

MECCANISMI di RISPOSTA allo STRESS CELLULARE

Allo stress la cellula reagisce:

attivando sistemi di smaltimento dei radicali liberi

sintesi di nuove classi di proteine:

proteine da stress!!

Heath Shock Protein

Meno del 2% in condizioni fisiologiche

Fino al 20% in condizioni patologiche

Bignami della risposta cellulare allo stress

1962

- Ferruccio Ritossa scopre un pattern di amplificazione nei cromosomi di *Drosophila* (ghiandole salivari) mai visto prima, mentre altri “puffs” sono scomparsi. Esperimento sbagliato? No Per sbaglio l’incubatore è rimasto con una temperatura più elevata

1974

- Alfred Tissières ‘riscopre’ questi risultati e li conferma con dati sperimentali completi Dimostrando che c’è nuova sintesi proteica indotta dallo shock termico

1982

- Sono clonati diversi geni che vengono trascritti o di cui aumenta la trascrizione dopo shock termico

1985

- Alfred Goldberg scopre che anche nei procarioti è presente questo sistema

1986

- Richard Voellmy scopre come viene attivata la sintesi di queste proteine

1988

- Sambrook and Gething identificano nel reticolo endoplasmatico un meccanismo mediato da Queste proteine: Unfolded Protein Response (UPR)

- Vengono delucidate strutture, meccanismi, funzioni e correlazione con patologie

Chi sono le Heat Shock Proteins

- Heat shock proteins (HSPs), chiamate anche *stress proteins*, sono un gruppo di proteine che sono presenti in tutte le cellule nei diversi organismi
- Up-regolate in seguito a stress cellulare, le HSPs sostengono la “resistenza” cellulare allo stress:
 - a. riparando le proteine danneggiate (Protein refolding) o
 - b. mediando la loro degradazione,in ogni caso ripristinando l'omeostasi proteica e promuovendo così la sopravvivenza cellulare.
- Quando non è possibile recuperare il corretto folding della proteina, le HSPs ne prevengono l'aggregazione e ne regolano la degradazione
- Many of these "stress proteins" are common to a variety of stresses while others are uniquely induced by a specific stress.
- Some are localized to specific organelles and many family members have counterparts, referred to as heat shock cognates (HSCs) that are expressed under normal, non-stress conditions.

- In base al loro peso molecolare, struttura e funzione sono raggruppate in distinte famiglie.

Hsp100	Protein disaggregation, thermotolerance
Hsp90	Regulatory interactions with signaling proteins, stabilization of misfolded proteins
Hsp70	Protein folding, membrane transport of proteins
Hsp60	Protein folding (limited substrates in eukaryotic cytoplasm)
Hsp40	Protein folding, co-chaperone for Hsp70
Small Hsp	Stabilization of misfolded proteins, thermotolerance, eye lens structural proteins

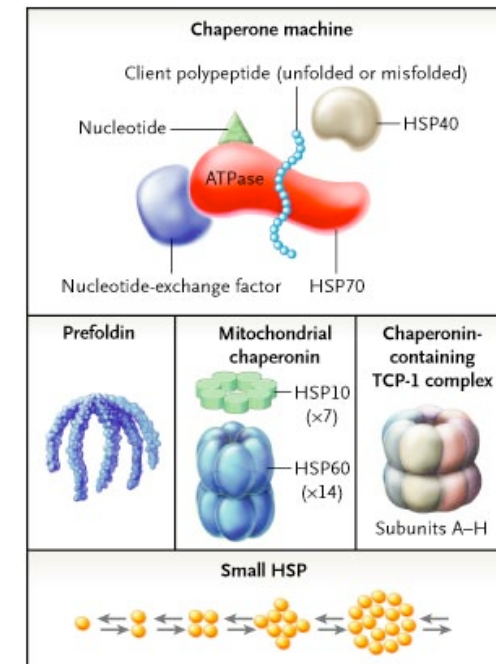
Si distinguono inoltre per:

