

Prof. Giorgio Sartor

Adattamento alla temperatura

Copyright © 2001-2012 by Giorgio Sartor.
All rights reserved.

Versione 2.0 - mar 2012



gs © 2001-2012 ver 2.0

N01 - Adattamento alla temperatura

2



gs © 2001-2012 ver 2.0

N01 - Adattamento alla temperatura

3

Ambiente polare

- Aspetti critici:
 - Temperatura dell'acqua vicina a -1.9°C
 - Cicli stagionali estremi
 - Fotoperiodo → produzione primaria
- Nonostante ciò:
 - Abbondanza e diversità di fauna marina.

gs © 2001-2012 ver 2.0

N01 - Adattamento alla temperatura

4

Animals from polar seas exhibit numerous so called resistance adaptations that serve to maintain homeostasis at low temperature and prevent lethal freezing injury. Specialization to temperatures at or below 0 °C is associated with an inability to survive at temperatures above 3-8 °C. Polar fish synthesize various types of glycoproteins or peptides to lower the freezing point of most extracellular fluid compartments in a non-colligative manner. Antifreeze production is seasonal in boreal species and is often initiated by environmental cues other than low temperature, particularly short day lengths. Most of the adaptations that enable intertidal invertebrates to survive freezing are associated with their ability to withstand arial exposure. Unique adaptations for freezing avoidance include the synthesis of low molecular mass ice-nucleating proteins that control and induce extracellular ice-formation.

Cold adaptation in marine organisms

I. A. JOHNSTON

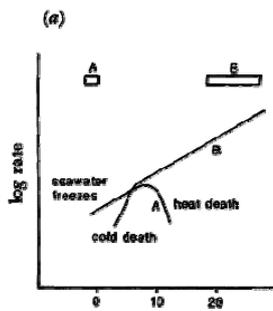
Phil. Trans. R. Soc. Lond. B 326, 655-667 (1990)

Adattamento enzimatico e di composizione

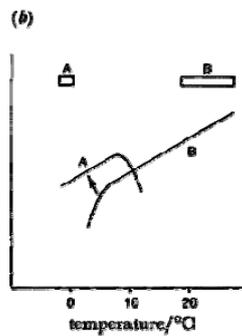
- Pesci di mari temperati
 - Microtubuli depolimerizzano a 0°-4°C
 - Potenziale di azione dei nervi periferici bloccato a bassa temperatura
 - Composizione delle membrane cellulari mantengono la fluidità
- Pesci di mari artici
 - Trascrizione del gene HSP70 a 5°C
 - Microtubuli polimerizzano a -2°C
 - Potenziale di azione dei nervi periferici attivo fino a -5°C
 - Aumentata affinità di legame del Ca²⁺ alla ATPasi a bassa temperatura
 - Composizione delle membrane cellulari ricche in acidi grassi insaturi

Resistenza e adattamento

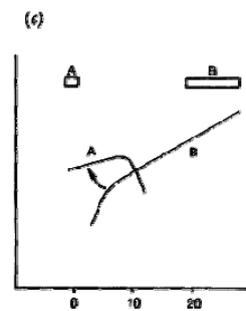
resistance adaptation
no compensation



resistance + partial
translational capacity
adaptation



resistance + mixed
translational and
rotational capacity
adaptation



Cold adaptation in marine organisms

I. A. JOHNSTON

Phil. Trans. R. Soc. Lond. B 326, 655-687 (1990)

gs © 2001-2012 ver 2.0

N01 - Adattamento alla temperatura

7

Pesci antartici

Temperatura corporea
bassa (-1.7°C)

l'acqua salata congela a -1.8°C

- Solubilità O_2 0.3%
- Basso metabolismo
- Nessun pigmento respiratorio
 - Risparmio di sintesi proteica
- Bassa viscosità del "sangue"
 - Facile da pompare
 - Poca spesa energetica



gs © 2001-2012 ver 2.0

N01 - Adattamento alla temperatura

8

Proprietà colligative delle soluzioni

$$\Delta T = -K_{cr} \cdot i \cdot m$$

- K_{cr} - costante crioscopica, dipende dal solvente
- i - coefficiente di van t'Hoff
- m - molalità
- $i \cdot m$ - osmolalità

