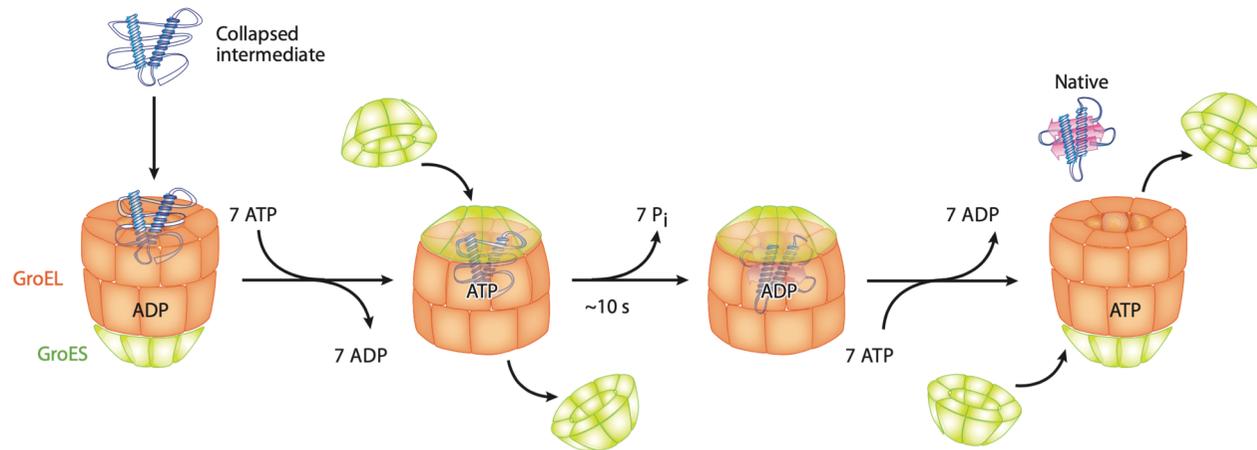
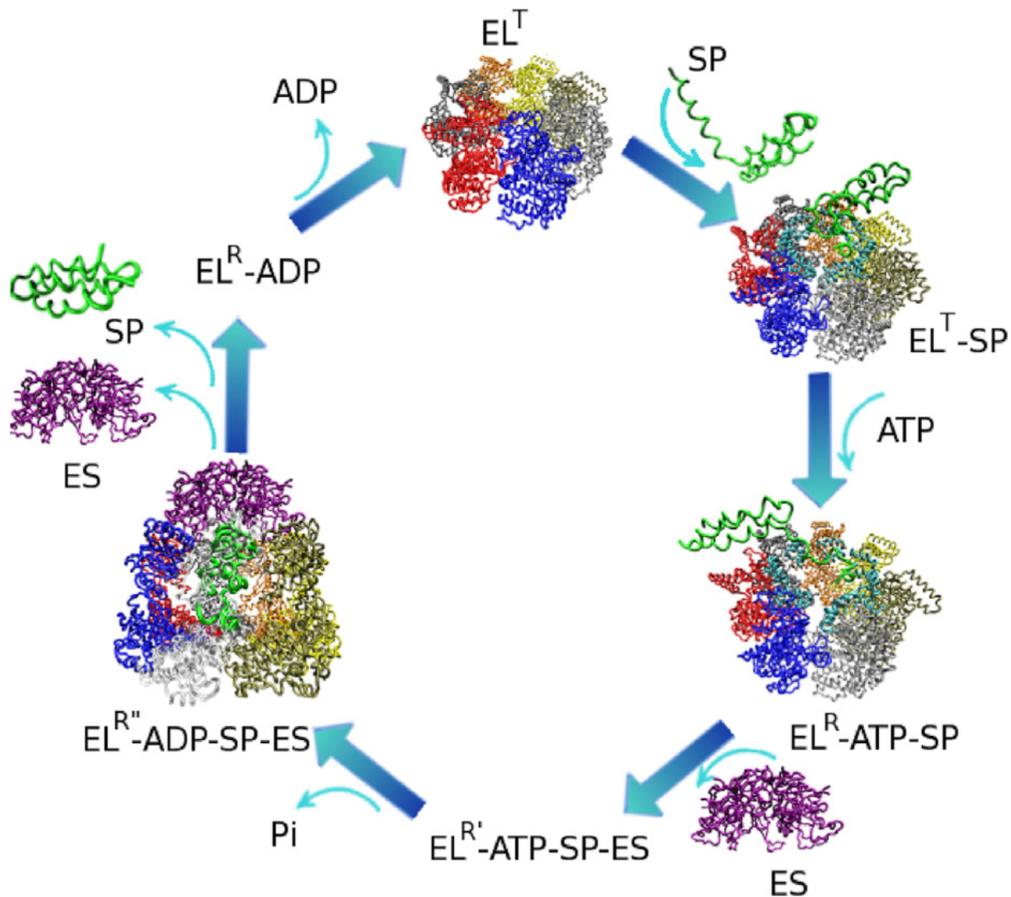


## Gruppo I chaperonine Hsp60 (GroEL-GroES)

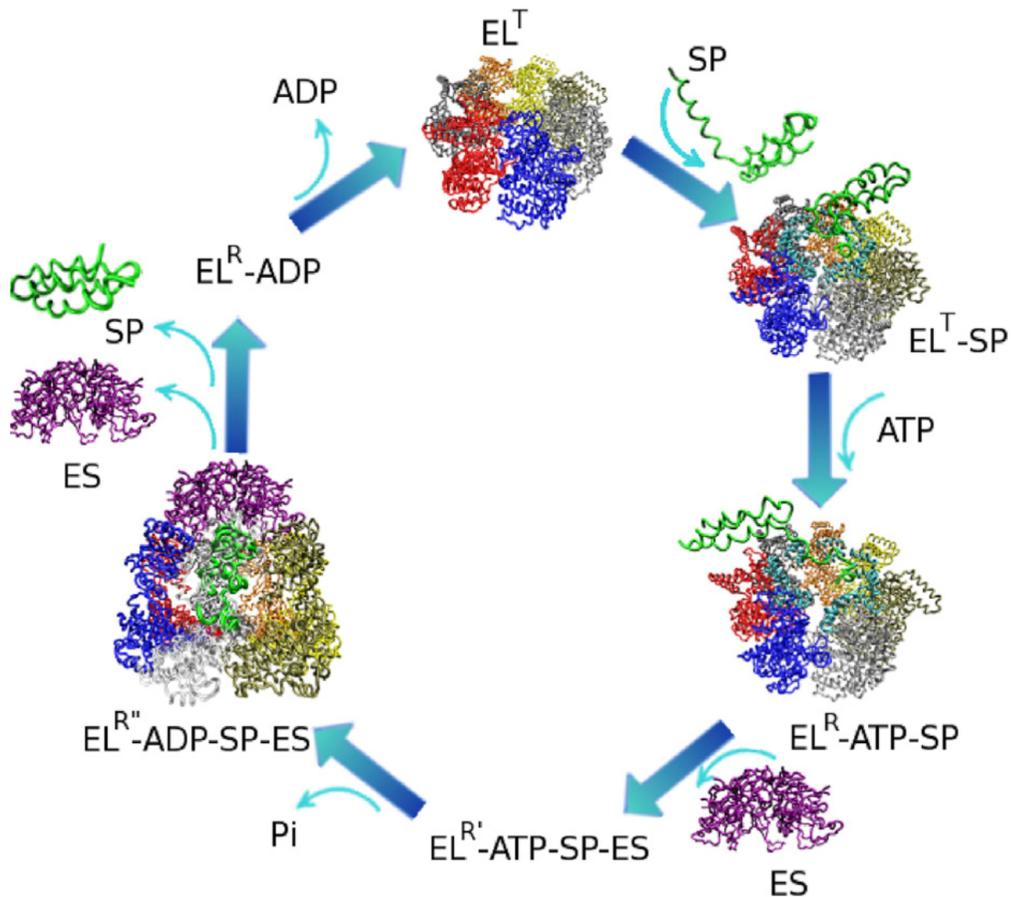


- Un polipeptide non foldato interagisce con i residui idrofobici in corrispondenza dell'ingresso della camera di GroEL.
- La seconda camera è bloccata da GroES.
- Ciascuna delle 14 subunità di GroEL lega ATP, presenta attività ATPasica con conseguente rilascio di ADP.
- Queste reazioni sono coordinate per tutte le 7 subunità di un singolo anello con conseguenti cambiamenti conformazionali a tutto il sistema.
- Questi cambiamenti influenzano sia il binding del coperchio GroES che chiude la camera sia l'ambiente della camera con cui il peptide che si deve ripiegare prende contatto.



