

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA UNIVERZITY KARLOVY V PRAZE

KATEDRA FYZIOLOGIE ŽIVOČICHŮ A VÝVOJOVÉ BIOLOGIE

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2006/2007

**Interakce kináz skupiny Src se stresovými
proteiny a s receptory glukokortikoidů**

ONDŘEJ BALLEK

ŠKOLITEL: PROF. RNDR. VÁCLAV HOŘEJŠÍ, CSC.

*MÉ UPŘÍMNÉ PODĚKOVÁNÍ ZA VEDENÍ, ČAS A POMOC PŘI ZPRACOVÁNÍ
BAKALÁŘKÉ PRÁCE PATŘÍ PANU PROF. RNDR. VÁCLAVU HOŘEJŠÍMU, CSC.*

Ondřej Ballek

Abstrakt:

Kinázy skupiny Src (SFK) jsou enzymy fosforylující tyrosinové zbytky v jiných proteinech. Mají zásadní význam pro mnohé signalizační a regulační děje v různých typech buněk. Jejich aktivity jsou mimo jiné regulovány interakcemi s tzv. stresovými proteiny a s receptory glukokortikoidů. Tato práce shrnuje dosavadní poznatky o těchto proteinech a funkčně důležitých komplexech, které spolu vytvářejí. Jeden ze stresových proteinů, Hsp90, hraje jakožto tzv. chaperon obzvláště důležitou roli při regulaci významných signálních dějů v buňce. Tvorba komplexů Hsp90 s SFK napomáhá těmto enzymům k zaujmutí správné terciární struktury, nebo se přímo podílí na jejich aktivaci. Při nefunkčnosti chaperonu Hsp90 dochází k poruchám funkce SFK a k jejich degradaci. To se může projevit v zastavení růstu, diferenciaci a dokonce i smrti buňky (např. u T-lymfocytů). Hsp90 podobně interaguje také s receptory steroidních hormonů. Na jejich „složení“ do správné, aktivní struktury, která je schopná přijmout ligand, se kromě Hsp90 podílí celý komplex dalších co-chaperonů, též stresových proteinů. Hsp90 je kromě aktivace receptoru zodpovědný i za jeho translokaci z cytoplasmy do jádra. Steroidní hormony ze skupiny glukokortikoidů (GC) působí silnou imunosupresi. Kromě klasického „genomického“ efektu, kdy je glukokortikoidní receptor (GR) translokován do jádra a aktivuje transkripční faktory ovlivňující tvorbu imunosupresivních proteinů, je popsán i „non-genomický“ efekt, který je rychlejší. Tento děj je založen na skutečnosti, že GR tvoří spolu s Hsp90 a SFK komplex, který se účastní aktivace T-lymfocytů vyvolané ligací jejich antigenně specifického receptoru (TCR). Vazba GC na GR vede k rozrušení vzájemných interakcí v tomto složitém komplexu a rychlému přerušení signální odpovědi.

Klíčová slova:

Hsp90, chaperony, Lck, glukokortikoidní receptor, glukokortikoidy, Src

Abstract

Src family kinases (SFK) are enzymes phosphorylating tyrosine residues in other proteins. They are of essential importance for many signaling and regulatory processes in various cell types. Their activities are among others regulated by interactions with so called stress proteins and with glucocorticoid receptors. This study summarizes current findings about these proteins and functionally important complexes they form. One of the stress proteins, Hsp90, plays as a chaperone an especially important role in the regulation of important signalling processes in a cell. Complex formation of Hsp90 with SFK helps these enzymes to fold into correct tertiary structure and directly participates in their activation. When chaperon Hsp90 is dysfunctional, SFK are rapidly degraded and their functioning is limited. This can stop the cell's growth or differentiation and can even result in its death (e.g. in T-cells). Hsp90 also interacts with steroid receptors. Besides Hsp90, many other stress proteins, specifically co-chaperons, participate in the proper folding of steroid receptors into an active structure, which is able to bind ligands. Hsp90 is, in addition to the previously mentioned activation, also responsible for translocation of the activated receptor from cytoplasm to the nucleus. Steroid hormones of the glukocorticoid group cause strong immunosuppression. Besides the classical "genomic" effect, when the glukocorticoid receptor (GR) is translocated to nucleus and activates transcriptional factors, resulting in production of immunosuppressive proteins, there is also a faster, "non-genomic" effect. This is based on the fact that GR is a part of a complex involving also Hsp90 and SFK, which participates in T-cell activation elicited by ligation of the antigen-specific receptor of T cells (TCR). Binding of GC to GR leads to disruption of this complex and rapid interruption of the signal response.

Key words:

Hsp90, chaperons, Src kinases, Lck, glucocorticoid receptor, glucocorticoids,

OBSAH:

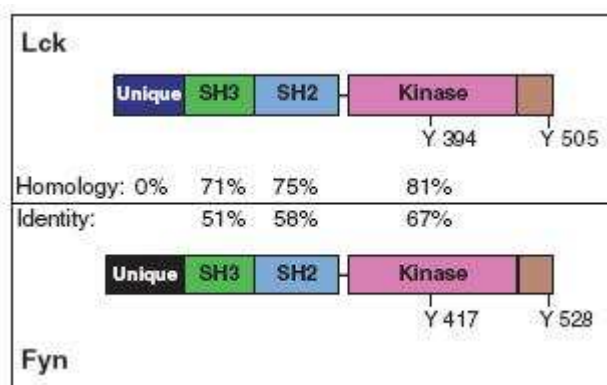
- 1. Úvod**
- 2. Kinázy skupiny Src (SFK)**
- 3. Stresové proteiny**
 - 3.1. Struktura a funkce
 - 3.2. Molekulární mechanismy interakcí Hsp90 s co-chaperony
- 4. Hsp90 a jeho interakce**
 - 4.1. Interakce kináz skupiny Src s Hsp90
 - 4.1.1. *Role Hsp90 v maturačních procesech SFK*
 - 4.1.2. *Vliv Hsp90 na připojení SFK do membrány*
 - 4.2. Interakce steroidních receptorů se stresovými proteiny
 - 4.2.1. *Struktura a funkce steroidních receptorů*
 - 4.2.2. *Molekulární mechanismy aktivace receptoru pro GC*
 - 4.2.3. *Translokace receptoru do jádra*
- 5. Vliv Hsp90 na aktivaci T-lymfocytů přes TCR**
 - 5.1. TCR signalizace
 - 5.2. Vliv Hsp90 na degradaci SFK v T-lymfocytech
 - 5.3. Non-genomický efekt glukokortikoidů
- 6. Závěr**
- 7. Seznam zkratk**
- 8. Seznam použité literatury**

1. ÚVOD

Kinázy skupiny Src (SFK) a stresové proteiny jsou významnými regulačními faktory, zajišťujícími mnoho důležitých reakcí uvnitř buňky. Jejich vzájemné interakce se podílí na regulaci aktivity SFK. Kromě stresových proteinů interagují SFK také s receptory steroidních hormonů. Tato práce se zejména zabývá komplexem SFK Lck se stresovým proteinem, chaperonem Hsp90, a s receptorem pro glukokortikoidy (GR) v T lymfocytech. Tvorba těchto komplexů výrazným způsobem ovlivňuje maturaci Lck, její asociaci s plazmatickou membránou a vliv na aktivaci T lymfocytů. Studie, které odhalily tyto funkční souvislosti byly m.j. založené na použití inhibitorů Hsp90. Významné bylo objevení pravděpodobného mechanismu tzv. „non-genomického“ efektu glukokortikoidů (GC), který vede velmi rychle (řádově v minutách) k účinnému potlačení aktivace T lymfocytů a tím k imunosupresi .