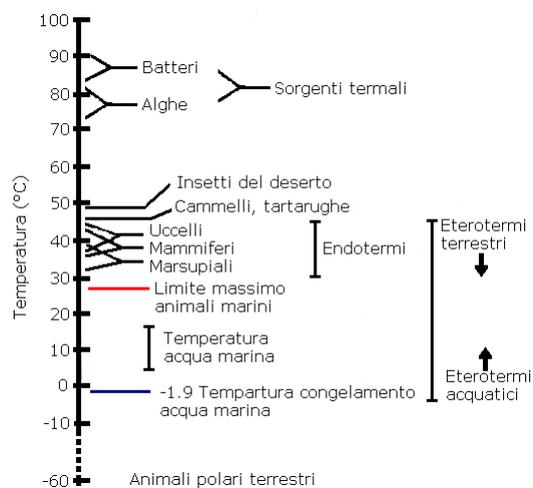
gs © 2001-2012 ver 2.0

N01 - Adattamento alla temperatura

9

Ambiente acquatico e temperatura

- Gli organismi viventi popolano l'ambiente acquatico con temperature comprese tra -1.9°C (temperatura di congelamento dell'acqua marina) e circa 90°C (temperatura di sorgenti termali).

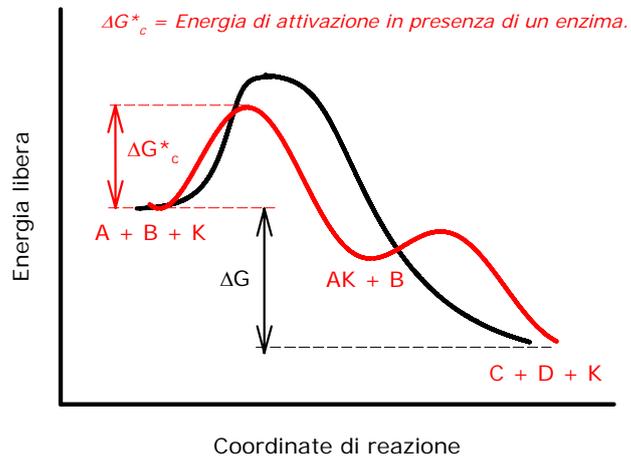


gs © 2001-2012 ver 2.0

N01 - Adattamento alla temperatura

10

Catalisi enzimatica

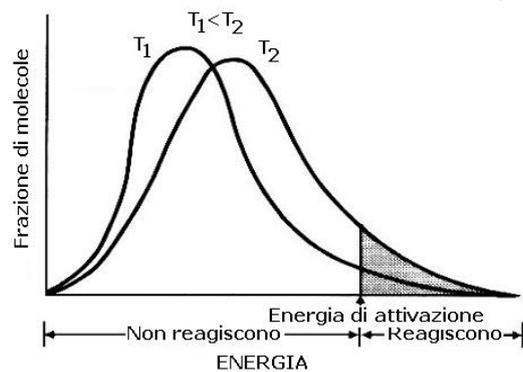


gs © 2001-2012 ver 2.0

N01 - Adattamento alla temperatura

11

Capacità di adattamento alla temperatura



- Ad una data temperatura solo le molecole che possiedono una energia maggiore dell'energia di attivazione reagiscono
- Ciò è l'origine dell'effetto Q_{10} .

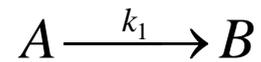
gs © 2001-2012 ver 2.0

N01 - Adattamento alla temperatura

12

$$Q_{10}$$

- Data una qualunque reazione chimica



- k_1 rappresenta la costante di velocità della reazione ($V = k_1[A]$)

$$Q_{10}$$

- Se la stessa reazione avviene ad una temperatura di 10°C maggiore, il valore di k_1 varia e Q_{10} è il rapporto tra le due costanti.

