transfectadas con plásmidos de expresión para AR, PSA-Luc, β -Gal, 14-3-3 σ , cantidades crecientes de SGT1 α y pCDNA3. La inducción se llevó a cabo por incubación con 10 nM de DHT. Los resultados se expresan en unidades arbitrarias (U.A.) como la media \pm ES, de al menos tres experimentos independiente realizados cada uno por cuadruplica.

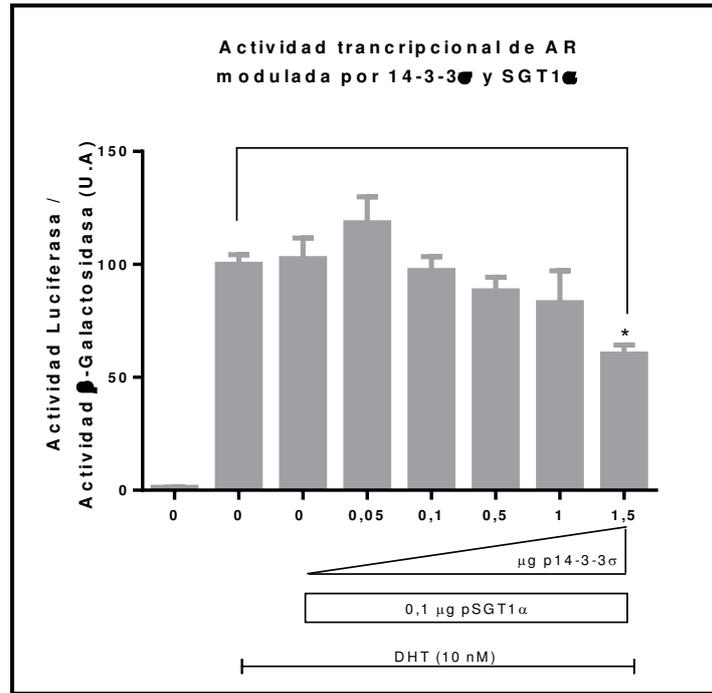


Figura 51. Efectos de 14-3-3σ sobre la actividad transcripcional de AR modulada por SGT1α. Células HEK 293T fueron co-transfectadas con plásmidos de expresión para AR, PSA-Luc, β-Gal, SGT1α, cantidades crecientes de 14-3-3σ y pCDNA3. La inducción se llevó a cabo por incubación con 10 nM de DHT. Los resultados se expresan en unidades arbitrarias (U.A.) como la media ± ES, de al menos tres experimentos independiente realizados cada uno por cuadruplica. * Diferencia significativa (p < 0.001).

La Figura 52 representa los resultados obtenidos al evaluar el efecto de la sobreexpresión de PP5 sobre la actividad transcripcional de AR. En la misma se puede apreciar que al transfectar las células con las bajas cantidades de plásmido que codifica para PP5 se observa un efecto inhibitorio ligero (~20-25%) pero constante y estadísticamente significativo, mientras que al aumentar su expresión se observa un significativo efecto estimulador sobre la actividad de AR. Se recuerda que PP5 también mostró con GR una curva concentración-dependiente de naturaleza bifásica (Figura 42), pero opuesta en su comportamiento a la que aquí se obtuvo con AR, es decir, para GR se observa incremento de la actividad seguido de inhibición (o pérdida de tal estímulo). Ello podría tener importancia funcional en el caso del balance de actividad AR (pro-oncogénico) / GR (anti-oncogénico) para el caso de la regulación de ambos receptores por PP5 en las células prostáticas, en las cuales se ha reportado un mayor grado de expresión de PP5 respecto de las líneas celulares normales [221] así

como una mayor actividad de fosfatasa (presumiblemente por su asociación a caveolina-1) [222].

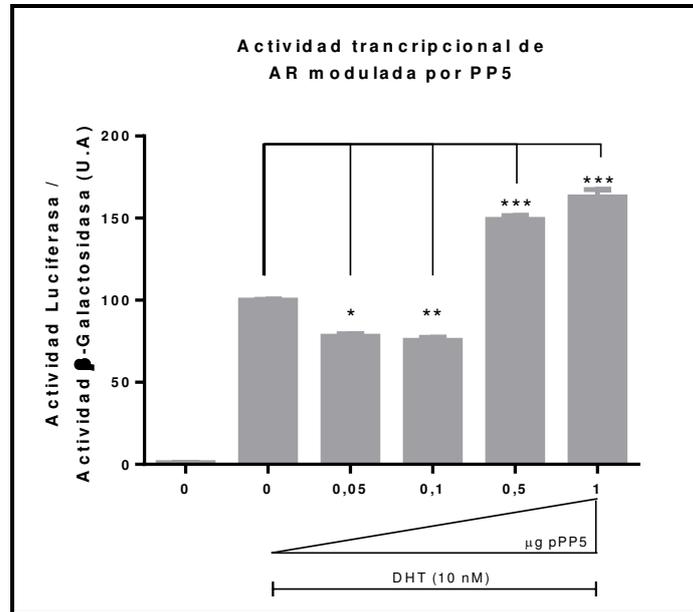


Figura 52. Efectos de PP5 sobre la actividad transcripcional de AR. Se procedió como en la Figura 48 pero co-transfectando con 14-3-3σ. Los resultados expresan la media ± ES, de al menos tres experimentos independientes realizados cada uno por cuadruplicado. * Diferencia significativa ($p = 0.020$). ** Diferencia significativa ($p = 0.010$). *** Diferencia significativa ($p < 0.001$).

DISCUSIÓN

Según los resultados que se mostraron en este capítulo, tanto PP5 como 14-3-3σ muestran una modulación bifásica sobre la actividad transcripcional de GR (Figuras 45 y 46). Lo cual significa que el efecto final sobre el receptor se encuentra condicionado por el nivel de expresión de la proteína, explicándose así las controversias encontradas en la literatura. En cambio, SGT1α mostró un efecto inhibitorio concentración-dependiente sobre la actividad transcripcional de GR (Figura 47). Cabe destacar que SGT1α no pudo ser recuperado con los heterocomplejos de GR-Hsp90, no obstante lo cual regula la actividad transcripcional de GR, razón por la que especulamos su mecanismo debe ser a nivel de la maquinaria transcripcional y/o en el

sitio promotor, tal como hemos demostrado recientemente que ocurre con otras proteínas TPR como FKBP51 y FKBP52 para otros factores como NF- κ B [185]. Es posible que estas proteínas regulen a GR a través de la interacción directa con otros coreguladores de la transcripción, o bien a través del control del grado de fosforilación que ejerce PP5 [130].

En el caso de AR se obtuvieron resultados cuya intensidad de efecto fue mucho menor en comparación con GR para los casos de 14-3-3 σ y SGT1 α (Figuras 48, 49). En cuanto a PP5 (Figura 52) mostró de manera análoga a lo visto con GR una curva concentración-dependiente de naturaleza bifásica (Figura 45), pero opuesta en su efectos, es decir, para GR se observa incremento de la actividad seguido de inhibición (o pérdida de tal estímulo), mientras que para AR se observó una ligera inhibición seguida de activación a niveles de expresión más altos. Ello podría tener importancia funcional en el caso del balance de actividad AR (pro-oncogénico) / GR (anti-oncogénico) para la regulación de ambos receptores por PP5 en células prostáticas, en las cuales se ha reportado un mayor grado de expresión de PP5 respecto de células prostáticas normales [221] así como una mayor actividad de fosfatasa (presumiblemente por su asociación a caveolina-1) [222].

Ambos receptores son de suma importancia en el desarrollo y progresión del cáncer de próstata resistente a castración, donde la señalización de GR compensa la disminución de la vía de AR provocada por el tratamiento antiandrogénico. En este contexto cobra relevancia el estudio de las proteínas TPR, las cuales sufren drásticos cambios de expresión en dicha patología. Además del caso comentado de PP5, 14-4-3 σ se encuentra fuertemente silenciada en líneas celulares y en muestras de pacientes [218], mientras que SGT1 α ve disminuida su expresión durante la progresión del cáncer de próstata [162].

CAPITULO 3

Inhibidores de Hsp90

3 INHIBIDORES DE HSP90

Uno de los mayores desafíos que presenta el campo de las proteínas TPR en general y las inmunofilinas en particular es su potencial como blanco farmacológico [95, 223]. El mayor problema en tal sentido radica en la inespecificidad de las pocas drogas existentes respecto de la IMM blanco y al hecho de que todas ellas son inmunosupresoras, un efecto secundario ciertamente indeseado si se las quiere usar con otros fines. Tanto la ciclosporina (que reconoce a ciclofilinas) como FK506 y rapamicina, drogas que reconocen a las IMM de la subfamilia FKBP, son incapaces de mostrar selectividad por su blanco. Por ejemplo, las K_i de estas drogas por FKBP51 Y FKBP52 son equivalentes [106, 224-227], tal que, a manera de ejemplo, si se deseara suprimir la acción inhibitoria que muestra FKBP51 para activar a GR no se podría evitar inhibir simultáneamente la acción estimulante que posee FKBP52 por el mismo receptor. En otras palabras, terapias de este tipo no podrían llevarse a cabo sin consecuencias que hasta podrían ser opuestas al problema que se quiere solucionar o atenuar. Para abordar este inconveniente con un procedimiento alternativo, nos focalizamos en Hsp90. Sabemos que tratamientos de proteínas purificadas o células intactas con los inhibidores específicos de Hsp90 geldanamicina (GA) o radicicol, inactivan a los complejos Hsp90•proteína TPR sin que la proteína TPR se disocie de la chaperona, simplemente se inactiva al complejo funcional como un todo. Por ende, la alternativa farmacológica sería utilizar a este otro componente del complejo activo con el que las IMM forman tal unidad funcional, la chaperona Hsp90.

Entre los roles primordiales de Hsp90 se cuenta estabilizar de manera ATP-dependiente la conformación activa de proteínas-cliente que ya poseen una estructura terciaria estable [228]. A lo largo de esta tesis se ha mencionado la importancia de Hsp90 en las vías de señalización de los RE. Sin embargo, en este punto cabe remarcar que la relevancia de Hsp90 trasciende a la formación de complejos con los RE, dado que su acción regula la función de un inmenso número de proteínas clientes [229]. Una gran cantidad de las mismas está involucrada en el desarrollo y progresión tumoral, y por ello Hsp90 se ha convertido en un blanco importante en el tratamiento contra el cáncer [84, 95, 230, 231]. Dado que asiste a su estabilización, se considera a la célula tumoral “adicta” a Hsp90 [232, 233]; por lo cual se propone que como consecuencia de

la inhibición de esta chaperona la célula tumoral perdería la protección que ésta le confiere. Un dato interesante es el hecho aún no descifrado en sus bases biológicas de que las células tumorales son más sensibles a la inhibición de Hsp90 que las células no tumorales. Los tratamientos de animales y humanos con inhibidores de Hsp90, demostraron que tales drogas se acumulan consistentemente en los tumores, mientras que no aparecen o lo hacen en menor cuantía en la mayoría de los tejidos normales [234-240].

De Boer en 1970 purificó a partir de *Streptomyces hygroscopicus* una benzoquinona ansamicina con propiedades antibióticas: la geldanamicina (GA) [241]. Posteriormente a esta molécula se le atribuyeron propiedades antitumorales, y se demostró que inhibe la actividad ATPasa de Hsp90 al unirse al bolsillo de unión a ATP (ver Figura 5) [55, 242, 243]. Sin embargo, a pesar de sus potentes efectos antitumorales, no pudo ser utilizada en la clínica fundamentalmente debido a su elevada toxicidad. Al ser una molécula muy poco polar (Figura 7) también presenta baja solubilidad en medios acuosos, inestabilidad in vivo, genera altos niveles de ROS gracias a su anillo de quinona y mostró una alta toxicidad hepática y renal en modelos animales [244, 245]. En la actualidad, han sido ensayados en “*clinical trials*” una gran cantidad de inhibidores de la actividad ATPasa de Hsp90 con resultados diversos [207], pero que mostraron todos ellos efectos secundarios indeseados de manera muy temprana debiéndose suspender los ensayos. Existen al presente una docena de compuestos en estudio [207], pero ninguno de ellos ha mostrado hasta ahora los efectos esperados. Al presente, laboratorios de investigación y compañías farmacéuticas están abocadas al diseño y síntesis de nuevas moléculas que optimicen las propiedades farmacocinéticas, farmacodinámicas y toxicológicas de los posibles agentes terapéuticos. En este contexto el Dr. Sayan Dutta Gupta y su grupo de la Universidad de Osmania (Hyderabad, India), diseñaron por modelado computacional (*molecular docking*) y luego sintetizaron, un conjunto de nuevos compuestos ideados como potenciales inhibidores de la actividad ATPasa de Hsp90 [246, 247].

Según los antecedentes el resorcinol se comporta como un buen agente de interacción del dominio de unión al ATP de Hsp90 [248-250]. Además, se acepta que produce menos efectos tóxicos que otros precursores, como quinonas, halopirimidinas, etc. [251]. Por otro lado, ciertas bases de Schiff como iminas o

azometinas presentan propiedades citotóxicas sobre células tumorales [252], y algunas mostraron un moderado efecto sobre la actividad de Hsp90 [253]. Teniendo en cuenta dichos antecedentes, se diseñaron una serie de compuestos que en su mayoría son derivados del 2,4-dihidroxibenzaldehído o del 5-cloro-2,4-dihidroxibenzaldehído. En el laboratorio de nuestro colaborador, el Dr. Gupta, se realizaron estudios *in silico* a fin de predecir la capacidad del compuesto sintético para unirse a Hsp90, y en base a esos resultados se sintetizaron aquéllos que resultaron más prometedores [246, 247].

En la presente sección se muestran los resultados que se obtuvieron al ensayar la actividad biológica de los compuestos diseñados por el Dr. Gupta, los que fueron arbitrariamente nombrados de S1 a S48 según el orden de síntesis y cuyas estructuras se muestran en Métodos sección 17. Se evaluó la capacidad de estas drogas de inhibir la actividad ATPasa de Hsp90 y su potencia farmacológica para inhibir algunos de los procesos regulados por esta chaperona.

3.1 EFECTO DE LOS COMPUESTOS SOBRE LA ACTIVIDAD ATPASA DE HSP90 β

En primera instancia se evaluaron los efectos directos sobre la actividad ATPasa de Hsp90 β . Para ello, se cuantificó la liberación de fosfato inorgánico por acción de la proteína purificada, en presencia de diferentes concentraciones de cada compuesto (0,1 μ M, 1 μ M y 5 μ M). En paralelo a los compuestos se evaluó el efecto de GA, como un referente control de la inhibición de la actividad enzimática ATPasa [86, 254-257].

En la Figura 53 se muestran los resultados de los compuestos más representativos de las 48 drogas ensayadas a fin de hacer más simple la visualización e interpretación de los resultados, siendo que muchos de ellos presentan propiedades equivalentes y sería redundante saturar de gráficos este trabajo.

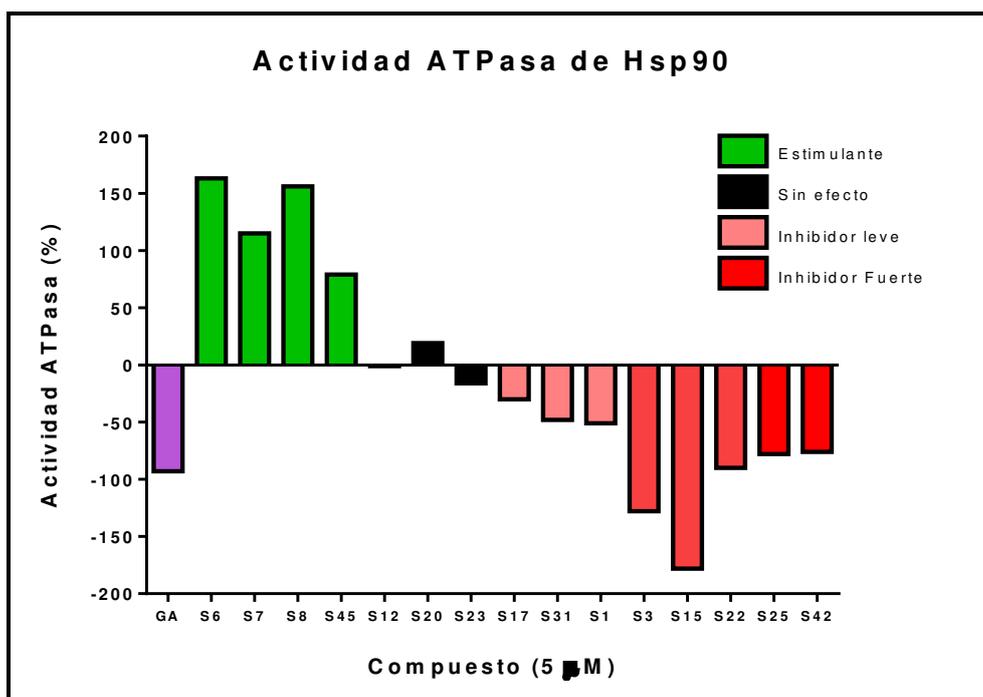


Figura 53: Efecto sobre la actividad ATPasa de Hsp90 β . La actividad de Hsp90 β fue medida en ausencia de compuesto (control) se consideró el 100% de actividad ATPasa. La actividad medida en presencia de los compuestos fue relativizada al control. Los resultados se expresan como la diferencia entre el porcentaje de actividad de Hsp90 obtenido en presencia del compuesto y el medido en el control. El blanco de reacción (extractos bacterianos no inducidos para Hsp90 β sometidos al mismo proceso de purificación) no mostró actividad de fosfatasa bacterianas contaminantes. Con fines comparativos, se muestra el efecto de GA (violeta).

A las drogas estudiadas se las clasificó en cuatro grupos según su efecto sobre la actividad ATPasa de Hsp90 β : Sin efecto (barras negras), Estimulantes (barras verdes), Inhibidores Débiles (barras rosadas) e Inhibidor Fuertes (barras rojas). La Tabla 4 resume esta clasificación (ver las estructuras químicas en las Figuras 17 a 22, en donde las drogas también fueron agrupadas funcionalmente). Variaciones menores al 20% respecto a la actividad ATPasa de Hsp90 en ausencia de compuesto se clasificaron dentro del grupo Sin efecto, mientras que inhibiciones por debajo del 50% se clasificaron como Inhibidores débiles.

TABLA 4: Agrupación de los compuestos en función de su efecto sobre la actividad ATPasa de Hsp90 β .

GRUPO		COMPUESTO
SIN EFECTO		S10, S12, S19, S20, S23, S24.
ESTIMULANTE		S5, S6, S7, S8, S45
INHIBIDOR	DÉBIL	S1, S17, S28, S31, S32, S35, S36, S37
	FUERTE	S2, S3, S4, S9, S11, S13, S14, S15, S16, S18, S21, S22, S25, S27, S29, S30, S33, S34, S38, S39, S40, S41, S42, S43, S44, S46, S47, S48

Variaciones menores al 20%, respecto a la condición sin tratamiento, se consideraron sin efecto. Inhibiciones por debajo del 50% se consideraron débiles.

Tal como se esperaba, la mayoría de los compuestos ensayados ejerció efecto inhibitorio sobre la actividad ATPasa de Hsp90 β , ya sea igualando la acción de la GA (S22, S25 y S42) o bien superándola como en los casos de S3 y S15. De manera sorprendente, cinco compuestos mostraron sistemáticamente efecto estimulante de la actividad de ATPasa de Hsp90 β , lo cual resulta más difícil de justificar.