diversa localizzazione

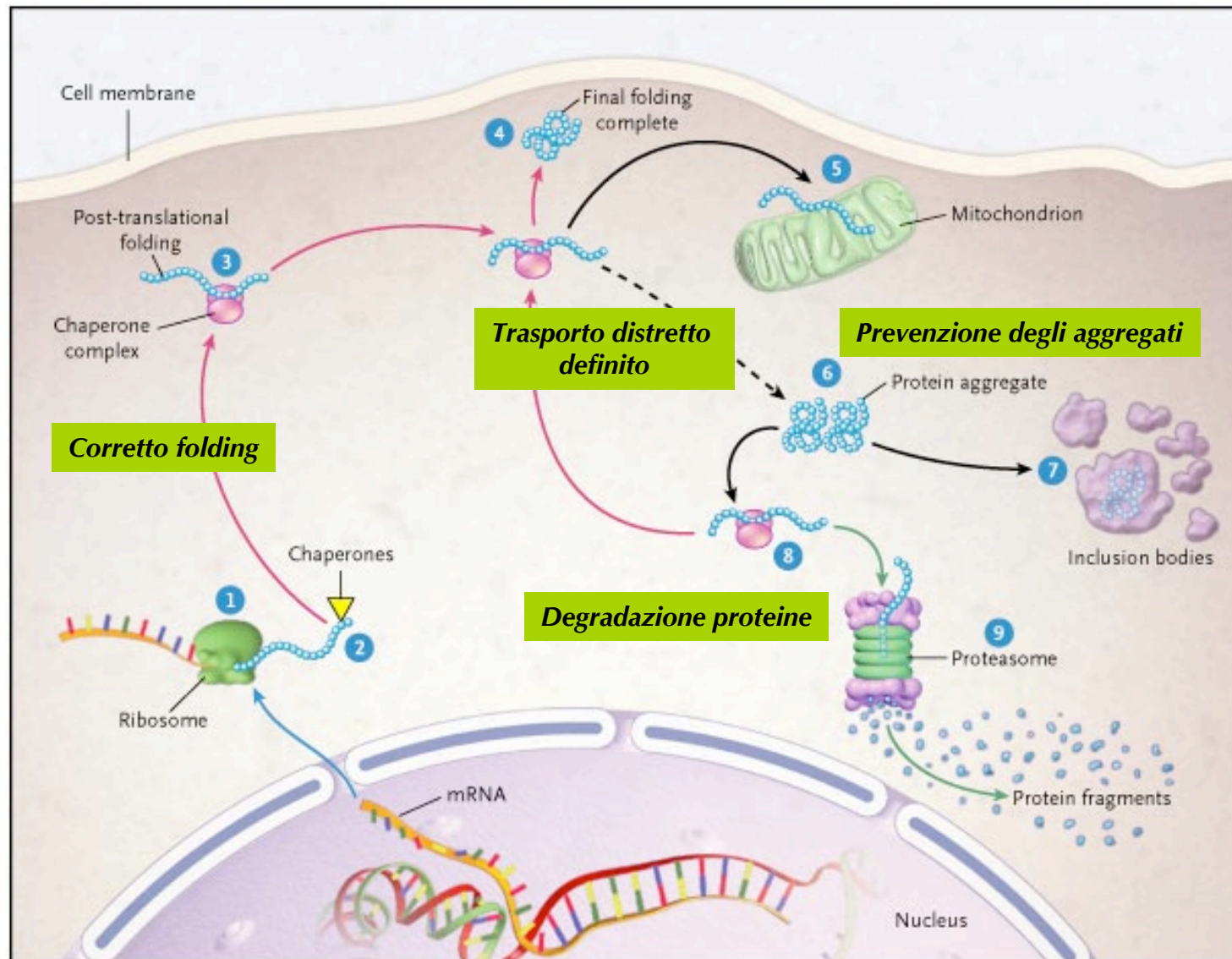
diversa struttura

diversa funzionalità (ATP dipendente)