2. KINÁZY SKUPINY SRC

SFK patří do velké skupiny nerekceptorových (cytoplasmatických) protein-tyrosin kináz (PTK). Jsou to enzymy, které katalyzují přenos fosfátu z ATP či jiných fosfátových donorů na tyrosinové zbytky ve specifických proteinech. Fosforylace může zásadním způsobem regulovat funkci těchto proteinů. Tímto mechanismem často SFK spouštějí celou receptorovou signální kaskádu, která může vést až k ovlivnění různých transkripčních faktorů v jádře buňky. Název této skupiny je odvozen od onkogenu objeveném ve viru Rousova sarkomu (RSV). Ten je odpovědný za indukci kuřecího fibrosarkomu, a byl nazván *v-src*; jeho proteinový produkt se obvykle nazývá pp60^{vsrc}, nebo pouze v-Src. Je to cytoplasmatický protein s tyrosin specifickou kinázovou aktivitou. Mezi kinázy skupiny Src patří: Yes, Yrk, Src, Hck, Fgr, Lyn, Blk, Lck a Fyn. Právě poslední dvě jmenované SFK jsou kriticky důležité pro signalizaci přes receptor T-lymfocytů (TCR) při jejich aktivaci.



Obr. 1. – Struktura kinázy Lck a Fyn. Domény: unikátní, SH3, SH2, kinázová; regulační, respektive aktivační tyrosiny - Lck (Y505 a Y394), Fyn (Y528 a Y417). Převzato ze *Zamoyska et al., 2003*

Ve struktuře SFK je možno rozlišit obecně 6 částí (Obr. 1). Na samý počátek N-koncového úseku se kovalentně váže kyselina myristová, která je zodpovědná za zakotvení takto modifikovaného proteinu do buněčné membrány. V této části se u některých SFK (např. Lck, Fyn) může navíc vázat i kyselina palmitová (*Palacios et al., 2004*). Zdá se, že právě tato dvojnásobná acylace je důležitá pro lokalizaci příslušných SFK do speciálních oblastí membrány s odlišnými strukturními vlastnostmi, tzv. lipidických raftů, kde pak mají značný význam při TCR signalizaci. Dalším úsekem je tzv. unikátní doména. Její funkce jsou v rámci rodiny Src zřejmě variabilní a není o nich příliš známo. Např. u kinázy Lck zprostředkovává přes dva cysteinové zbytky interakci s koreceptory CD4 a CD8 (*Palacios et al., 2004*). To jsou transmembránové proteiny (koreceptory T lymfocytů), které váží MHC molekuly na povrchu antigen prezentujících buněk (APC, např. dendritických buněk) a tím pravděpodobně přenášejí signál k aktivaci asociované Lck. Na unikátní doménu navazují velmi důležité domény SH3 a SH2. Obě dvě jsou zodpovědné za regulaci samotné kinázové aktivity a zprostředkovávají interakce s jinými proteiny, a to prostřednictvím vazby na oblasti bohaté na prolin (SH3) či na fosforylované tyrosinové zbytky (SH2). Způsobují změny konformace, která umožňuje kinázové doméně (SH1) plnit její katalytickou funkci. Intramolekulárně je kináza regulována ještě přes C-terminální „ocásek“ a aktivační tyrosin (u Lck Y394). Zmíněný „ocásek“ obsahuje kritický regulační tyrosin (u Lck Y505), který je-li nafosforylován, naváže se na vlastní SH2 doménu. Tím vzniká „uzavřená“ konformace, ve které je aktivita katalytické, kinázové domény blokována.

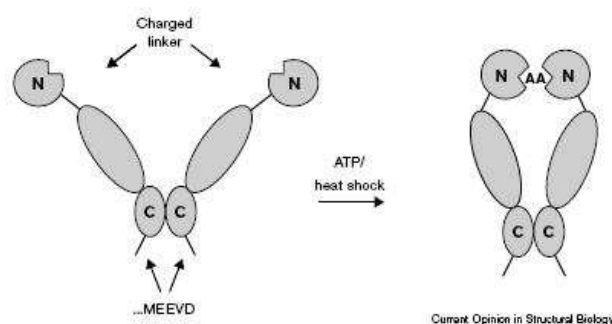
Aktivita SFK je negativně regulována cytoplasmatickou kinázou Csk, která fosforyluje kritický C-terminální tyrosinový zbytek (Y505 u Lck). Pozitivní regulaci zajišťuje transmembránová fosfatáza CD45, jejíž funkce je opačná k Csk – defosforyluje regulační C-terminální fosfotyrosin. Právě vzájemný poměr aktivit těchto dvou enzymů je rozhodující pro správnou funkci SFK a tedy i aktivaci T-buněk (*Mustelin et al., 2003*).

3. STRESOVÉ PROTEINY

3.1. Struktura a funkce

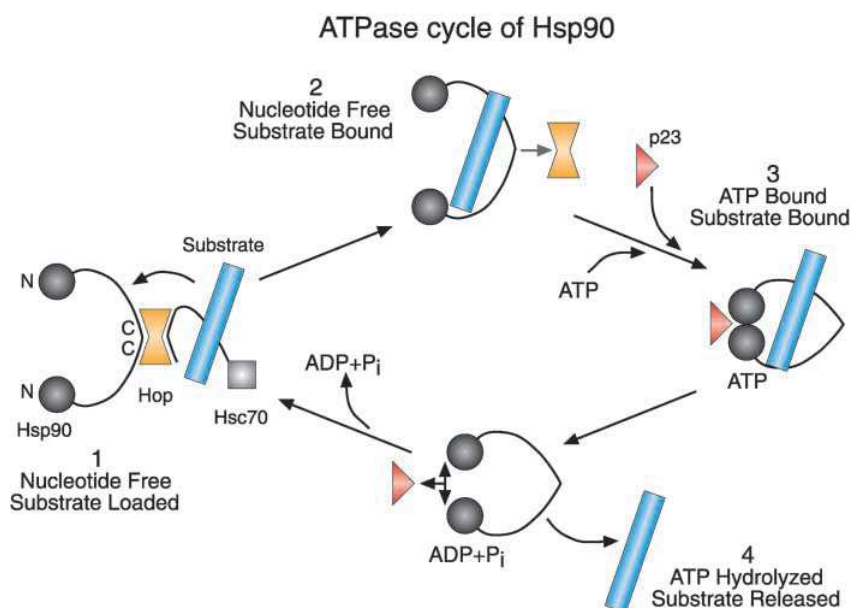
Stresovými proteiny se v buněčné biologii označuje skupina proteinů, jejichž exprese se výrazně zvyšuje v okamžiku, kdy je buňka, popřípadě celý organismus, vystaven různým stresovým faktorům (například zánět, infekce, reakce na toxiny, nedostatek vody či kyslíku). Důsledkem těchto změn jsou především výkyvy vnitřní teploty. Odtud stresové proteiny získaly též označení „proteiny tepelného šoku“ (heat shock proteins, HSP). Vedle stresových stavů se však významně uplatňují i při nestresových podmínkách. Zajišťují monitorování stavu buněčných proteinů, a to jak nově vznikajících, tak těch stávajících. Rozeznávají částečně denaturované, špatně sbalené či nějak poškozené proteiny a předávají signál opravným mechanismům v buňce která chybné proteiny opraví, či rovnou určí k degradaci v proteazomu (*Picard, 2002*). Krom této monitorovací funkce některé HSP pomáhají nově syntetizovaným proteinům v jejich sbalení do správné konformační struktury či transportují proteiny napříč buňkou do různých kompartmentů - mají funkci tzv. *chaperonů*. Většina těchto proteinů potřebuje pro svou správnou funkci, popřípadě regulaci, kooperaci s různými *co-chaperony* (podpůrnými proteiny), se kterými vytvářejí složité heterokomplexy (*Pearl et al., 2003*). Bylo objeveno mnoho různých typů a isoform HSP. Vyskytují se ve všech živých buňkách, od prokaryotních organismů až po člověka. Mezi významné zástupce patří: GroEL, GrpE, HtpG, Grp78, Grp94, Hsp40, Hsp70, Hsp90. Tato práce si všímá především cytosolických stresových proteinů Hsp70 a zvláště Hsp90, které se značnou měrou podílejí na signální transdukcii.