doi: 10.3389/fmolb.2022.1071168

- Le chaperonine operano come macchine di folding alternando l'incapsulamento delle proteine del substrato all'interno della cavità di ciascun anello.
- Questi eventi di incapsulamento sono abilitati da transizioni conformazionali coordinati **su larga scala che avvengono in combinazione con il legame ATP e GroES nell'anello attivo di GroEL.**
- Emiciclo di GroEL (coinvolge un anello alla volta): sette siti di legame del dominio apicale. Questo stato ha un'elevata affinità per i polipeptidi non nativi, che presentano anche superfici idrofobiche esposte. Il legame delle proteine mal ripiegate a GroEL impedisce la formazione di aggregati proteici irreversibili.
- **In seguito al legame di ATP e GroES allo stesso anello, i cambiamenti conformazionali in quell'anello** provocano il raddoppio delle dimensioni della cavità. Durante queste trasformazioni, GroES sposta la SP nella cavità largamente espansa.



- Come risultato di queste transizioni allosteriche, la SP si presenta con un ambiente completamente diverso, per lo più idrofilo, che promuove il ripiegamento della SP.
- Avviene il folding del peptide fino a quando l'idrolisi di ATP è completa (intrinseca attività ATPasica di GroEL) (rate-limiting step del ciclo  $t_{1/2} \sim 10$  s). Questo induce successivamente il binding di ATP e di un differente GroES al secondo anello.
- Il ciclo della chaperonina è completato dall'idrolisi dell'ATP e dal legame dell'ATP nell'anello opposto, che avvia il ciclo in quell'anello.
- Il rilascio sia di GroES sia di ADP dalla camera contenente il peptide, con conseguente apertura della camera, consente il rilascio della proteina foldata che diffonde fuori dalla camera.
- Se il peptide è correttamente foldato potrà svolgere la sua funzione. Altrimenti se risultasse non completamente foldato verrà ricatturato ancora da un GroEL libero ed il ciclo viene ripetuto.

# Folding co-traduzionale e post-traduzionale

**Folding co-traduzionale:** processo di ripiegamento proteico che avviene durante la sintesi proteica e che è già completo al termine della sintesi.

**Folding post-traduzionale:** processo di ripiegamento proteico che avviene prevalentemente dopo che la sintesi è completata. Non si esclude che il «folding» inizi anche durante la sintesi (esempio: le alfa-eliche si formano in frazioni di secondo prima che la sintesi della catena polipeptidica sia completata).

## «Folding-shift hypothesis»

- Velocità di sintesi proteica: 20 aa/sec (procarioti), di 2-4 aa/sec (eucarioti)
- Nei procarioti la sintesi di una catena polipeptidica è generalmente terminata prima che la proteina stessa abbia avuto il tempo di completare il ripiegamento, mentre negli eucarioti la sintesi della catena e il ripiegamento procedono secondo una scala dei tempi che è simile.
- Prima importante conseguenza: **nei procarioti il ripiegamento è generalmente post-traduzionale, negli eucarioti generalmente co-traduzionale.**
- Questo spostamento del folding da post- a co-traduzionale nel corso dell'evoluzione da procarioti ad eucarioti (“**folding shift**”) si correla direttamente ad un'altra caratteristica:  
**negli eucarioti le proteine sono costituite prevalentemente da più di un dominio, mentre nei procarioti consistono più spesso di un solo dominio.**

- Nei procarioti il ripiegamento è prevalentemente post-traduzionale a causa dell'elevata velocità della sintesi proteica e le proteine consistono molto più spesso di un unico dominio.
- La coesistenza di più funzioni nelle proteine procariotiche è generalmente ottenuta grazie all'assemblaggio di più subunità a dare proteine oligomeriche.
- Il ripiegamento post-traduzionale nei procarioti è garantito sia da chaperonine GroEL/GroES (sistema Hsp60), sia dal sistema delle Hsp70.
- Il sistema delle Hsp70 può garantire anche il ripiegamento co-traduzionale.
- Il ripiegamento delle proteine eucariotiche è prevalentemente co-traduzionale
- La presenza di molteplici domini ad uno stadio non ancora completamente ripiegato determinerebbe la loro aggregazione poiché tratti idrofobici esposti di domini diversi potrebbero interagire tra loro aggregando.
- I domini delle proteine eucariotiche si ripiegano sequenzialmente: quando il primo dominio è ripiegato, il secondo è ancora in via di sintesi e quindi non intralcia il ripiegamento del primo.

# Gli chaperoni molecolari Hsp90

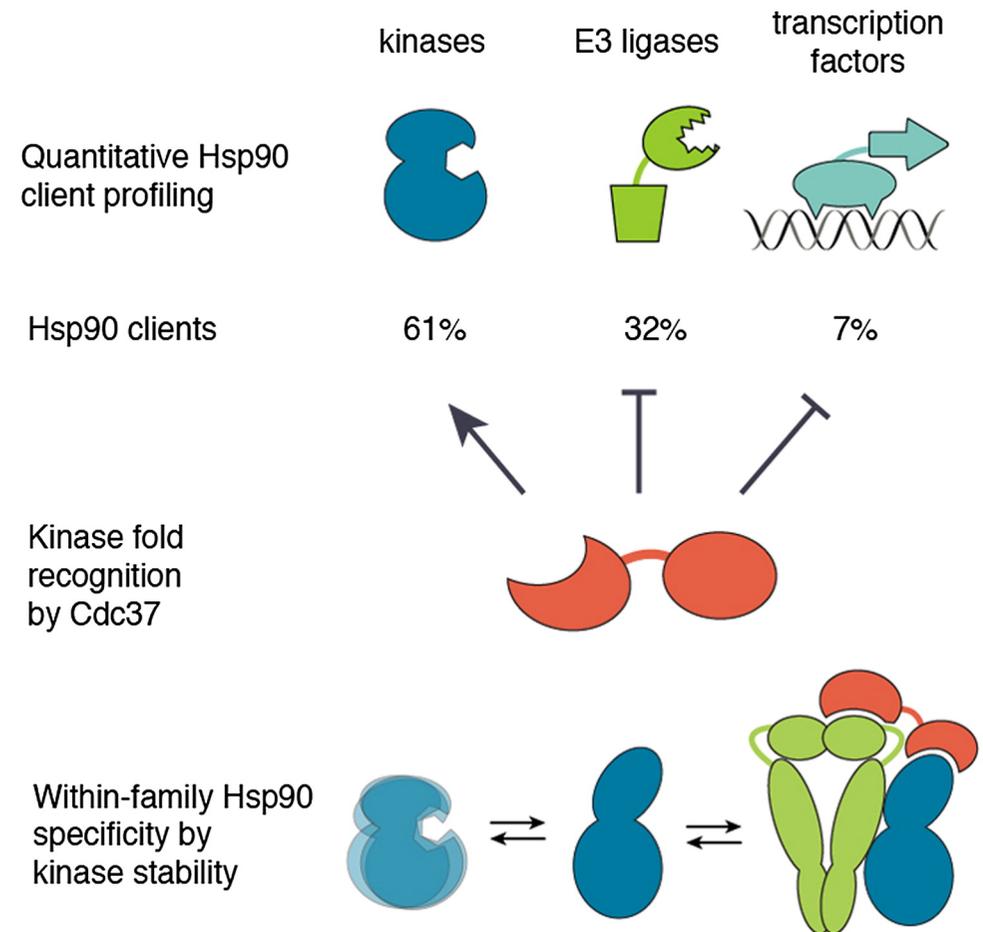
**Hsp90s riconoscono le proteine substrato (*client protein*) parzialmente foldate.**

