



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE  
**DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE**

**Corso di Laurea**

**Scienze Biologiche**

Controllo qualitativo di chaperoni molecolari e proteine chinasi

Molecular chaperones and protein kinase quality control

Tesi di Laurea di:

Ilenia Mannucchi

Docente Referente Chiar.mo Prof.

Tiziana Cacciamani

Sessione autunnale - Dicembre 2021

Anno Accademico 2020/2021

## Introduzione:

Lo studio oggetto di questo articolo riguarda il possibile ruolo che possono svolgere gli chaperoni molecolari e le proteine chinasi nel bloccare la crescita tumorale. Gli esperimenti eseguiti e presentati nello studio hanno mostrato come gli inibitori di un particolare tipo di chaperone molecolare, Hsp90, siano in grado di bloccare l'azione fisiologica di alcune molecole che interagiscono con gli chaperoni stessi.

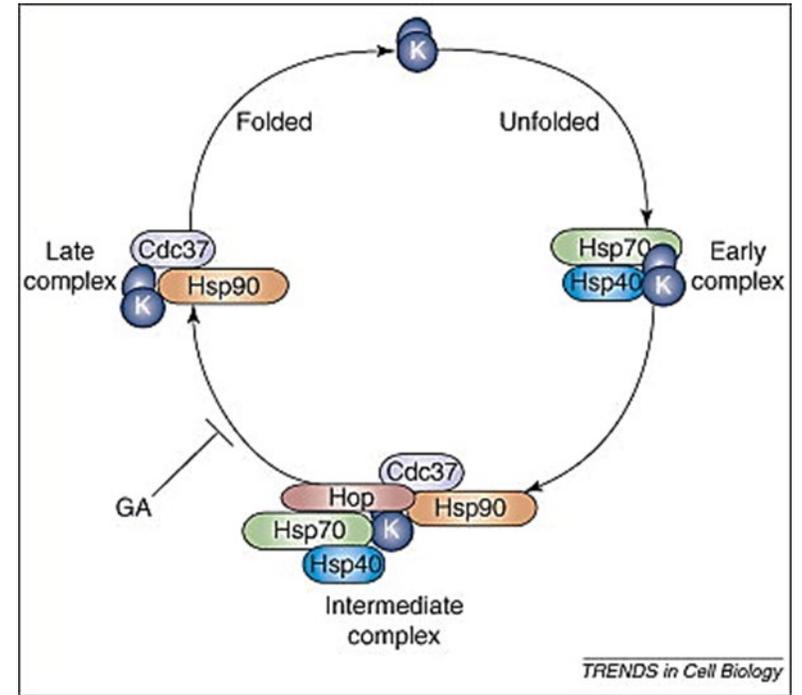


Fig.1 Rappresentazione del meccanismo d'azione (generale)

Le molecole coinvolte negli esperimenti sono gli chaperoni molecolari, i co-chaperoni, le proteine chinasi e gli inibitori di Hsp90, ad esempio Geldanamicina (GA).

Il folding proteico, dunque anche quello delle chinasi, segue un processo di auto-assemblamento che consente alla proteina che si sta formando di assumere la conformazione apposta alla funzione che svolgerà. Il folding, normalmente, ha luogo nel citosol, nel RE o nei mitocondri, dove sono contenuti set altamente conservati di Hsp90 e Hsp70.

Gli chaperoni molecolari:

Gli chaperoni presenti negli eucarioti appartengono alle famiglie Hsp70 e Hsp90. Hsp90 deve essere guidata verso la sua molecola bersaglio da un complesso iniziale formato da Hsp70 e Hsp40 e altri co-chaperoni, che possono essere Cdc37 e HOP (Hsp Organizing Protein).