El análisis de las estructuras químicas de los compuestos ensayados (Métodos, sección 17) no reveló una relación directa entre la presencia o ausencia del cloro en la posición 5 del 2,4-dihidroxibenzaldehído, y su efecto sobre la actividad ATPasa de Hsp90 β . A igual conclusión se arribó cuando se evaluaron para estos compuestos otros parámetros no incluidos en este trabajo pero que ya hemos publicado con el Dr. Gupta

[246, 247], tales como el *Crash Index* (capacidad de la molécula de penetrar el sitio activo de la proteína), *Polar-score* (evidencia el grado de interacciones polares entre proteína y ligando), *G-score* (evidencia el grado de asociaciones por puente de H entre proteína y ligando), *D-score* (evidencia el grado de interacciones de van der Waals entre proteína y ligando), *PMF-score* (evalúa las energías libres de interacción ligando-proteína), *Chem-score* (evalúa de manera integral la capacidad de generar puentes de H, la entropía rotacional de la molécula, la capacidad de ejercer contactos lipofílicos, y la interacción con metales), y *Total-score* (combinación de todos los anteriores).

3.2 EFECTO DE LOS COMPUESTOS SOBRE LA VIABILIDAD DE CÉLULAS DE CÁNCER DE PRÓSTATA

A continuación, se evaluó el efecto de los compuestos sobre la viabilidad de células tumorales. Para ello, se utilizó un modelo de cáncer de próstata resistente a la castración (CPRC), la línea celular PC3. Las células se trataron por 48 hs. con distintas concentraciones de cada droga, utilizándose a la GA como patrón de comparación. En las Figuras 54, 55, 56 y 57 se graficaron los resultados obtenidos. Notar que los compuestos fueron agrupados siguiendo la misma clasificación que para la actividad de ATPasa mostrada en la Tabla 4 a fin de facilitar la eventual asociación entre tal efecto biológico y la viabilidad celular.

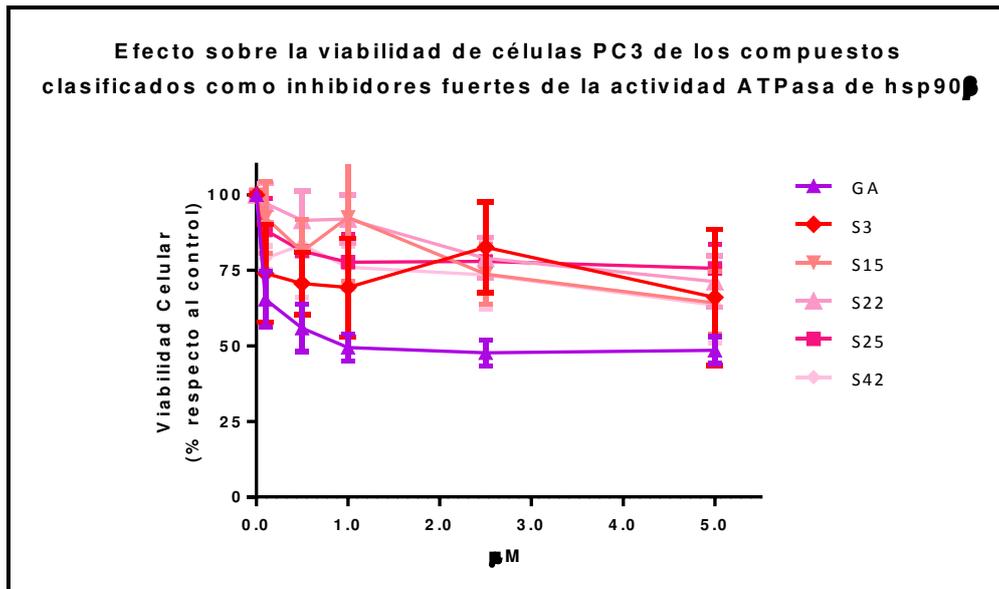


Figura 54. Efecto de los compuestos sobre la viabilidad de células PC3 de cáncer de próstata. Se grafican las curvas de aquellas drogas clasificadas como “inhibidores fuertes” de la actividad ATPasa de Hsp90. Los resultados se expresan como el promedio \pm ES del porcentaje de viabilidad celular respecto a las células tratadas con vehículo (grupo control) en función de concentración del compuesto, de al menos tres experimentos independientes.

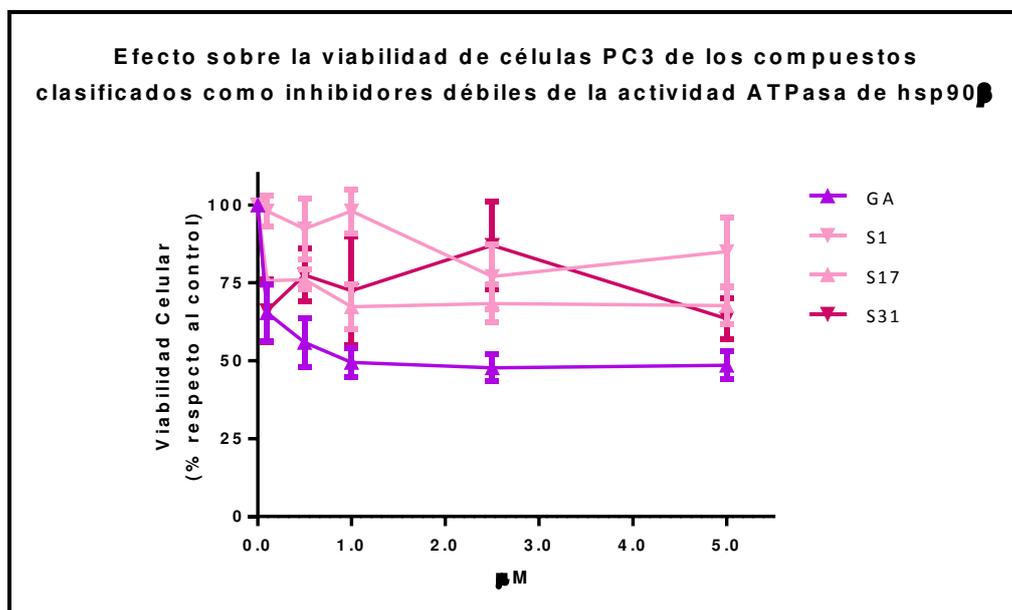


Figura 55. Efecto de los compuestos sobre la viabilidad de células PC3 de cáncer de próstata. Se grafican las curvas de aquellas drogas clasificadas como “inhibidores débiles” de la actividad ATPasa de Hsp90. Los resultados se expresan como el promedio \pm ES del porcentaje de viabilidad celular respecto a las células tratadas con vehículo (grupo control) en función de concentración del compuesto, de al menos tres experimentos independientes.

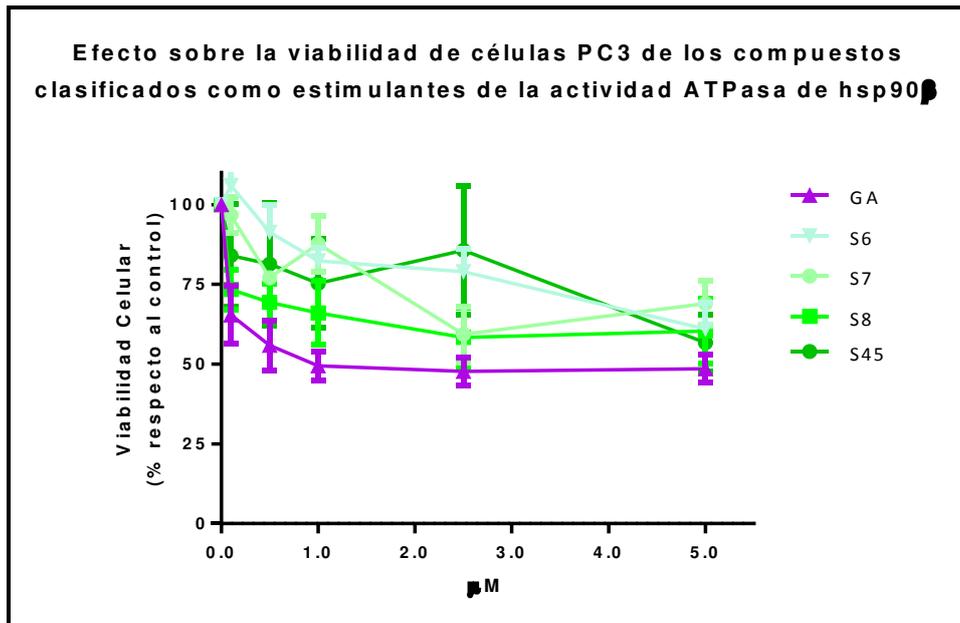


Figura 56. Efecto de los compuestos sobre la viabilidad de células PC3 de cáncer de próstata. Se grafican las curvas de aquellas drogas clasificadas como “estimulantes” de la actividad ATPasa de Hsp90B. Los resultados se expresan como el promedio \pm ES del porcentaje de viabilidad celular respecto a las células tratadas con vehículo (grupo control) en función de concentración del compuesto, de al menos tres experimentos independientes.

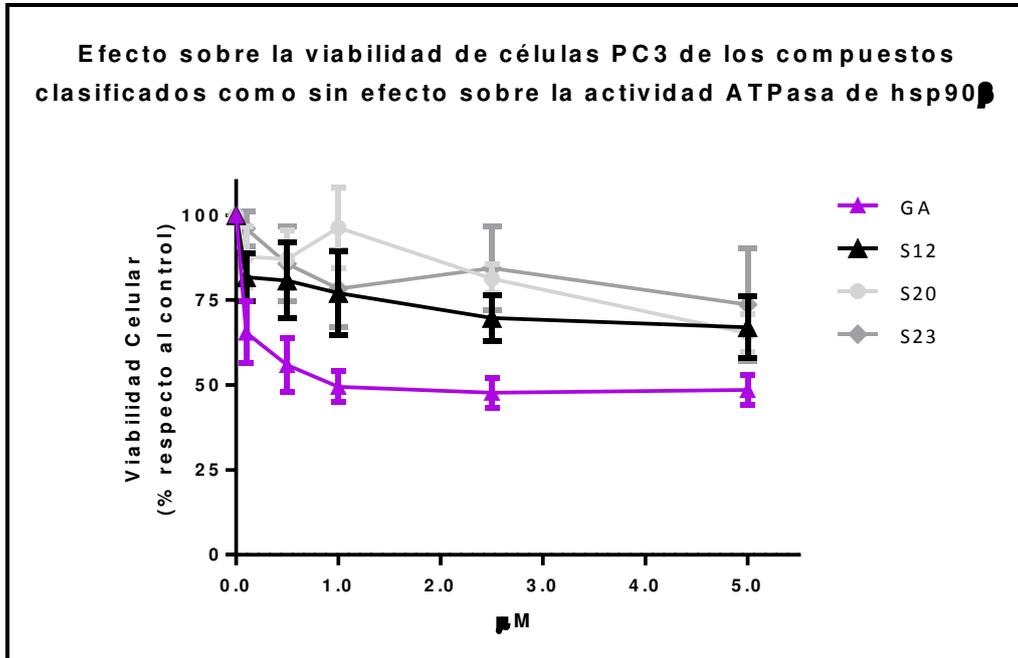


Figura 57. Efecto de los compuestos sobre la viabilidad de células PC3 de cáncer de próstata. Se grafican las curvas de aquellas drogas clasificadas como “sin efecto” sobre la actividad ATPasa de Hsp90B. Los resultados se expresan como el promedio \pm ES del porcentaje de viabilidad celular respecto a las células tratadas con vehículo (grupo control) en función de concentración del compuesto, de al menos tres experimentos independientes.

Notar que si bien ninguno de los compuestos ensayados mostró la potencia farmacológica de GA en las curvas de concentración-viabilidad, varios de ellos lograron un efecto máximo equivalente al de la droga patrón. Tal efecto parece ser independiente de su capacidad para inhibir la actividad de ATPasa de Hsp90. Por ejemplo, la Figura 53 nos muestra que el compuesto S45 posee acción estimulante sobre la actividad de ATPasa, S3 es fuertemente inhibitorio mientras que S31 y S25 los son en menor grado, sin embargo, todos ellos muestran valores de viabilidad para la máxima concentración (5 μ M) que son equivalentes entre sí y no son significativamente diferentes de aquéllos valores medidos para igual concentración de GA.

En el año 2003, fue publicado por Kamal *et al.* [258] que la Hsp90 de células tumorales posee una mayor actividad ATPasa y es 100 veces más sensible al inhibidor 17-AGG que la Hsp90 de células normales. Ello generó gran expectativa porque podría justificar la mayor sensibilidad de las células tumorales al tratamiento con inhibidores de Hsp90. Estas cuantificaciones de las afinidades relativas no se han podido reproducir hasta la fecha, aunque sí se acepta que la célula tumoral, por algún motivo aún no elucidado mecanísticamente, es sin dudas más sensible a estos inhibidores que las células normales, siendo ello la base racional por la cual se están realizando “*clinical trials*” con algunos compuestos. Coincidente con aquéllos reportes que no muestran una relación directa entre la capacidad de inhibir la actividad ATPasa y el efecto citotóxico, nuestros datos tampoco permiten elucidar tan controversia. Como ya se ha mencionado, algunos compuestos fueron capaces de disminuir la viabilidad de las células PC3 mostrando efectos diferentes sobre la actividad de ATPasa. Por este motivo decidimos seguir trabajando con un subconjunto de los mismos, representando el espectro de efectos sobre la actividad ATPasa. La correlación se mantiene no obstante para GA, lo que es consecuente con lo reportado por otros laboratorios.

Con el fin determinar si las respuestas observadas son línea-celular específicas o bien más generales, se evaluó el efecto de las drogas sobre la viabilidad de otra línea celular de cáncer de próstata, las células C4-2. Las células PC3 son un modelo de cáncer de próstata resistente a la castración que no expresan cantidades significativas de AR (aunque sí a su ARNm [259]) comparadas con otras líneas celulares, por lo que se las considera AR negativas. Por el contrario, las células C4-2 expresan AR [260-262]. En la Figuras 58, 59 y 60 se grafican las curvas de viabilidad para células C4-2,

mostrando que del subconjunto de compuestos ensayados el único que muestra un efecto importante sobre la viabilidad de las células C4-2 fue, una vez más, el compuesto S45. Puede apreciarse nuevamente que no hay una relación directa entre el efecto sobre la actividad ATPasa y la viabilidad de las células tumorales.

Si comparamos con las células PC3, las células C4-2 muestran menor sensibilidad a los compuestos ensayados. Ello podría deberse a la sobreexpresión de una variable de *splicing* de AR que está presente en estas células y que carece del LBD [263], lo que permite la señalización de AR en ausencia de ligando [263-266]. Estas variables constitutivamente activas son funcionalmente independientes de Hsp90 [266] y las células se muestran más insensibles a sus antagonistas e inhibidores.

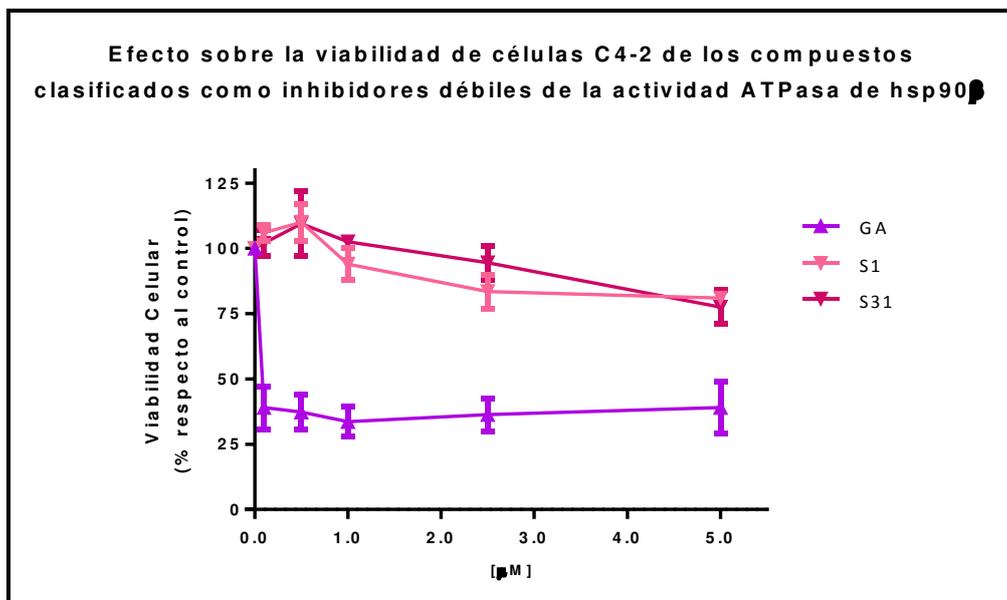


Figura 58. Efecto de los compuestos sobre la viabilidad de células C4-2 de cáncer de próstata. Se grafican las curvas de aquellas drogas clasificadas como “inhibidores débiles” de la actividad ATPasa de Hsp90. Los resultados se expresan como el promedio \pm ES del porcentaje de viabilidad celular respecto a las células tratadas con vehículo (grupo control) en función de concentración del compuesto, de al menos tres experimentos independientes.

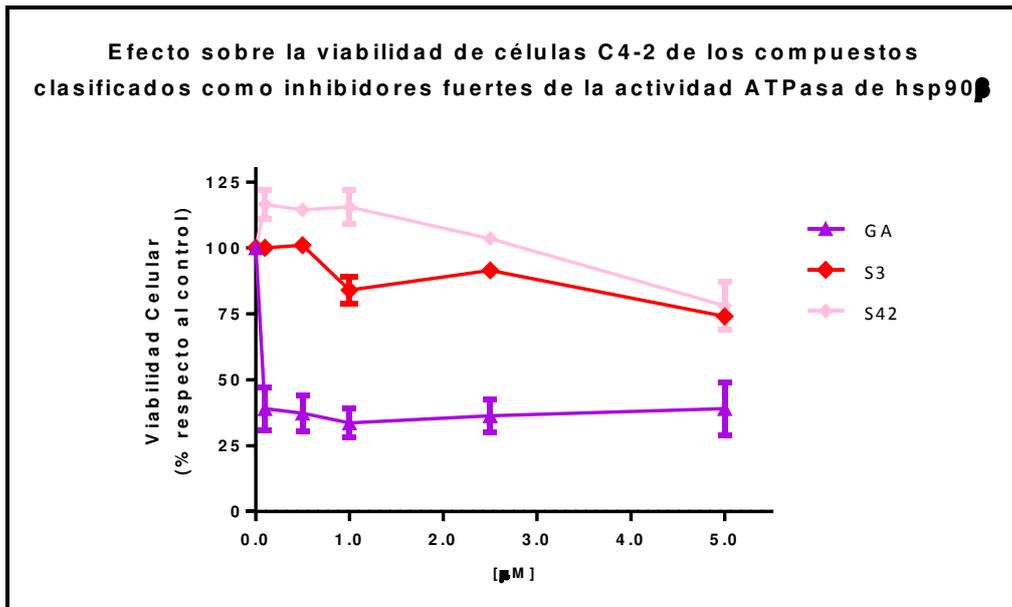


Figura 59. Efecto de los compuestos sobre la viabilidad de células C4-2 de cáncer de próstata. Se grafican las curvas de aquellas drogas clasificadas como “inhibidores fuertes” de la actividad ATPasa de Hsp90. Los resultados se expresan como el promedio \pm ES del porcentaje de viabilidad celular respecto a las células tratadas con vehículo (grupo control) en función de concentración del compuesto, de al menos tres experimentos independientes.