$$Q_{10} = \frac{k_{2(T+10^\circ C)}}{k_{1(T^\circ C)}}$$

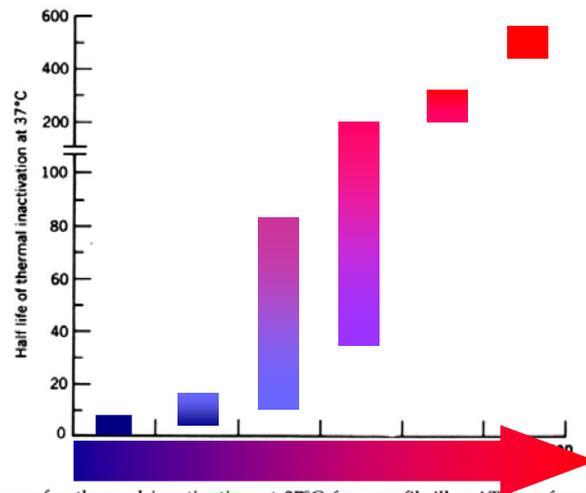
$$Q_{10}$$

Reazione	Q_{10}	Temperatura
Diffusione	1.03	20°C
Citocromo c	2.5	<20°C
Reduttasi	1.5	>20°C
Piruvato kinasi	3.2	<25°C
	1.7	>25°C
Coagulazione	13.8	60°C

Attività enzimatiche e temperatura

- Adattamento → Tempi brevi: secondi → ore
- Acclimatazione → Tempi medi: giorni → mesi
- Evoluzione → Tempi lunghi: anni → secoli.

Resistenza alle alte temperature: ATPasi delle miofibrille di pesci



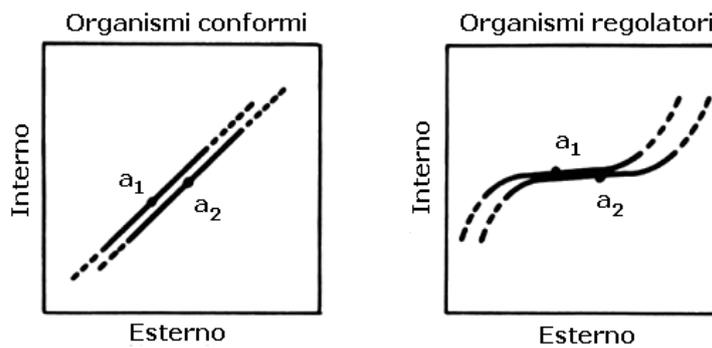
Half-times for thermal inactivation at 37°C for myofibrillar ATPase from fish living in different environments (83a).

gs © 2001-2012 ver 2.0

N01 - Adattamento alla temperatura

17

Organismi conformi o regolatori



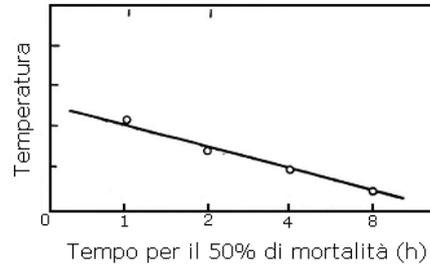
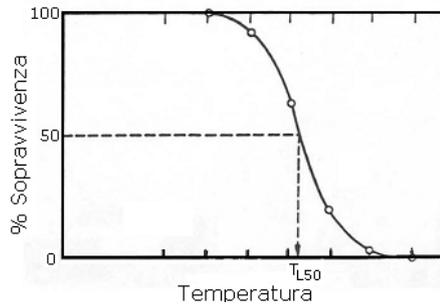
- Un organismo che si *conforma* varia il suo stato nello stesso modo con cui variano le condizioni ambientali.
- Un organismo che *regola* mantiene costanti (o quasi) il suo ambiente interno anche in seguito a variazioni dell'ambiente esterno.

gs © 2001-2012 ver 2.0

N01 - Adattamento alla temperatura

18

Limiti della resistenza



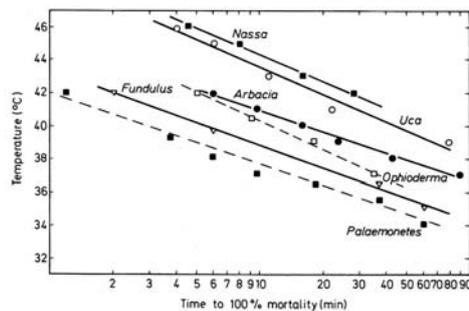
- Permette il popolamento di nicchie ecologiche.
- Il valore LD_{50} (50% di sopravvissuti di una specie ad un dato tempo) è usato per definire la resistenza ad un particolare stress.
- In alternativa si definisce il tempo di sopravvivenza per determinare la loro tolleranza allo stress.

gs © 2001-2012 ver 2.0

N01 - Adattamento alla temperatura

19

Limiti della resistenza



Graphs showing the thermal resistance of lines of various marine invertebrates in water. The time taken for 100% mortality (data from Orr, 1955).