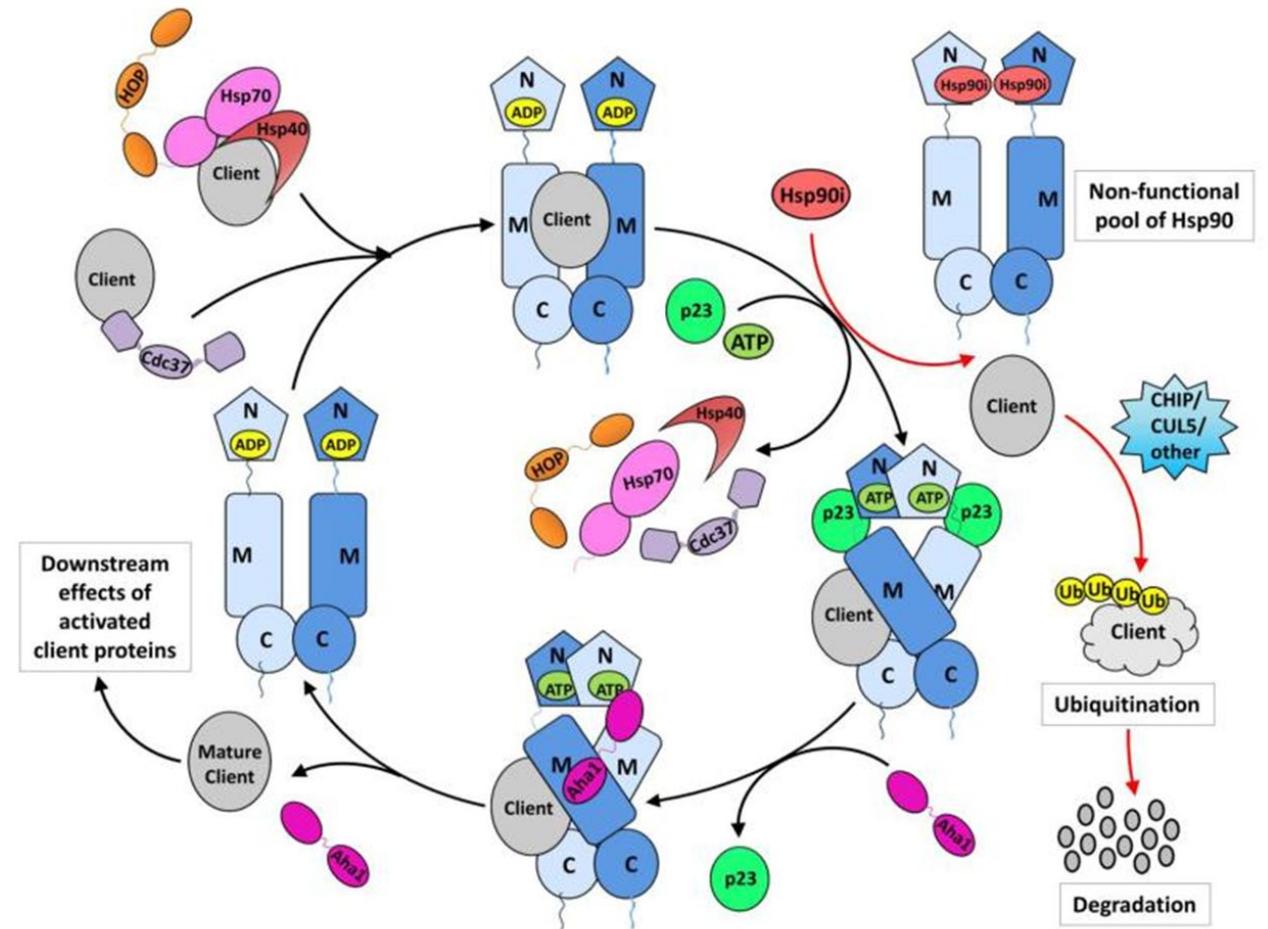


Fig.2 Ciclo degli chaperoni molecolari

Le proteine chinasi:

Appartenenti al gruppo delle chinasi, sono enzimi che catalizzano l'aggiunta di un gruppo fosfato alla loro proteina bersaglio; il meccanismo è detto fosforilazione e spesso comporta l'attivazione del substrato. Le chinasi, dunque, svolgono un ruolo centrale nei processi di traduzione del segnale. La regione fondamentale delle proteine chinasi è il loro dominio catalitico che è diviso in un Lobo-N (posizionato superiormente ma di minori dimensioni) e un Lobo-C (posizionato inferiormente ma di dimensioni maggiori), divisi da un solco in cui si lega il nucleotide.