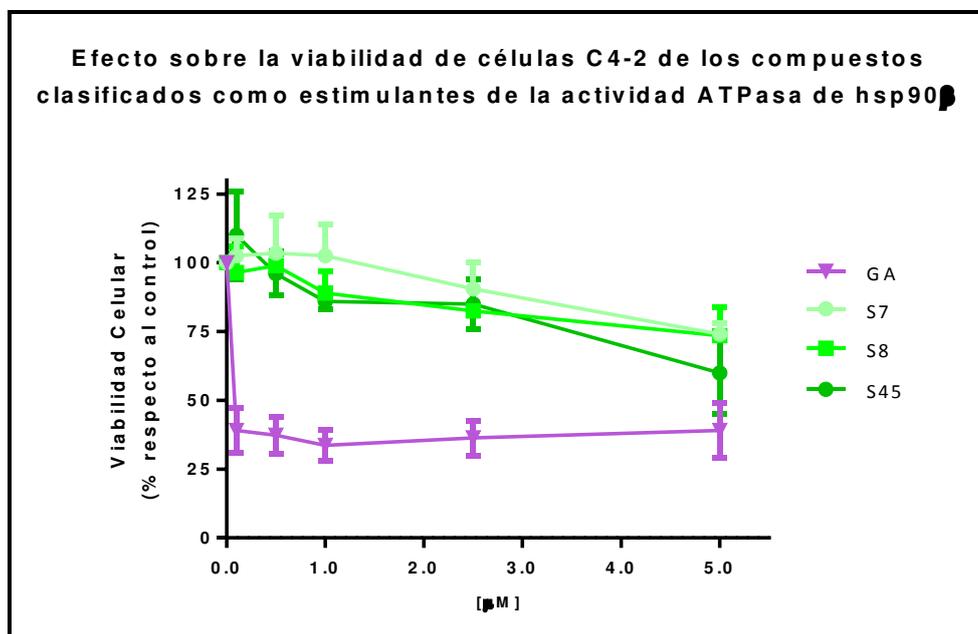


Figura 60. Efecto de los compuestos sobre la viabilidad de células C4-2 de cáncer de próstata. Se grafican las curvas de aquellas drogas clasificadas como “estimulantes” de la actividad ATPasa de Hsp90. Los resultados se expresan como el promedio \pm ES del porcentaje de viabilidad celular respecto a las células tratadas con vehículo (grupo control) en función de concentración del compuesto, de al menos tres experimentos independientes.

3.3 EFECTO DE LOS COMPUESTOS SOBRE LA CAPACIDAD MIGRATORIA DE CÉLULAS DE CÁNCER DE PRÓSTATA.

Una gran variedad de estímulos promueven la localización extracelular de Hsp90. Como ejemplo se pueden citar el daño al ADN, estrés oxidativo, estrés térmico e hipoxia entre otros [267-271]. Dentro de las varias funciones que desempeña la versión extracelular de la chaperona, se destaca su participación en la movilidad celular. La misma fue evidenciada por primera vez por el grupo de Patsavoudi [272-275]. Posteriormente se relacionó de manera directa la actividad de Hsp90 con el proceso de reparación de herida [271, 275, 276]; el cual está estrechamente relacionado con la movilidad y la proliferación celular, la deposición y el remodelado de matriz extracelular, la inflamación y la neo-angiogénesis [277-279]. Cada uno de estos procesos se encuentra desregulado y exacerbado en el proceso de desarrollo y la progresión tumoral, y es en consecuencia que el rol extracelular de Hsp90 cobra particular relevancia.

Existen numerosas evidencias donde se demuestra que al bloquear la acción de Hsp90, ya sea por el uso de inhibidores o de un anticuerpo específico contra la chaperona, se suprime de manera efectiva la movilidad celular y la invasión de células tumorales [275, 280, 281]. Por este motivo, se decidió evaluar el efecto de los compuestos en estudio sobre la migración celular de la línea PC3. A través del ensayo de reparación de herida (descrito previamente Métodos sección 15), se estudió al mismo subgrupo de compuestos con el cual se decidió continuar trabajando en Resultados sección 3.2.

En la Figura 61 se puede observar que, al tratar las células con vehículo (DMSO), disminuye la distancia entre los bordes de la lesión con el transcurso del tiempo. Esto ocurre porque lentamente las células recubren la herida al migrar. Este fenómeno no es apreciable en las células tratadas con GA (5 μ M) y que compuestos inactivos como S1 no impiden la migración celular.

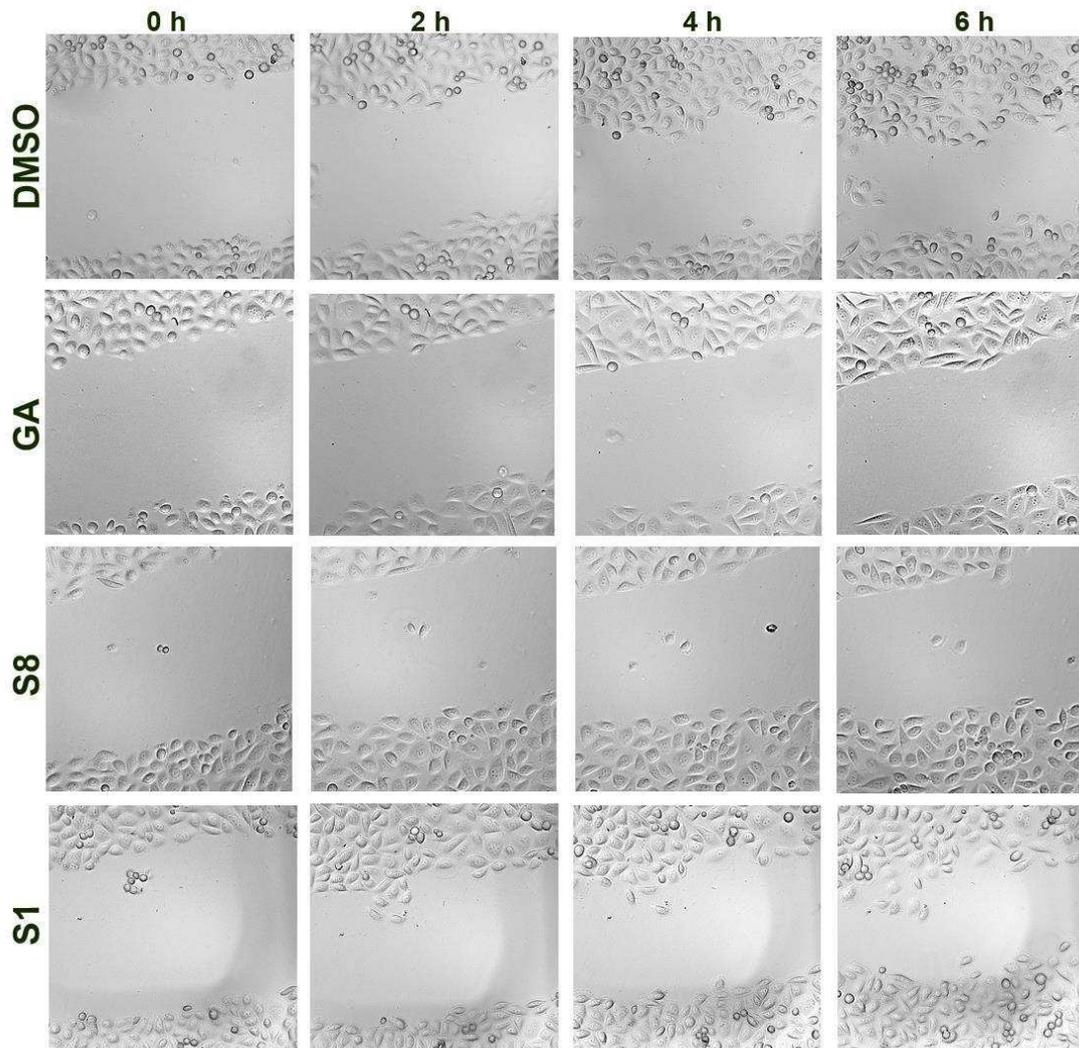


Figura 61. Migración de las células PC3 de cáncer de próstata. Se removió mecánicamente una franja de células de un cultivo confluyente. Las células se incubaron con el compuesto a evaluar (5 μ M) o vehículo. Las fotos son representativas de al menos tres experimentos independientes.

A continuación y según descrito en Métodos sección 15, se cuantificó el progreso de la reparación y los resultados obtenidos se representan en la Figura 62. Se puede apreciar que, luego de 6 horas de incubación, todos los compuestos semicuantificados en este experimento inhibieron la migración celular de la línea PC3, excepto S1. La capacidad de inhibir la migración celular tampoco resultó tan directamente relacionada con el efecto del compuesto sobre la actividad ATPasa de Hsp90. Así, al tratar con los compuestos S7 y S8, ambos estimulantes fuertes de la actividad ATPasa, se observó una inhibición más potente que con el resto de los

compuestos, pero en el caso de S45, el que muestra una capacidad estimulante de la actividad enzimática equivalente a los anteriores, el efecto es menos ~~remarcado~~. Esto se exagera más en el caso de la inhibición de la migración en la línea celular C4-2B, la que se muestra en la Figura 63. A diferencia de las PC3, S1 mostró ser activo y, sorprendentemente, S45 no mostró efecto alguno siendo indistinguible del control tratado con vehículo. Aún con las particularidades del caso, los ligandos de Hsp90 mostraron en general el efecto esperado sobre la migración celular. Como estos experimentos fueron realizados a un tiempo fijo (6 hs), luego se estudió si sufría modificaciones en función del tiempo. Los resultados se muestran en la Figura 64 y demuestran que el efecto inhibitor sobre la migración celular es aproximadamente lineal con el tiempo.

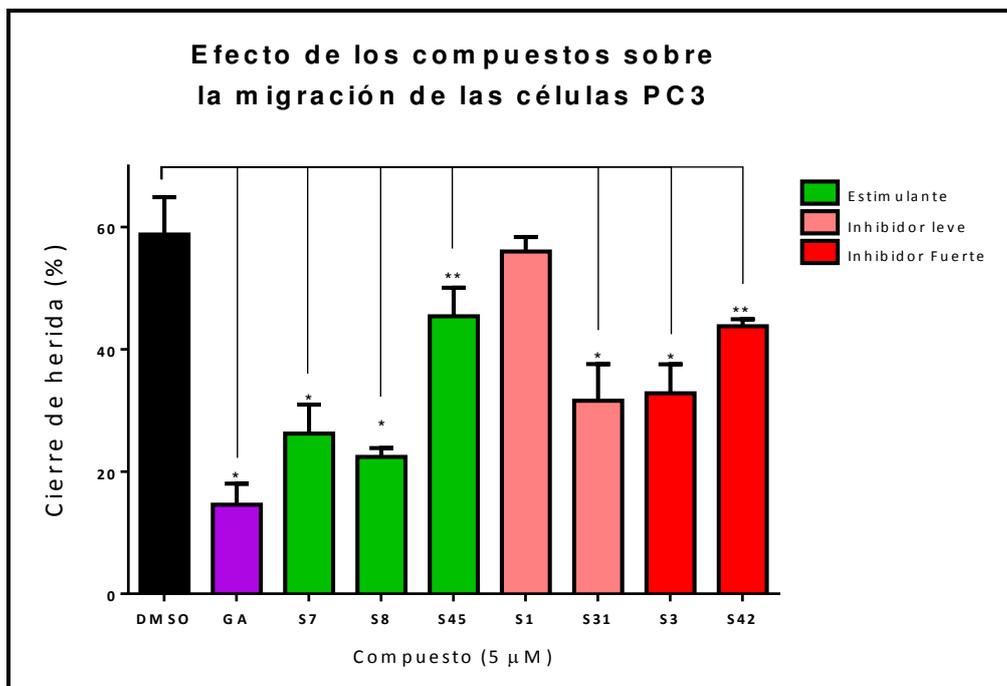


Figura 62. Efecto de los compuestos sobre la migración de las células PC3 de cáncer de próstata. Se representa el porcentaje de cierre de la herida luego de 6 horas de incubación con el compuesto evaluado (5 μM) o vehículo. Los resultados se expresan como la media ± SEM de al menos dos experimentos independientes. * Diferencia significativa $p < 0,001$. ** Diferencia significativa $p < 0,030$. La clasificación de la droga y el código de color de las barras siguen lo explicitado en la Figura 53 para el efecto inhibitorio sobre la actividad de ATPasa.

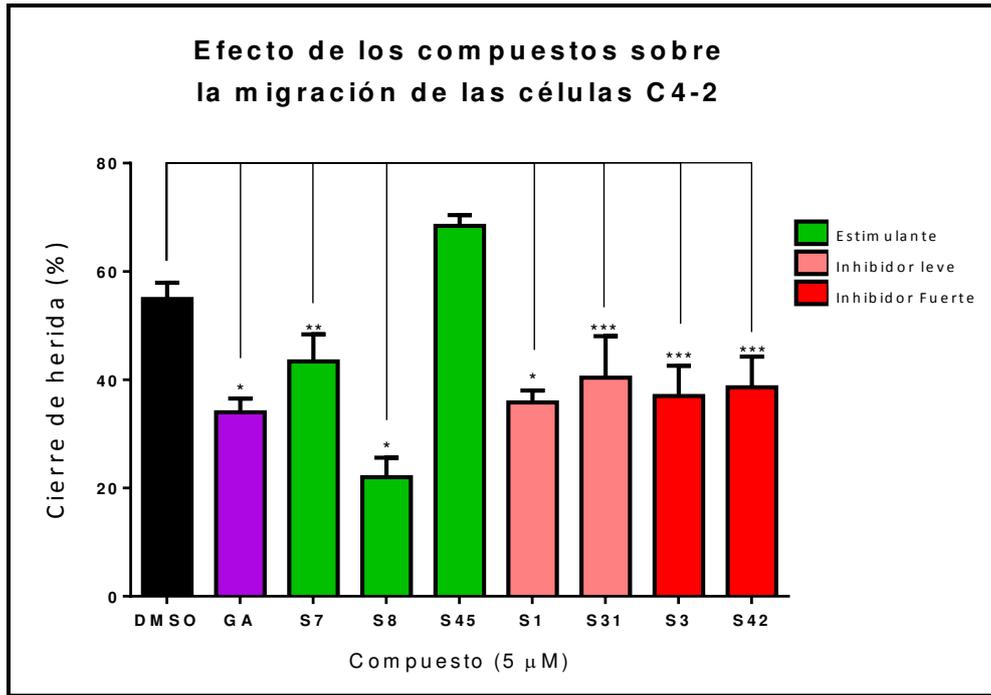


Figura 63. Efecto de los compuestos sobre la migración de las células C4-2B de cáncer de próstata. Se representa el porcentaje de cierre de la herida luego de 6 horas de incubación con el compuesto evaluado (5 μM) o vehículo. Los resultados se expresan como la media ± SEM de al menos dos experimentos independientes. * Diferencia significativa $p < 0,001$. ** Diferencia significativa $p < 0,050$.

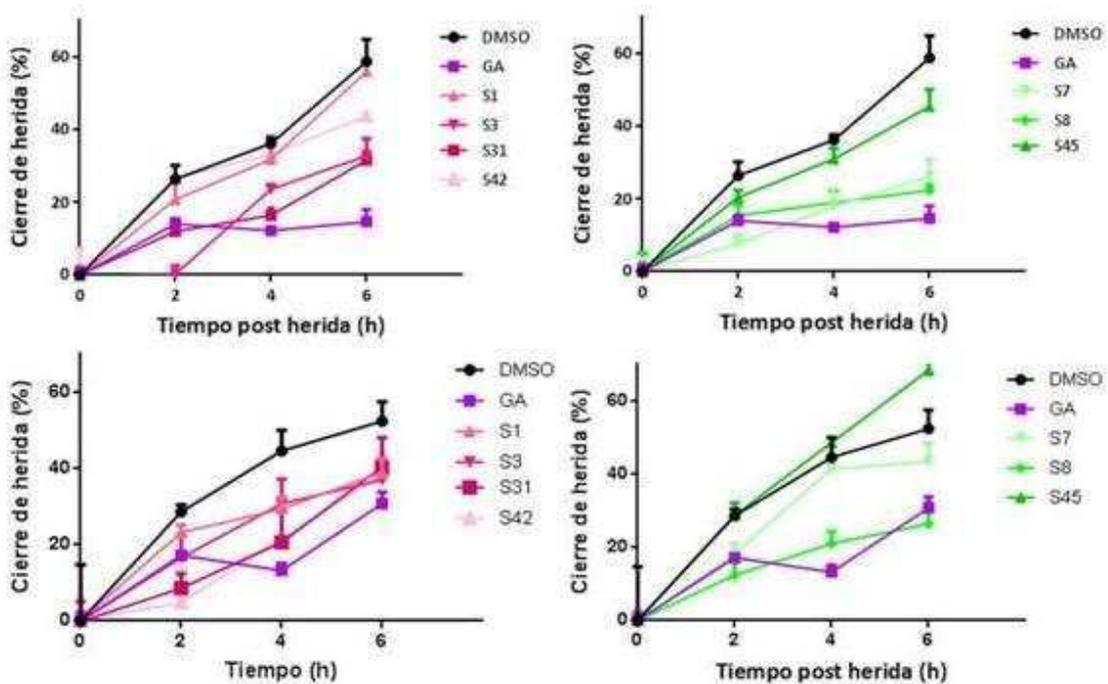


Figura 64. Efecto del tiempo de incubación con los compuestos (5 μM) sobre la migración de células PC3 (paneles superiores) y C4-2B (paneles inferiores). Los paneles de la izquierda muestran a drogas inhibitoras de la actividad ATPasa de Hsp90β y los de la derecha estimulantes.

Una de las principales características tanto de Hsp90 como de las IMM es en cuanto a la organización de la estructura de la célula dada su capacidad de actuar con todos los componentes responsable de la misma, esto es microtúbulos, microfilamentos y filamentos intermedios [282]. Es por ello que cuando se afecta la funcionalidad de estos heterocomplejos las células presentan cambios morfológicos por desarreglos del citoesqueleto y se afecta la capacidad migratoria e invasiva de la célula. Esto es particularmente importante en el caso de los microfilamentos ya que la polimerización de actina en el frente de migración empuja la membrana hacia delante (proceso llamado extensión). Luego sobreviene la adhesión por la cual algunos lamelipodios se unen al sustrato y forman contactos focales firmes. Ello permite la translocación del cuerpo celular cuando el núcleo y el citosol se mueven hacia delante por mecanismos aún no muy bien definidos pero que se sabe implican a la miosina, la que también es una proteína cliente de Hsp90. Finalmente, se da el despegue del extremo posterior de la célula, el que se retrae sobre el cuerpo celular y a veces hasta deja tras de sí fragmentos de membrana. Todo este proceso involucra tanto a Hsp90 como a IMM como FKBP51 y FKBP52. Fue por ello que decidimos analizar si estos compuestos sintéticos modificaban de la manera prevista a los microfilamentos. Para visualizar estructuras del citoesqueleto, se utilizaron las células C4-2B ya que presentan un citoplasma más prominente que las PC3. Se trataron con faloidina marcada con Alexa 633, una droga que tiñe específicamente a los filamentos de actina. La Figura 65 muestra que GA altera grandemente la arquitectura de las células, las que cambian drásticamente su morfología, se redondean y se contraen. El compuesto S42 (un inhibidor “fuerte”) muestra células fusiformes y también contraídas, mientras que S45 (“estimulante”) que no mostró sin embargo efectos importantes sobre la migración celular, genera células redondeadas con acúmulos de actina en el área perinuclear. Por otra parte, (un inhibidor “leve” como S31 y que afectó la migración (Figura 64), muestra un fuerte efecto disruptor de la forma y tamaño de las células prostáticas. En contraposición, S17, un inhibidor “débil”, no altera significativamente la morfología celular, la que es más parecida a la del control. En conclusión, las drogas afectan la morfología celular al afectar la integridad funcional de los complejos Hsp90•IMM asociados a la citoesqueleto, pero nuevamente no se guarda una relación

directa con su capacidad de inhibir la actividad de ATPasa de la chaperona, dogma central que ha dominado el campo por varios años.