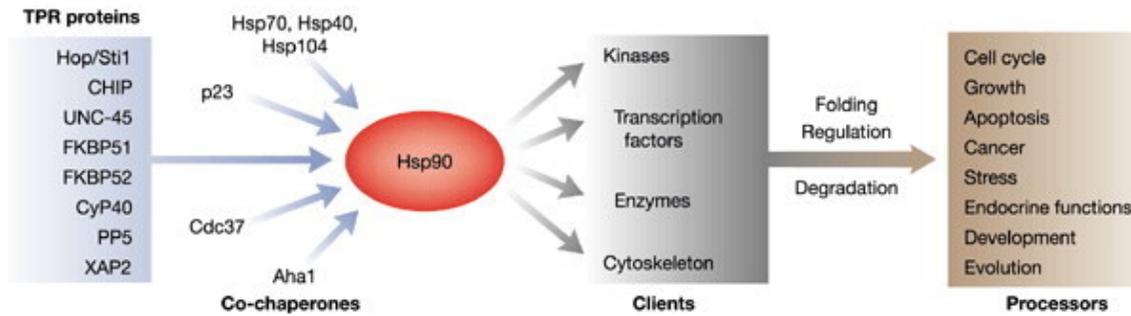
- Membri della famiglia Hsp90 evolutivamente correlati sono presenti in tutti gli organismi tranne gli archibatteri.
- La loro forte conservazione evolutiva si riscontra nell'elevata conservazione di sequenza (55% tra Hsp90 di *E. coli* e Hsp90 umano).
- Nella maggior parte degli eucarioti ci sono 4 Hsp90, due si trovano nel citosol (Hsc82 e Hsp82 in *S. cerevisiae*, HSP90 $\alpha$  e HSP90 $\beta$  in *Homo sapiens*; 1–2% delle proteine totali, Hsp90 è una delle proteine citosoliche più abbondanti), gli altri due nel reticolo endoplasmatico e nei mitocondri.
- **Si tratta di proteine essenziali** (almeno il 10% delle proteine del lievito sono substrati di Hsp90).
- Gli Hsp90 aiutano le cellule a far fronte alle proteine denaturate generate dallo stress (ad es. shock termico) e assicurano che alcuni dei loro substrati possano essere convertiti da uno stato inattivo a uno stato attivo o altrimenti mantenuti in una conformazione funzionale.
- In alcuni casi le proteine Hsp90 formano dei complessi stabili con le proteine substrato fino a quando appropriati segnali causano la loro dissociazione dalle *client* che svolgeranno le loro funzioni all'interno della cellula.
- Tra le *client proteins* delle Hsp90 includiamo i recettori degli ormoni steroidei e le proteine chinasi coinvolte nella proliferazione cellulare.

**Gli Hsp90 non agiscono sulla proteina neosintetizzata, ma su proteine già ripiegate e funzionali e quindi in grado di legare i loro ligandi fisiologici.**

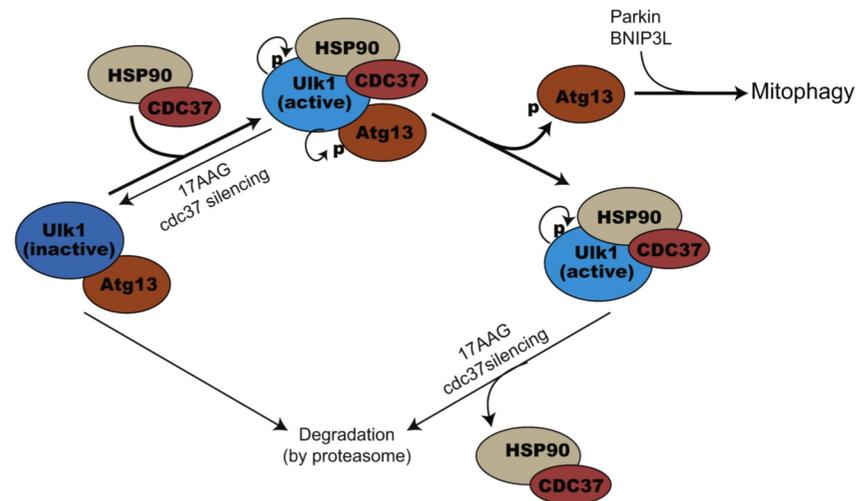
**Gli Hsp90 ricevono le proprie proteine substrato da altri chaperoni.**

- Le proteine prese in carico dagli Hsp90 sono solo marginalmente stabili (“quasi native”).
- Le proteine “quasi native” hanno una propensione a denaturare e quindi richiedono una costante assistenza di uno chaperone, Hsp90 per tutta la durata della loro vita.
- Tali proteine sono generalmente parte di vie di trasduzione del segnale (es. recettori degli ormoni steroidei, chinasi coinvolte nel controllo del ciclo cellulare).





EMBO Reports, Volume: 4, Issue: 2, Pages: 126-130, First published: 01 February 2003, DOI: (10.1038/sj.embor.embor742)



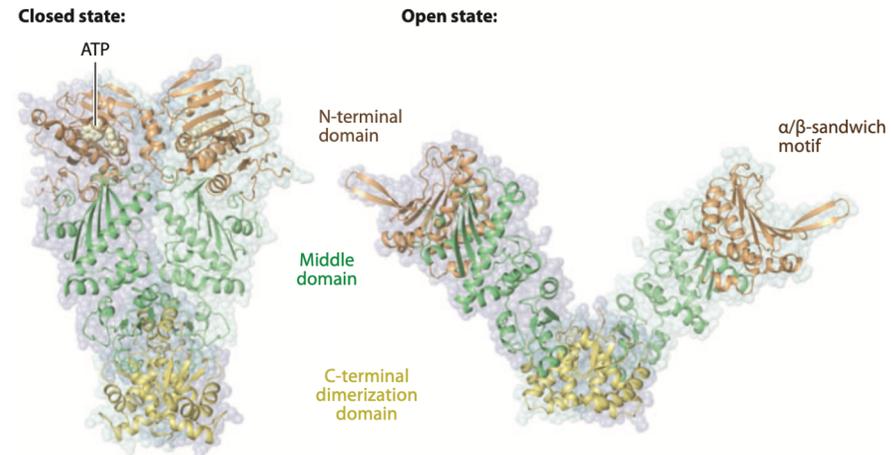
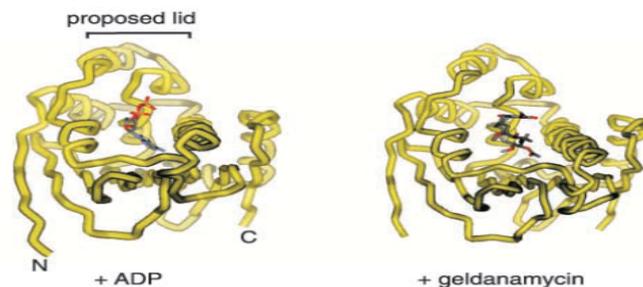
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.06.018>