- I fattori che limitano la sopravvivenza interagiscono tra loro.
- L'abilità di tollerare lo stress cambia con l'acclimatazione.

gs © 2001-2012 ver 2.0

N01 - Adattamento alla temperatura

20

Adattamento

- Regolato da ormoni o neurotrasmettitori che variano:
 - l'attività o la concentrazione degli enzimi,
 - la concentrazione di substrati attraverso la stimolazione di attività enzimatiche,
 - il rifornimento di energia,
 - l'ambiente intracellulare in modo da modulare l'attività enzimatica.
- I meccanismi con i quali esplicano queste funzioni sono:
 - La fosforilazione/defosforilazione
 - La modulazione allosterica (inibizione o attivazione)
 - La variazione del pH, concentrazioni di ioni (K^+ , Ca^{++} ...) e substrati.

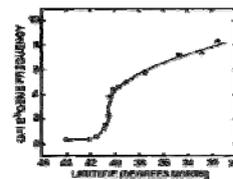
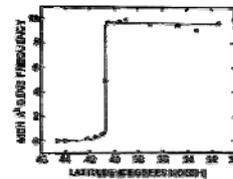
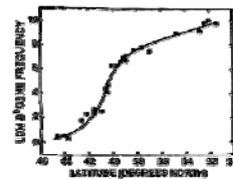
Acclimatazione

- Alterazione della via metabolica piuttosto che della singola reazione enzimatica.
- I meccanismi che regolano l'acclimatazione di un organismo sono:
 - L'induzione genica: meccanismi di sintesi e degradazione di proteine
 - Variazione della popolazione di isoenzimi
 - Variazione della concentrazione della composizione delle membrane biologiche

Adattamento dell'attività enzimatica

Adattamento molecolare

- Frequenza di isoenzimi in *Fundulus heteroclitus*

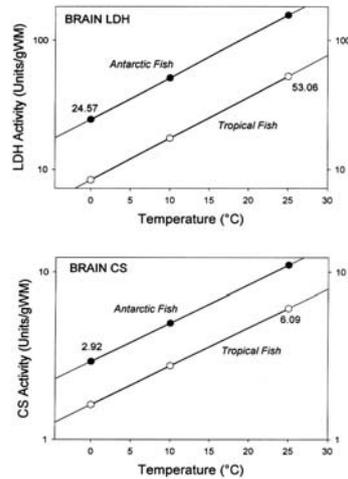


Distribution for some of the allelic types of three enzymes: LDH-1, MEH-1, and GOT-1 in *Fundulus heteroclitus* in southern and northern parts of its range. (Holtz to Florida. [Pearson, and Rose (1958). Copyright © 1958, Pearson Publishing, New York.]



Adattamento dell'attività enzimatica

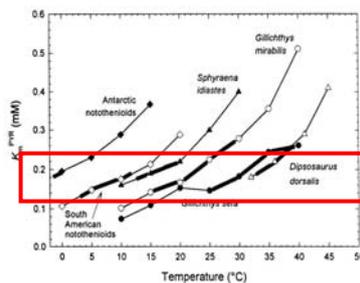
- Gli enzimi coinvolti nel metabolismo energetico nei pesci tropicali ed in quelli antartici sono molto diversi in termini di attività enzimatica alle stesse temperature.



Temperature compensation of LDH (upper panel) and citrate synthase (CS) (lower panel) activity in brains of Antarctic notothenioid fishes and tropical fishes. Enzymatic activity in homogenates of brain was measured at a common temperature, 10°C, and extrapolated to the approximate habitat temperatures of the species (0°C for Antarctic fish and 25°C for tropical species) using experimentally determined Q_{10} values. Activities at habitat temperatures are indicated in the figure. Despite substantial temperature compensation, an approximately twofold difference in activity persists at habitat temperatures for both enzymes. (Data from Kawall et al., 2001).