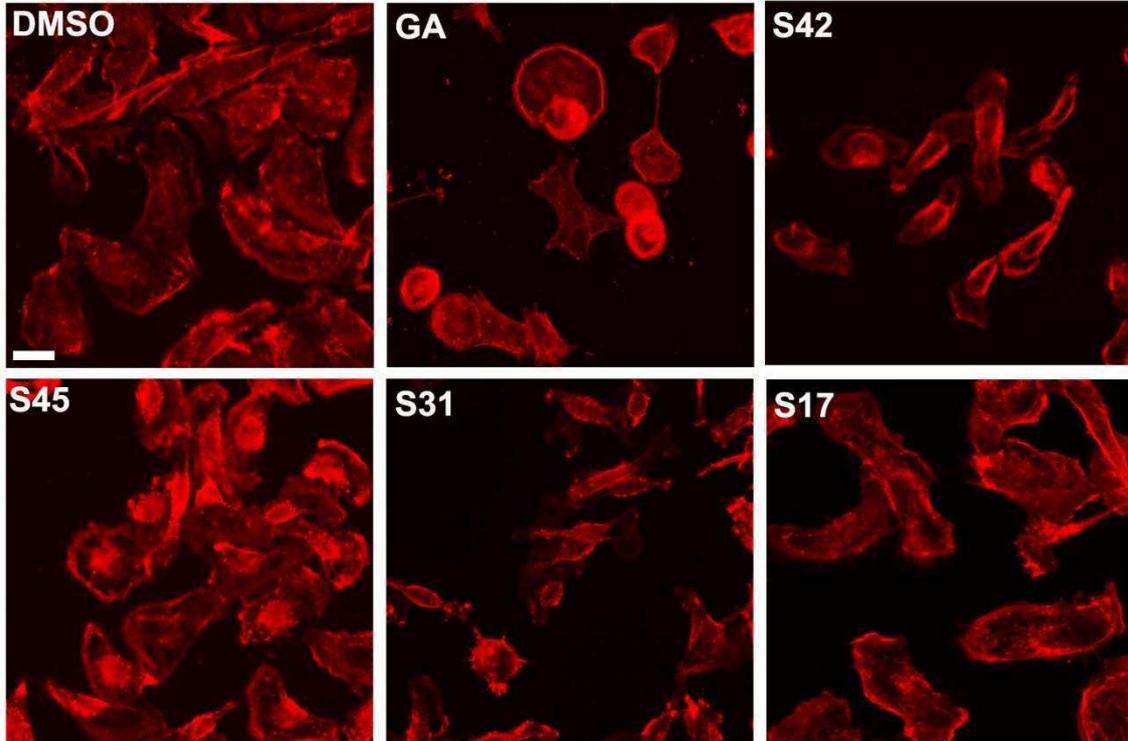


Figura 65. Efecto de los compuestos sobre el citoesqueleto de actina de células C4-2B. Las células se trataron con el compuesto a evaluar (5 μ M) o vehículo (DMSO) durante 48 hs.

En un contexto fisiológico, la movilidad celular se encuentra estrechamente ligada con la remodelación de la matriz extracelular; ambas funciones son esenciales para el proceso de reparación de una herida. Enzimas proteolíticas como las metaloproteasas (MMPs), disminuyen la adhesión celular a la lámina basal; facilitando así, la movilidad celular requerida para la reparación de la herida [273, 283]. Este proceso fisiológico es cooptado en cáncer, permitiendo el desarrollo de metástasis [284-286].

Teniendo en cuenta la capacidad de ambas Hsp90 [280, 287-291] y las IMMs FKBP51 y FKBP52 [185] de regular la expresión y la actividad de varios miembros de la familia de las MMPs, se decidió evaluar el efecto de los compuestos sobre la actividad gelatinolítica presente en el medio condicionado por células PC3. En la Figura 66 se evidencia que, excepto el caso de S7, el tratamiento con los compuestos mostró una tendencia inhibitoria sobre la actividad de MMP-9, siendo GA el inhibidor más

eficiente. Curiosamente, S7 resultó ser un buen inhibidor de la migración de esta línea celular. Consistentemente con los resultados obtenidos previamente, no se evidencia relación entre la capacidad del compuesto para disminuir la actividad de MMP-9 y su efecto sobre la actividad ATPasa de Hsp90.

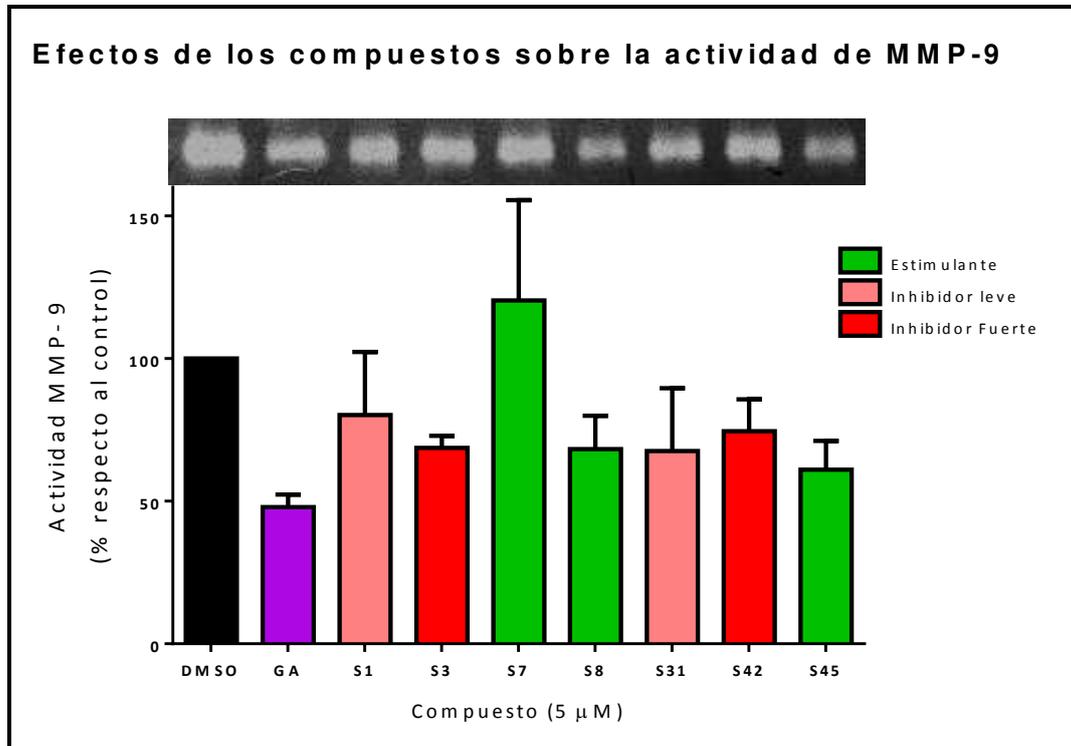


Figura 66. Efecto de los compuestos sobre la actividad de MMP-9 presente en el medio de cultivo condicionado por las células PC3. Se representa el porcentaje de actividad gelatinolítica respecto a la actividad presente en el medio condicionado por células incubadas con vehículo (DMSO). Los resultados se expresan como la media \pm SEM de al menos dos experimentos independientes.

3.4 EFECTO DE LOS COMPUESTOS SOBRE LA TRANSLOCACIÓN DE LOS RECEPTORES DE GLUCOCORTICOIDES Y ANDRÓGENOS

En la sección 1.1 de Resultados, se demostró que en presencia de hormona el receptor de glucocorticoides migra rápidamente del citoplasma al núcleo (Figura 23). Dicho transporte, se ve afectado por todo aquello que irrumpa la interacción del heterocomplejo con la maquinaria motora; por ejemplo, la sobreexpresión de

proteínas TPR que siendo incapaces de unir dineína, desplazan por competencia a FKBP52 del único sitio aceptor de dominio TPR presente en el dímero de Hsp90.

La inhibición de Hsp90, a través del tratamiento con GA, también provoca un retraso en la translocación nuclear de GR [34, 115, 292]. Por lo tanto, se decidió evaluar el efecto de los compuestos sobre la importación de GR. Para ello, las células se pre-incubaron con el compuesto por 30 minutos antes de su inducción con Dexa.

En la Figura 67 se observa que, en contraposición a GA, ninguno de los compuestos estudiados retrasó significativamente la translocación del receptor al núcleo en las condiciones ensayadas. En la Figura 68, se puede observar que los compuestos no tuvieron un efecto apreciable sobre la actividad transcripcional de GR, excepto S31 que muestra una tendencia a estimular la misma.

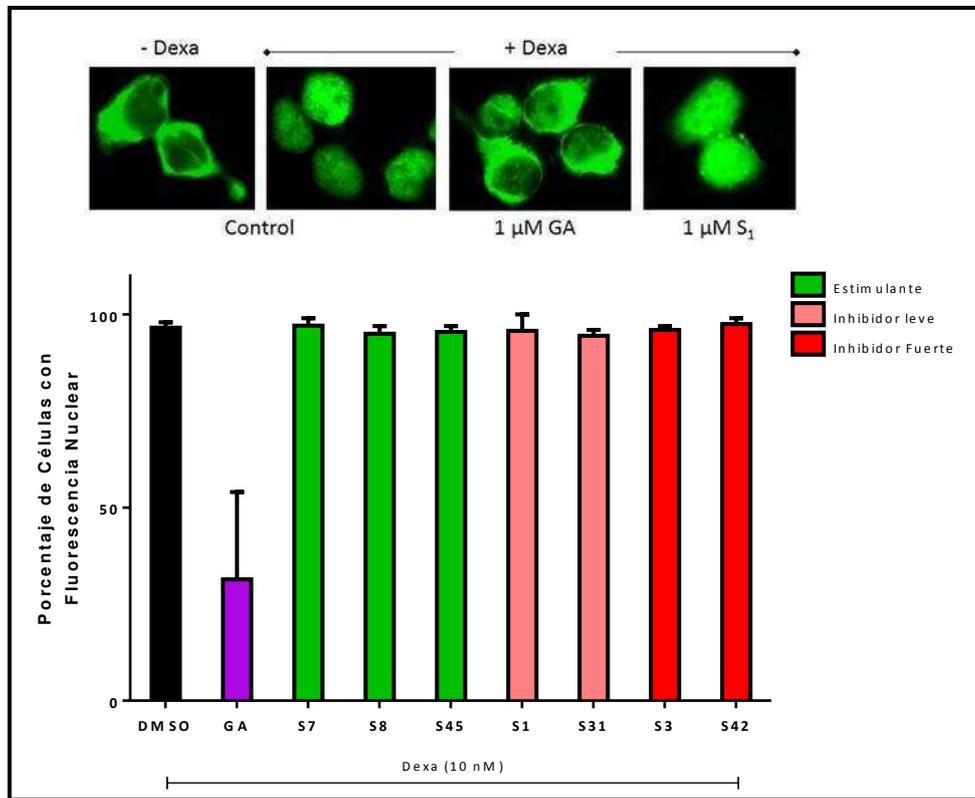


Figura 61. Importación nuclear de GFP-GR. Células HEK 293T transfectadas con GFP-GR, fueron pre-incubadas con el compuesto a evaluar (1 μM) o vehículo (DMSO) durante 30 min.; y luego incubadas con 10 nM Dexa durante 30 min. Las fotos son representativas de al menos 100 células analizadas por experimento, en tres experimentos independientes. Los resultados se expresan como el promedio de células con fluorescencia nuclear ± SEM.

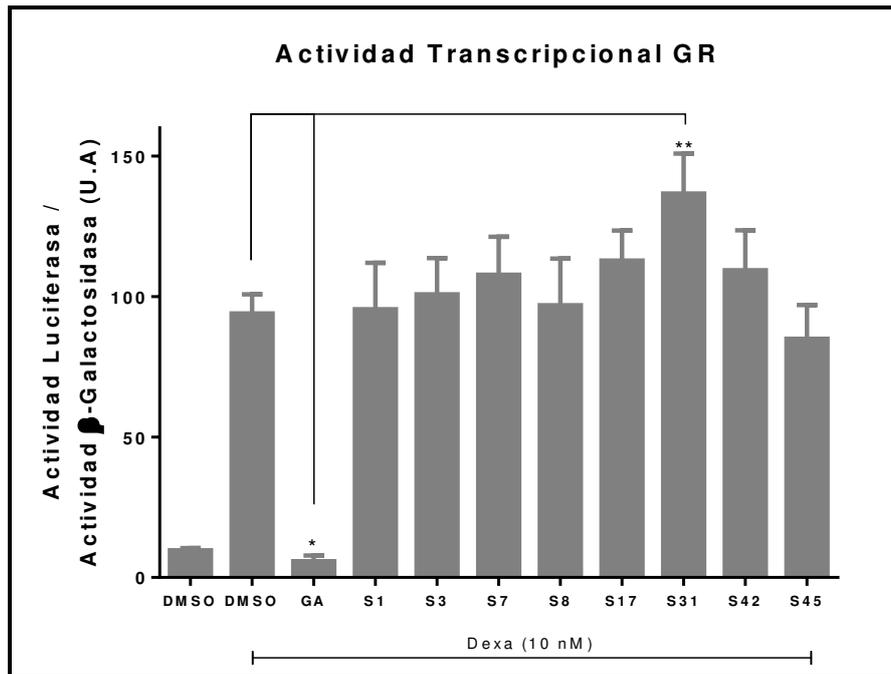


Figura 68. Efectos de los compuestos sobre la actividad transcripcional de GR. Células HEK 293T fueron co-transfectadas con GR, MMTV-Luc y β-Gal. Se preincubaron con el compuesto a evaluar (1 μM) por 30 min. La inducción se llevó a cabo con 10 nM de Dexa. Los resultados se expresan como la media ± ES, de al menos tres experimentos independientes, en unidades arbitrarias (U.A.) resultado del cociente entre la actividad de luciferasa /β-Gal. * Diferencia significativa ($p < 0.001$). ** Diferencia significativa ($p = 0.016$).

Resultados equivalentes se obtuvieron cuando el receptor ensayado fue AR (no mostrados). Tomados en su conjunto, estos resultados cuestionan la relación directa entre la actividad ATPasa de Hsp90 y su función biológica.

DISCUSIÓN

En respuesta a distintas condiciones de estrés la célula responde incrementando la producción de una familia de proteínas llamadas chaperonas moleculares. El rol esencial de estas moléculas es asistir a proteínas cuyo plegamiento es incorrecto, lo cual provee a la célula de tiempo para compensar el daño producido por el agente estresor. Hsp90 es una chaperona molecular que posee baja afinidad por proteínas mal plegadas. Su función biológica está centrada en estabilizar a proteínas

en su conformación activa a proteínas que ya poseen una estructura tridimensional estable. Entre sus proteínas cliente se encuentran proteínas clave en el desarrollo y la progresión tumoral, de manera tal que se considera a la célula tumoral adicta a Hsp90. En consecuencia, se ha convertido en un prometedor blanco terapéutico en el tratamiento del cáncer.

Debido a que el tratamiento con GA (un potente inhibidor de su actividad ATPasa) afecta la mayor parte de los procesos regulados por Hsp90, se considera que dicha actividad es fundamental para su acción biológica. Por lo tanto han sido diseñados, sintetizados y probados una gran cantidad de inhibidores de la actividad ATPasa de Hsp90 en ensayos preclínicos. Algunos de ellos han mostrado resultados prometedores en ensayos clínicos, sin embargo aún quedan por resolver los efectos secundarios indeseados (para actualización recientes ver [207]).

En el transcurso de este capítulo se han ensayado una serie de compuestos diseñados como potenciales inhibidores de la actividad ATPasa de Hsp90. Según nuestros resultados 20 de los mismos disminuyen en al menos un 25% la viabilidad de la línea celular PC3, modelo de cáncer de próstata resistente a la castración o CPRC. Queda por determinar si estos resultados se deben a que los compuestos provocan la muerte celular o poseen un efecto antiproliferativo. Sin embargo, otra línea celular modelo de CPRC (C4-2) fue menos sensible al tratamiento con los compuestos. Esta diferencia ejemplifica las distintas dependencias a la chaperona que existen para distintos tipos de cáncer, incluso derivando a partir del mismo tejido.

Por otro lado encontramos que 5 compuestos (S3, S8, S31 Y S42) inhiben de manera significativa la capacidad migratoria de las líneas PC3 y C4-2B, los cuales además muestran una tendencia inhibitoria sobre la actividad gelatinolítica de MMP-9 secretada por las PC3 (Figura 66). Sorprendentemente, ninguno de ellos fue capaz de afectar el tráfico de GR (Figura 67), o su actividad transcripcional (excepto por S31) (Figura 68). Ensayos preliminares no incluidos en este capítulo, mostraron resultados similares para AR, sugiriendo que el tratamiento con estos compuestos podría dejar inalterada la regulación de ambos receptores. Si bien el efecto de la droga sobre la actividad de ATPasa de Hsp90 utiliza a la proteína pura y por ende es una evidencia directa de la interacción droga-proteína, podría especularse que la falta de efecto de algunos compuestos en células intactas es la consecuencia de una pobre o nula

permeabilidad a través de la membrana plasmática. Observando las estructuras de las drogas y su alta solubilidad en solventes orgánicos, no parece ser este el caso, deberían atravesar la membrana plasmática sin problemas. No obstante, se me evaluó el coeficiente de permeabilidad en células MDCK (Schoredinger QuickProp Programme 2.0, Camberley, UK) y se le midió la partición octanol/agua ($P_{o/w}$) a algunos de ellos, analizándose de manera comparativa a los cuatro que mostraron menor permeabilidad (S8, S9, S29 y S35), la que es al menos un orden de magnitud menor que la del resto de los compuestos. La Tabla 5 ilustra también el efecto sobre la viabilidad (entre paréntesis se indica la figura que muestra ese dato).

TABLA 5. Polaridad de algunos compuestos.

COMPUESTO	LOG $P(o/w)$	Permeabilidad (nmoles/seg)	Viabilidad *
S8	1,54	13,3	Bueno (Fig.56)
S9	2,06	35,2	Débil (Fig.69)
S29	1,28	2,53	Bueno (Fig.69)
S35	0,64	6,50	Débil (Fig.54)
S1	3,13	2067	Débil (Fig.55)
S7	1,99	406,7	Bueno (Fig.56)

* Ver un esquema integrado para los cuatro derivados menos permeables en la Figura 69.