# Caratteristiche strutturali di Hsp90

A Hsp90 Domain Structure



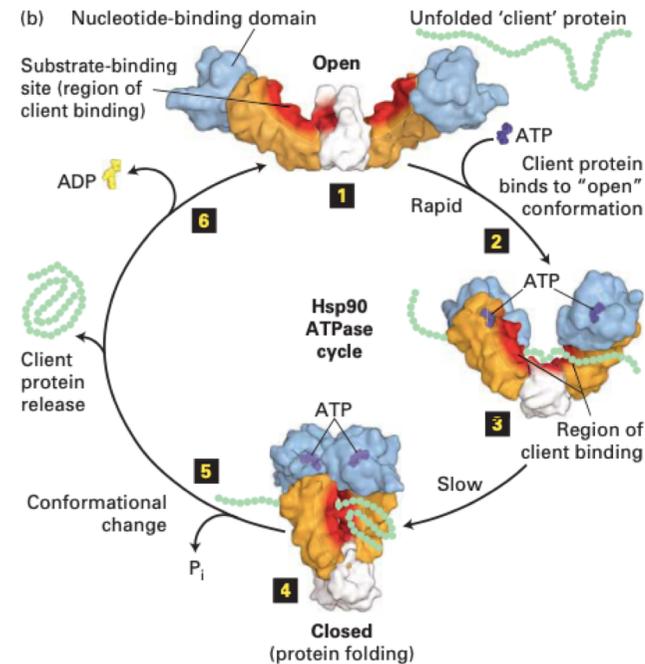
B Hsp90 N-terminal Domain



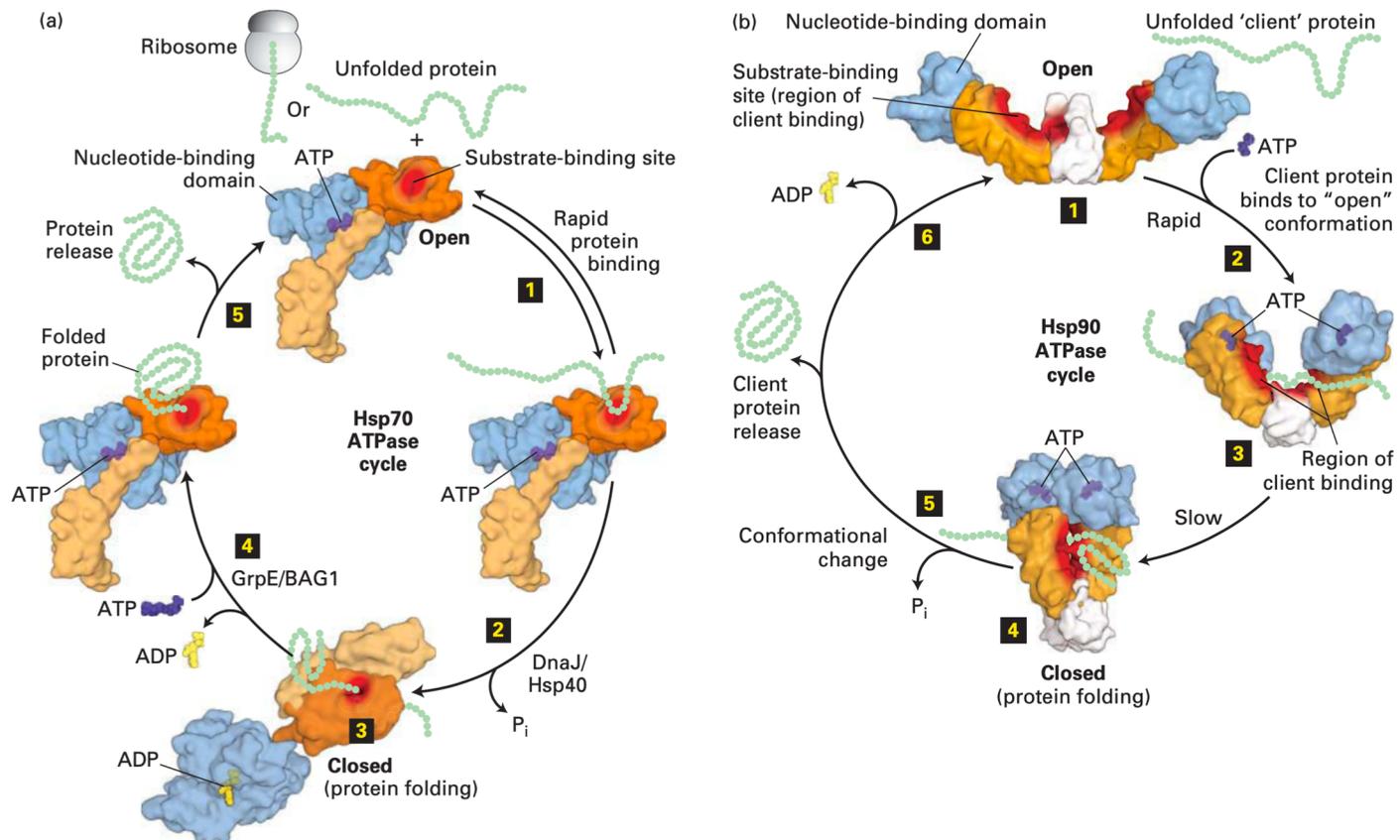
- Hsp90 funziona come dimero.
- Hsp90 possiede un dominio N-terminale (ca. 25 kDa) che presenta un sito di legame per l'ATP (struttura  $\alpha/\beta$  sandwich). Presenta attività ATPasica.
- L'antibiotico *geldanamicina*, della classe delle *ansamicine*, si lega allo stesso sito con affinità nanomolare e inibisce l'attività ATPasica, e di conseguenza la funzione dell'Hsp90, dimostrando la richiesta funzionale per Hsp90 della sua attività ATPasica.
- Alla sequenza N-terminale segue una sequenza carica (36 aa), un dominio intermedio (35 kDa) flessibile e il dominio C-terminale di circa 100 residui che termina con la sequenza Met-Glu-Glu-Val-Asp (MEEVD, media l'interazione con altri cofattori).
- Hsp90 si presenta in forma di omodimero. Le due subunità sono infatti permanentemente legate a livello dei 190 residui C-terminali, che includono l'intero dominio C-terminale e di una parte del dominio intermedio.

# Il ciclo di Hsp90

- Studi strutturali hanno chiarito i passaggi chiave e le modificazioni conformazionali che compongono il ciclo funzionale di Hsp90.
- Il legame del nucleotide ATP promuove il contatto tra i domini N-terminali nell'omodimero che è già legato a livello dei domini C-terminali.

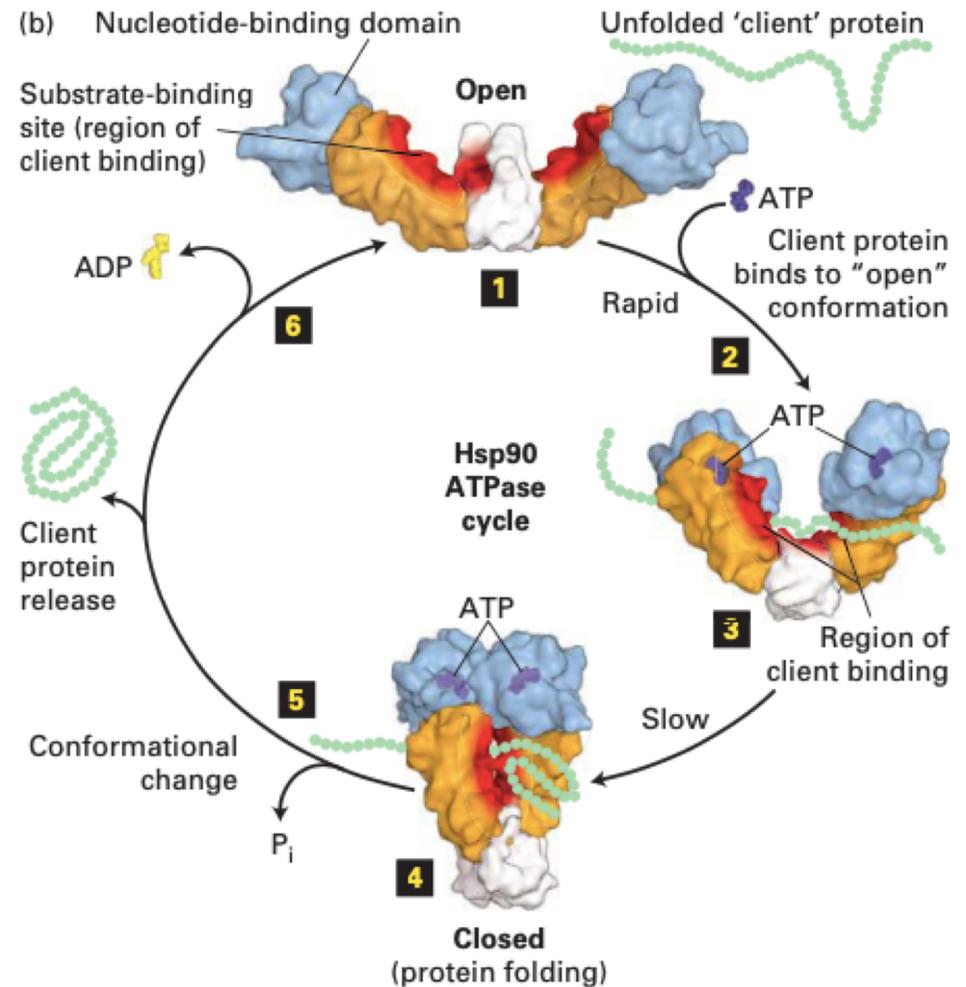


**Hsp90 assume una struttura circolare in presenza di ATP**



- Il binding di ATP a NBD di Hsp70 stabilizza la conformazione aperta di Hsp70, facilitando il binding del substrato reclutato da Hsp70 con Hsp40.
- Il binding di Hsp40 stimola l'idrolisi di ATP da Hsp70, determinando la chiusura del coperchio ad  $\alpha$ -elica di SBD sul peptide substrato legato.