necessità di co-chaperonine per funzionare



Cellular roles of HSPs



Altre funzioni delle HSPs

- Unica classe di proteine evoluta per prevenire l'instabilità delle proteine indotta da stress e agire come difesa contro le proteine danneggiate
- Molte HSPs hanno attività di chaperone: cioè accompagnano le proteine neo-sintetizzate nei distretti cellulari dove devono svolgere la loro funzione..
- Possono inoltre “spostare” proteine da un compartimento all'altro e “spingere” proteine “consunte” verso i “garbage disposals” della cellula, cioè verso i lisosomi ed il proteasoma e quindi compartimento di MHC I
- HSPs sono fondamentali nella presentazione antigenica, HSP-peptide è infatti una maniera di produrre il repertoire peptidico necessario per la presentazione antigenica da parte delle APCs
- Inoltre il rilascio dei complessi HSP-peptidi da parte della cellula è un segnale di attivazione per le cellule presentanti l'antigene

Come vengono prodotte le HSP in relazione allo stress?

- Esistono le HSCs cioè la versione “costitutiva” delle HSPs
- Lo stress cellulare determina l’attivazione di fattori di trascrizione Heat Shock Factor (HSF) che legano in maniera specifica il promotore delle HSPs (Heat shock responsive element HSE) e ne modulano quindi la espressione

Regulation of the stress response: **HSF**

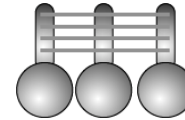
Inactive heat shock transcription factor (HSF) monomer