En la Figura 69 se resumen las curvas de viabilidad para células PC3 de los compuestos menos permeables. S8 posee un efecto equivalente al de GA, mientras que los otros compuestos son menos potentes y con un efecto máximo más débil. Sin embargo, S8 posee un grado de penetrabilidad en las células muy bajo comparado con compuestos normales como, p.ej., S7 que muestra un efecto similar sobre la viabilidad (Figura 56) y S1 que no muestra efecto alguno (Figura 55). Estos últimos también poseen efectos diferenciales en los ensayos de recuperación de herida: S7 tiene buen efecto (similar al de S8), mientras que S1 es directamente inactivo (Figura 62). Si a estas evidencias le sumamos las mediciones de actividad de ATPasa que no dependen de la permeabilidad, concluimos que las diferencias no se deben a diferentes grados de

permeabilidad, lo cual ya resultaba intuitivo observando las estructuras de los compuestos.

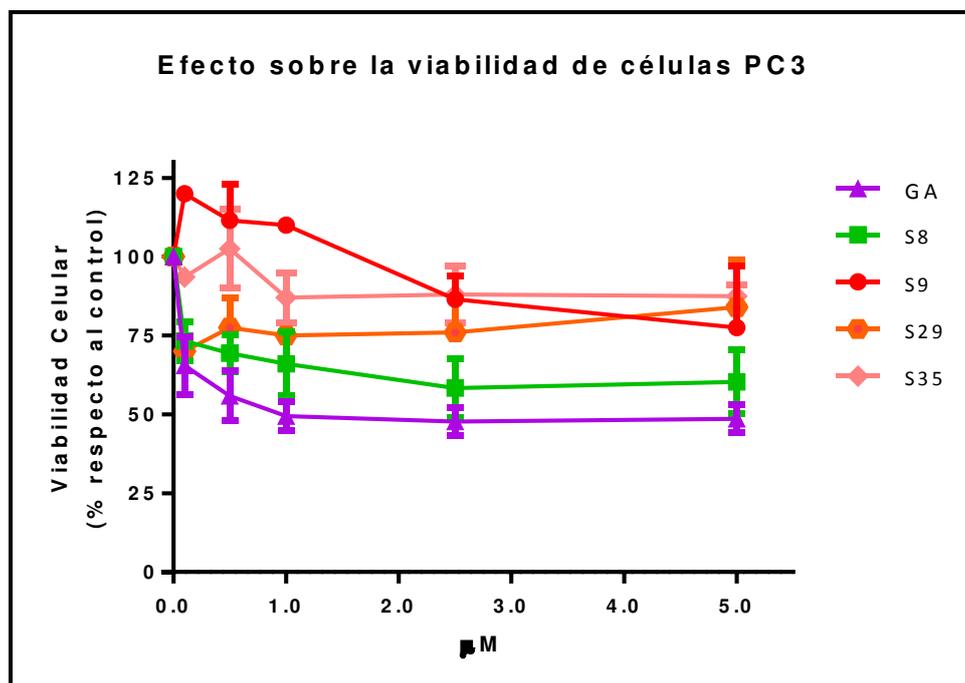


Figura 69. Curvas comparativas de viabilidad para los cuatro compuestos con menor grado de permeabilidad en las células. Notar las diferencias entre estas curvas a pesar de poseer todos una permeabilidad semejante, en particular aquél con muy buen efecto (S8) y los menos activos

En resumen, encontramos un conjunto de compuestos con efectos deletéreos sobre mecanismos relacionados con la sobrevivencia, la movilidad y la invasión de células tumorales. Los cuales, además, no afectarían aparentemente la regulación de los RE. Sin embargo, y de manera sorprendente, no se evidencia una relación directa entre la capacidad de inhibir la actividad ATPasa de Hsp90 in vitro y el efecto sobre el proceso celular. La falta de relación que advertimos podría deberse a múltiples factores. En primera instancia los efectos observados sobre los procesos celulares podrían estar relacionados a la isoforma α de Hsp90, la cual es inducida por estrés. Es una asignatura pendiente de este trabajo ensayar el efecto de los compuestos sobre la misma. Por otro lado, cabe la posibilidad que la actividad ATPasa de Hsp90 no esté directamente relacionada a la regulación de estos procesos, sino que ciertos compuestos como GA y sus derivados sean capaces de afectar ambas actividades.

Los resultados obtenidos permiten seleccionar un conjunto de compuestos prometedores para la realización de ensayos *in vivo*. Los mismos son sin duda un pequeño avance en el desarrollo de nuevas drogas para el tratamiento de diversos tipos de cáncer.

DISCUSIÓN GENERAL

El estudio de cómo macromoléculas como el ARNs y proteínas solubles se transportan en el citoplasma hacia el núcleo fue motivo de controversia durante muchos años. Siempre se asumió que la fuerza motriz del mismo era la simple difusión [293-296]. El pasaje al núcleo se daría por choques azarosos de la proteína-cargo con componentes solubles y estructurales del poro (importinas y nucleoporinas), las que reconocen a las “cargas” que poseen una señal de localización nuclear favoreciendo así su translocación. Según el modelo convencional, la concentración de estas proteínas en el núcleo ocurre porque quedan atrapadas en sus sitios de acción por interacciones proteína-proteína y/o ADN-proteína, lo que desplazaría el equilibrio del factor soluble hacia ese compartimiento. La microinyección citoplasmática de partículas de dextrano de 500-kDa (similares en tamaño a complejos proteicos) marcadas con una molécula fluorescente demostraron que, aún con ese tamaño, pueden difundir en el citoplasma [297], lo que apoyaría la teoría anterior. Sin embargo, estudios con partículas virales o fragmentos de ADN de menor tamaño que los virales demostraron que la velocidad de migración citoplasmática por simple difusión es entre 17 y 100 veces menos eficiente que en un medio acuoso convencional [296, 298, 299]. La microinyección en los axones de proteínas marcadas con una señal de localización nuclear hace que la misma deba retrotransportarse de manera activa a lo largo de los filamentos del citoesqueleto ya que de lo contrario, se ha calculado que demoraría años en llegar al núcleo [300]. Ello es indicativo que la difusión podría ser un medio de transporte pero sólo para distancias muy cortas. De hecho, resultados de nuestro laboratorio demostraron que cuando GR debe ser retrotransportado en neuronas, se degrada vía proteasoma a lo largo del camino, de no mediar procesos activos [168]. Desde el punto de vista biológico, además, la difusión simple haría que la proteína se disemine azarosamente por todo el compartimiento celular en la medida que se va acumulando en el núcleo, quitándole eficiencia al proceso de retrotransporte. Nuestro laboratorio fue el primero en proponer un modelo que hoy es ampliamente aceptado por el cual el complejo formado por la chaperona Hsp90 y su co-chaperona FKBP52 hacen de cadena de tracción de los RE en su tránsito hacia el núcleo, siendo éste mediado por el complejo motor de dineína/dinactina (ver [47, 96] para revisiones recientes). Como consecuencia, la velocidad de translocación nuclear de GR se reduce al menos un orden de magnitud comparado con el receptor retrotransportado por simple difusión

($t_{1/2}$ de 5 min vs. 50 min). Estudios previos del laboratorio demostraron esto en células tratadas con agentes despolimerizantes de microtúbulos, microfilamentos y filamentos intermedios, es decir, en células sin citoesqueleto, tal que la única posibilidad de movimiento sea la difusión. La interacción Hsp90•FKBP52 se da gracias a la existencia de un sitio aceptor TPR en el dímero de Hsp90 que incluye a la secuencia MEEVD de su C-terminal, la cual reconoce a una Arg esencial de los dominios TPR. Dada la similitud estructural entre la IMM inhibitoria FKBP51 y la favorecedora del transporte FKBP52 (Figura 9), ambas compiten por tal sitio regulando de unión a Hsp90 regulando así el tránsito citoplasmático de los RE y los sitios de anclado nuclear [40, 301].

Aquí analizamos a otras tres proteínas con dominios TPR: a)-PP5, una Ser/Thr fosfatasa que cuenta además con un sitio PPlasa como el de las FKBP5s y que por ello se la incluye como pariente cercano de esta familia (es una '*IMM-like protein*'); b)-14-3-3 σ , la que no es estrictamente una proteína con dominios TPR pero que posee semejanzas estructurales con ellas (Figura 11); y c)- SGT1 α , una proteína TPR propiamente dicha pero que, a diferencia del resto, no involucra su dominio TPR en la interacción con Hsp90 sino a su dominio CS (Figura 12). A su vez, analizamos los efectos de éstas sobre GR y AR, receptores cuyo balance de roles en células prostáticas es relevante para la carcinogénesis prostática.

Se demuestra que a pesar de que PP5 muestra semejanza estructural con FKBP52 y es capaz de interactuar con dineína vía su dominio PPlasa (Figura 24), la sobreexpresión de la misma produce una redistribución del receptor entre el citoplasma y el núcleo en ausencia de hormona, estando el equilibrio más desplazado hacia el núcleo que en condiciones normales. Una posibilidad es que, al igual que el caso de FKBP52, PP5 favorezca el anclado del receptor a estructuras nucleares. Notar que se logra un equilibrio de distribución equivalente entre el citoplasma y el núcleo (~50% de la población de receptor en cada uno) (Figura 36), el que es bastante diferente al del control, situación en la que se exporta casi el 80% de la población de receptor nuclear.

Las curvas de importación de la Figura 27 en células que sobreexpresan al péptido TPR de PP5 ya nos muestran que el receptor parte desde un equilibrio muy desplazado hacia el citoplasma, alcanzándose la misma localización nuclear que en el caso del control, pero a tiempos bastante mayores (~45 min vs ~10 min,

respectivamente). La exportación, por otra parte, se aceleró notablemente con el péptido TPR (Figura 34). Esto es muy diferente a lo observado con la proteína PP5 intacta, indicando claramente que su dominio TPR compite funcionalmente por la asociación del receptor con Hsp90. Fisiológicamente, este efecto del péptido TPR podría ser ejercido por 14-3-3 σ , tal que la inducción de su expresión genere una deslocalización similar del receptor. Normalmente, los niveles basales de 14-3-3 σ en células normales es muy bajo (casi indetectable), y puede ser normal en ciertos tipos de cánceres, pero en otros casos se induce mucho [302]. Esto es variable con el sistema experimental, por ejemplo, la proteína tiene un muy bajo nivel de expresión en cáncer de mama [303, 304], hígado [305], piel [306], endometrio [307] y próstata [218, 308], pero está fuertemente expresada en cáncer de cérvix [309], colon [310, 311], estómago [311], y páncreas [312, 313].

Se ha descrito que el silenciamiento del gen de 14-3-3 σ también ocurre por hipermetilación [147], lo cual es considerado como un evento temprano en varios procesos malignos. Por otra parte, 14-3-3 σ se induce por irradiación- γ o el uso de agentes que dañan al ADN [136, 145]. La secuencia promotora del gen que codifica para 14-3-3 σ hay un elemento que responde a p53 y este efecto inductor sería dependiente de este factor proapoptótico.

El otro efecto importante de las proteínas TPR además de regular la localización subcelular de factores nucleares, ocurre a nivel transcripcional. Es así que en estudios previos, FKBP51 y FKBP52 (las mismas proteínas TPR relacionadas al transporte de los RE) mostraron efectos antagónicos sobre la transcripción dependiente de esteroide [301] así como en la respuesta de NF- κ B [185], siendo FKBP52 un factor neutro o estimulante y FKBP51 inhibitorio, excepto para el caso de AR [117] en el que es estimulante. Debido a que existen proteínas como la parvulina Pin1 que están emparentadas con las inmunofilinas y muestran capacidad regulatoria sobre la transcripción, y son a su vez reclutadas a sitios activos [229], en estudios previos postulamos y demostramos que ambas, FKBP51 y FKBP52, participan de una acción de tipo *ying-yang* en sitios promotores de genes que responden a NF- κ B. Por tal motivo hipotetizamos que las mismas proteínas TPR aquí estudiadas podían ejercer efectos sobre la transcripción de GR y AR. Analizada la literatura al respecto, nos encontramos

con reportes que agregan confusión antes que elucidación del tema ya que los mismos son altamente discrepantes y opuestos en sus conclusiones, como ya se comentó en el capítulo 2. Acorde a nuestros propios datos, tanto PP5 como 14-3-3 σ mostraron curva bifásicas en su efecto activador sobre GR, lo cual explica bastante respecto de las mencionadas discrepancias ya que los niveles de expresión de ambas proteínas pueden variar significativamente según el tipo celular y la etapa del ciclo en la que se encuentran. Este factor nunca fue considerado en ninguno de los estudios ya publicados a la fecha en este campo. Por otra parte, PP5 activó a AR mientras que 14-3-3 σ se mostró como inhibidor de AR. Tomados en su conjunto, y considerando el pobre nivel de expresión de 14-3-3 σ en células prostáticas y la elevada expresión de PP5 en las mismas, estas observaciones podrían tener importancia en el balance de actividad AR/GR en el cáncer prostático, situación en la que hay un mayor grado de expresión de PP5 respecto de células normales [221], a la vez que 14-3-3 σ , como ya se mencionó, muestra niveles de expresión casi indetectables. Ello favorecería la mayor actividad del factor pro-oncogénico, AR (favorecido por PP5 y no inhibido por 14-3-3 σ) y la menor actividad de su factor de contrabalance funcional, GR, el que no se vería activado por 14-3-3 σ y, respecto de PP5, si estuviera muy inducida como es el caso en estas células [221], podría caer en la parte descendente de la curva bifásica, todo lo cual favorecería la progresión tumoral en la próstata.

Como ya se adelantó en el capítulo 3, utilizar a las proteínas TPR como blancos farmacológicos tiene al presente el inconveniente de no contar con drogas que sean específicas, y siendo los efectos de estas proteínas antagónicos en varios casos, se estarían estimulando e inhibiendo las mismas vías de señalización al mismo tiempo. Siendo que las proteínas TPR constituyen una unidad funcional con Hsp90, esta chaperona puede ser el blanco alternativo. Fue por ello que en un trabajo en colaboración con el Dr. Sayan Gupta se diseñaron drogas que pudieran unirse a Hsp90 e inhibir su actividad de ATPasa, a la que históricamente se la correlacionó de manera directa con el resto de las propiedades de la chaperona ya que las que clásicamente se han utilizado (geldanamicina, 17-AAG, radicicol, etc.) son todas inhibidoras de tal actividad. En el conjunto de compuestos aquí ensayados, claramente demostramos que, aunque ese dogma haya sido heurístico para el avance del conocimiento en este campo, no es correcto. Como ya se analizó en detalle al final del capítulo anterior, no

existe correlación directa entre la capacidad inhibitoria de la actividad de ATPasa y la inhibición de las propiedades biológicas de esta chaperona. Más allá del dato académico que ello representa, desde el punto de vista práctico podemos decir que se encontraron drogas nuevas que poseen efectos inhibitorios *in vitro* sobre la actividad enzimática, siendo algunas tan eficientes como GA (p.ej. S3 y S22) y otras significativamente más efectivas, como S15. También se encontraron compuestos que fueron capaces de disminuir la viabilidad de las células prostáticas. Por ejemplo, S8 y S31 para células PC3 y S45 para ambas líneas (PC3 y C4-2), debiéndoselos ensayar *in vivo* en un paso subsiguiente. Para ello, ya estamos criando ratones inmunodeficientes de la cepa Squid/Nod con el objeto de hacer estos estudios en cultivos xenográficos, no solamente en cuanto a velocidad de crecimiento tumoral y masa tumoral, sino también respecto de la motilidad celular (y eventualmente, invasividad), ensayos en los que el compuesto S8 mostró promisorias cualidades (Figura 61), así como la mayoría de las drogas ensayadas en la Figura 66 para la actividad de MMP9 (proteasa dependiente de una Hsp90 funcional para su actividad [289]).

Debe remarcarse el hecho que, a diferencia de GA, los compuestos activos para los ensayos arriba mencionados se mostraron incapaces de prevenir la translocación nuclear de los RE y su actividad transcripcional, lo que sería una ventaja respecto de las drogas clásicas que afectan a todos los procesos por igual, produciendo eventualmente efectos secundarios no deseados. A su vez, el desarrollo de drogas específicas para cada IMM está en marcha [314], pero los resultados hasta el momento no han logrado la deseada especificidad de acción.

BIBLIOGRAFÍA

1. Gronemeyer, H., J.A. Gustafsson, and V. Laudet, *Principles for modulation of the nuclear receptor superfamily*. Nat Rev Drug Discov, 2004. **3**(11): p. 950-64.
2. Escriva, H., S. Bertrand, and V. Laudet, *The evolution of the nuclear receptor superfamily*. Essays Biochem, 2004. **40**: p. 11-26.
3. Robinson-Rechavi, M., H. Escriva Garcia, and V. Laudet, *The nuclear receptor superfamily*. J Cell Sci, 2003. **116**(Pt 4): p. 585-6.
4. Galigniana, M.D. (2005) *El heterocomplejo hsp90•inmunofilina de alto peso molecular como maquinaria molecular de transporte de proteínas solubles*. Química Viva **4**.
5. Mangelsdorf, D.J., et al., *The nuclear receptor superfamily: the second decade*. Cell, 1995. **83**(6): p. 835-9.
6. Evans, R.M., *The steroid and thyroid hormone receptor superfamily*. Science, 1988. **240**(4854): p. 889-95.
7. Baker, M.E., *Evolution of adrenal and sex steroid action in vertebrates: a ligand-based mechanism for complexity*. Bioessays, 2003. **25**(4): p. 396-400.
8. Escriva, H., et al., *Ligand binding was acquired during evolution of nuclear receptors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(13): p. 6803-8.
9. Bledsoe, R.K., E.L. Stewart, and K.H. Pearce, *Structure and function of the glucocorticoid receptor ligand binding domain*. Vitam Horm, 2004. **68**: p. 49-91.
10. Chrousos, G.P., E. Charmandari, and T. Kino, *Glucocorticoid action networks--an introduction to systems biology*. J Clin Endocrinol Metab, 2004. **89**(2): p. 563-4.
11. Chrousos, G.P., *The glucocorticoid receptor gene, longevity, and the complex disorders of Western societies*. Am J Med, 2004. **117**(3): p. 204-7.
12. Galon, J., et al., *Gene profiling reveals unknown enhancing and suppressive actions of glucocorticoids on immune cells*. FASEB J, 2002. **16**(1): p. 61-71.
13. Rhen, T. and J.A. Cidlowski, *Antiinflammatory action of glucocorticoids--new mechanisms for old drugs*. N Engl J Med, 2005. **353**(16): p. 1711-23.
14. Hollenberg, S.M., et al., *Primary structure and expression of a functional human glucocorticoid receptor cDNA*. Nature, 1985. **318**(6047): p. 635-41.
15. Oakley, R.H. and J.A. Cidlowski, *Cellular processing of the glucocorticoid receptor gene and protein: new mechanisms for generating tissue-specific actions of glucocorticoids*. J Biol Chem, 2011. **286**(5): p. 3177-84.
16. Oakley, R.H. and J.A. Cidlowski, *The biology of the glucocorticoid receptor: new signaling mechanisms in health and disease*. J Allergy Clin Immunol, 2013. **132**(5): p. 1033-44.
17. Zilliacus, J., et al., *Structural determinants of DNA-binding specificity by steroid receptors*. Mol Endocrinol, 1995. **9**(4): p. 389-400.
18. Dostert, A. and T. Heinzel, *Negative glucocorticoid receptor response elements and their role in glucocorticoid action*. Curr Pharm Des, 2004. **10**(23): p. 2807-16.
19. Necela, B.M. and J.A. Cidlowski, *Mechanisms of glucocorticoid receptor action in noninflammatory and inflammatory cells*. Proc Am Thorac Soc, 2004. **1**(3): p. 239-46.
20. Newton, R. and N.S. Holden, *Separating transrepression and transactivation: a distressing divorce for the glucocorticoid receptor?* Mol Pharmacol, 2007. **72**(4): p. 799-809.
21. Lubahn, D.B., et al., *Cloning of human androgen receptor complementary DNA and localization to the X chromosome*. Science, 1988. **240**(4850): p. 327-30.