Již v samotném názvu HSP je obvykle zahrnuta jejich molekulová hmotnost (m.h.) v kDa. Hsp70 (m.h. 70 kDa) se vyskytuje v monomerní formě a má především chaperonovou funkci. Podílí se však též na tvorbě velkého heterokomplexu s Hsp90 a dalšími co-chaperony při aktivaci receptorů steroidních hormonů. (viz kapitola 4.2.2). Strukturně se skládá ze tří funkčních domén: N-terminální (ATPázové), kde probíhá vazba a následná fosforylace a hydrolyza ATP; prostřední domény se žlábkem, kam se váže cílový substrát (úsek peptidů s určitým nábojem a aminokyselinovou sekvencí); a C-terminální domény, bohaté na α -helikální úseky, která reguluje připojení, respektive uvolnění proteinu ze substrátové (prostřední) domény. Struktura Hsp90 je složitější. Je to protein, u něhož je v současné době především zkoumán jeho podíl na signální transdukci, zvláště při interakci s kinázami skupiny Src v TCR signalizaci (kap. 5). Jeho struktura je podobná Hsp70, avšak s několika drobnými, ale zato podstatnými, rozdíly (obr. 2).



Obr. 2 – Struktura Hsp90 a změna konformace po navázání ATP. N – doména s vazebným místem pro ATP, Charged linker – spojující segment, C – doména, MEEVD – aminokys. motiv, na který se váží další co-chaperony přes svou TRP doménu. A – ATP. Převzato z Pearl *et al.*, 2000.

Mezi N-terminální doménou a prostřední doménou je segment, jehož význam není dosud zcela znám. N-terminální doména (N) je zodpovědná za vazbu ATP, popřípadě jeho inhibitoru geldanamycinu, na prostřední doménu (M) se váže cílový protein. Značný rozdíl proti Hsp70 se pak nachází v C-terminální doméně. Ta zprostředkovává spojení dvou jednotek Hsp90 do homodimeru. Na samotném C-konci se pak nachází krátký aminokyselinový motiv označovaný *MEEVD*, který umožňuje vazbu přídatných co-chaperonů přes jejich tetratrikopeptidové repetitivní domény (TPR) (Pearl *et al.*, 2006). Co-chaperony se uplatňují při regulaci aktivity jejich vazebných partnerů. ATPázový cyklus Hsp90 je mechanismem, jakým probíhá jeho aktivace (obr. 3).



Obr. 3 – Příklad ATPázového cyklu Hsp90 při aktivaci glukokortikoidního receptoru. Komplex Hsp70-Hop s navázaným substrátem se přiblíží k Hsp90 (1). Po přenosu substrátu na střední doménu Hsp90 a uvolnění komplexu Hop-Hsp70 (2) dochází k vazbě ATP, propojení dimerů v N-terminální doméně a stabilizaci co-chaperonem p23 (3). Následnou hydrolyzou ATP se změní konformace substrátu a uvolní se z Hsp90 (4). Ten se pak vrátí do původního stavu (1) a je připraven na další cyklus. (Převzato z *Young et al., 2000*)

Existují též látky, které velmi specificky reagují s Hsp90 a způsobují jeho silnou inhibici. Jedná se především o ansamycinové antibiotikum geldanamycin (GA) a nově také o protinádorové antibiotikum radicicol (RA) (*Roe et al., 1999*). Inhibice je způsobena kompeticí těchto látek s ATP/ADP o jeho vazebné nukleotidové místo na N-terminální doméně chaperonu Hsp90. Objev této inhibice umožnil zkoumat přímý vliv Hsp90 na proteiny na něm závislé.

3.2 Molekulární mechanismy interakcí Hsp90 s co-chaperony

Důležitou regulační úlohu při interakcích Hsp90 s jeho vazebnými partnery mají i co-chaperony. Jsou to různě velké proteiny, tvořící s Hsp90 mnoho rozličných multiproteinových heterokomplexů. Některé nesou vlastní enzymovou aktivitu (PP5 – ser/thr protein fosfatáza, CHIP – E3/E4 ubikvitin-ligáza), některé působí na Hsp90 aktivačně (Aha1, Cpr6), jiné zas inhibičně (Hop, Cdc37, p23). K nejlépe prostudovaným patří systémy, účastníci se aktivace steroidního receptoru, proteiny Hop a p23 (popsáno v kap. 4.2.2), a proteiny Cdc37/Aha1 účastníci se interakcí s PTK.

Co-chaperon Cdc37 (též označován p50) interaguje s SFK Lck a Hsp90 (*Scroggins et al., 2003, Prince et al., 2004*). Funguje jako adaptorový protein, který spojuje Hsp90 s kinázou. Svým N-koncem se váže se na N-terminální úsek katalytické (kinázové) domény Lck, svým C-koncem pak na N-terminální doménu Hsp90 (*Roe et al., 2004*). Vazba na N-terminální doménu Hsp90 je však kritická, neboť ta obsahuje vazebné místo pro ATP, jehož hydrolýza je nutná pro vlastní chaperonovou aktivitu proteinu. Co-chaperon Cdc37 tedy brání přiblížení a spojení N konců homodimeru Hsp90 k sobě. Takto otevřená konformace však zároveň umožňuje navázání nesbalené Lck do této „dutiny“ vazbou na střední doménu (M). Pokud je kináza navázána, může dojít vlivem dalšího co-chaperonu Aha1 (*Lotz et al, 2003*), vázajícího se též na M-doménu Hsp90, ke změně konformace, zřejmě i uvolnění Cdc37, a následné vazbě a hydrolýze ATP. Obě N-koncové části Hsp90 homodimeru se mohou tedy spojit a tím poskytnout pomoc při sbalení proteinu, kinázy Lck. Detaily vazby jak vazebných partnerů tak co-chaperonů na střední doménu Hsp90 byly pomocí různých bodových mutací ve struktuře Hsp90 prokázány a podrobně popsány (*Hawle et al., 2006*). Střední doména je tedy velmi důležitá pro co-chaperony Aha1 a p23, stejně tak i pro kinázu skupiny Src Lck a glukokortikoidní receptor. Oba dva vazební partneři Hsp90, kináza Lck a GR, ke své vazbě vyžadují správnou strukturu střední domény Hsp90, avšak zároveň každý v jiných místech. Hsp90 tedy zjevně využívá různé mechanismy, zprostředkované jeho M-doménou, k aktivaci jednotlivých druhů svých cílových proteinů. Funkce ostatních co-chaperonů (např. PP5, cyp40, cpr6) nejsou ještě důkladněji prostudovány

4. HSP90 A JEHO INTERAKCE

4.1. Interakce kináz skupiny Src s Hsp90

4.1.1 Role Hsp90 v maturačních procesech SFK

Zpočátku se předpokládalo, že geldanamycin (GA) je zodpovědný za přímou inaktivaci SFK (např. Lck), receptorů steroidních hormonů a dalších. Bylo však zjištěno, že tato interakce je nepřímá přes prostředníka, chaperon Hsp90. Byl testován vliv GA na tři vlastnosti chaperonu Hsp90: zda Lck je spojen s Hsp90, zda je Lck náchylnější