Il dominio catalitico è una delle strutture più abbondanti e conservate, i geni che codificano il dominio rappresentano ~ il 2% del genoma eucariote e la sua architettura è riscontrabile in serin-chinasi, treonin-chinasi e tirosin-chinasi.

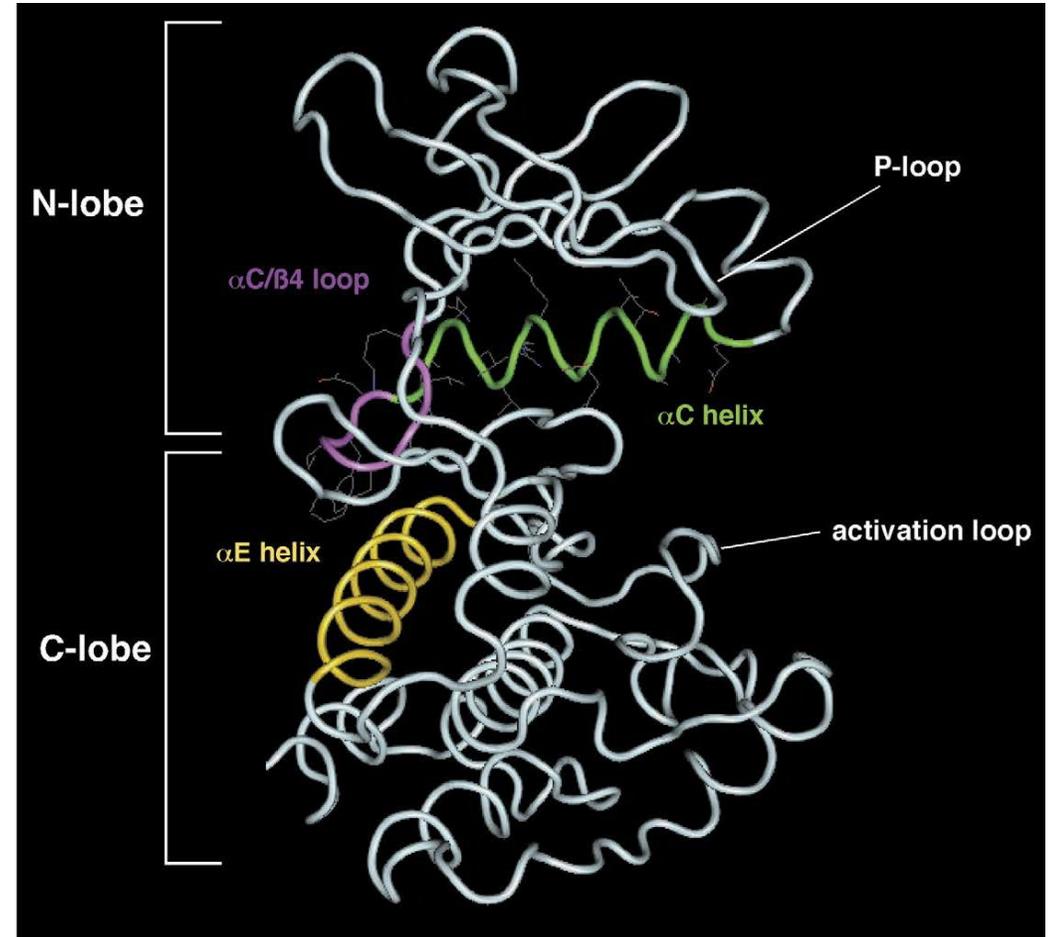


Fig. 3 Struttura dominio catalitico proteina chinasi

Gli inibitori di Hsp90:

Gli inibitori di Hsp90 sono molecole che legandosi nella tasca della catena N-terminale di Hsp90 impediscono a quest'ultima di legare l'ATP e, di conseguenza non potendo scindere la molecola altamente energetica, non prosegue il folding e la stabilizzazione della proteina client di Hsp90. Il primo inibitore di Hsp90 che fu individuato è la Geldanamicina (GA), antibiotico appartenente alla classe delle ansamicine, che però non può essere utilizzato a scopo terapeutico a causa della sua elevata tossicità. GA e i suoi derivati sintetici agiscono come descritto prima.

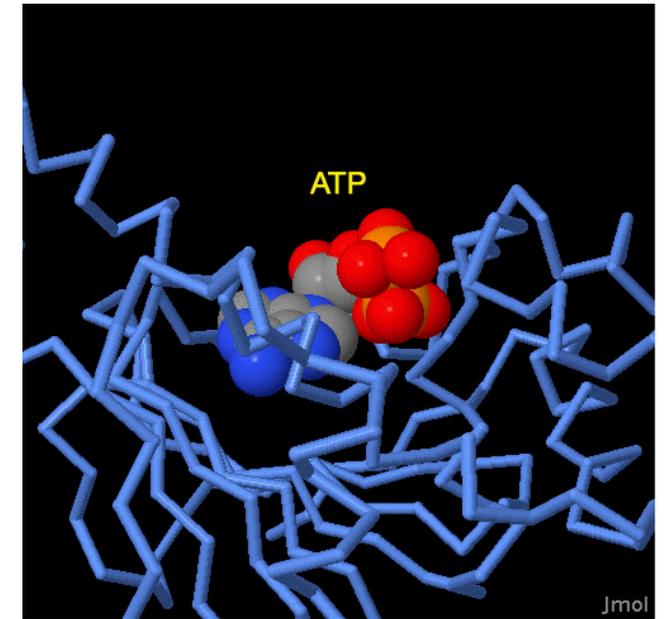


Fig. 4 Legame Hsp90 ad una molecola di ATP

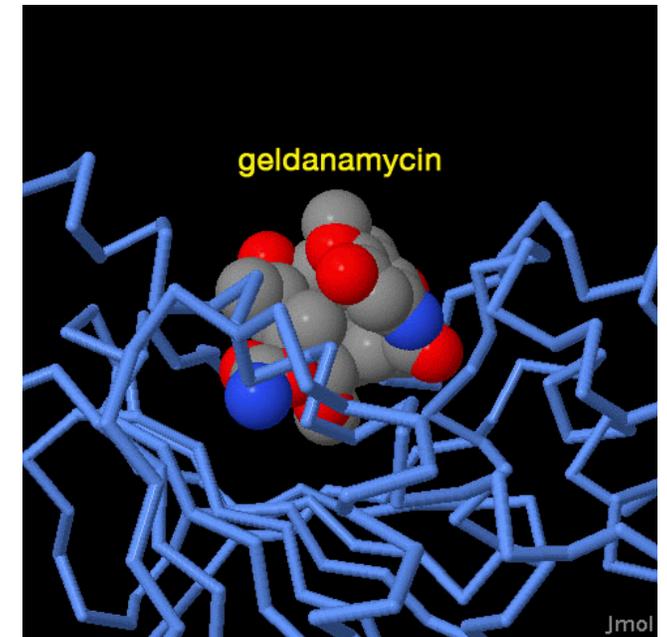


Fig. 5 Legame Hsp90 con l'inibitore, GA

Il problema sorto durante lo studio è la diversa sensibilità che le varie chinasi mostrano a contatto con gli inibitori di Hsp90, alcune chinasi mostrano una elevata sensibilità che le porta ad una rapida degradazione mentre altre sono totalmente insensibili. Si è pensato a vari motivi che possano spiegare questa diversa sensibilità ma non si è arrivata ancora una causa comune.