22. Migeon, B.R., et al., *Studies of the locus for androgen receptor: localization on the human X chromosome and evidence for homology with the Tfm locus in the mouse.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1981. **78**(10): p. 6339-43.
23. Gao, T. and M.J. McPhaul, *Functional activities of the A and B forms of the human androgen receptor in response to androgen receptor agonists and antagonists.* Mol Endocrinol, 1998. **12**(5): p. 654-63.
24. Wilson, J.D., *The promiscuous receptor. Prostate cancer comes of age.* N Engl J Med, 1995. **332**(21): p. 1440-1.
25. Gao, W., C.E. Bohl, and J.T. Dalton, *Chemistry and structural biology of androgen receptor.* Chem Rev, 2005. **105**(9): p. 3352-70.
26. Katsu, Y., et al., *Molecular cloning and characterization of estrogen, androgen, and progesterone nuclear receptors from a freshwater turtle (Pseudemys nelsoni).* Endocrinology, 2008. **149**(1): p. 161-73.
27. Balk, S.P., *Androgen receptor as a target in androgen-independent prostate cancer.* Urology, 2002. **60**(3 Suppl 1): p. 132-8; discussion 138-9.
28. Heidenreich, A., et al., *EAU guidelines on prostate cancer. part 1: screening, diagnosis, and local treatment with curative intent-update 2013.* Eur Urol, 2014. **65**(1): p. 124-37.
29. Michels, G. and U.C. Hoppe, *Rapid actions of androgens.* Front Neuroendocrinol, 2008. **29**(2): p. 182-98.
30. Nicolaidis, N.C., et al., *The human glucocorticoid receptor: molecular basis of biologic function.* Steroids, 2010. **75**(1): p. 1-12.
31. Sanchez, E.R., et al., *Relationship of the 90-kDa murine heat shock protein to the untransformed and transformed states of the L cell glucocorticoid receptor.* J Biol Chem, 1987. **262**(15): p. 6986-91.
32. Pratt, W.B. and D.O. Toft, *Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones.* Endocr Rev, 1997. **18**(3): p. 306-60.
33. Pratt, W.B., et al., *Role of molecular chaperones in steroid receptor action.* Essays Biochem, 2004. **40**: p. 41-58.
34. Galigniana, M.D., et al., *Heat shock protein 90-dependent (geldanamycin-inhibited) movement of the glucocorticoid receptor through the cytoplasm to the nucleus requires intact cytoskeleton.* Mol Endocrinol, 1998. **12**(12): p. 1903-13.
35. Galigniana, M.D. and G. Piwien-Pilipuk, *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, 1999. **341** (Pt 3): p. 585-92.
36. Silverstein, A.M., et al., *Different regions of the immunophilin FKBP52 determine its association with the glucocorticoid receptor, hsp90, and cytoplasmic dynein.* J Biol Chem, 1999. **274**(52): p. 36980-6.
37. Yamamoto, K.R., *Multilayered control of intracellular receptor function.* Harvey Lect, 1995. **91**: p. 1-19.
38. Jenkins, B.D., C.B. Pullen, and B.D. Darimont, *Novel glucocorticoid receptor coactivator effector mechanisms.* Trends Endocrinol Metab, 2001. **12**(3): p. 122-6.
39. Lamont, K.R. and D.J. Tindall, *Androgen regulation of gene expression.* Adv Cancer Res, 2010. **107**: p. 137-62.
40. Galigniana, M.D., et al., *The hsp90-FKBP52 complex links the mineralocorticoid receptor to motor proteins and persists bound to the receptor in early nuclear events.* Mol Cell Biol, 2010. **30**(5): p. 1285-98.
41. Echeverria, P.C., et al., *Nuclear import of the glucocorticoid receptor-hsp90 complex through the nuclear pore complex is mediated by its interaction with Nup62 and importin beta.* Mol Cell Biol, 2009. **29**(17): p. 4788-97.
42. Galigniana, M.D., *The biology of molecular chaperones--very complex activities for quite simple proteins.* Curr Protein Pept Sci, 2014. **15**(3): p. 169-70.

43. Csermely, P., et al., *The 90-kDa molecular chaperone family: structure, function, and clinical applications. A comprehensive review.* Pharmacol Ther, 1998. **79**(2): p. 129-68.
44. Prince, T. and R.L. Matts, *Definition of protein kinase sequence motifs that trigger high affinity binding of Hsp90 and Cdc37.* J Biol Chem, 2004. **279**(38): p. 39975-81.
45. Pratt, W.B., Y. Morishima, and Y. Osawa, *The Hsp90 chaperone machinery regulates signaling by modulating ligand binding clefts.* J Biol Chem, 2008. **283**(34): p. 22885-9.
46. Hartl, F.U. and M. Hayer-Hartl, *Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein.* Science, 2002. **295**(5561): p. 1852-8.
47. Galigniana, M.D., et al., *Role of molecular chaperones and TPR-domain proteins in the cytoplasmic transport of steroid receptors and their passage through the nuclear pore.* Nucleus, 2010. **1**(4): p. 299-308.
48. Chen, B., D. Zhong, and A. Monteiro, *Comparative genomics and evolution of the HSP90 family of genes across all kingdoms of organisms.* BMC Genomics, 2006. **7**: p. 156.
49. Gupta, R.S., *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**(6): p. 1063-73.
50. Hickey, E., et al., *Sequence and regulation of a gene encoding a human 89-kilodalton heat shock protein.* Mol Cell Biol, 1989. **9**(6): p. 2615-26.
51. Sreedhar, A.S., et al., *Hsp90 isoforms: functions, expression and clinical importance.* FEBS Lett, 2004. **562**(1-3): p. 11-5.
52. Scheufler, C., et al., *Structure of TPR domain-peptide complexes: critical elements in the assembly of the Hsp70-Hsp90 multichaperone machine.* Cell, 2000. **101**(2): p. 199-210.
53. Prodromou, C., et al., *Regulation of Hsp90 ATPase activity by tetratricopeptide repeat (TPR)-domain co-chaperones.* Embo J, 1999. **18**(3): p. 754-62.
54. Chen, S., et al., *Differential interactions of p23 and the TPR-containing proteins Hop, Cyp40, FKBP52 and FKBP51 with Hsp90 mutants.* Cell Stress Chaperones, 1998. **3**(2): p. 118-29.
55. Grenert, J.P., et al., *The amino-terminal domain of heat shock protein 90 (hsp90) that binds geldanamycin is an ATP/ADP switch domain that regulates hsp90 conformation.* J Biol Chem, 1997. **272**(38): p. 23843-50.
56. Roe, S.M., et al., *Structural basis for inhibition of the Hsp90 molecular chaperone by the antitumor antibiotics radicicol and geldanamycin.* J Med Chem, 1999. **42**(2): p. 260-6.
57. Schulte, T.W., et al., *Disruption of the Raf-1-Hsp90 molecular complex results in destabilization of Raf-1 and loss of Raf-1-Ras association.* J Biol Chem, 1995. **270**(41): p. 24585-8.
58. Smith, D.F., et al., *Assembly of progesterone receptor with heat shock proteins and receptor activation are ATP mediated events.* J Biol Chem, 1992. **267**(2): p. 1350-6.
59. Ziemiecki, A., et al., *Association of the heat shock protein hsp90 with steroid hormone receptors and tyrosine kinase oncogene products.* Biochem Biophys Res Commun, 1986. **138**(3): p. 1298-307.
60. Howard, K.J., et al., *Mapping the HSP90 binding region of the glucocorticoid receptor.* J Biol Chem, 1990. **265**(20): p. 11928-35.
61. Xu, Y. and S. Lindquist, *Heat-shock protein hsp90 governs the activity of pp60v-src kinase.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(15): p. 7074-8.
62. Gu, F., et al., *A novel mutation in AlphaA-crystallin (CRYAA) caused autosomal dominant congenital cataract in a large Chinese family.* Hum Mutat, 2008. **29**(5): p. 769.
63. Momose, F., et al., *Identification of Hsp90 as a stimulatory host factor involved in influenza virus RNA synthesis.* J Biol Chem, 2002. **277**(47): p. 45306-14.

64. Mayor, A., et al., *A crucial function of SGT1 and HSP90 in inflammasome activity links mammalian and plant innate immune responses*. Nat Immunol, 2007. **8**(5): p. 497-503.
65. Boulon, S., et al., *HSP90 and its R2TP/Prefoldin-like cochaperone are involved in the cytoplasmic assembly of RNA polymerase II*. Mol Cell, 2010. **39**(6): p. 912-24.
66. Guo, Y., et al., *Evidence for a mechanism of repression of heat shock factor 1 transcriptional activity by a multichaperone complex*. J Biol Chem, 2001. **276**(49): p. 45791-9.
67. Zou, J., 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**(4): p. 471-80.
68. Nadeau, K., A. Das, and C.T. Walsh, *Hsp90 chaperonins possess ATPase activity and bind heat shock transcription factors and peptidyl prolyl isomerases*. J Biol Chem, 1993. **268**(2): p. 1479-87.
69. Hubert, D.A., et al., *Specific Arabidopsis HSP90.2 alleles recapitulate RAR1 cochaperone function in plant NB-LRR disease resistance protein regulation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(24): p. 9556-63.
70. Toogun, O.A., D.C. Dezwaan, and B.C. Freeman, *The hsp90 molecular chaperone modulates multiple telomerase activities*. Mol Cell Biol, 2008. **28**(1): p. 457-67.
71. Pratt, W.B., et al., *Proposal for a role of the Hsp90/Hsp70-based chaperone machinery in making triage decisions when proteins undergo oxidative and toxic damage*. Exp Biol Med (Maywood), 2010. **235**(3): p. 278-89.
72. Picard, D., et al., *Reduced levels of hsp90 compromise steroid receptor action in vivo*. Nature, 1990. **348**(6297): p. 166-8.
73. Pratt, W.B., et al., *The relationship between glucocorticoid receptor binding to Hsp90 and receptor function*. Nihon Naibunpi Gakkai Zasshi, 1990. **66**(12): p. 1185-97.
74. Young, J.C., N.J. Hoogenraad, and F.U. Hartl, *Molecular chaperones Hsp90 and Hsp70 deliver preproteins to the mitochondrial import receptor Tom70*. Cell, 2003. **112**(1): p. 41-50.
75. Whittier, J.E., et al., *Hsp90 enhances degradation of oxidized calmodulin by the 20 S proteasome*. J Biol Chem, 2004. **279**(44): p. 46135-42.
76. Dezwaan, D.C. and B.C. Freeman, *HSP90: the Rosetta stone for cellular protein dynamics?* Cell Cycle, 2008. **7**(8): p. 1006-12.
77. Taipale, M., D.F. Jarosz, and S. Lindquist, *HSP90 at the hub of protein homeostasis: emerging mechanistic insights*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2010. **11**(7): p. 515-28.
78. Li, W., D. Sahu, and F. Tsen, *Secreted heat shock protein-90 (Hsp90) in wound healing and cancer*. Biochim Biophys Acta, 2012. **1823**(3): p. 730-41.
79. Welch, W.J. and J.R. Feramisco, *Purification of the major mammalian heat shock proteins*. J Biol Chem, 1982. **257**(24): p. 14949-59.
80. Lai, B.T., et al., *Quantitation and intracellular localization of the 85K heat shock protein by using monoclonal and polyclonal antibodies*. Mol Cell Biol, 1984. **4**(12): p. 2802-10.
81. Nollen, E.A. and R.I. Morimoto, *Chaperoning signaling pathways: molecular chaperones as stress-sensing 'heat shock' proteins*. J Cell Sci, 2002. **115**(Pt 14): p. 2809-16.
82. Piwien-Pilipuk, G., et al., *Impairment of mineralocorticoid receptor (MR)-dependent biological response by oxidative stress and aging: correlation with post-translational modification of MR and decreased ADP-ribosylatable level of elongating factor 2 in kidney cells*. J Biol Chem, 2002. **277**(14): p. 11896-903.
83. Neckers, L., A. Kern, and S. Tsutsumi, *Hsp90 inhibitors disrupt mitochondrial homeostasis in cancer cells*. Chem Biol, 2007. **14**(11): p. 1204-6.
84. Trepel, J., et al., *Targeting the dynamic HSP90 complex in cancer*. Nat Rev Cancer, 2010. **10**(8): p. 537-49.

85. Kim, Y.S., et al., *Update on Hsp90 inhibitors in clinical trial*. *Curr Top Med Chem*, 2009. **9**(15): p. 1479-92.
86. D'Andrea, L.D. and L. Regan, *TPR proteins: the versatile helix*. *Trends Biochem Sci*, 2003. **28**(12): p. 655-62.
87. Das, A.K., P.W. Cohen, and D. Barford, *The structure of the tetratricopeptide repeats of protein phosphatase 5: implications for TPR-mediated protein-protein interactions*. *EMBO J*, 1998. **17**(5): p. 1192-9.
88. Blatch, G.L. and M. Lassar, *The tetratricopeptide repeat: a structural motif mediating protein-protein interactions*. *Bioessays*, 1999. **21**(11): p. 932-9.
89. Smith, D.F., *Tetratricopeptide repeat cochaperones in steroid receptor complexes*. *Cell Stress Chaperones*, 2004. **9**(2): p. 109-21.
90. Hirano, T., et al., *Snap helix with knob and hole: essential repeats in S. pombe nuclear protein nuc2+*. *Cell*, 1990. **60**(2): p. 319-28.
91. Sikorski, R.S., et al., *A repeating amino acid motif in CDC23 defines a family of proteins and a new relationship among genes required for mitosis and RNA synthesis*. *Cell*, 1990. **60**(2): p. 307-17.
92. King, R.W., et al., *A 20S complex containing CDC27 and CDC16 catalyzes the mitosis-specific conjugation of ubiquitin to cyclin B*. *Cell*, 1995. **81**(2): p. 279-88.
93. Pirkl, F. and J. Buchner, *Functional analysis of the Hsp90-associated human peptidyl prolyl cis/trans isomerases FKBP51, FKBP52 and Cyp40*. *J Mol Biol*, 2001. **308**(4): p. 795-806.
94. Barent, R.L., et al., *Analysis of FKBP51/FKBP52 chimeras and mutants for Hsp90 binding and association with progesterone receptor complexes*. *Mol Endocrinol*, 1998. **12**(3): p. 342-54.
95. Erlejman, A.G., M. Lagadari, and M.D. Galigniana, *Hsp90-binding immunophilins as a potential new platform for drug treatment*. *Future Med Chem*, 2013. **5**(5): p. 591-607.
96. Mazaira, G.I., et al., *The Emerging Role of TPR-Domain Immunophilins in the Mechanism of Action of Steroid Receptors* *Nucl Receptor Res*, 2014. **1**: p. In press.
97. Erlejman, A.G., et al., *Molecular chaperone activity and biological regulatory actions of the TPR-domain immunophilins FKBP51 and FKBP52*. *Curr Protein Pept Sci*, 2014. **15**(3): p. 205-15.
98. Davies, T.H. and E.R. Sanchez, *Fkbp52*. *Int J Biochem Cell Biol*, 2005. **37**(1): p. 42-7.
99. Pratt, W.B., et al., *Role of hsp90 and the hsp90-binding immunophilins in signalling protein movement*. *Cell Signal*, 2004. **16**(8): p. 857-72.
100. Li, H., A. Rao, and P.G. Hogan, *Interaction of calcineurin with substrates and targeting proteins*. *Trends Cell Biol*, 2011. **21**(2): p. 91-103.
101. Pratt, W.B., *The role of heat shock proteins in regulating the function, folding, and trafficking of the glucocorticoid receptor*. *J Biol Chem*, 1993. **268**(29): p. 21455-8.
102. Galigniana, M.D., et al., *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*, 2002. **41**(46): p. 13602-10.
103. McKeen, H.D., et al., *A novel FK506-like binding protein interacts with the glucocorticoid receptor and regulates steroid receptor signaling*. *Endocrinology*, 2008. **149**(11): p. 5724-34.
104. Berg, P. and I. Pongratz, *Two parallel pathways mediate cytoplasmic localization of the dioxin (aryl hydrocarbon) receptor*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(35): p. 32310-9.
105. Silverstein, A.M., et al., *Protein phosphatase 5 is a major component of glucocorticoid receptor.hsp90 complexes with properties of an FK506-binding immunophilin*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(26): p. 16224-30.
106. Sinars, C.R., et al., *Structure of the large FK506-binding protein FKBP51, an Hsp90-binding protein and a component of steroid receptor complexes*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. **100**(3): p. 868-73.

107. Wochnik, G.M., et al., *FK506-binding proteins 51 and 52 differentially regulate dynein interaction and nuclear translocation of the glucocorticoid receptor in mammalian cells*. J Biol Chem, 2005. **280**(6): p. 4609-16.
108. Davies, T.H., Y.M. Ning, and E.R. Sanchez, *A new first step in activation of steroid receptors: hormone-induced switching of FKBP51 and FKBP52 immunophilins*. J Biol Chem, 2002. **277**(7): p. 4597-600.
109. Sanchez, E.R., *Hsp56: a novel heat shock protein associated with untransformed steroid receptor complexes*. J Biol Chem, 1990. **265**(36): p. 22067-70.
110. Baughman, G., et al., *Tissue distribution and abundance of human FKBP51, and FK506-binding protein that can mediate calcineurin inhibition*. Biochem Biophys Res Commun, 1997. **232**(2): p. 437-43.
111. Reynolds, P.D., et al., *Glucocorticoid resistance in the squirrel monkey is associated with overexpression of the immunophilin FKBP51*. J Clin Endocrinol Metab, 1999. **84**(2): p. 663-9.
112. Denny, W.B., et al., *Squirrel monkey immunophilin FKBP51 is a potent inhibitor of glucocorticoid receptor binding*. Endocrinology, 2000. **141**(11): p. 4107-13.
113. Scammell, J.G., et al., *Overexpression of the FK506-binding immunophilin FKBP51 is the common cause of glucocorticoid resistance in three New World primates*. Gen Comp Endocrinol, 2001. **124**(2): p. 152-65.
114. Denny, W.B., et al., *Structure-function analysis of squirrel monkey FK506-binding protein 51, a potent inhibitor of glucocorticoid receptor activity*. Endocrinology, 2005. **146**(7): p. 3194-201.
115. Galigniana, M.D., et al., *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, 2001. **276**(18): p. 14884-9.
116. Riggs, D.L., et al., *The Hsp90-binding peptidylprolyl isomerase FKBP52 potentiates glucocorticoid signaling in vivo*. Embo J, 2003. **22**(5): p. 1158-67.
117. Periyasamy, S., et al., *FKBP51 and Cyp40 are positive regulators of androgen-dependent prostate cancer cell growth and the targets of FK506 and cyclosporin A*. Oncogene, 2010. **29**(11): p. 1691-701.
118. Ni, L., et al., *FKBP51 promotes assembly of the Hsp90 chaperone complex and regulates androgen receptor signaling in prostate cancer cells*. Mol Cell Biol, 2010. **30**(5): p. 1243-53.
119. Yong, W., et al., *Essential role for Co-chaperone Fkbp52 but not Fkbp51 in androgen receptor-mediated signaling and physiology*. J Biol Chem, 2007. **282**(7): p. 5026-36.
120. Gallo, L.I., et al., *The 90-kDa heat-shock protein (Hsp90)-binding immunophilin FKBP51 is a mitochondrial protein that translocates to the nucleus to protect cells against oxidative stress*. J Biol Chem, 2011. **286**(34): p. 30152-60.
121. Chinkers, M., *Targeting of a distinctive protein-serine phosphatase to the protein kinase-like domain of the atrial natriuretic peptide receptor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(23): p. 11075-9.
122. Chen, M.X., et al., *A novel human protein serine/threonine phosphatase, which possesses four tetratricopeptide repeat motifs and localizes to the nucleus*. EMBO J, 1994. **13**(18): p. 4278-90.
123. Becker, W., et al., *Molecular cloning of a protein serine/threonine phosphatase containing a putative regulatory tetratricopeptide repeat domain*. J Biol Chem, 1994. **269**(36): p. 22586-92.
124. Chen, M.X. and P.T. Cohen, *Activation of protein phosphatase 5 by limited proteolysis or the binding of polyunsaturated fatty acids to the TPR domain*. FEBS Lett, 1997. **400**(1): p. 136-40.