- A differenza dell'Hsp70 monomero, l'Hsp90 funziona come un dimero in un ciclo in cui il legame di ATP, l'idrolisi e il rilascio di ADP sono associati ai principali cambiamenti conformazionali di Hsp90 e al legame, al ripiegamento e al rilascio delle proteine *client*.
- I *client* si legano ai domini che legano il substrato quando Hsp90 è nella configurazione "aperta" (passaggio 1).
- Il legame dell'ATP conduce alla conformazione "chiusa" (passaggio 2) in cui i domini leganti il nucleotide e i domini leganti il substrato si muovono insieme (intermedio mostrato nel passaggio 3) in una conformazione chiusa in cui i domini leganti il nucleotide sono dimerizzati (fase 4).
- L'idrolisi dell'ATP determina un cambiamento conformazionale in Hsp90 (passaggio 5) che assume una forma altamente compatta, con conseguente ripiegamento e rilascio di proteine «client».
- Il rilascio di ADP (passaggio 6) rigenera lo stato aperto flessibile iniziale, che può quindi interagire con altri «client».



E. D. Kirschke et al., 2014, *Cell* 157:1685

M. Taipale, D. F. Jarosz, and S. Lindquist, 2010, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol* 11:515

# Il legame dei nucleotidi ATP e ADP a Hsp90

- Il legame dei domini N-terminali di Hsp90 si basa sul fatto che il fosfato gamma dell'ATP interagisce con un tratto di catena flessibile, con struttura prevalentemente ad alfa-elica (che funge da coperchio).
- In questa conformazione il dominio N-terminale espone una superficie che è capace di associarsi al dominio N-terminale dell'altra subunità e ne determina la chiusura (o circolarizzazione).
- Anche l'ADP si lega nel sito di legame dell'ATP, ma non chiude il coperchio (perché manca il fosfato gamma) e quindi quando l'ADP è legato il dimerico non è circolarizzato.
- L'ADP, formatosi a seguito dell'idrolisi dell'ATP viene rilasciato rendendo possibile un altro ciclo funzionale di Hsp90.
- Al contrario, la geldanamicina si lega e porta alla chiusura del coperchio, ma lo blocca permanentemente in conformazione chiusa, impedendo così la progressione nel ciclo e il trattamento delle proteine substrato.

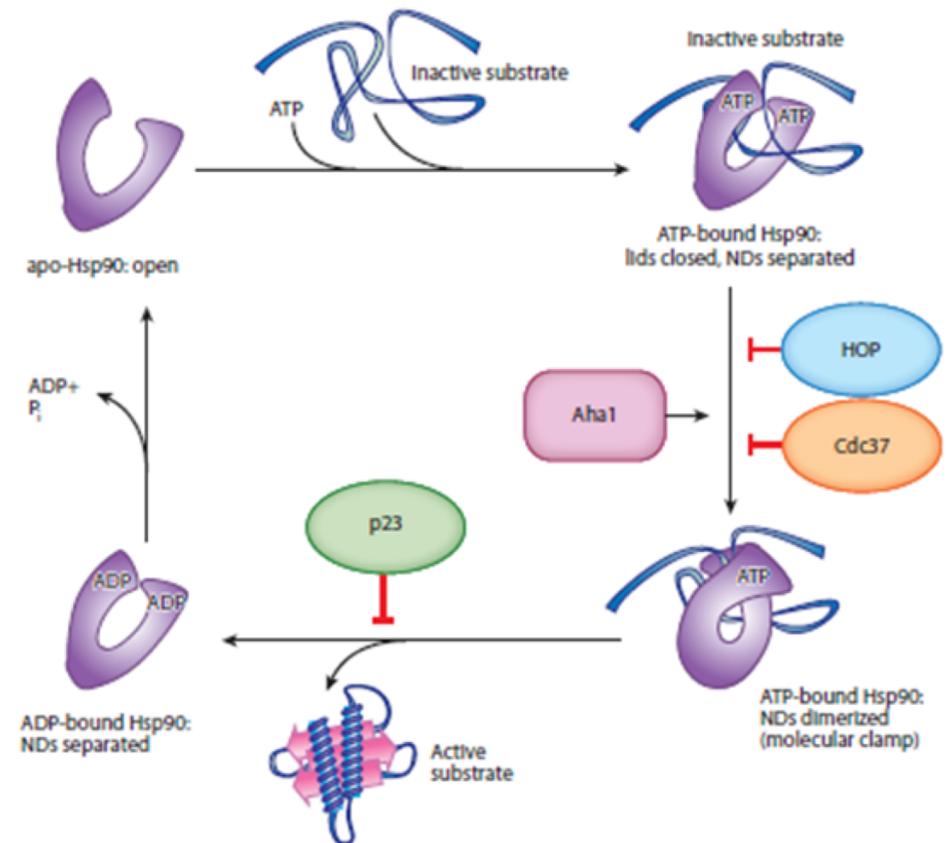
# Il legame dei nucleotidi ATP e ADP a Hsp90

**Il legame dell'ATP determina la dimerizzazione a livello del dominio ATPasico e la circularizzazione del dimero.**

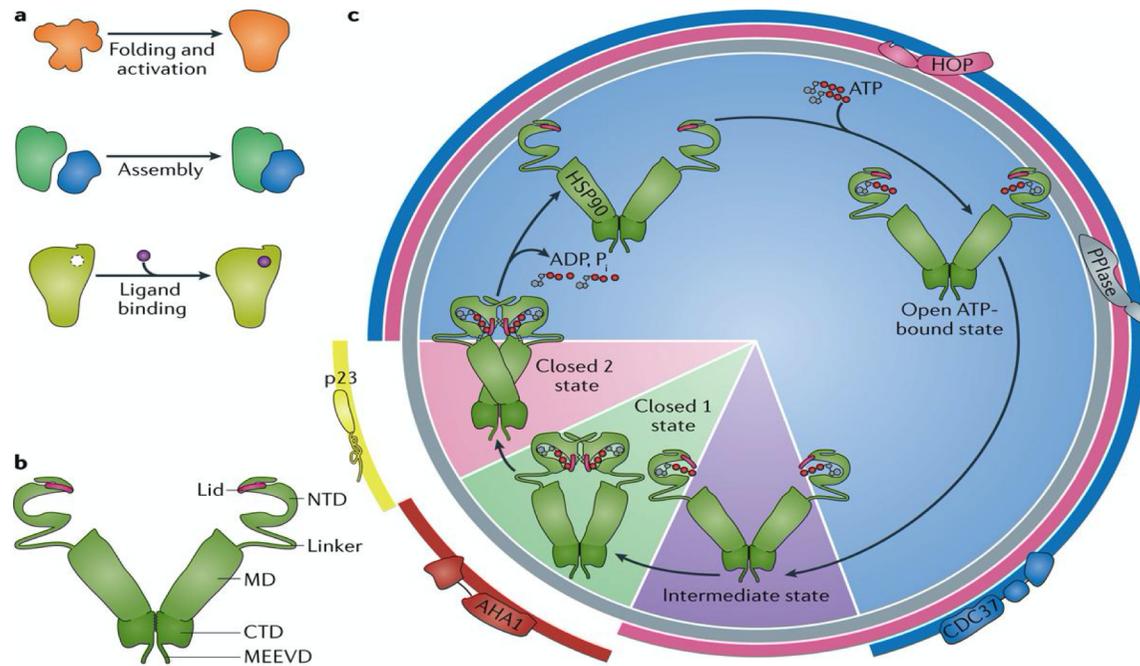
- La circularizzazione comporta anche una certa torsione dei due monomeri l'uno attorno all'altro. Ciò promuove il ripiegamento della proteina substrato, che si trova all'interno del canale generato con la circularizzazione stessa.
- La successiva idrolisi dell'ATP porta al distacco dei domini ATPasici l'uno dall'altro, e al rilascio della proteina substrato assieme ad ADP e fosfato.
- Analoghi artificiali dell'ATP, che possono essere legati ma non idrolizzati, comportano la chiusura irreversibile del canale e, analogamente alla geldanamicina, l'arresto del ciclo funzionale di Hsp90.
- **IMPORTANTE: il legame di Hsp90 con i suoi substrati non varia con il legame dell'ATP. Il legame dell'ATP rende l'interazione dinamica favorendo il ripiegamento della proteina.**
- Hsp90 lega proteine ripiegate, sia pur con diversi gradi di compattezza, e non proteine estese come nel caso di Hsp70.
- Il canale che si forma in seguito alla dimerizzazione ha un diametro di 3-4 nm che è minore delle dimensioni della cavità di GroEL (6.5 x 8 nm).