Adattamento dell'attività enzimatica

- Enzimi in pesci che vivono in differenti ambienti si sono adattati per avere valori simili di K_m a temperature molto diverse



Effects of assay temperature on the apparent Michaelis-Menten constant of pyruvate (K_m^{app}) for A_1 -LDH orthologs of differently thermally adapted vertebrates. K_m^{app} versus measurement temperature for orthologs of Antarctic and South American notothenioid fishes, a barracuda fish (*Sphyræna idlastræ*), two goby fishes (*Gillichthys mirabilis* and *Gillichthys seta*) and the desert iguana (*Diposaurus dorsalis*). Thick line segments indicate the approximate ranges of body temperatures of the species. Species shown, from left to right across the abscissa, are an Antarctic notothenioid, a South American notothenioid, a cold-adapted scorpaenid (*Sebastes altonemus*), *Sphyræna idlastræ*, a subtropical barracuda (*Sphyræna lucasana*), *Gillichthys mirabilis*, a warm-adapted goby (*Coryphopterus personatus*), and *Gillichthys seta*. (Data from Graves and Somero (1982), Holland et al., 1997, and Fields and Somero, 1997, 1998.)

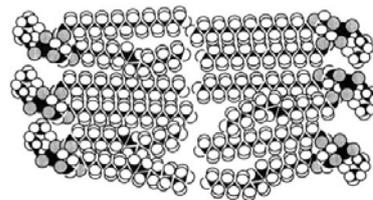
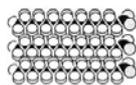
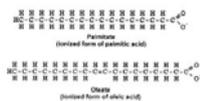
Adattamento della composizione delle membrane biologiche

gs © 2001-2012 ver 2.0

N01 - Adattamento alla temperatura

27

Omeoviscosità delle membrane biologiche



Palmitic acid (16:0, melting temperature 63° C) and
Oleic acid (18:1, melting temperature 16°C)

Space-filling model of a fluid membrane bilayer

- Le proprietà fisiche delle membrane biologiche dipendono dalla classe di lipidi (in termini di catena laterale) e dalla loro concentrazione.
- In particolare la fluidità (proprietà dipendente dalla temperatura) può regolare molte attività enzimatiche che avvengono a livello delle membrane biologiche

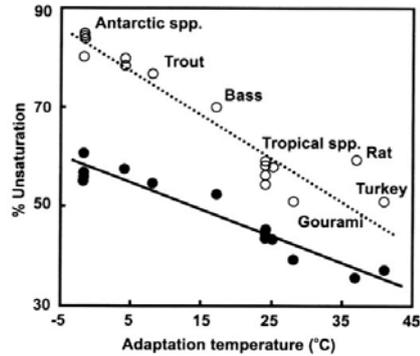
gs © 2001-2012 ver 2.0

N01 - Adattamento alla temperatura

28

Omeoviscosità delle membrane biologiche

- A basse temperature le membrane cellulari si arricchiscono in acidi grassi insaturi



The relationship between adaptation temperature and percentage of unsaturated acyl chains in synaptosomal phospholipids of differently thermally adapted vertebrates. Each symbol represents a different species. Open symbols denote phosphatidylethanolamine; filled symbols denote phosphatidylcholine. (Figure modified after Logue et al., 2000.)

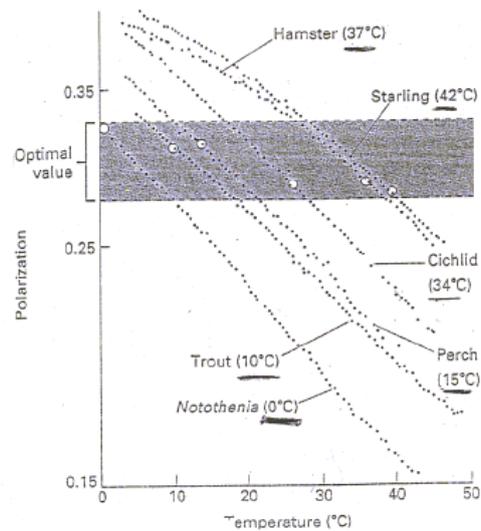
gs © 2001-2012 ver 2.0

N01 - Adattamento alla temperatura

29

Omeoviscosità delle membrane biologiche

- Varia la fluidità, misurata come polarizzazione di fluorescenza di sonde di membrana.