125. Chinkers, M., *Protein phosphatase 5 in signal transduction*. Trends Endocrinol Metab, 2001. **12**(1): p. 28-32.
126. Yang, J., et al., *Molecular basis for TPR domain-mediated regulation of protein phosphatase 5*. Embo J, 2005. **24**(1): p. 1-10.
127. Hinds, T.D., Jr. and E.R. Sanchez, *Protein phosphatase 5*. Int J Biochem Cell Biol, 2008. **40**(11): p. 2358-62.
128. Chen, M.S., et al., *The tetratricopeptide repeat domain of protein phosphatase 5 mediates binding to glucocorticoid receptor heterocomplexes and acts as a dominant negative mutant*. J Biol Chem, 1996. **271**(50): p. 32315-20.
129. Davies, T.H., Y.M. Ning, and E.R. Sanchez, *Differential control of glucocorticoid receptor hormone-binding function by tetratricopeptide repeat (TPR) proteins and the immunosuppressive ligand FK506*. Biochemistry, 2005. **44**(6): p. 2030-8.
130. Wang, Z., et al., *Modulation of glucocorticoid receptor phosphorylation and transcriptional activity by a C-terminal-associated protein phosphatase*. Mol Endocrinol, 2007. **21**(3): p. 625-34.
131. Zuo, Z., et al., *Ser/Thr protein phosphatase type 5 (PP5) is a negative regulator of glucocorticoid receptor-mediated growth arrest*. Biochemistry, 1999. **38**(28): p. 8849-57.
132. Wang, W. and D.C. Shakes, *Molecular evolution of the 14-3-3 protein family*. J Mol Evol, 1996. **43**(4): p. 384-98.
133. Obsilova, V., et al., *Mechanisms of the 14-3-3 protein function: regulation of protein function through conformational modulation*. Physiol Res, 2014. **63 Suppl 1**: p. S155-64.
134. Mackintosh, C., *Dynamic interactions between 14-3-3 proteins and phosphoproteins regulate diverse cellular processes*. Biochem J, 2004. **381**(Pt 2): p. 329-42.
135. Matyushenko, A.M., et al., *Structural and functional effects of two stabilizing substitutions, D137L and G126R, in the middle part of alpha-tropomyosin molecule*. FEBS J, 2014. **281**(8): p. 2004-16.
136. Chan, T.A., et al., *14-3-3Sigma is required to prevent mitotic catastrophe after DNA damage*. Nature, 1999. **401**(6753): p. 616-20.
137. van Hemert, M.J., et al., *Isoform-specific differences in rapid nucleocytoplasmic shuttling cause distinct subcellular distributions of 14-3-3 sigma and 14-3-3 zeta*. J Cell Sci, 2004. **117**(Pt 8): p. 1411-20.
138. Wilker, E.W., et al., *A structural basis for 14-3-3sigma functional specificity*. J Biol Chem, 2005. **280**(19): p. 18891-8.
139. Yaffe, M.B., et al., *The structural basis for 14-3-3:phosphopeptide binding specificity*. Cell, 1997. **91**(7): p. 961-71.
140. Xiao, B., et al., *Structure of a 14-3-3 protein and implications for coordination of multiple signalling pathways*. Nature, 1995. **376**(6536): p. 188-91.
141. Liu, D., et al., *Crystal structure of the zeta isoform of the 14-3-3 protein*. Nature, 1995. **376**(6536): p. 191-4.
142. Verdoodt, B., et al., *Characterization of 14-3-3sigma dimerization determinants: requirement of homodimerization for inhibition of cell proliferation*. Cell Cycle, 2006. **5**(24): p. 2920-6.
143. Kino, T., et al., *Protein 14-3-3sigma interacts with and favors cytoplasmic subcellular localization of the glucocorticoid receptor, acting as a negative regulator of the glucocorticoid signaling pathway*. J Biol Chem, 2003. **278**(28): p. 25651-6.
144. Quayle, S.N. and M.D. Sadar, *14-3-3 sigma increases the transcriptional activity of the androgen receptor in the absence of androgens*. Cancer Lett, 2007. **254**(1): p. 137-45.
145. Hermeking, H., et al., *14-3-3 sigma is a p53-regulated inhibitor of G2/M progression*. Mol Cell, 1997. **1**(1): p. 3-11.

146. Toyota, M., et al., *Cancer epigenomics: implications of DNA methylation in personalized cancer therapy*. *Cancer Sci*, 2009. **100**(5): p. 787-91.
147. Ferguson, A.T., et al., *High frequency of hypermethylation at the 14-3-3 sigma locus leads to gene silencing in breast cancer*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. **97**(11): p. 6049-54.
148. Suzuki, H., et al., *Inactivation of the 14-3-3 sigma gene is associated with 5' CpG island hypermethylation in human cancers*. *Cancer Res*, 2000. **60**(16): p. 4353-7.
149. Drabik, A., et al., *A comparative study of glycoproteomes in androgen-sensitive and -independent prostate cancer cell lines*. *Mol Cell Biochem*, 2014. **386**(1-2): p. 189-98.
150. Kitagawa, K., et al., *SGT1 encodes an essential component of the yeast kinetochore assembly pathway and a novel subunit of the SCF ubiquitin ligase complex*. *Mol Cell*, 1999. **4**(1): p. 21-33.
151. Wang, H., et al., *Overexpression of small glutamine-rich TPR-containing protein promotes apoptosis in 7721 cells*. *FEBS Lett*, 2005. **579**(5): p. 1279-84.
152. Winnefeld, M., J. Rommelaere, and C. Cziepluch, *The human small glutamine-rich TPR-containing protein is required for progress through cell division*. *Exp Cell Res*, 2004. **293**(1): p. 43-57.
153. Dubacq, C., et al., *Sgt1p contributes to cyclic AMP pathway activity and physically interacts with the adenylyl cyclase Cyr1p/Cdc35p in budding yeast*. *Eukaryot Cell*, 2002. **1**(4): p. 568-82.
154. Kadota, Y. and K. Shirasu, *The HSP90 complex of plants*. *Biochim Biophys Acta*, 2012. **1823**(3): p. 689-97.
155. Kordes, E., et al., *Isolation and characterization of human SGT and identification of homologues in Saccharomyces cerevisiae and Caenorhabditis elegans*. *Genomics*, 1998. **52**(1): p. 90-4.
156. Liou, S.T. and C. Wang, *Small glutamine-rich tetratricopeptide repeat-containing protein is composed of three structural units with distinct functions*. *Arch Biochem Biophys*, 2005. **435**(2): p. 253-63.
157. Lee, Y.T., et al., *Human Sgt1 binds HSP90 through the CHORD-Sgt1 domain and not the tetratricopeptide repeat domain*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(16): p. 16511-7.
158. Zhang, S.L., et al., *Regulation of human hsp90alpha gene expression*. *FEBS Lett*, 1999. **444**(1): p. 130-5.
159. Yin, H., et al., *SGT, a Hsp90beta binding partner, is accumulated in the nucleus during cell apoptosis*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006. **343**(4): p. 1153-8.
160. Shen, Y., et al., *Essential role of the first intron in the transcription of hsp90beta gene*. *FEBS Lett*, 1997. **413**(1): p. 92-8.
161. Handley, M.A., et al., *Association of Vpu-binding protein with microtubules and Vpu-dependent redistribution of HIV-1 Gag protein*. *Virology*, 2001. **291**(2): p. 198-207.
162. Buchanan, G., et al., *Control of androgen receptor signaling in prostate cancer by the cochaperone small glutamine rich tetratricopeptide repeat containing protein alpha*. *Cancer Res*, 2007. **67**(20): p. 10087-96.
163. Piwien Pilipuk, G., et al., *Evidence for NL1-independent nuclear translocation of the mineralocorticoid receptor*. *Biochemistry*, 2007. **46**(5): p. 1389-97.
164. Hernandez-Diaz, I., et al., *The mineralocorticoid receptor is a constitutive nuclear factor in cardiomyocytes due to hyperactive nuclear localization signals*. *Endocrinology*, 2010. **151**(8): p. 3888-99.
165. Leslie, K.K., et al., *Progesterone receptor isoform identification and subcellular localization in endometrial cancer*. *Gynecol Oncol*, 2005. **96**(1): p. 32-41.
166. Galigniana, M.D., et al., *Inhibition of glucocorticoid receptor nucleocytoplasmic shuttling by okadaic acid requires intact cytoskeleton*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(23): p. 16222-7.

167. Galigniana, M.D., *Functional regulation of corticosteroid receptors by phosphorylation and redox potential*. Current Topics in Steroid Research, 2000. **3**: p. 1-22.
168. Galigniana, M.D., et al., *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, 2004. **123**(1-2): p. 27-36.
169. Vallee, R.B., et al., *Dynein: An ancient motor protein involved in multiple modes of transport*. J Neurobiol, 2004. **58**(2): p. 189-200.
170. Schroer, T.A., *Dynactin*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2004. **20**: p. 759-79.
171. Burkhardt, J.K., et al., *Overexpression of the dynamitin (p50) subunit of the dynactin complex disrupts dynein-dependent maintenance of membrane organelle distribution*. J Cell Biol, 1997. **139**(2): p. 469-84.
172. Harrell, J.M., et al., *Evidence for glucocorticoid receptor transport on microtubules by dynein*. J Biol Chem, 2004. **279**(52): p. 54647-54.
173. Galigniana, M.D., et al., *Hsp90-binding immunophilins link p53 to dynein during p53 transport to the nucleus*. J Biol Chem, 2004. **279**(21): p. 22483-9.
174. Colo, G.P., et al., *The p160 nuclear receptor co-activator RAC3 exerts an anti-apoptotic role through a cytoplasmatic action*. Oncogene, 2008. **27**(17): p. 2430-44.
175. Zhao, W., et al., *Role of cellular FKBP52 protein in intracellular trafficking of recombinant adeno-associated virus 2 vectors*. Virology, 2006. **353**(2): p. 283-93.
176. Li, P., et al., *Structure of the N-terminal domain of human FKBP52*. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 2003. **59**(Pt 1): p. 16-22.
177. Bublik, D.R., et al., *Human GTSE-1 regulates p21(CIP1/WAF1) stability conferring resistance to paclitaxel treatment*. J Biol Chem, 2010. **285**(8): p. 5274-81.
178. Thomas, M., et al., *Androgen receptor acetylation site mutations cause trafficking defects, misfolding, and aggregation similar to expanded glutamine tracts*. J Biol Chem, 2004. **279**(9): p. 8389-95.
179. Vafopoulou, X. and C.G. Steel, *Cytoplasmic travels of the ecdysteroid receptor in target cells: pathways for both genomic and non-genomic actions*. Front Endocrinol (Lausanne), 2012. **3**: p. 43.
180. Gallo, L.I., et al., *Differential recruitment of tetratricorpeptide repeat domain immunophilins to the mineralocorticoid receptor influences both heat-shock protein 90-dependent retrotransport and hormone-dependent transcriptional activity*. Biochemistry, 2007. **46**(49): p. 14044-57.
181. Nigg, E.A., *Nucleocytoplasmic transport: signals, mechanisms and regulation*. Nature, 1997. **386**(6627): p. 779-87.
182. Terry, L.J., E.B. Shows, and S.R. Wentz, *Crossing the nuclear envelope: hierarchical regulation of nucleocytoplasmic transport*. Science, 2007. **318**(5855): p. 1412-6.
183. Piwien Pilipuk, G., Galigniana, M.D., *Subcellular movement of signalling molecules. How and why?*, in *Focus on Cellular Signalling*, D.T. Leeds, Editor. 2006, Nova Publishers: New York. p. 73-107.
184. Grossmann, C., et al., *Nuclear shuttling precedes dimerization in mineralocorticoid receptor signaling*. Chem Biol, 2012. **19**(6): p. 742-51.
185. Erlejman, A.G., et al., *NF-kappaB Transcriptional Activity Is Modulated by FK506-binding Proteins FKBP51 and FKBP52: A ROLE FOR PEPTIDYL-PROLYL ISOMERASE ACTIVITY*. J Biol Chem, 2014. **289**(38): p. 26263-76.
186. Quinta, H.R., et al., *Subcellular rearrangement of hsp90-binding immunophilins accompanies neuronal differentiation and neurite outgrowth*. J Neurochem, 2010. **115**(3): p. 716-34.
187. Quinta, H.R. and M.D. Galigniana, *The neuroregenerative mechanism mediated by the Hsp90-binding immunophilin FKBP52 resembles the early steps of neuronal differentiation*. Br J Pharmacol, 2012. **166**(2): p. 637-49.

188. Vaughan, C.K., et al., *A common conformationally coupled ATPase mechanism for yeast and human cytoplasmic HSP90s*. FEBS J, 2009. **276**(1): p. 199-209.
189. Scheibel, T., et al., *ATP-binding properties of human Hsp90*. J Biol Chem, 1997. **272**(30): p. 18608-13.
190. Rowlands, M., et al., *Detection of the ATPase activity of the molecular chaperones Hsp90 and Hsp72 using the TranscreenerTM ADP assay kit*. J Biomol Screen, 2010. **15**(3): p. 279-86.
191. Sylvester, P.W., *Optimization of the tetrazolium dye (MTT) colorimetric assay for cellular growth and viability*. Methods Mol Biol, 2011. **716**: p. 157-68.
192. Scudiero, D.A., et al., *Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines*. Cancer Res, 1988. **48**(17): p. 4827-33.
193. Fontana, V., et al., *Matrix metalloproteinase expression and activity in trophoblast-decidual tissues at organogenesis in CF-1 mouse*. J Mol Histol, 2012. **43**(5): p. 487-96.
194. Defranco, D.B., et al., *Nucleocytoplasmic shuttling of steroid receptors*. Vitam Horm, 1995. **51**: p. 315-38.
195. Picard, D. and K.R. Yamamoto, *Two signals mediate hormone-dependent nuclear localization of the glucocorticoid receptor*. Embo J, 1987. **6**(11): p. 3333-40.
196. Qi, M., B.J. Hamilton, and D. DeFranco, *v-mos oncoproteins affect the nuclear retention and reutilization of glucocorticoid receptors*. Mol Endocrinol, 1989. **3**(8): p. 1279-88.
197. Czar, M.J., et al., *Evidence that the FK506-binding immunophilin heat shock protein 56 is required for trafficking of the glucocorticoid receptor from the cytoplasm to the nucleus*. Mol Endocrinol, 1995. **9**(11): p. 1549-60.
198. Hinds, T.D., Jr., et al., *Protein phosphatase 5 mediates lipid metabolism through reciprocal control of glucocorticoid receptor and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPARGamma)*. J Biol Chem, 2011. **286**(50): p. 42911-22.
199. Widen, C., et al., *Glucocorticoid receptor interaction with 14-3-3 and Raf-1, a proposed mechanism for cross-talk of two signal transduction pathways*. J Biol Chem, 2000. **275**(50): p. 39296-301.
200. Simental, J.A., et al., *Transcriptional activation and nuclear targeting signals of the human androgen receptor*. J Biol Chem, 1991. **266**(1): p. 510-8.
201. Georget, V., et al., *Mechanism of antiandrogen action: key role of hsp90 in conformational change and transcriptional activity of the androgen receptor*. Biochemistry, 2002. **41**(39): p. 11824-31.
202. Saporita, A.J., J. Ai, and Z. Wang, *The Hsp90 inhibitor, 17-AAG, prevents the ligand-independent nuclear localization of androgen receptor in refractory prostate cancer cells*. Prostate, 2007. **67**(5): p. 509-20.
203. Renoir, J.M., et al., *The non-DNA-binding heterooligomeric form of mammalian steroid hormone receptors contains a hsp90-bound 59-kilodalton protein*. J Biol Chem, 1990. **265**(18): p. 10740-5.
204. De Leon, J.T., et al., *Targeting the regulation of androgen receptor signaling by the heat shock protein 90 cochaperone FKBP52 in prostate cancer cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(29): p. 11878-83.
205. Shafi, A.A., M.B. Cox, and N.L. Weigel, *Androgen receptor splice variants are resistant to inhibitors of Hsp90 and FKBP52, which alter androgen receptor activity and expression*. Steroids, 2013. **78**(6): p. 548-54.
206. Yemelyanov, A., et al., *Differential targeting of androgen and glucocorticoid receptors induces ER stress and apoptosis in prostate cancer cells: a novel therapeutic modality*. Cell Cycle, 2012. **11**(2): p. 395-406.
207. Jhaveri, K., et al., *Advances in the clinical development of heat shock protein 90 (Hsp90) inhibitors in cancers*. Biochim Biophys Acta, 2012. **1823**(3): p. 742-55.