Nel caso di ErbB1 ed ErbB2, molecole omologhe, la causa sembra essere nel loop fra l'elica  $\alpha$ -C e il foglietto  $\beta$ -4; studi più approfonditi hanno ristretto il campo ad una sola carica presente nel loop. ErbB1 ha esposta sulla superficie l'aspartato (Asp746), che ha carica negativa, mentre ErbB2 ha nella stessa posizione una glicina (neutra) e ciò la rende estremamente sensibile e rapidamente degradata dalla via del complesso ubiquitina-proteasoma.

Convertendo l'aspartato di ErbB1 in glicina lo si rende sensibile a GA e derivati, mentre convertendo la glicina in aspartato si limita la sensibilità di ErbB2 a GA.

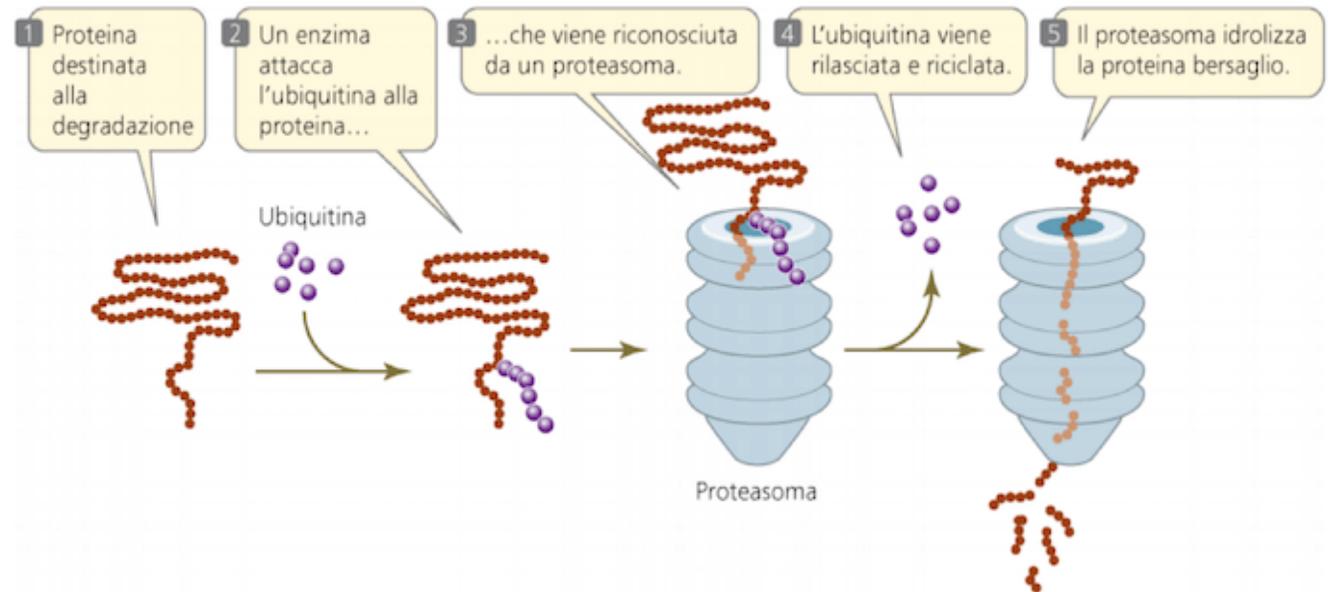


Fig. 6 Ubiquitazione di una proteina da degradare

Nel caso della chinasi B-Raf, la forma wild è insensibile mentre la forma mutante trovata nei melanomi, Val600Glu, ha una mutazione nel giro di attivazione, e dunque lontano dal giro  $\alpha$ C- $\beta$ 4, che provoca una conformazione più aperta che si riflette su siti di legame con gli chaperoni più esposti. Anche la Raf chinasi mutante-morte, Asp594Val, ha una elevata sensibilità alla GA.