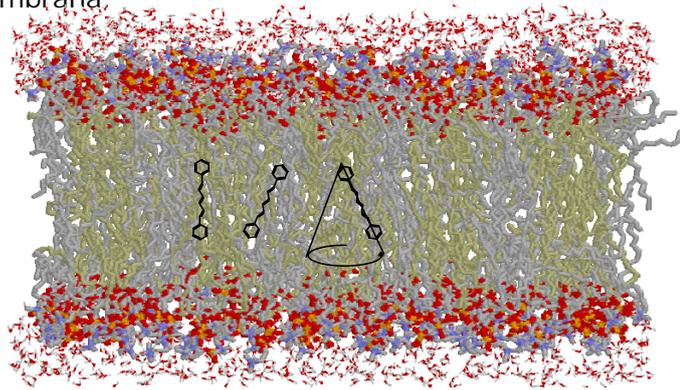
gs © 2001-2012 ver 2.0

N01 - Adattamento alla temperatura

30

Omeoviscosità delle membrane biologiche

- E varia la fluidità, misurata come polarizzazione di fluorescenza di sonde di membrana.
- Difenilesatriene (DPH)

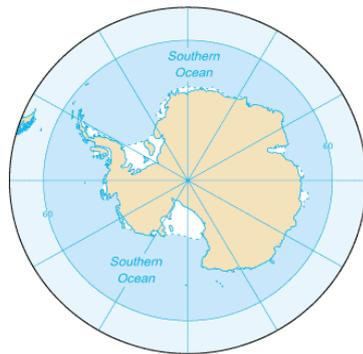


gs © 2001-2012 ver 2.0

N01 - Adattamento alla temperatura

31

I mari



- Il mare antartico mantiene una temperatura inferiore a -1°C per tutto l'anno.
- Contiene 274 specie conosciute di pesci
- 95 delle quali sono Perciformi del subordine dei nototenioidi.
- Nel mare artico le temperature invernali possono scendere anche al di sotto di -1.8°C .
- In estate la temperatura arriva fino a 7°C .

gs © 2001-2012 ver 2.0

N01 - Adattamento alla temperatura

32

ANTARTIDE



gs © 2001-2012 ver 2.0

N01 - Adattamento alla temperatura

33

ARTIDE



gs © 2001-2012 ver 2.0

N01 - Adattamento alla temperatura

34

Proprietà colligative delle soluzioni

$$\Delta T = -K_{cr} \cdot i \cdot m$$

- K_{cr} - costante crioscopica, dipende dal solvente
- i - coefficiente di van t'Hoff
- m - molalità
- $i \cdot m$ - osmolalità

Come fanno i pesci a sopravvivere?

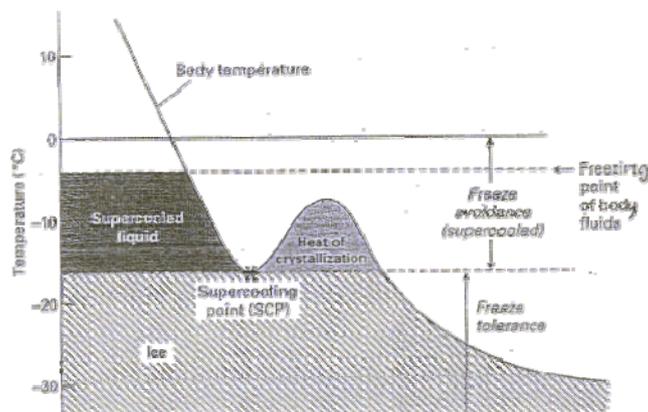
- Per gli animali sono più pericolosi i cristalli di ghiaccio che non le temperature al di sotto del congelamento.
 - Quando un animale congela i cristalli di ghiaccio crescono RAPIDAMENTE danneggiando i tessuti.
 - I cristalli si formano su nuclei di accrescimento nei fluidi extra ed intracellulari
 - Per evitare danni è necessario che i cristalli crescano LENTAMENTE anche a temperature al di sotto del punto di congelamento.

Come fanno i pesci a sopravvivere?