k degradaci v proteazomu a zda nemá takto postižená Lck nějakou zvláštní specifickou aktivitu (Hartson *et al.*, 1996). Ukázalo se, že ke spojení skutečně dochází, ale u nově syntetizovaných molekul Lck již detekováno nebylo. To podpořilo hypotézu, že GA rozrušuje vzájemnou interakci mezi Lck a Hsp90 především již v syntéze *de novo*. Takto vznikající molekuly Lck postrádají zřejmě svou kinázovou aktivitu a jsou citlivé k proteolytické degradaci. Je možné tedy usoudit, že Hsp90 je potřebný pro jejich sbalení a případně i udržení ve správné terciární konformaci. Vzhledem k tomu, že nově syntetizované molekuly kinázy za nepřítomnosti inhibitoru interagují se chaperonem velmi rychle, naskytla se otázka, zda GA brání pouze nasednutí Hsp90 na Lck v prvotní fázi, nebo zda tento komplex rozrušuje i v pozdějších stádiích. Aby se odstínila možnost vlivu jiných inhibičních a aktivačních dějů probíhajících v buňce, byla použita mutace regulačního tyrosinu Y505 za fenylalanin F505 v kináze Lck (Lck^{F505}). Tato mutantní forma je pak stále aktivovaná. Po přidání GA dochází skutečně již u maturované mutantní formy Lck^{F505} k jejímu celkovému rozrušení. Hsp90 je tedy důležitý pro udržování aktivního Lck^{F505}. Vedle Lck bylo i u dalších SFK, kinázy Lyn (obdobu Lck u B-buněk) a c-Src (v transfekovaných fibroblastech) potvrzeno, že přítomnost funkčního Hsp90 je kriticky nutná pro jejich syntézu *de novo* (Biljmarkers *et al.*, 2000). Bez jeho přítomnosti jinak dochází k degradaci kináz do 30-45 minut. Velmi důležitých je prvních 5 minut interakce Hsp90 s nascentním proteinem, neboť po přidání inhibitoru radicicolu až po této době takřka vůbec nedocházelo k degradaci. Překvapilo však, že Hsp90 není potřebný pro stálé udržování funkčnosti přirozené formy kinázy Lck po správné maturaci, což je v rozporu se zjištěním, že mutantní forma Lck^{F505} je při nefunkčnosti chaperonu rychle degradována (Hartson, 1996). Byl tedy porovnán samostatně vliv inhibitorů Hsp90 na přirozenou formu Lck, na mutantní formu Lck^{F505} a též na Lck Δ SH2 (mutantní forma s delecí SH2 domény). Přirozená forma Lck zůstala neporušená, obě dvě mutantní však po přidání inhibitoru velmi rychle vymizely. Z toho lze usoudit, že vzájemná interakce mezi SH2 doménou a regulačním tyrosinem Y505 u Lck zřejmě vyžaduje přítomnost Hsp90 pro udržení stability maturovaného proteinu. Toto zjištění potvrzuje závislost sbalení jednotlivých domén kinázy Lck na přítomnosti či nepřítomnosti chaperonu Hsp90 (Hartson *et al.*, 1998). SH2 doména Lck je na Hsp90 nezávislá a rychle se sbalí, na rozdíl od domény s kinázovou aktivitou. Ta je zřejmě sbalena nesprávně a dochází v případě mutantní formy Lck^{F505} ke ztrátě její kinázové

aktivity. U přirozené formy nebyla ztráta prokázána. Hsp90 je tedy pravděpodobně zodpovědný za správné sbalení kinázové domény a poskytuje proteinu ochranu před degradací.

Podobné závěry byly postulovány i pro SFK Hck, vyskytující se v aktivační dráze receptorů makrofágů (Schulz *et al.*, 2001). Hck se podílí na signální odpovědi po rozeznání bakteriálních lipopolysacharidů, která vede k imunitní reakci. Také zde byl studován vliv geldanamycinu na sbalení *de novo* vznikajícího proteinu a na udržení maturovaných molekul v aktivním stavu. Stále aktivní mutantní forma Hck (záměna v regulačním tyrosinu) byla porovnána s přirozenou formou. Výsledky byly téměř stejné jako u Lck (Bijlmarkers *et al.*, 2000). Nově vznikající, ať již mutantní či přirozená forma Hck, potřebuje Hsp90 ke správnému sbalení do funkční struktury. U maturované kinázy je vůči GA citlivá jen mutantní forma Hck. Hck je tedy další SFK závislá na interakci s Hsp90.

Významnou roli zaujímá Hsp90 i při diferenciaci myoblastů (Yun *et al.*, 2004). Jeho specifická inhibice geldanamycinem působí poruchy diferenciaci, přerušuje expresi myogenu (transkripčního faktoru důležitého pro vývoj myocytů) a formování svalových vláken. Inhibicí Hsp90 jsou zablokovány důležité signální dráhy, přes protein-kinázy ErbB2, Akt a Fyn. Jak již bylo řečeno, kináza Fyn patří též mezi SFK a v myoblastech se podílí především na signálech potřebných k adhezi. Je zodpovědná za vytváření vícejaderných svalových buněk, neurosvalových spojení a regulaci apoptózy, indukované špatnou adhezí buněk na extracelulární matrix. Stejně jak bylo pozorováno u Lck v předešlých studiích (Hartson *et al.*, 1996, Bijlmarkers *et al.*, 2000, Schulz *et al.*, 2001), tak i u kinázy Fyn bylo potvrzeno, že Hsp90 je kriticky důležitý pro nově syntetizované kinázy (po přidání GA došlo k rychlé degradaci). Naopak již maturované proteiny zůstaly inhibicí chaperonu Hsp90 nedotčeny. SFK Fyn je tedy též jedním z Hsp90 dependentních proteinů.

4.1.2 Vliv Hsp90 na připojení SFK do membrány

Nově syntetizovaná Lck se rychle po vzniku přesouvá k membráně a interaguje s koreceptorem CD4. Po přidání inhibitorů chaperonu Hsp90 (GA či RA) však k této vazbě nedochází (Bijlmarkers *et al.*, 2000). Bylo vyloučeno že tyto inhibitory tuto

interakci přímo blokuje. Příčinou může být prvotní špatné zakotvení Lck do membrány, což potvrzuje její menší množství vázané v membráně při neaktivním Hsp90. Pomáhá Hsp90 přímo při transportu k membráně, je pro vazbu nutné správné sbalení proteinu závislé na Hsp90, nebo má Hsp90 vliv na acylaci proteinu v N-terminální doméně SFK? Na všechny tyto otázky se zatím nepodařilo odpovědět. Za tímto účelem byl zkonstruován fúzní protein UD-GFP obsahující N-terminální unikátní doménu (UD) SFK se všemi náležitostmi potřebnými k vazbě do membrány i vazbě s CD4 (acylace, specifické cysteinové sekvence). Tento konstrukt nepotřebuje na rozdíl od kináz skupiny Src ke své stabilní syntéze Hsp90 a nepotřebuje ho ani k vazbě k membráně. UD-GFP byl při pokusu stejně stabilně zapojen v přítomnosti i nepřítomnosti inhibitorů Hsp90, což vylučuje možnost, že Hsp90 reaguje s unikátní doménou Lck a napomáhá jí tím v transportu a vazbě do membrány. Vliv Hsp90 na myristylaci byl také vyloučen; zbývá však ještě objasnit vliv na palmitylaci. Pravděpodobně je tedy funkce Hsp90 nepřímá a vliv na připojení Lck k membráně spočívá asi hlavně ve správném sbalení proteinu.

4.2. Interakce steroidních receptorů se stresovými proteiny

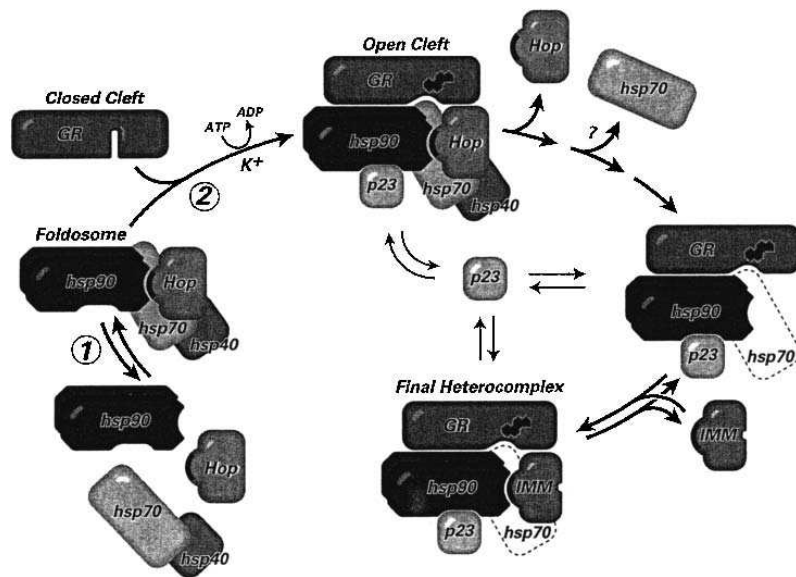
4.2.1 Struktura a funkce steroidních hormonů