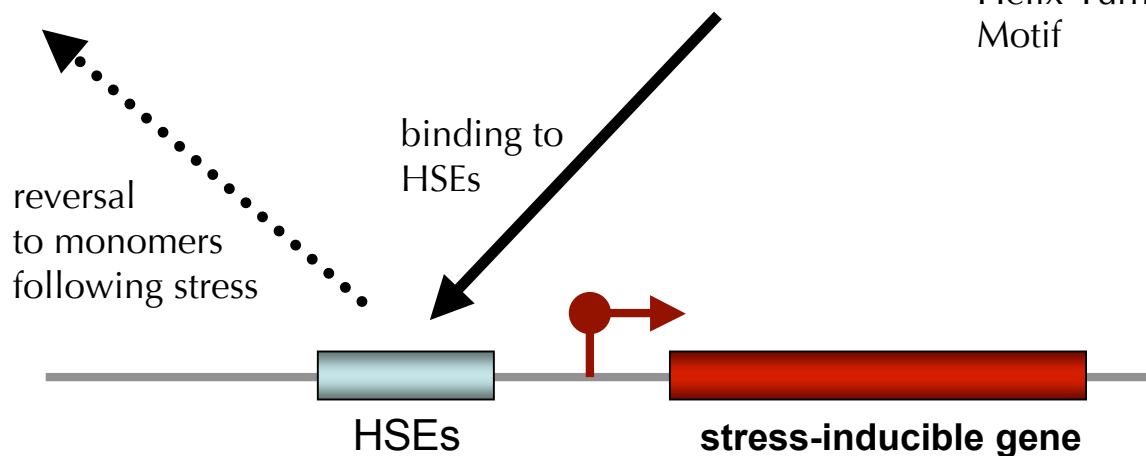
cellular stress



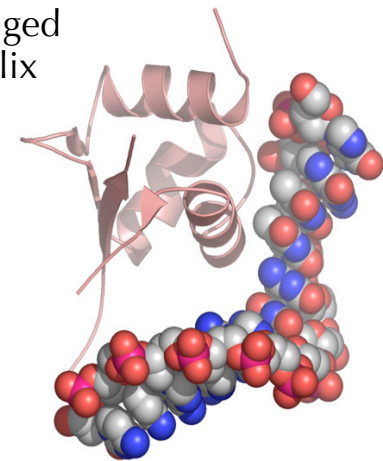
trimerization *via*
leucine zippers



Active trimer



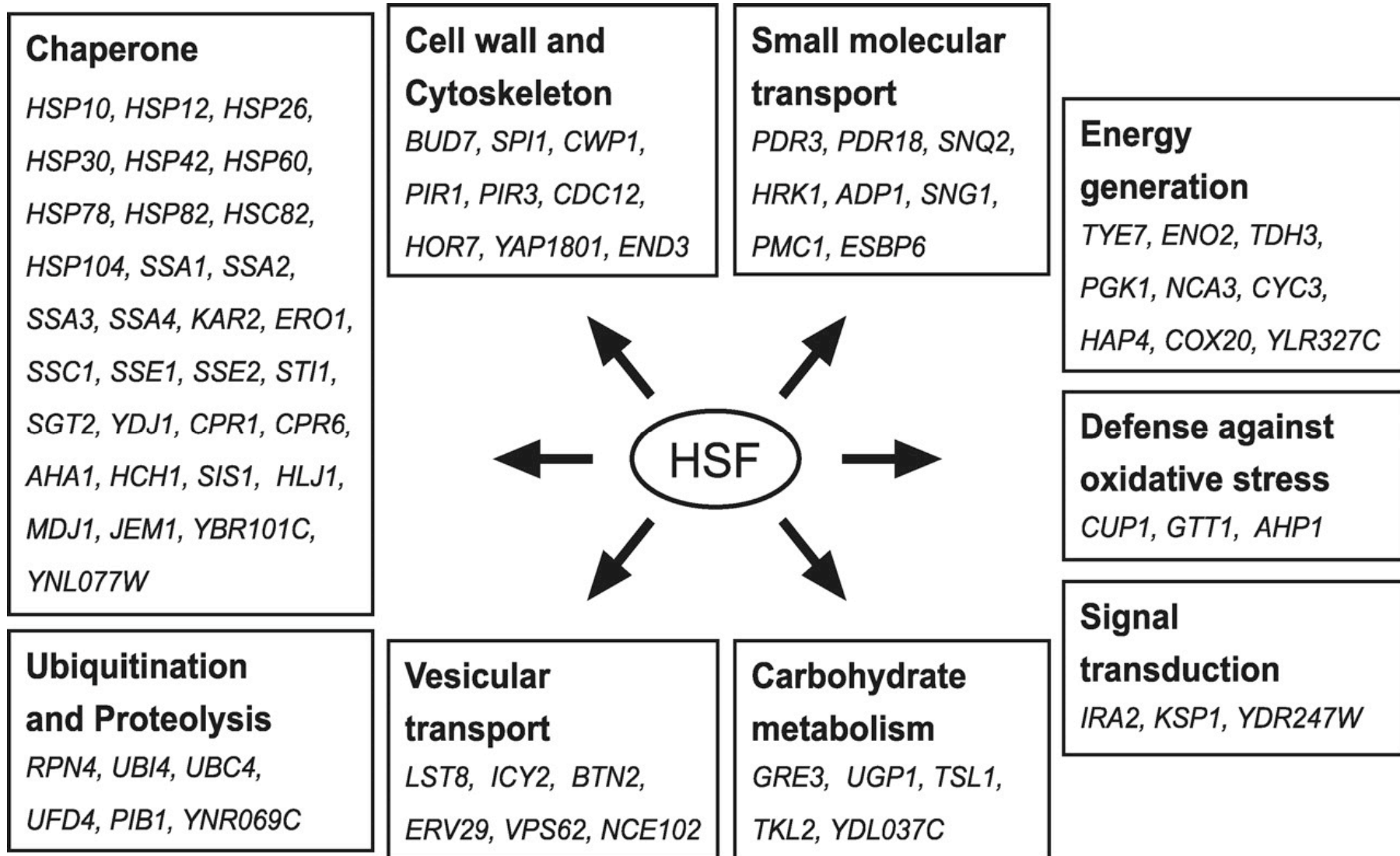
HSF has a Winged Helix-Turn-Helix Motif



- ❖ activation of transcription by HSF requires phosphorylation
- ❖ monomer-trimer transition, and activity while bound to DNA is regulated by molecular chaperones