- Per gli animali sono più pericolosi i cristalli di ghiaccio che non le temperature al di sotto del congelamento.
 - In alcuni invertebrati è presente una Ice Nucleating Protein (glicosilata) che permette la crescita di PICCOLI cristalli extracellulari
 - LENTAMENTE aumenta la concentrazione dei soluti extracellulari
 - LENTAMENTE le cellule perdono acqua (shrinkage)
 - LENTAMENTE aumenta la concentrazione di soluti con effetto osmotico

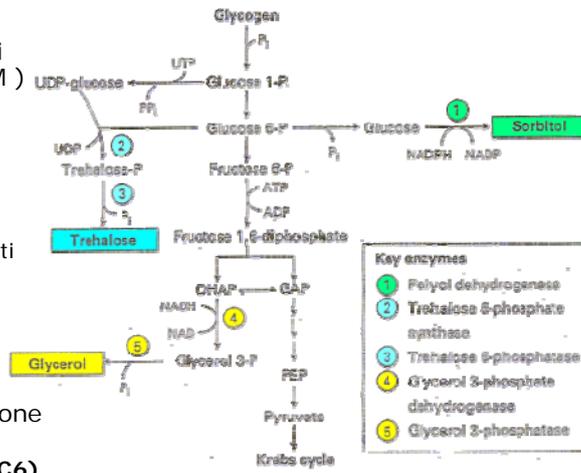
Come fanno i pesci a sopravvivere?

- Superaffreddamento



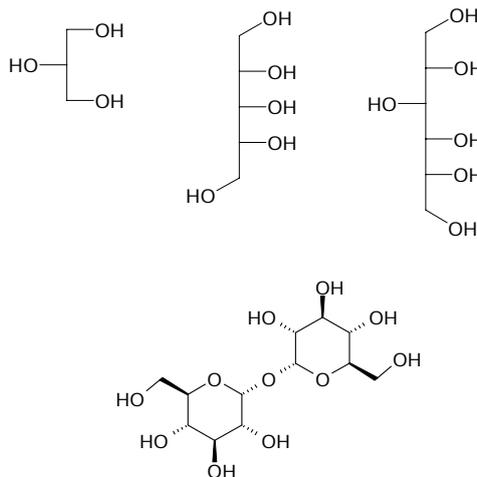
Come fanno i pesci a sopravvivere?

- Sintesi di composti crioprotettivi colligativi (concentrazioni 0.2-2M)
 - Polialcoli
 - **Glicerolo (C3)**
 - **Ribitolo (C5)**
 - **Sorbitolo (C6)**
- sono:
 - Metabolicamente inerti
 - Non tossici
 - Intermedi di vie metaboliche
- Sintesi di composti crioprotettivi non colligativi (concentrazione minore di 0.2M)
 - **Trealosio (α 1C6- α 1C6)**
 - Si lega alle membrane al posto dell'acqua



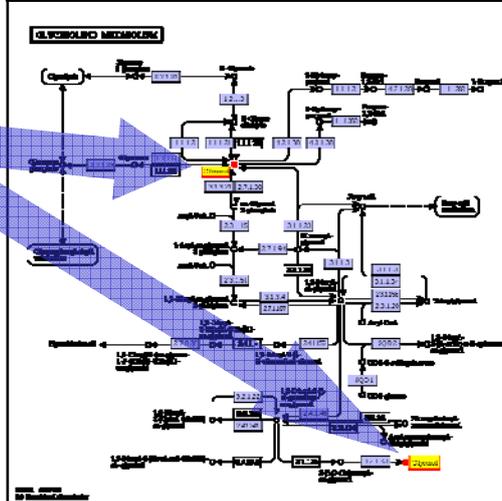
Come fanno i pesci a sopravvivere?

- Sintesi di composti crioprotettivi colligativi (concentrazioni 0.2-2M)
 - Polialcoli
 - **Glicerolo (C3)**
 - **Ribitolo (C5)**
 - **Sorbitolo (C6)**
- sono:
 - Metabolicamente inerti
 - Non tossici
 - Intermedi di vie metaboliche
- Sintesi di composti crioprotettivi non colligativi (concentrazione minore di 0.2M)
 - **Trealosio (α 1C6- α 1C6)**
 - Si lega alle membrane al posto dell'acqua



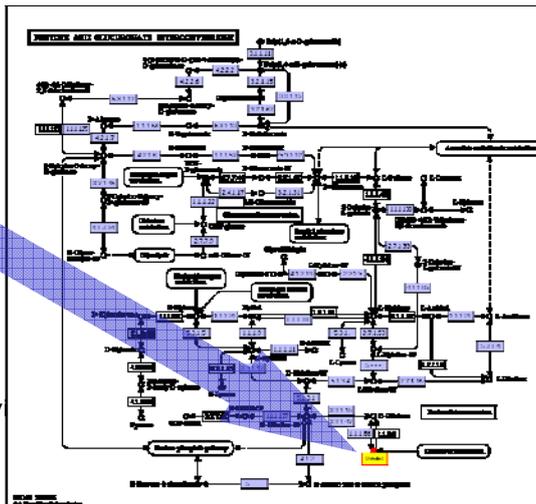
Come fanno i pesci a sopravvivere?