La tirosin-chinasi Lck ha un mutante costitutivamente attivo molto sensibile che viene degradato velocemente in presenza degli inibitori. Elemento che modifica la sensibilità a GA è la presenza della fosfatasi 2 (PP2), che lega direttamente Lck non permettendo il legame di GA e impedendo la degradazione della chinasi Lck.

Si è notato come anche la stabilità del Lobo-N influenzi le interazioni che si formano fra Cdc37 e la chinasi; esempio è la chinasi JNKs (C-Jun N-terminal) che nella sua forma attiva è relativamente insensibili agli inibitori di Hsp90 ma se si rimuovono 28 amminoacidi nella regione N-terminale si nota un aumento delle interazioni fra la chinasi e il binomio Hsp90-Cdc37. A differenza di JNKs, AKT, membro della famiglia AGC, subisce fosforilazione del motivo idrofobico presente sul Lobo-C nella posizione Ser474 e ciò provoca l'inserzione di Phe470 e Phe473 nel solco idrofobico che vanno a stabilizzare la molecola.

Si potrebbe, dunque, ipotizzare che il Lobo-N regoli se il legame fra chaperone, co-chaperone e chinasi debba durare il tempo necessario al ripiegamento o anche dopo; nel caso delle chinasi in cui persiste il legame si possono distinguere due gruppi.

Nel primo gruppo ricadono le chinasi che sono instabili nella forma inattiva;

Nel secondo gruppo, invece, ricadono chinasi in cui anche la forma matura è instabile e di conseguenza le interazioni con chaperoni e co-chaperoni servono a stabilizzarle.

Per capire l'instabilità del Lobo-N sono state fatte delle comparazioni tra proteine chinasi non legate e proteine chinasi legate ad Hsp90 o all'inibitore di Hsp90. Nelle forme non legate si è notata una maggiore temperatura al Lobo-N che nella forma legata invece diminuisce.

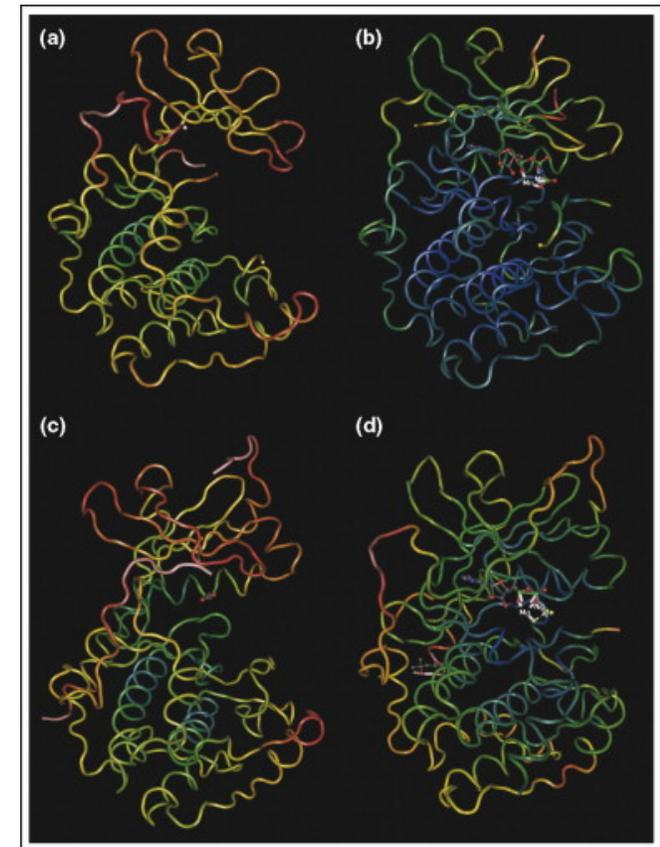


Fig. 7 Confronto stato non legato e legato di una chinasi

Altra ipotesi è quella secondo cui lo stesso Hsp90 a destabilizzare la chinasi e gli interventi di GA servano ad indirizzare la proteina verso la degradazione attraverso il complesso ubiquitina-proteasoma. GA dunque sarebbe l'ultimo fattore che interviene mentre prima interverrebbero altri che riprogrammerebbero la funzione di Hsp90 da aiuto nel folding a promozione della degradazione della proteina target.