HSF DNA binding domain (monomer) in complex with HSE sequence

HSF activated genes



Hahn et al., 2004

Quale ruolo nelle patologie?

Dipende dalla loro funzione

Coinvolte nei processi di senescenza cellulare

Mutazioni rendono le cellule suscettibili ad alterazioni
(causa di malattia)

Conferiscono “resistenza” alle cellule tumorali

Sono un segnale di pericolo/attivazione per il sistema immunitario

HSF e HSPs nell'invecchiamento

Nel ratto: Dimostrato che le cellule con la vecchiaia producono meno HSF1 e quindi meno HSP70

In Drosophila: Dimostrato che l'overespressione di HSP22 (mitocondriale) aumenta la longevità

Meccanismo Ipotizzato:

Overexpression di HSPs nei mitocondri comporta:
diminuzione dei radicali liberi
incremento della funzionalità mitocondriale.

Small HSPs

Gruppo eterogeneo, divergente rispetto alle altre HSPs

Dominio α -cristallina

Dimeri

Funzione: riducono la aggregazione proteica, interazione con i filamenti intermedi

Espressione: tessuto muscolare, nervoso, ottico

Patologie:

Cataratta

Miopia desminica dipendente

Disturbi neurologici

Danno da ri-perfusione

Malattie neurodegenerative: quando le sHSPs non prevengono l'aggregazione delle proteine

- La formazione di aggregati proteici è coinvolta nella patogenesi di malattie neurodegenerative.
- β -amyloide, tau e gli aggregati di poliglutamina sono ridotti dall'espressione di sHSPs.
- Switching di produzione di sHSP diverse o riduzione di HSPs nel fisiologico vs patologico
- Anche HSF1 è coinvolto nella regolazione di questi fenomeni. Infatti l' overespressione di HSPs riduce la formazione dell'aggregato (*C. elegans*)

(Hsu et al., 2003).

HSPs e cataratta

- Proteine α A-cristallina e α B-cristallina
- Fondamentali per la corretta organizzazione delle proteine del cristallino
- Meccanismi di patogenesi:
 - Glicazione delle α A/ α B-cristallina
 - Deaminazione: alterazione struttura terziaria
 - Ossidazione: cross-linking

Mutazioni: Cataratta congenita (autosomico dominante)

R116C

R49C

sHSPs e miopatie

α B-cristallina è particolarmente espressa nel tessuto muscolare scheletrico e cardiaco
Ha funzione chaperon della desmina

Mutazioni puntiformi/delezioni α B-cristallina



HSP perde attività di chaperon e desmina non si organizza

Mutazione R120G nella proteina α B-cristallina $\Rightarrow$ miopatia correlata con la desmina (DRM)

sHSPs e danno da riperfusione/ischemia

Nelle miofibrille cardiache:

α B-cristallina, HspB2, Hsp25, Hsp20, cv Hsp

Localizzazione citoplasmatica:

in seguito a danno ischemico migrano alle miofibrille
e si dispongono sulla zona Z/I e sui dischi intercalari.