## Il ruolo dei co-caperoni

- La proteina del substrato inattivo si associa a Hsp90 legato all'ATP. In questo stato, i coperchi ATP vengono chiusi e i domini N-terminali sono separati
- Nella fase successiva, i domini N-terminali dimerizzano, formando il dimero Hsp90 chiuso (indicato come un morsetto molecolare) con subunità contorte.
- Questo stato metastabile è impegnato nell'idrolisi dell'ATP, con conseguente dissociazione dei domini N-terminali.
- La proteina del substrato legato assume la conformazione nativa mentre Hsp90 procede attraverso il ciclo.
- **Cofattori come Cdc37 e la proteina HOP («Hsp90-organizing protein) rallentano la fase di idrolisi ATP del ciclo, mentre l'attivatore di Hsp90 ATPase (Aha1) stimola l'idrolisi di ATP.**
- **Il cofattore p23 stabilizza il dimero chiuso per rallentare il rilascio della proteina del substrato da Hsp90.**



# Il ruolo dei co-caperoni



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

<https://doi.org/10.1038/nrm.2017.20>

# Il ruolo dei co-chaperoni nel modulare il ciclo funzionale di Hsp90

- I co-chaperoni negli eucarioti “consegnano” agli chaperoni Hsp90 le proteine substrato e ne regolano il ciclo funzionale.
- Alcuni di essi contengono un dominio generalmente composto di tre ripetizioni del motivo **tetratricopeptide (TPR)**.
- TPR consiste di 34 residui che formano due  $\alpha$ -eliche anti-parallele separate da  $\beta$ -turn (“helix-turn-helix”).
- TPR di diversi co-chaperoni competono l’uno con l’altro per il legame alla sequenza MEEVD al C-terminale di Hsp90.
- Il motivo di ripetizione del tetratricopeptide (TPR) è un modulo di interazione proteina-proteina presente in più copie in un numero di proteine funzionalmente diverse che facilita interazioni specifiche con una o più proteine partner. Dati strutturali tridimensionali hanno dimostrato che motivi TPR generano una struttura elicoidale destrorsa con un canale anfipatico che potrebbe ospitare la regione complementare di una proteina bersaglio.
- La maggior parte delle proteine contenenti TPR sono associate a complessi multiproteici e vi sono ampie prove che indicano che i motivi TPR siano importanti per il funzionamento di complessi di chaperoni coinvolti nel ciclo cellulare, nella trascrizione e nel trasporto di proteine. Il motivo TPR può rappresentare un antico modulo di interazione proteina-proteina che è stato reclutato da diverse proteine e adatto per funzioni specifiche.

# Co-chaperoni di Hsp90

Table 1 | Regulation of heat shock protein 90 function by co-chaperones

<https://doi.org/10.1038/nrm.2017.20>

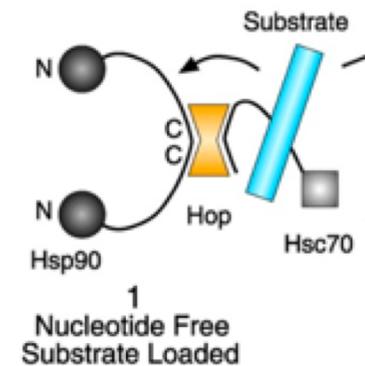
Co-chaperone	Interacting domain in co-chaperone	Binding site in HSP90	Function
HOP (Sti1 in yeast)	TPR2A, TPR2B	Mainly MEEVD; also MD and CTD	Stabilizes the HSP90 open conformation; transfers clients from HSP70–HSP40 to HSP90
CDC37	MD, CTD	NTD, MD	Prevents closure of the 'lid' in HSP90; specific for maturation of kinases
SGTA (Sgt1 in yeast)	CS	NTD	Involved in NLR maturation in plants and kinetochore assembly in yeast
Tah1 (Spaghetti in <i>Drosophila melanogaster</i> )	TPR	MEEVD	Component of the Rvb1–Rvb2–Tah1–Pih1 (R2TP) complex
AHA1	NTD, CTD	NTD, MD	Stimulates ATPase activity of HSP90
PP5 (Ppt1 in yeast)	TPR	MEEVD	Phosphatase that dephosphorylates HSP90; maturation of kinases
FKBP51 and/or FKBP52	TPR	MEEVD	General co-chaperones
CHIP	TPR	MEEVD	E3 ubiquitin ligase
CYP40 (Cpr6 and Cpr7 in yeast)	TPR	MEEVD	PPlase; maturation of the glucocorticoid receptor
p23 (Sba1 in yeast)	CS	NTD, MD	Inhibition of HSP90 ATPase activity; stabilization of the HSP90 closed 2 state
TTC4 (Cns1 in yeast)	TPR	MEEVD	Interacts with CDC6
Unc45	TPR	MEEVD	Myosin-dependent processes

For an extended list of co-chaperones, please see REFS 15, 45, 116. AHA1, activator of HSP90 ATPase homologue 1; CHIP, carboxyl terminus of HSP70-interacting protein; Cns1, cyclophilin seven suppressor 1; Cpr6, cyclosporin-sensitive proline rotamase 6; CS, Chord and Sgt1 domain; CTD, carboxy-terminal domain; CYP40, cyclophilin 40; FKBP51, 51 kDa FK506-binding protein; HOP, HSC70/HSP90-organizing protein; MEEVD, Met-Glu-Glu-Val-Asp motif; MD, middle domain; NLR, NOD-like receptor; NTD, amino-terminal domain; Pih1, protein interacting with Hsp90 1; PPlase, peptidyl-prolyl *cis*–*trans* isomerase; Ppt1, Ser/Thr protein phosphatase 1; PP5, Ser/Thr protein phosphatase 5; Rvb1, RuvB-like protein 1; SGS, SGT1-specific domain; SGTA, small glutamine-rich TPR-containing protein- $\alpha$ ; Sgt1, suppressor of G2 allele of SKP1; Sti1, stress-induced phosphoprotein 1; Tah1, TPR-containing protein associated with HSP90; TPR, tetratricopeptide repeat; TTC4, TPR protein 4.

# HOP (Hsp70-Hsp90-organizing protein)

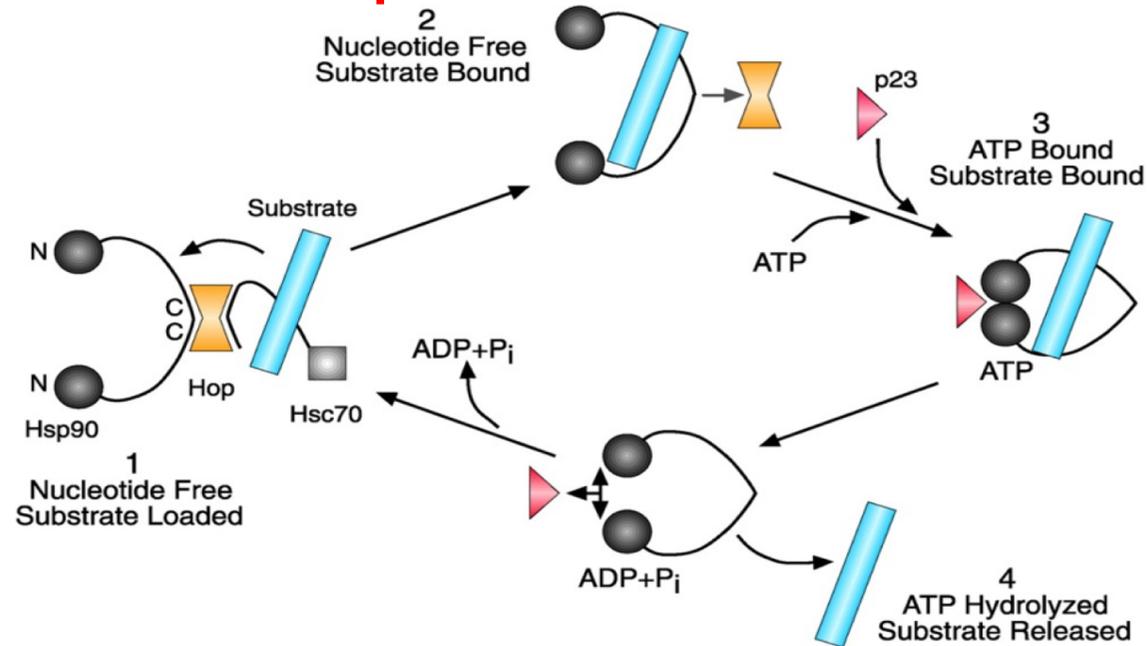
Il co-chaperone **HOP** (Hsp70-Hsp90-organizing protein) possiede un TPR all’N-terminale che si lega alla sequenza GPTIEEVD al C-terminale dell’Hsp70, e un altro TPR al centro della sequenza, che si lega a una simile sequenza C-terminale dell’Hsp90, cioè MEEVD.