Receptory steroidních hormonů jsou druhou velkou skupinou proteinů interagující se stresovými proteiny. Tyto intracelulární proteiny jsou po navázání svého ligandu většinou translokovány přímo do jádra, kde působí jako specifické transkripční faktory. V organismu existuje celá řada steroidních hormonů a k nim příslušejících konkrétních steroidních receptorů. K nejvýznamnějším patří hormony zodpovědné za správný pohlavní vývoj jedince – estrogény, progesterony a androgeny, či hormony účastnící se regulace metabolismu cukrů – glukokortikoidy (GC). Z imunologického hlediska je velmi důležitý výzkum mechanismů výrazných protizánětlivých a imunosupresivních účinků glukokortikoidů. Receptory steroidních hormonů včetně GC sestávají ze čtyř domén: variabilní, aktivační domény na N-konci, specifické pro různé typy receptorů, DNA-vazebné domény (DBD) zodpovědné za vazbu na DNA v jádře a regulaci genu, který má být transkribován, „Hinde“ domény, účastnící se transportu aktivovaného

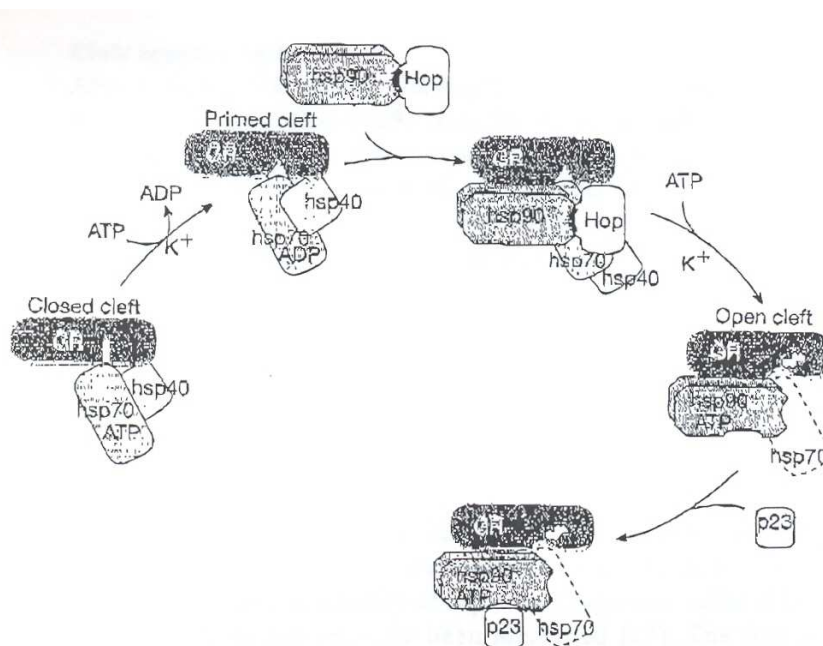
receptoru do jádra a C-koncové ligand-vázací domény (LBD), na kterou se váží krom ligandu také důležité kofaktory nutné pro aktivaci.

4.2.2 Molekulární mechanismy aktivace receptoru pro GC

Aktivace a regulace receptorů steroidních hormonů je celkem dobře prostudována a popsána i na molekulární úrovni především v systémech *in vitro* u receptoru pro glukokortikoidy (GR) (Richter et al. 2001, Pratt et al., 2003,2004). Pro jejich správnou funkci je třeba mnoho kofaktorů, tvořících velké heterokomplexy. Ty indukují konformační změny v receptoru potřebné pro navázání ligandu a následný transport aktivovaného receptoru do jádra. Mezi tyto kofaktory patří hlavně chaperony Hsp40, Hsp70 a Hsp90 a jejich pomocné proteiny Hop, p23, Aha1 a další. Hlavní úloha všech těchto kofaktorů je otevřít na receptoru „štěrbinu“ kam se potom bude moci navázat ligand a tím zahájit dráhu přenosu signálu. Energie uvolněná hydrolýzou ATP je potřebná pro otevření štěrbinu pomocí konformačních mechanismů závislých na chaperonech Hsp70/Hsp90. Poté je štěrbina pomocí Hsp90 udržována otevřená, dokud nedojde k navázání správného ligandu, který GR aktivuje a spustí zmíněný transport receptoru do jádra. Sestavení samotného heterokomplexu je velmi složitý děj. Hlavními hybateli jsou chaperony Hsp70/Hsp90, jejichž aktivita je spojená s konformační změnou, umožňující jim vázat a aktivovat GR. Tato změna je nadále regulována jejich co-chaperony. Mechanismus je zobrazen na obr. 4. Na samotném počátku sestavení heterokomplexu je interakce Hsp40 s Hsp70, čímž se aktivuje ATPázová aktivita na Hsp70. Proces pokračuje interakcí co-chaperonu Hop s Hsp70 i Hsp90 přes *tetratrikopeptidové* (TRP) domény. Vytváří se tak komplex Hsp90-Hop-Hsp70-Hsp40, který je připraven k vazbě k GC receptoru se zavřenou štěrbinou. K jejímu otevření dojde až po změně konformace Hsp90 po navázání a hydrolýze ATP. Následuje stabilizace celého heterokomplexu proteinem p23, jež se váže na Hsp90. Po otevření štěrbinu dochází k disociaci proteinu Hop a pravděpodobně i většiny Hsp70. TRP akceptorové místo se uvolní a je připravené navázat další substrát. Jiný pokus s cílem objasnit podrobněji mechanismus otevření štěrbinu však ukázal, že se tak děje v trochu jiném pořadí (obr. 5).



Obr. 4 – Mechanismus sestavení komplexu chaperonů kolem GR a jeho aktivace. Na počátku se sestaví heterokomplex Hsp90-Hsp70-Hop-Hsp40 (1), ten poté interaguje s neaktivním GR, který má uzavřené vazebné místo pro ligand („štěrbinu“). (2). Hydrolyzáta ATP za přítomnosti K^+ iontů umožní spojení receptoru s komplexem a konformační změnou se místo pro vazbu ligandu otevře. Co-chaperon p23 se váže na Hsp90, čímž ho stabilizuje. Z tohoto heterokomplexu se pak uvolní Hop a z větší části i Hsp70. Komplex GR-Hsp90-p23 je pak schopný vázat immunophilin (IMM), odpovědný za translokaci celého komplexu do jádra. Převzato z *Prat et al., 2003*.



Obr. 5 – Mechanismus otevření „štěrbiny“ v GR. Na počátku dochází k sestavení komplexu GR-Hsp70-Hsp40. Hydrolyzou ATP se mění konformace Hsp70 a štěrbina na GR se pootevře. Tato změna umožní navázání komplexu chaperonu Hsp90-Hop na GR. Další hydrolyzou, tentokrát na Hsp90 se štěrbina otevře a co-chaperon Hop a z větší částí i Hsp70 se z komplexu uvolní. Protein p23 se poté váže na Hsp90, čímž ho stabilizuje. Převzato z *Pratt et al., 2004*.

Po aktivaci Hsp70 a interakci s Hsp40 tento komplex asociuje s GR a díky hydrolýze ATP dochází k „pootevření“ štěrby. Toto „pootevření“ umožní navázání chaperonu Hsp90 a Hop ke komplexu Hsp40-Hsp70-GR. K úplnému otevření štěrby či zpřístupnění vazebného místa pro steroidní hormon (ligand) dochází až aktivací Hsp90 hydrolýzou ATP. Výsledkem je konformační změna v rámci komplexu a uvolnění chaperonu Hop a z větší části i Hsp70. Celý zbylý komplex je poté ještě stabilizován vazbou p23 k Hsp90. Je třeba však poznamenat, že oba dva mechanismy byly zjednodušeně studovány na modelu *in vitro*. *In vivo* na celý tento systém různě působí mnoho dalších vlivů, kofaktorů a co-chaperonů jako např. Aha1, Hip, BAG-1.