Molte domande sono ancora senza risposta ma continuare lo studio per capire come poter sfruttare queste suscettibilità delle chinasi nei confronti degli inibitori di Hsp90 potrebbe rivelarsi fondamentale per un uso terapeutico nel caso di pazienti oncologici. Sapere il numero effettivo di chinasi sensibili a GA, come intervengono altre molecole e che ruolo abbiano, sono alcune delle domande a cui è necessario dare una risposta per poter sfruttare al meglio gli inibitori di Hsp90.

Il potenziale terapeutico degli inibitori di Hsp90 non è messo però in dubbio data la loro capacità di far degradare sia chinasi che promuovono la crescita tumorale sia chinasi che fungono da snodo per le informazioni cellulari.

## Riassunto esteso:

Lo studio presentato in questo articolo ha valutato come le interazioni degli inibitori di Hsp90 vadano, in alcuni casi, a bloccare l'attività di proteine chinasi. Partendo dall'analisi della struttura e dalla funzione delle molecole coinvolte si è capito come alcune chinasi siano soggette ad una vulnerabilità nei confronti degli inibitori di Hsp90. Proseguendo negli studi si è visto come però le proteine chinasi non rispondano tutte allo stesso modo in presenza di GA o derivati, ossia inibitori di Hsp90, e sono state per questo indagate le cause di questa variabilità nella risposta. Al termine dell'articolo si afferma che nonostante ancora siano molte le domande senza una risposta, la validità della scoperta e della ricerca inerente ad un controllo qualitativo operato da inibitori di Hsp90 su proteine chinasi non è in discussione, soprattutto nel caso in cui sono coinvolte chinasi che svolgono la loro funzione in cellule tumorali e che consentono dunque di far espandere il tumore, per questa ragione l'inibizione della loro funzione risulterebbe utile per evitare la progressione tumorale.

## Referenze:

Bibliografia: «Molecular chaperones and protein kinase quality control» di Avrom J. Caplan, Atin K. Mandal e Maria A. Theodoraki.

## Immagini:

Fig.1 «Rappresentazione del meccanismo d'azione (generale)» da «Molecular chaperones and protein kinase quality control» di Avrom J. Caplan, Atin K. Mandal e Maria A. Theodoraki»;

Fig. 2 «Ciclo degli chaperoni» da «Butler, Lisa M et al. "Maximizing the Therapeutic Potential of HSP90 Inhibitors." *Molecular cancer research : MCR* vol. 13,11 (2015): 1445-51. doi:10.1158/1541-7786.MCR-15-0234»;

Fig. 3 «Struttura dominio catalitico proteine chinasi» da «Molecular chaperones and protein kinase quality control» di Avrom J. Caplan, Atin K. Mandal e Maria A. Theodoraki»;

Fig. 4 «Legame Hsp90 ad una molecola di ATP» da «PDB-101, Molecular explorations through biology and medicine, Molecule of the Month, publication December 2008, by David Goodsell»;

Fig. 5 «Legame Hsp90 con l'inibitore, GA» da «PDB-101, Molecular explorations through biology and medicine, Molecule of the Month, publication December 2008, by David Goodsell»;

Fig. 6 «Ubiquitazione di una proteina da degradare» da «Chimica-online, sezione Biologia, argomento Proteasoma»;

Fig. 7 «Confronto stati non legati e stati legati proteine chinasi» da «Molecular chaperones and protein kinase quality control» di Avrom J. Caplan, Atin K. Mandal e Maria A. Theodoraki»;