Substrati di HOP: il recettore dei glucocorticoidi e il recettore dei progestinici.



**HOP connette i due chaperoni (Hsp70 e Hsp90), stabilizza la conformazione aperta di Hsp90, inibisce l'idrolisi di ATP e facilita di conseguenza il transito delle proteine substrato da Hsp70 a Hsp90.**

## Il ciclo funzionale di Hsp90



(1) Il substrato polipeptidico può essere trasferito da un chaperone (in questo caso Hsc70) all'Hsp90 in una forma non legata a nucleotidi. (2) L'Hsp90 nella forma aperta e priva di nucleotide può legare substrato polipeptidico. (3) Il legame ad ATP induce la dimerizzazione dei domini N-terminali di Hsp90 (rappresentati come sferette) e permette il legame di p23; in questo stato il substrato è legato dall'Hsp90 a seguito della sua chiusura "a pinza". (4) L'idrolisi dell'ATP legato rilascia il substrato aprendo la pinza o inducendo qualche altro cambiamento conformazionale. p23 e Hop sono co-chaperoni che regolano il ciclo funzionale di Hsp90.

*Young J.C. et al. (2001) J. Cell Biol. 154, 267–273.*

## CYP40 FKBP51 FKBP52

- **CYP40, FKBP51 e FKBP52** sono altri co-chaperoni che contengono domini PPI, cioè ad attività peptidil-prolil isomerasica.
- Possiedono domini TPR mediante i quali interagiscono con Hsp90 a livello del suo dominio C-terminale.
- Assistono il processamento dei recettori degli ormoni steroidei. L'attività peptidil-prolil isomerasica incrementa la flessibilità conformazionale delle proteine substrato ed è questo il fattore che con ogni probabilità ne favorisce il ripiegamento.

# CHIP

- **CHIP** è un altro co-chaperone che interagisce con Hsp90 attraverso TPR. La peculiarità di questa proteina è che *essa partecipa anche alla ubiquitinazione delle proteine (è una ubiquitina ligasi)*. Le proteine ubiquitinate sono destinate alla degradazione proteolitica da parte del *proteasoma*, un complesso proteolitico citoplasmatico.
- Si ritiene che proteine che stazionano molto a lungo a livello del complesso Hsp90-cochaperoni, o perché l'Hsp90 è inibita artificialmente (ad esempio da geldanamicina), o per cause fisiologiche (sovraccarico di substrati, carenza di ATP, impossibilità di refolding a causa di mutazioni) vengano destinate alla degradazione proteolitica attraverso CHIP.
- Anche questo processo rientra nello schema generale del **controllo di qualità delle proteine**, secondo il quale una proteina che richieda assistenza nel folding, viene prima sottoposta a tentativi di refolding dai chaperoni; se tali tentativi falliscono la proteina viene indirizzata alla degradazione proteolitica.
- Substrati di CHIP: il recettore dei glucocorticoidi, il regolatore transmembrana della fibrosi cistica (CFTR) e la proteina citoscheletrica tau.

## Cdc37 Aha1 p23

- La proteina **Cdc37** (cell division-cycle 37 homologue) si lega ai domini N-terminali di Hsp90 e come HOP stabilizza la conformazione aperta del dimero, inibisce l'idrolisi dell'ATP e facilita il legame dei substrati. Essa stessa ha un ruolo di chaperone e tipicamente **indirizza un repertorio di proteine chinasi a Hsp90**.
- **Aha1** (activator of HSP90 ATPase homologue 1) è un modulatore del ciclo funzionale di Hsp90. Promuove l'associazione tra i domini N-terminali e intermedi, e ciò accelera l'idrolisi dell'ATP.
- **p23** è un co-chaperone che *non interagisce attraverso i TPR*. Anch'esso è dotato di attività chaperonica, ma il suo ruolo forse più importante è la regolazione del ciclo funzionale di Hsp90 *in modo antagonistico ad Aha1* (vale a dire, il legame di ciascuna delle due proteine compete con il legame dell'altra). In particolare, due molecole di p23 legano i domini N-terminali di Hsp90 stabilizzando la conformazione circolarizzata e in tal modo rallentano l'idrolisi dell'ATP e il rilascio dei substrati medesimi. Tuttavia p23 accoppia efficientemente l'attività ATPasica alla dissociazione del substrato.

# Quali tratti strutturali delle proteine substrato riconosce l'Hsp90?

- I tratti strutturali riconosciuti non sono conservati.
- Le proteine substrato non hanno tratti distintivi evidenti che le differenzino dalle caratteristiche medie di una popolazione di proteine intracellulari (ad esempio non possiedono più tratti disordinati o idrofobici delle altre proteine).
- L'interazione avviene con proteine substrato già parzialmente ripiegate e con struttura globulare.
- Hsp90 ha una preferenza per proteine con bassa stabilità termodinamica, come può essere dimostrato osservando che esse si inattivano a più bassa temperatura rispetto a proteine con caratteristiche medie.
- Per esempio i recettori ormonali sono stabilizzati dall'interazione con i rispettivi ormoni, quando l'interazione avviene essi sono rilasciati dalla Hsp90.
- Hsp90 eucariotica (al pari di quella procariotica) è coinvolta anche nell'assistenza al ripiegamento di normali proteine dopo un heat shock.