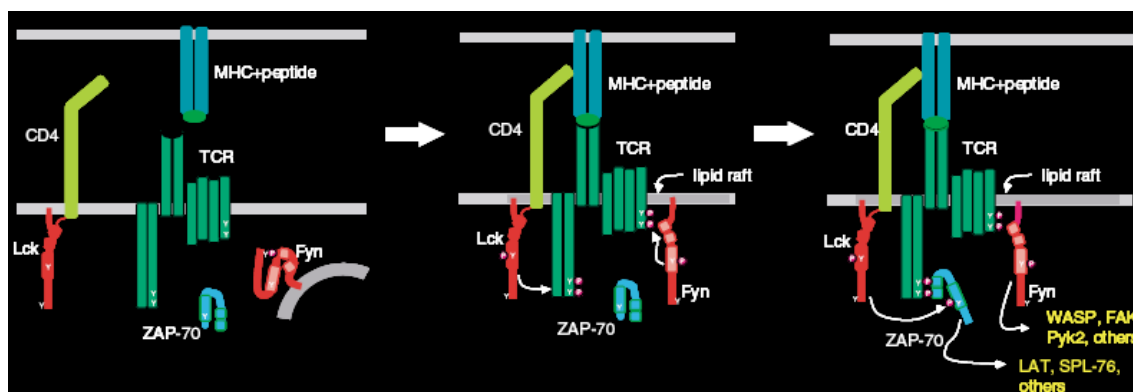
4.2.3 Translokace receptoru do jádra.

Po samotné aktivaci steroidního receptoru (GR) navázáním ligandu, dostává celý tento komplex signál k translokaci do jádra. Tam reguluje různé transkripční faktory. Míra regulace závisí na změnách hladiny hormonů navázaných na receptor. Sledován byl i vliv inhibitoru chaperonu Hsp90 geldanamycinu na kinetiku translokace GR (*Pratt et al., 1999*). Ze zjištění, že receptor s neinhibovaným Hsp90 se přesouvá velmi rychle, na rozdíl od toho inhibovaného, se usoudilo na přímou souvislost chaperonu Hsp90 s touto drahou. Rychlost s jakou se receptor v případě neinhibovaného Hsp90 pohyboval navíc naznačila, že se pohybuje po cytoskeletu, zatímco v případě Hsp90 inhibovaného se pohybuje pomalu, zřejmě difúzně. Pohyb GR do jádra je zprostředkován motorovým proteinem *dyneinem*, jehož hlavní buněčná funkce spočívá v retrográdním transportu různých váčků a organel po mikrotubulech směrem k jádru. Vazbu dyneinu s GR zajišťuje chaperon Hsp90. Děje se tak prostřednictvím tzv. *immunophilinů* (IMM), konkrétněji prostřednictvím protein-proteinové interakce s jejich peptidylprolyl izomerázovou doménou. IMM obsahuje totiž TPR doménu, která se specificky váže na příslušné akceptorové místo na Hsp90, kde se při otevírání „štěrby“ uvolnil co-chaperon Hop. Mezi takto interagující IMM patří Cyp40, PP5, FKBP51 a FKBP52.

5. VLIV HSP90 NA AKTIVACI T-LYMFOCYTŮ PŘES TCR

5.1. TCR signalizace

Kinázy Lck a Fyn jsou klasické tyrosin-kinázy skupiny Src, podílející se na prvotní fázi aktivace T-receptoru (TCR) u T-lymfocytů (obr. 6). To je velmi složitý proces, při kterém se spouští dlouhá kaskáda dějů, vedoucí až k aktivaci příslušných transkripčních faktorů v jádře buňky (Zamayoska *et al.*, 2003, Palacios *et al.*, 2004). Je iniciován interakcí MHC glykoproteinu na antigen prezentující buňce s TCR/CD3 komplexem na povrchu T buněk. Kináza Lck nekovalentně spojená s transmembránovými koreceptory CD8 či CD4 se přiblíží k TCR, koreceptory se spojí s MHC a aktivní kináza Lck je schopná fosforylovat specifické tzv. ITAM motivy (*immunoreceptor tyrosine-based activation motif*) na ξ -řetězci TCR/CD3 komplexu. Takto fosforylované motivy přitáhnou kinázu skupiny Syk ZAP-70, která je pak též fosforylována kinázou Lck. Kináza ZAP-70 je tím aktivována a spustí signální kaskády vedoucí k tvorbě příslušných transkripčních faktorů. Celý tento děj je regulován prostřednictvím mnoha faktorů na téměř všech úrovních. A právě na té prvotní úrovni aktivace a funkčnosti SFK, které jsou vlastně iniciační jiskrou celé signální kaskády, se podílí Hsp90.



Obr. 6 – Schéma aktivace TCR komplexu. Po rozeznání antigenu na MHCgp TCR komplexem dochází k vazbě koreceptoru CD4 asociovaného s Lck k MHCgp. SFK Lck fosforyluje ITAM motivy na ξ -řetězci TCR/CD3 komplexu. Takto fosforylované motivy umožní vazbu tandemových SH2 domén kinázy skupiny Syk ZAP-70, která je následně fosforylována kinázou Lck. Tím je aktivována a může fosforylovat další substráty. SFK Fyn je přítomna v lipidických raftech a po aktivačním signálu se translokuje k TCR komplexu. Kináza Lck a TCR komplex se do raftů přesouvají patrně až po aktivaci přes MHCgp. Převzato z Palacios *et al.*, 2004.

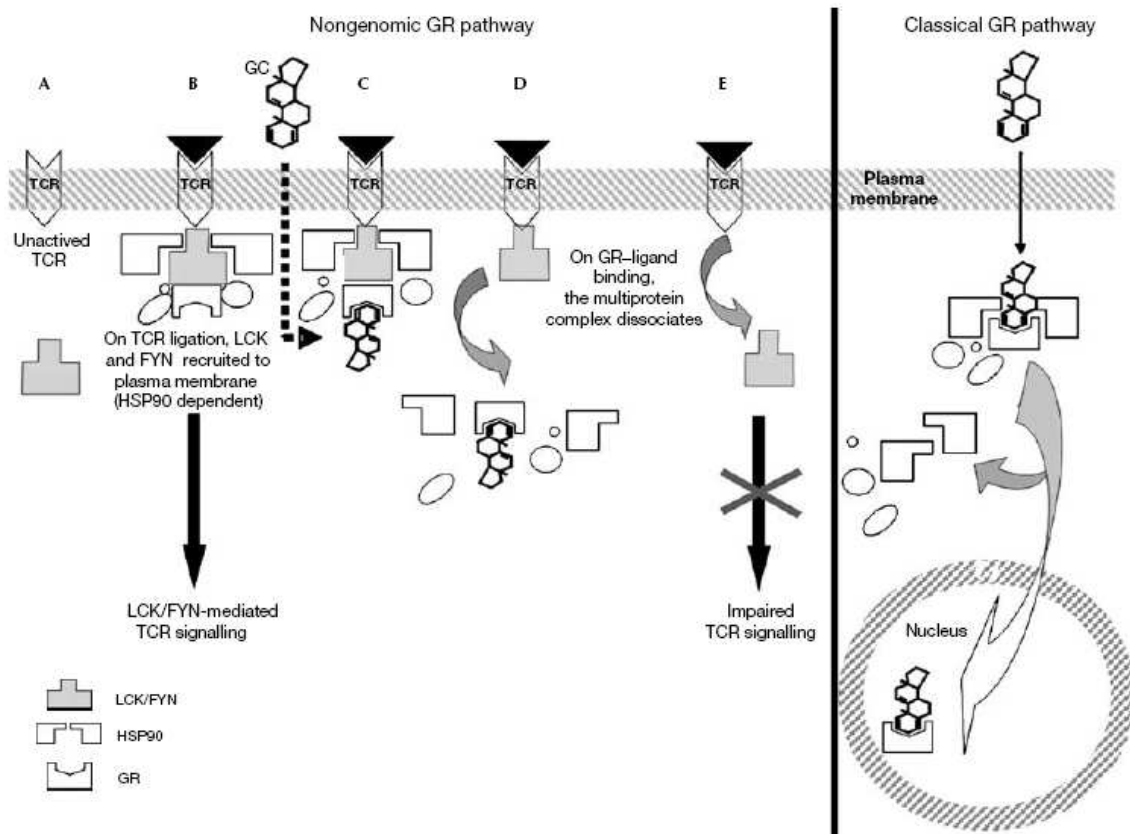
5.2. Vliv Hsp90 na degradaci SFK v T-lymfocytech