Protezione dei sarcomeri

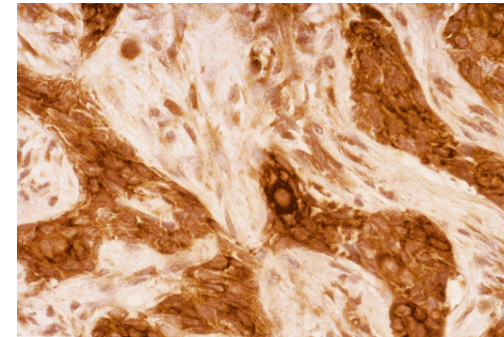
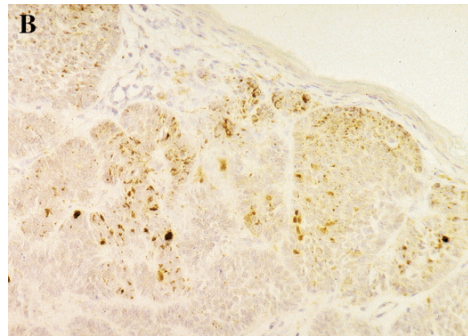
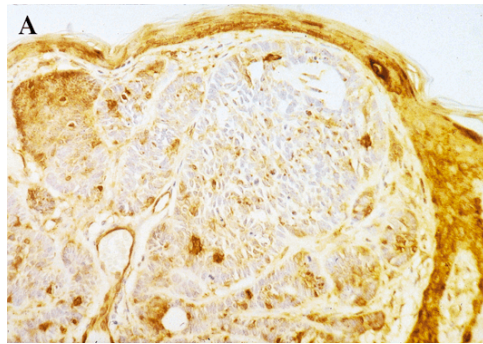
HSPs e risposta immune

- La presenza di HSPs è un segnale di danno per l'organismo: attivazione del sistema immunitario
- Aumento della degradazione proteasoma mediata delle proteine, trasportano i peptidi che legano alle molecole di MHC I e quindi inducono la "presentazione" di molecole endogene
- HSP-peptidi vengono rilasciati e vengono legati da specifici recettori espressi sulle APCs attivandole

HSP attivano le cellule presentanti l'antigene

HSPs e tumori

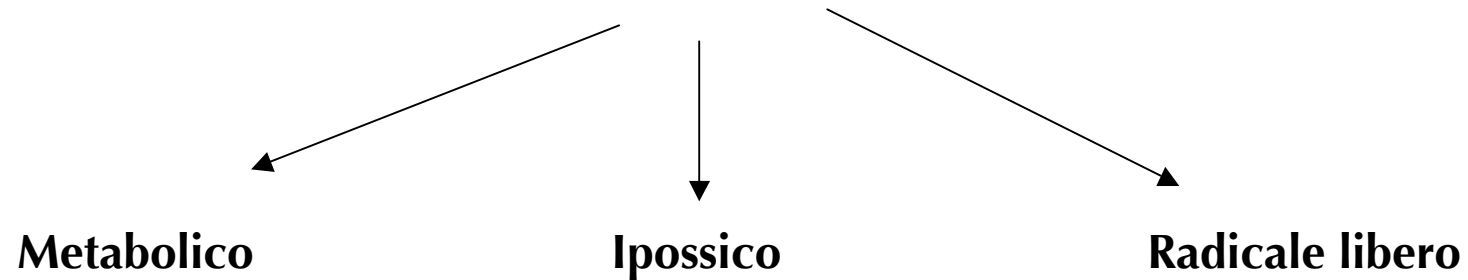
- Espressione di HSPs associata allo sviluppo neoplastico: un vantaggio per la cellula tumorale. HSPs come Marcatori!



Più sono espresse più la cellula è refrattaria agli stress

Blocco della espressione e/o della funzione delle HSPs nelle cellule tumorali, diminuisce la refrattarietà delle cellule all'azione dei farmaci

In sintesi:.....DANNO.



DANNO: Meccanismi in cooperazione

DANNO: Cause/prodotti sono fattori regolatori della risposta al danno

DANNO: Risposta coordinata dalla produzione di fattori di trascrizione a funzione pleiotropica: esempi HSF1 e HIF1