208. Singh, P., et al., *Combinatorial androgen receptor targeted therapy for prostate cancer*. *Endocr Relat Cancer*, 2006. **13**(3): p. 653-66.
209. Aridor, M. and L.A. Hannan, *Traffic jams II: an update of diseases of intracellular transport*. *Traffic*, 2002. **3**(11): p. 781-90.
210. Cobbold, C., et al., *Aberrant trafficking of transmembrane proteins in human disease*. *Trends Cell Biol*, 2003. **13**(12): p. 639-47.
211. Fabbro, M. and B.R. Henderson, *Regulation of tumor suppressors by nuclear-cytoplasmic shuttling*. *Exp Cell Res*, 2003. **282**(2): p. 59-69.
212. Perry, R.B. and M. Fainzilber, *Nuclear transport factors in neuronal function*. *Semin Cell Dev Biol*, 2009. **20**(5): p. 600-6.
213. Taipale, M., et al., *Quantitative analysis of HSP90-client interactions reveals principles of substrate recognition*. *Cell*, 2012. **150**(5): p. 987-1001.
214. Paul, A., et al., *The cochaperone SGTA (small glutamine-rich tetratricopeptide repeat-containing protein alpha) demonstrates regulatory specificity for the androgen, glucocorticoid, and progesterone receptors*. *J Biol Chem*, 2014. **289**(22): p. 15297-308.
215. Feldman, B.J. and D. Feldman, *The development of androgen-independent prostate cancer*. *Nat Rev Cancer*, 2001. **1**(1): p. 34-45.
216. Heinlein, C.A. and C. Chang, *Androgen receptor in prostate cancer*. *Endocr Rev*, 2004. **25**(2): p. 276-308.
217. McCarty, M.F., J. Hejazi, and R. Rastmanesh, *Beyond androgen deprivation: ancillary integrative strategies for targeting the androgen receptor addiction of prostate cancer*. *Integr Cancer Ther*, 2014. **13**(5): p. 386-95.
218. Lodygin, D., J. Diebold, and H. Hermeking, *Prostate cancer is characterized by epigenetic silencing of 14-3-3sigma expression*. *Oncogene*, 2004. **23**(56): p. 9034-41.
219. Trotta, A.P., et al., *Subdomain structure of the co-chaperone SGTA and activity of its androgen receptor client*. *J Mol Endocrinol*, 2012. **49**(2): p. 57-68.
220. Trotta, A.P., et al., *Knockdown of the cochaperone SGTA results in the suppression of androgen and PI3K/Akt signaling and inhibition of prostate cancer cell proliferation*. *Int J Cancer*, 2013. **133**(12): p. 2812-23.
221. Periyasamy, S., et al., *The immunophilin ligands cyclosporin A and FK506 suppress prostate cancer cell growth by androgen receptor-dependent and -independent mechanisms*. *Endocrinology*, 2007. **148**(10): p. 4716-26.
222. Taira, J. and Y. Higashimoto, *Caveolin-1 interacts with protein phosphatase 5 and modulates its activity in prostate cancer cells*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013. **431**(4): p. 724-8.
223. Mazaira, G.I., et al., *Biological relevance of Hsp90-binding immunophilins in cancer development and treatment*. *International Journal of Cancer*, 2015: p. In press.
224. Edlich, F., et al., *The specific FKBP38 inhibitor N-(N',N'-dimethylcarboxamidomethyl)cycloheximide has potent neuroprotective and neurotrophic properties in brain ischemia*. *J Biol Chem*, 2006. **281**(21): p. 14961-70.
225. Yeh, W.C., B.E. Bierer, and S.L. McKnight, *Rapamycin inhibits clonal expansion and adipogenic differentiation of 3T3-L1 cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. **92**(24): p. 11086-90.
226. Galat, A., *Peptidylproline cis-trans-isomerases: immunophilins*. *Eur J Biochem*, 1993. **216**(3): p. 689-707.
227. Peattie, D.A., et al., *Expression and characterization of human FKBP52, an immunophilin that associates with the 90-kDa heat shock protein and is a component of steroid receptor complexes*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992. **89**(22): p. 10974-8.
228. Pratt, W.B. and D.O. Toft, *Regulation of signaling protein function and trafficking by the hsp90/hsp70-based chaperone machinery*. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2003. **228**(2): p. 111-33.

229. Erlejan, A.G., et al., *Regulatory role of the 90-kDa-heat-shock protein (Hsp90) and associated factors on gene expression*. *Biochim Biophys Acta*, 2014. **1839**(2): p. 71-87.
230. Nahleh, Z., et al., *Heat shock proteins in cancer: targeting the 'chaperones'*. *Future Med Chem*, 2012. **4**(7): p. 927-35.
231. Dixit, A. and G.M. Verkhivker, *Probing molecular mechanisms of the Hsp90 chaperone: biophysical modeling identifies key regulators of functional dynamics*. *PLoS One*, 2012. **7**(5): p. e37605.
232. Sangster, T.A., S. Lindquist, and C. Queitsch, *Under cover: causes, effects and implications of Hsp90-mediated genetic capacitance*. *Bioessays*, 2004. **26**(4): p. 348-62.
233. Bagatell, R. and L. Whitesell, *Altered Hsp90 function in cancer: a unique therapeutic opportunity*. *Mol Cancer Ther*, 2004. **3**(8): p. 1021-30.
234. Chiosis, G. and L. Neckers, *Tumor selectivity of Hsp90 inhibitors: the explanation remains elusive*. *ACS Chem Biol*, 2006. **1**(5): p. 279-84.
235. Bachleitner-Hofmann, T., et al., *Antitumor activity of SNX-2112, a synthetic heat shock protein-90 inhibitor, in MET-amplified tumor cells with or without resistance to selective MET Inhibition*. *Clin Cancer Res*, 2011. **17**(1): p. 122-33.
236. Chandarlapaty, S., et al., *SNX2112, a synthetic heat shock protein 90 inhibitor, has potent antitumor activity against HER kinase-dependent cancers*. *Clin Cancer Res*, 2008. **14**(1): p. 240-8.
237. Huang, K.H., et al., *Discovery of novel 2-aminobenzamide inhibitors of heat shock protein 90 as potent, selective and orally active antitumor agents*. *J Med Chem*, 2009. **52**(14): p. 4288-305.
238. Fadden, P., et al., *Application of chemoproteomics to drug discovery: identification of a clinical candidate targeting hsp90*. *Chem Biol*, 2010. **17**(7): p. 686-94.
239. Eiseman, J.L., et al., *Pharmacokinetics and pharmacodynamics of 17-demethoxy 17-[[[2-dimethylamino]ethyl]amino]geldanamycin (17DMAG, NSC 707545) in C.B-17 SCID mice bearing MDA-MB-231 human breast cancer xenografts*. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2005. **55**(1): p. 21-32.
240. Vilenchik, M., et al., *Targeting wide-range oncogenic transformation via PU24FC1, a specific inhibitor of tumor Hsp90*. *Chem Biol*, 2004. **11**(6): p. 787-97.
241. DeBoer, C., et al., *Geldanamycin, a new antibiotic*. *J Antibiot (Tokyo)*, 1970. **23**(9): p. 442-7.
242. Whitesell, L., et al., *Benzoquinonoid ansamycins possess selective tumoricidal activity unrelated to src kinase inhibition*. *Cancer Res*, 1992. **52**(7): p. 1721-8.
243. Prodromou, C., et al., *Identification and structural characterization of the ATP/ADP-binding site in the Hsp90 molecular chaperone*. *Cell*, 1997. **90**(1): p. 65-75.
244. Supko, J.G., et al., *Preclinical pharmacologic evaluation of geldanamycin as an antitumor agent*. *Cancer Chemother Pharmacol*, 1995. **36**(4): p. 305-15.
245. Neckers, L., *Chaperoning oncogenes: Hsp90 as a target of geldanamycin*. *Handb Exp Pharmacol*, 2006(172): p. 259-77.
246. Dutta Gupta, S., et al., *Molecular docking study, synthesis and biological evaluation of Schiff bases as Hsp90 inhibitors*. *Biomed Pharmacother*, 2014. **68**(3): p. 369-76.
247. Dutta Gupta, S., et al., *2,4-dihydroxy benzaldehyde derived Schiff bases as small molecule Hsp90 inhibitors: Rational identification of a new anticancer lead*. *Bioorg Chem*, 2015. **59C**: p. 97-105.
248. Petrikaite, V. and D. Matulis, *Binding of natural and synthetic inhibitors to human heat shock protein 90 and their clinical application*. *Medicina (Kaunas)*, 2011. **47**(8): p. 413-20.
249. Biamonte, M.A., et al., *Heat shock protein 90: inhibitors in clinical trials*. *J Med Chem*, 2010. **53**(1): p. 3-17.
250. Winssinger, N., J.G. Fontaine, and S. Barluenga, *Hsp90 inhibition with resorcylic acid lactones (RALs)*. *Curr Top Med Chem*, 2009. **9**(15): p. 1419-35.

251. Bolton, J.L., et al., *Role of quinones in toxicology*. Chem Res Toxicol, 2000. **13**(3): p. 135-60.
252. Hodnett, E.M. and W.J. Dunn, 3rd, *Cobalt derivatives of Schiff bases of aliphatic amines as antitumor agents*. J Med Chem, 1972. **15**(3): p. 339.
253. O'Boyle, N.M., et al., *Lead identification of beta-lactam and related imine inhibitors of the molecular chaperone heat shock protein 90*. Bioorg Med Chem, 2011. **19**(20): p. 6055-68.
254. Prodromou, C., et al., *The ATPase cycle of Hsp90 drives a molecular 'clamp' via transient dimerization of the N-terminal domains*. EMBO J, 2000. **19**(16): p. 4383-92.
255. Chadli, A., et al., *Dimerization and N-terminal domain proximity underlie the function of the molecular chaperone heat shock protein 90*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(23): p. 12524-9.
256. Stebbins, C.E., et al., *Crystal structure of an Hsp90-geldanamycin complex: targeting of a protein chaperone by an antitumor agent*. Cell, 1997. **89**(2): p. 239-50.
257. Prapapanich, V., et al., *Mutational analysis of the hsp70-interacting protein Hip*. Mol Cell Biol, 1996. **16**(11): p. 6200-7.
258. Kamal, A., et al., *A high-affinity conformation of Hsp90 confers tumour selectivity on Hsp90 inhibitors*. Nature, 2003. **425**(6956): p. 407-10.
259. Alimirah, F., et al., *DU-145 and PC-3 human prostate cancer cell lines express androgen receptor: implications for the androgen receptor functions and regulation*. FEBS Lett, 2006. **580**(9): p. 2294-300.
260. Kaighn, M.E., et al., *Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3)*. Invest Urol, 1979. **17**(1): p. 16-23.
261. Wu, H.C., et al., *Derivation of androgen-independent human LNCaP prostatic cancer cell sublines: role of bone stromal cells*. Int J Cancer, 1994. **57**(3): p. 406-12.
262. Thalmann, G.N., et al., *Androgen-independent cancer progression and bone metastasis in the LNCaP model of human prostate cancer*. Cancer Res, 1994. **54**(10): p. 2577-81.
263. Guo, Z., et al., *A novel androgen receptor splice variant is up-regulated during prostate cancer progression and promotes androgen depletion-resistant growth*. Cancer Res, 2009. **69**(6): p. 2305-13.
264. Sun, S., et al., *Castration resistance in human prostate cancer is conferred by a frequently occurring androgen receptor splice variant*. J Clin Invest, 2010. **120**(8): p. 2715-30.
265. Dehm, S.M., et al., *Splicing of a novel androgen receptor exon generates a constitutively active androgen receptor that mediates prostate cancer therapy resistance*. Cancer Res, 2008. **68**(13): p. 5469-77.
266. Hu, R., et al., *Ligand-independent androgen receptor variants derived from splicing of cryptic exons signify hormone-refractory prostate cancer*. Cancer Res, 2009. **69**(1): p. 16-22.
267. Yu, X., S.L. Harris, and A.J. Levine, *The regulation of exosome secretion: a novel function of the p53 protein*. Cancer Res, 2006. **66**(9): p. 4795-801.
268. Liao, D.F., et al., *Purification and identification of secreted oxidative stress-induced factors from vascular smooth muscle cells*. J Biol Chem, 2000. **275**(1): p. 189-96.
269. Clayton, A., et al., *Induction of heat shock proteins in B-cell exosomes*. J Cell Sci, 2005. **118**(Pt 16): p. 3631-8.
270. Ramteke, A., et al., *Exosomes secreted under hypoxia enhance invasiveness and stemness of prostate cancer cells by targeting adherens junction molecules*. Mol Carcinog, 2013.
271. Li, W., et al., *Extracellular heat shock protein-90alpha: linking hypoxia to skin cell motility and wound healing*. EMBO J, 2007. **26**(5): p. 1221-33.

272. Thomaidou, D. and E. Patsavoudi, *Identification of a novel neuron-specific surface antigen in the developing nervous system, by monoclonal antibody 4C5*. Neuroscience, 1993. **53**(3): p. 813-27.
273. Thomaidou, D., E. Yfanti, and E. Patsavoudi, *Expression of the 4C5 antigen during development and after injury of the rat sciatic nerve*. J Neurosci Res, 1996. **46**(1): p. 24-33.
274. Yfanti, E., et al., *The 4C5 antigen is associated with Schwann cell migration during development and regeneration of the rat peripheral nervous system*. Glia, 2004. **45**(1): p. 39-53.
275. Sidera, K., et al., *Involvement of cell surface HSP90 in cell migration reveals a novel role in the developing nervous system*. J Biol Chem, 2004. **279**(44): p. 45379-88.
276. Woodley, D.T., et al., *Participation of the lipoprotein receptor LRP1 in hypoxia-HSP90alpha autocrine signaling to promote keratinocyte migration*. J Cell Sci, 2009. **122**(Pt 10): p. 1495-8.
277. Martin, P., *Wound healing--aiming for perfect skin regeneration*. Science, 1997. **276**(5309): p. 75-81.
278. Singer, A.J. and R.A. Clark, *Cutaneous wound healing*. N Engl J Med, 1999. **341**(10): p. 738-46.
279. Gurtner, G.C., et al., *Wound repair and regeneration*. Nature, 2008. **453**(7193): p. 314-21.
280. Eustace, B.K., et al., *Functional proteomic screens reveal an essential extracellular role for hsp90 alpha in cancer cell invasiveness*. Nat Cell Biol, 2004. **6**(6): p. 507-14.
281. Tsutsumi, S., et al., *A small molecule cell-impermeant Hsp90 antagonist inhibits tumor cell motility and invasion*. Oncogene, 2008. **27**(17): p. 2478-87.
282. Quinta, H.R., et al., *Management of cytoskeleton architecture by molecular chaperones and immunophilins*. Cell Signal, 2011. **23**(12): p. 1907-20.
283. Lund, L.R., et al., *Plasminogen activation independent of uPA and tPA maintains wound healing in gene-deficient mice*. EMBO J, 2006. **25**(12): p. 2686-97.
284. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. **144**(5): p. 646-74.
285. Joyce, J.A. and J.W. Pollard, *Microenvironmental regulation of metastasis*. Nat Rev Cancer, 2009. **9**(4): p. 239-52.
286. Nieto, M.A., *Epithelial plasticity: a common theme in embryonic and cancer cells*. Science, 2013. **342**(6159): p. 1234850.
287. Song, X., et al., *The regulatory mechanism of extracellular Hsp90{alpha} on matrix metalloproteinase-2 processing and tumor angiogenesis*. J Biol Chem, 2010. **285**(51): p. 40039-49.
288. Wang, X., et al., *The regulatory mechanism of Hsp90alpha secretion and its function in tumor malignancy*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(50): p. 21288-93.
289. Stellas, D., A. El Hamidieh, and E. Patsavoudi, *Monoclonal antibody 4C5 prevents activation of MMP2 and MMP9 by disrupting their interaction with extracellular HSP90 and inhibits formation of metastatic breast cancer cell deposits*. BMC Cell Biol, 2010. **11**: p. 51.
290. Hance, M.W., et al., *Secreted Hsp90 is a novel regulator of the epithelial to mesenchymal transition (EMT) in prostate cancer*. J Biol Chem, 2012. **287**(45): p. 37732-44.
291. Lagarrigue, F., et al., *Matrix metalloproteinase-9 is upregulated in nucleophosmin-anaplastic lymphoma kinase-positive anaplastic lymphomas and activated at the cell surface by the chaperone heat shock protein 90 to promote cell invasion*. Cancer Res, 2010. **70**(17): p. 6978-87.

292. Czar, M.J., et al., *Geldanamycin, a heat shock protein 90-binding benzoquinone ansamycin, inhibits steroid-dependent translocation of the glucocorticoid receptor from the cytoplasm to the nucleus*. *Biochemistry*, 1997. **36**(25): p. 7776-85.
293. Agutter, P.S., *Role of the cytoskeleton in nucleocytoplasmic RNA and protein distributions*. *Biochem Soc Trans*, 1991. **19**(4): p. 1094-8.
294. Kristensson, K. and Y. Olsson, *Diffusion pathways and retrograde axonal transport of protein tracers in peripheral nerves*. *Prog Neurobiol*, 1973. **1**(2): p. 87-109.
295. Bhargava, P.M., *Is the "soluble" phase of cells structured?* *Biosystems*, 1985. **18**(2): p. 135-9.
296. Campbell, E.M. and T.J. Hope, *Role of the cytoskeleton in nuclear import*. *Adv Drug Deliv Rev*, 2003. **55**(6): p. 761-71.
297. Seksek, O., J. Biwersi, and A.S. Verkman, *Translational diffusion of macromolecule-sized solutes in cytoplasm and nucleus*. *J Cell Biol*, 1997. **138**(1): p. 131-42.
298. Lukacs, G.L., et al., *Size-dependent DNA mobility in cytoplasm and nucleus*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(3): p. 1625-9.
299. Sodeik, B., *Mechanisms of viral transport in the cytoplasm*. *Trends Microbiol*, 2000. **8**(10): p. 465-72.
300. Ambron, R.T., et al., *A signal sequence mediates the retrograde transport of proteins from the axon periphery to the cell body and then into the nucleus*. *J Neurosci*, 1992. **12**(7): p. 2813-8.
301. Storer, C.L., et al., *FKBP51 and FKBP52 in signaling and disease*. *Trends Endocrinol Metab*, 2011. **22**(12): p. 481-90.
302. Li, Z., J.Y. Liu, and J.T. Zhang, *14-3-3sigma, the double-edged sword of human cancers*. *Am J Transl Res*, 2009. **1**(4): p. 326-40.
303. Vercoutter-Edouart, A.S., et al., *Proteomic analysis reveals that 14-3-3sigma is down-regulated in human breast cancer cells*. *Cancer Res*, 2001. **61**(1): p. 76-80.
304. Suzuki, T., et al., *Nuclear cyclin B1 in human breast carcinoma as a potent prognostic factor*. *Cancer Sci*, 2007. **98**(5): p. 644-51.
305. Iwata, N., et al., *Frequent hypermethylation of CpG islands and loss of expression of the 14-3-3 sigma gene in human hepatocellular carcinoma*. *Oncogene*, 2000. **19**(46): p. 5298-302.
306. Lodygin, D., et al., *Analysis of 14-3-3sigma expression in hyperproliferative skin diseases reveals selective loss associated with CpG-methylation in basal cell carcinoma*. *Oncogene*, 2003. **22**(35): p. 5519-24.
307. Nakayama, H., et al., *Increasing 14-3-3 sigma expression with declining estrogen receptor alpha and estrogen-responsive finger protein expression defines malignant progression of endometrial carcinoma*. *Pathol Int*, 2005. **55**(11): p. 707-15.
308. Cheng, L., et al., *Loss of 14-3-3sigma in prostate cancer and its precursors*. *Clin Cancer Res*, 2004. **10**(9): p. 3064-8.
309. Sano, T., et al., *Immunohistochemical expression of 14-3-3 sigma protein in various histological subtypes of uterine cervical cancers*. *Pathol Int*, 2004. **54**(10): p. 743-50.
310. Perathoner, A., et al., *14-3-3sigma expression is an independent prognostic parameter for poor survival in colorectal carcinoma patients*. *Clin Cancer Res*, 2005. **11**(9): p. 3274-9.
311. Tanaka, K., et al., *The clinical implication of 14-3-3 sigma expression in primary gastrointestinal malignancy*. *Int J Oncol*, 2004. **25**(6): p. 1591-7.
312. Logsdon, C.D., et al., *Molecular profiling of pancreatic adenocarcinoma and chronic pancreatitis identifies multiple genes differentially regulated in pancreatic cancer*. *Cancer Res*, 2003. **63**(10): p. 2649-57.
313. Guweidhi, A., et al., *Enhanced expression of 14-3-3sigma in pancreatic cancer and its role in cell cycle regulation and apoptosis*. *Carcinogenesis*, 2004. **25**(9): p. 1575-85.

314. Mazaira, G.I., et al., *Biological relevance of Hsp90-binding immunophilins in cancer development and treatment*. Int J Cancer, 2015. **In press**.