Aktivita SFK, zvláště pak Lck, je kriticky důležitá pro regulaci a správný vývoj T-buněk. Přílišná aktivita SFK může vést k nekontrolovanému buněčnému dělení a k nádorovým onemocněním. Krom klasických regulačních prostředků SFK jako je fosforylace a defosforylace regulačních tyrosinových zbytků (Csk/CD45) (*Mustelin et al., 2003*) se objevila možná souvislost mezi funkcí Hsp90 a ubikvitinylací (degradací). U stále aktivní mutantní formy Lck^{F505} dochází inhibicí chaperonu Hsp90 k její degradaci. Zároveň však geldanamycin nemá vliv na aktivitu přirozené formy Lck. Působí však její postupnou degradaci, která se v nestimulovaných buňkách či v buňkách s funkčním Hsp90 neobjevuje (*Giannini et al., 2004*). Inhibicí proteazomu epoxomycinem je většina Lck ušetřena degradace. Hsp90 v určité míře chrání aktivní kinázu před degradací. Lze tedy usoudit, že aktivní Lck je stabilizována Hsp90 a zároveň ubikvitinylována. Celková aktivita Lck je pak závislá na poměru těchto dvou procesů. Zda nějaké konkrétní mechanismy přímo ovlivňují zvýšenou míru degradace či Hsp90 monitoringu se zatím nepodařilo prokázat. Degradaci zřejmě ovlivňuje zrušení inhibiční intramolekulární interakce s SH2 či SH3 doménou, nezávisí však zároveň na aktivitě kinázové domény (fosforylaci aktivačního Y394 u Lck). Tuto hypotézu podporuje fakt, že použitím inhibitoru PP2, který se specificky váže do ATP vazebného místa na kinázové doméně v Lck, dochází k inaktivaci kinázy, interakce Hsp90-Lck se rozruší a takto nefunkční Lck není degradována, nýbrž naopak stabilizována (*Giannini et al., 2004*). Míra degradace je tedy závislá na aktivitě Lck a tedy i na konformačním uspořádání kinázové domény, jejíž správné sbalení do terciární struktury zřejmě zajišťuje chaperon Hsp90 (*Hartson et al., 1998*). Bylo též prokázáno, že GA je toxický a má vliv na aktivaci, proliferaci a diferenciaci T-buněk *in vivo* (*Yorgin et al., 2000*). Nejvíce je to patrné u rychle se dělících buněk, kde se přidáním GA dělení zastavuje. Příčinou tohoto zastavení je nefunkčnost chaperonu Hsp90, který ovlivňuje složky signálních drah vedoucích k regulaci proliferace. Jedná se zejména o PTK kaskádu, kde GA blokuje nově syntetizované SFK Lck a Fyn. Klidové, neaktivní T-buňky nejsou přítomností téměř vůbec ovlivněny. To dává v budoucnu možnost využít inhibitorů Hsp90 k případné terapii některých leukemií a lymfomů.

5.3. Non-genomický efekt glukokortikoidů

Genomický efekt cytosolického glukokortikoidního receptoru (GR) je v současnosti podrobně prozkoumán. Po aktivaci je GR translokován do jádra, kde se váže na specifické DNA motivy a transkripční faktory (např. AP1 a NFκB), čímž reguluje řadu mechanismů hlavně v imunitních procesech. Je zodpovědný především za inhibici tvorby prozánětlivých cytokinů (IL1, IL2, TNFα, IFNγ), prostaglandinů či NO. Krom této relativně pomalé odpovědi (v rádech hodin a dnů) existuje dosud ne příliš objasněná velmi rychlá imunosuprese, projevující se již během několika málo minut od aplikace GC (Löwenberg *et al.*, 2005). Ke zkoumání podstaty průběhu tohoto „non-genomického“ děje bylo využito dexamethasonu (DEX), syntetického analogu glukokortikoidů. Jelikož však nebyla známa podstata této rychlé imunosuprese a jaké proteiny jsou ovlivňovány, byl prozkoumán vliv DEX na všechny kinázy a jejich substráty v CD4⁺ T-buňkách pomocí tzv. kinomového arraye. Výsledkem bylo zjištění, že fosforylace substrátů SFK Lck a Fyn byla značně redukována. Dexamethason má tedy přímý vliv na aktivaci signálních procesů spouštěných přes TCR a kinázy Lck a Fyn. Přítomnost analogu GC v T-buňkách velmi rychle inhibuje TCR signalizaci. Tato skutečnost vedla k myšlence, že i Hsp90, který je potřeba jak pro maturaci SFK, tak pro aktivaci GR receptoru, se nějakým způsobem účastní této inhibice prostřednictvím GC. Asociace kináz Lck a Fyn s koreceptory CD4/CD8, respektive s CD3, a následná lokalizace těchto komplexů je mimořádně důležitá pro správnou TCR signalizaci. Potlačení exprese Hsp90 pomocí siRNA (malá interferující dsRNA specificky umlčující expresi chaperonu Hsp90) a přidání dexamethasonu vedly k tomu, že tyto asociace byly redukovány. Bylo též pozorováno, že molekuly CD4 i CD3 jsou v aktivovaných T-buňkách asociovány s GR. Po přidání Hsp90siRNA či dexamethasonu však tyto komplexy byly rozrušeny. Použití geldanamycinu a dexamethasonu vedlo k rozvolnění vazeb GR i s kinázami Lck i Fyn. Tyto skutečnosti vedou k závěru, že v aktivovaných T-buňkách Hsp90, SFK i GR bez navázaného ligandu tvoří jeden velký multiproteinový komplex, který je asociovaný s TCR (obr. 7) (Löwenberg *et al.*, 2006). Tento komplex je však zároveň velmi závislý na přítomnosti chaperonu Hsp90. Inhibice jeho syntézy pomocí Hsp90siRNA stejně jako vazba dexamethasonu (GC) na GR se podílí na rozrušení tohoto multikomplexu. T-buněčná signalizace je tedy přerušena. Podrobnější molekulární mechanismy rozpadu komplexu nejsou zatím známy, předpokládá se však,

že dexamethason má spíše vliv na formování komplexu SFK-Hsp90, nežli na přímé rozrušení celého proteinového komplexu kolem TCR. Stejně tak není dosud zřejmé, co vede buňku k tomu, aby spustila genomickou nebo non-genomickou imunosupresi.



Obr. 7 – Model non-genomické imunosuprese indukované GC v T-buňkách. A) neaktivní TCR receptor; B) po aktivním signálu se zformuje komplex TCR-Hsp90-Lck-Fyn-GR, bez navázaného ligandu na GR je aktivní a pokračuje signalizace. C,D) Navázáním ligandu, GC na GR (C) dochází k rozrušení komplexu (D) a přerušení signalizace (E). Na obrázku vpravo je znázorněna klasická „genomická“ cesta aktivace GR, navázáním ligandu na GR se iniciuje translokace GR do jádra, kde ovlivňuje expresi imunosupresivních látek; TCR (T-buněčný receptor, GC - glukokortikoid), GR- glukokortikoidní receptor, Hsp90 – Heat shock protein 90, LCK/FYN – tyrosin kinázy skupiny Src. Převzato z Löwenberg *et al.*, 2006.