Table 2 | The range of HSP90 clients

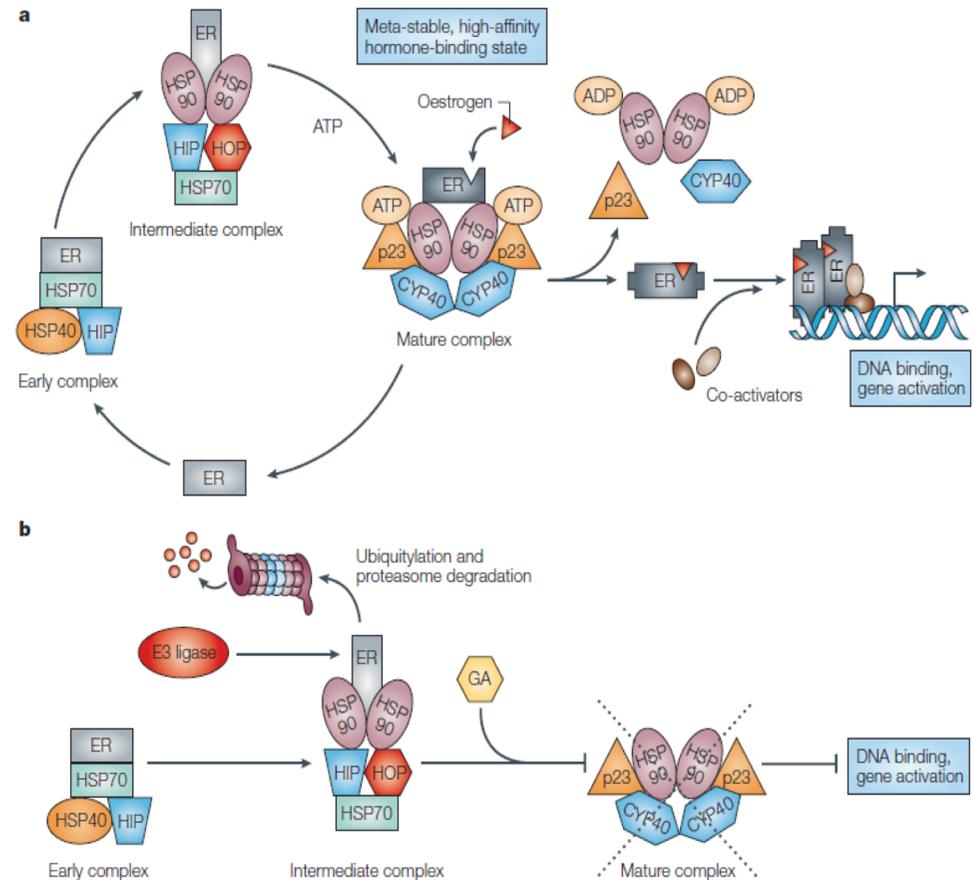
<https://doi.org/10.1038/nrm.2017.20>

Client	Function	Diseases
<b>Steroid hormone receptors</b>		
Glucocorticoid receptor	Response to glucocorticoids	Cushing syndrome
Mineralocorticoid receptor	Response to mineralocorticoids	Chronic kidney disease
Progesterone receptor	Response to progesterone	Cancer
Androgen receptor	Response to androgens	Spinobulbar muscular atrophy
Oestrogen receptor	Response to oestrogens	Cancer
<b>Kinases</b>		
AKT (also known as PKB)	Mitogen signalling	Cancer
CDK4	Cell cycle control	Cancer
ERBB2	EGF receptor	Cancer
HCK	Immune response	Cancer
JAK1 and/or JAK2	Cytokine signalling	Cancer
SRC	Constitutively active Tyr kinase	Cancer
BRAF	Mitogen signalling	Cancer
BCR-ABL	Constitutively active Tyr kinase	Cancer
<b>E3 ubiquitin ligases</b>		
MDM2	p53 degradation	Cancer
UHRF1	DNA methylation	Cancer
<b>Transcription factors</b>		
p53	Tumour suppressor protein	Cancer
OCT4	Embryonic development	Cancer
HIF1 $\alpha$	Angiogenesis	Cancer
PPAR $\alpha$ , PPAR $\beta$ , PPAR $\gamma$	Fat and glucose metabolism	Diabetes mellitus
STAT2, STAT3, STAT5	Cytokine signalling	Cancer
<b>Others</b>		
Argonaute 1, Argonaute 2	RNA interference	
Calcineurin	Immune response	Rheumatoid arthritis
Calmodulin	Various signalling pathways	
CFTR	Chloride channel	Cystic fibrosis
HSF1	Regulation of heat shock response	
NLR proteins	Innate immune response	Inflammation
TERT	Telomere maintenance	Cancer
eNOS	Nitric oxide synthesis	
RAD51 and/or RAD52	DNA repair	Cancer
Tau	Microtubule stabilization	Alzheimer disease

For a comprehensive list of HSP90 clients, see <https://www.picard.ch/downloads>. BCR-ABL, breakpoint cluster region-Abelson tyrosine kinase oncoprotein; CDK4, cyclin-dependent kinase 4; CFTR, cystic fibrosis transmembrane conductance regulator; EGF, epidermal growth factor; eNOS, endothelial nitric oxide synthase; HCK, haematopoietic cell kinase; HIF1 $\alpha$ , hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ ; HSF1, heat shock factor protein 1; HSR, heat shock response; JAK1, Janus kinase 1; MDM2, mouse double minute 2 homologue; NLR, NOD-like receptor; OCT4, octamer-binding protein 4; PPAR, peroxisome proliferator-activated receptor; STAT, signal transducer and activator of transcription; TERT, telomerase reverse transcriptase; UHRF1, ubiquitin-like PHD and RING finger domain-containing protein 1.

# Hsp90 e il recettore degli estrogeni

- Il recettore degli estrogeni (ER) appena sintetizzato si associa a HSP70, HSP40 e l'adattatore HIP (proteina che interagisce con HSP70) per formare un complesso precoce.
- Il dominio idrofobico del recettore è parzialmente esposto in questo complesso e HSP90, che si lega a questa regione in associazione con la proteina HOP, sposta HSP40 per formare un complesso intermedio.
- In un modo ATP-dipendente, HSP90 espone completamente il dominio di legame del recettore all'ormone e il co-chaperone p23 stabilizza HSP90 legato ad ATP. La ciclofilina 40 (CYP40) mediante i motivi TPR si associa a HSP90 e si forma il complesso maturo.
- Il legame con l'estrogeno porta a un cambiamento conformazionale nel recettore, che rilascia le componenti degli chaperoni e, in seguito al reclutamento dei co-attivatori, viene attivata la trascrizione.
- In assenza di ligandi estrogenici, ER viene rilasciato dal complesso maturo per subire ulteriori cicli di interazione con gli chaperoni.
- La geldanamicina (GA), che si lega a HSP90, blocca lo chaperone in una conformazione alternativa che impedisce il normale ciclo e la formazione di complessi di chaperone maturi.
- Il recettore ER si accumula in un complesso intermedio che recluta l'ubiquitina ligasi E3 e guida la degradazione della proteina mediata dal proteasoma, riducendo così drasticamente i livelli cellulari del recettore e interrompendone la funzione.



Whitesell, L. & Lindquist, S.L. (2005) *Nature Rev.* 5, 761-772.

# Hsp90 in terapia

- Recettori ormonali o chinasi che attuano la trasduzione di un segnale ormonale possono andare incontro a mutazioni che li bloccano in uno stato permanentemente attivato.
- Ciò si traduce in una permanente attivazione trascrizionale, che porta a proliferazione cellulare incontrollata e alla conseguente insorgenza di tumori.
- L'attivazione trascrizionale mediata dai recettori ormonali richiede la costante assistenza degli chaperoni Hsp90.
- Composti come la geldanamicina (antibiotico benzochinonico) o altri antibiotici che inibiscono Hsp90 bloccandone il ciclo funzionale, impediscono anche la progressione del ciclo cellulare con conseguente arresto della proliferazione cellulare. Ciò ha fatto di Hsp90 un potenziale target di farmaci antitumorali. All'inizio è stato considerato con scetticismo, considerata l'essenzialità di Hsp90, tuttavia cellule non neoplastiche richiedono un minore pool di Hsp90 rispetto alle cellule tumorali altamente proliferanti.
- La geldanamicina si è dimostrata troppo tossica per un suo utilizzo clinico, attualmente sono allo studio altre varianti della molecola, meno tossiche per cellule non neoplastiche e quindi più selettive ed efficaci sulle cellule tumorali (50 clinical trials con almeno 15 diversi inibitori di Hsp90).
- La simultanea inibizione di Hsp90 e delle proteine chinasi, regolatori chiave della proliferazione cellulare, è allo studio per una possibile strategia terapeutica.

# Hsp90 e la tumorigenesi

- Tra i substrati di Hsp90 ci sono il soppressore tumorale p53, l'oncoproteina SRC e proteine chinasi, telomerasi e il fattore HIF1 $\alpha$  coinvolti nella crescita tumorale.
- Alta espressione di Hsp90 è associata a prognosi negativa in alcuni tumori. Per esempio p53 mutata rimane fortemente associata a Hsp90 e questo porta ad un accumulo di p53 disfunzionale nella cellule. L'abrogazione di questa interazione prolunga la sopravvivenza e aumenta la regressione del tumore in modelli murini.
- Le cellule tumorali sono generalmente più sensibili agli inibitori di Hsp90 e questo correla con la presenza di «epichaperone» (complessi stabili tra Hsp70 e Hsp90 e altri chaperoni) che facilitano le interazioni con le client protein. Questi complessi promuovono la sopravvivenza tumorale sebbene rendano simultaneamente le cellule tumorali più sensibili agli inibitori di Hsp90.

- <https://www.youtube.com/watch?v=Bo9MTCh-y8s> (Struttura 3D del dimero circolarizzato)
- <http://highered.mheducation.com/sites/dl/free/0072835125/126997/animation29.html>  
(Schema dell'interazione tra un glucocorticoide, il suo recettore e l'Hsp90)
- <http://pdb101.rcsb.org/motm/108> (Hsp90 in Protein Data Base)
- **HSP90 and the chaperoning of cancer** doi:10.1038/nrc1716
- **Approfondimento: il ruolo di Hsp90 nella crescita tumorale?**