6. ZÁVĚR

Stresové proteiny, kinázy skupiny Src a steroidní receptory se účastní mechanismů signální transdukce a ovlivňují tak řadu vlastností a funkcí buňky. Jednou z hlavních funkcí stresových proteinů, zvaných též proteiny tepelného šoku, je napomáhat ve

správném sbalení a udržování stálé konformace jejich cílových substrátů, tedy funkce „chaperonová“. Takovýmto proteinem zodpovědným za mnoho různých buněčných interakcí je chaperon Hsp90. V dosavadních výzkumech se ukázalo, že je přímým účastníkem procesu maturace a aktivace steroidních receptorů i SFK. Správná funkce Hsp90 je pro oba děje až kriticky důležitá. Ačkoli bylo provedeno mnoho pokusů, které objasnily řadu jeho účinků, zůstává přesto několik nezodpovězených otázek. Především není přesně známa molekulární podstata tvorby různých heterokomplexů Hsp90 s co-chaperony a jejich regulační význam. U glukokortikoidních receptorů, kde byl nedávno objasněn jejich non-genomický efekt, je potřeba prozkoumat podrobněji interakce TCR s komplexem Hsp90, GR a SFK Lck a Fyn. Lze doufat, že v budoucnu bude možné využít zjištěných poznatků k léčbě autoimunitních nemocí či některých typů nádorových onemocnění, jelikož Hsp90 ovlivňuje právě klíčové signální dráhy regulující buněčnou proliferaci a diferenciaci.

7. SEZNAM ZKRATEK

ATP	adenosintrifosfát
CD4 / CD8	koreceptory MHC
DEX	dexamethason
DNA	deoxyribonukleová kyselina
GA	geldanamycin
GC	glukokortikoidy
GR	receptor pro glukokortikoidy
Hsp90	heat shock protein 90
IMM	immunophilin
ITAM	immunoreceptor tyrosine-based activation motif
kDa	kilodalton
MHC	major histocompatibility complex
PTK	protein tyrosin-kináza
RA	radicicol
SFK	kináza skupiny Src
SH2	Src homology 2 domain
siRNA	krátká interferující RNA
TCR	receptor T-lymfocytů
TRP	tetratrikopeptidová repetice

8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Bijlmakers MJ, Marsh M. Hsp90 is essential for the synthesis and subsequent membrane association, but not the maintenance, of the Src-kinase p56(lck). *Mol Biol Cell* 2000;11:1585–1595

Franchimont D. Overview of the actions of glucocorticoids on the immune response: a good model to characterize new pathways of immunosuppression for new treatment strategies. *Ann NY Acad Sci* 2004;1024:124–137.

Giannini A, Bijlmakers MJ. Regulation of the Src family kinase Lck by Hsp90 and ubiquitination. *Mol Cell Biol*. 2004;13:5667-76.

Hartson SD, Barrett DJ, Burn P, Matts RL. Hsp90-mediated folding of the lymphoid cell kinase p56lck. *Biochemistry* 1996;35:13451–13459.

Hartson SD, Ottinger EA, Huang W, Barany, Burn P, Matts RL. Modular folding and evidence for phosphorylation-induced stabilization of an hsp90-dependent kinase. *J. Biol. Chem.* 1998;273:8475.

Hawle P, Siepmann M, Harst A, Siderius M, Reusch HP, Obermann WM. The middle domain of Hsp90 acts as a discriminator between different types of client proteins. *Mol Cell Biol*. 2006;22:8385-95

Koga F, Xu W, Karpova TS, McNally JG, Baron R, Neckers L. Hsp90 inhibition transiently activates Src kinase and promotes Src-dependent Akt and Erk activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103:11318-22.

Lowenberg M, Tuynman J, Bilderbeek J, Gaber T, Buttgerit F, van Deventer S, Peppelenbosch M, Hommes D. Rapid immunosuppressive effects of glucocorticoids mediated through Lck and Fyn. *Blood* 2005;106: 1703–1710.

Lowenberg M, Verhaar AP, Bilderbeek J, Marle J, Buttgerit F, Peppelenbosch MP, van Deventer SJ, Hommes DW. Glucocorticoids cause rapid dissociation of a T-cell-receptor-associated protein complex containing LCK and FYN. *EMBO Rep*. 2006; 10:1023-9.

Lowenberg M, Verhaar AP, van den Brink GR, Hommes DW. Glucocorticoid signaling: a nongenomic mechanism for T-cell immunosuppression. *Trends Mol Med*. 2007;13:158-63.

Lotz GP, Lin H, Harst A, Obermann WMJ. Aha1 binds to the middle domain of Hsp90, contributes to client protein activation and stimulates the ATPase activity of the molecular chaperone. *J. Biol. Chem.* 2003;278:17228–17235.

Mustelin T, Tasken K. Positive and negative regulation of T-cell activation through kinases and phosphatases. *Biochem J*. 2003;371:15-27. Review

- Palacios EH, Weiss A. Function of the Src-family kinases, Lck and Fyn, in T-cell development and activation. *Oncogene* 2004;23: 7990–8000.
- Pearl LH, Prodromou C. Structure and in vivo function of Hsp90. *Curr Opin Struct Biol.* 2000;10:46-51. Review
- Pearl LH, Prodromou C. Structure and Mechanism of the Hsp90 Molecular Chaperone Machinery *Annu Rev Biochem.* 2006;75:271–94.
- Picard D. Heat-shock protein 90, a chaperone for folding and regulation. *Cell Mol Life Sci.* 2002;59:1640-8. Review
- Pratt WB, Toft DO. Regulation of signaling protein function and trafficking by the hsp90/hsp70-based chaperone machinery. *Exp Biol Med.* 2003;228:111–133.
- Pratt WB, Galigniana MD, Morishima Y, Murphy PJ. Role of molecular chaperones in steroid receptor action. *Essays Biochem* 2004;40: 41–58.
- Pratt WB, Silverstein AM, Galigniana MD. A model for the cytoplasmic trafficking of signalling proteins involving the hsp90-binding immunophilins and p50cdc37. *Cell Signal.* 1999;11:839-51. Review.
- Richter K, Buchner J. Hsp90: chaperoning signal transduction. *J Cell Physiol.* 2001;188:281-90.
- Roe SM, Prodromou C, O'Brien R, Ladbury JE, Piper PW, Pearl LH. Structural basis for inhibition of the Hsp90 molecular chaperone by the antitumor antibiotics radicicol and geldanamycin. *J Med Chem.* 1999;42:260-6.
- Roe SM, Ali MM, Meyer P, Vaughan CK, Panaretou B, Piper PW, Prodromou C, Pearl LH. The mechanism of Hsp90 regulation by the protein kinase-specific cochaperone p50cdc37. *Cell* 2004;116:87–98.
- Scholz GM, Hartson SD, Cartledge K, Volk L, Matts RL, Dunn AR. The molecular chaperone Hsp90 is required for signal transduction by wild-type Hck and maintenance of its constitutively active counterpart. *Cell Growth Differ.* 2001;12:409-17.
- Scroggins BT, Prince T, Shao J, Uma S, Huang W, Guo Y, Yun BG, Hedman K, Matts RL, Hartson SD. High affinity binding of Hsp90 is triggered by multiple discrete segments of its kinase clients. *Biochemistry.* 2003;42:12550-61
- Yorgin PD, Hartson SD, Fella AM, Scroggins BT, Huang W, Katsanis E, Couchman JM, Matts RL, Whitesell L. Effects of geldanamycin, a heat-shock protein 90-binding agent, on T cell function and T cell nonreceptor protein tyrosine kinases. *J Immunol.* 2000;164: 2915-23.

Young JC, Moarefi I, Hartl FU. Hsp90: a specialized but essential protein-folding tool. *J Cell Biol.* 2001;154:267–273

Yun BG, Matts RL. Differential effects of Hsp90 inhibition on protein kinases regulating signal transduction pathways required for myoblast differentiation. *Exp Cell Res.* 2005;307:212-23.

Zamoyska R, Basson A, Filby A, Legname G, Lovatt M, Seddon B The influence of the Src-family kinases, Lck and Fyn, on T cell differentiation, survival and activation. *Immunol Rev* 2003;191:107–118