- Sintesi di composti crioprotettivi colligativi (concentrazioni 0.2-2M)
 - Polialcoli
 - **Glicerolo (C3)**
 - **Ribitolo (C5)**
 - **Sorbitolo (C6)**
- sono:
 - Metabolicamente inerti
 - Non tossici
 - Intermedi di vie metaboliche
- Sintesi di composti crioprotettivi non colligativi (concentrazione minore di 0.2M)
 - **Trealosio (α 1C6- α 1C6)**
 - Si lega alle membrane al posto dell'acqua



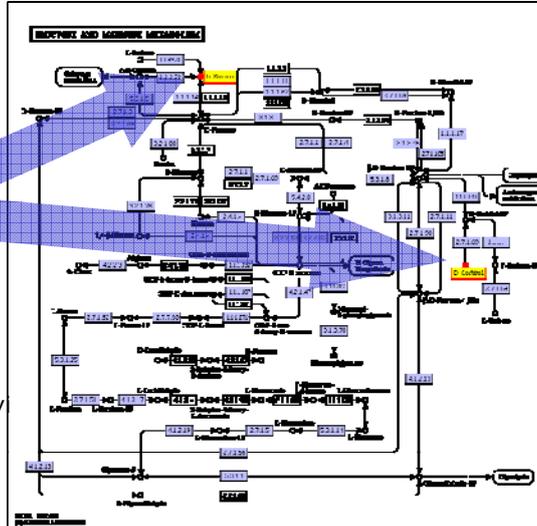
Come fanno i pesci a sopravvivere?

- Sintesi di composti crioprotettivi colligativi (concentrazioni 0.2-2M)
 - Polialcoli
 - **Glicerolo (C3)**
 - **Ribitolo (C5)**
 - **Sorbitolo (C6)**
- sono:
 - Metabolicamente inerti
 - Non tossici
 - Intermedi di vie metaboliche
- Sintesi di composti crioprotettivi non colligativi (concentrazione minore di 0.2M)
 - **Trealosio (α 1C6- α 1C6)**
 - Si lega alle membrane al posto dell'acqua



Come fanno i pesci a sopravvivere?

- Sintesi di composti crioprotettivi colligativi (concentrazioni 0.2-2M)
 - Polialcoli
 - **Glicerolo (C3)**
 - **Ribitolo (C5)**
 - **Sorbitolo (C6)**
- sono:
 - Metabolicamente inerti
 - Non tossici
 - Intermedi di vie metaboliche
- Sintesi di composti crioprotettivi non colligativi (concentrazione minore di 0.2M)
 - **Trealosio (α 1C6- α 1C6)**
 - Si lega alle membrane al posto dell'acqua



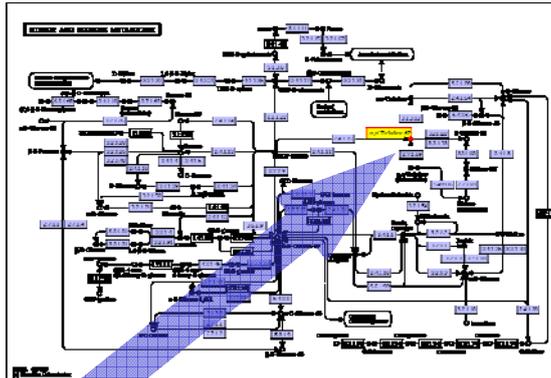
gs © 2001-2012 ver 2.0

N01 - Adattamento alla temperatura

43

Come fanno i pesci a sopravvivere?

- Sintesi di composti crioprotettivi colligativi (concentrazioni 0.2-2M)
 - Polialcoli
 - **Glicerolo (C3)**
 - **Ribitolo (C5)**
 - **Sorbitolo (C6)**
- sono:
 - Metabolicamente inerti
 - Non tossici
 - Intermedi di vie metaboliche
- Sintesi di composti crioprotettivi non colligativi (concentrazione minore di 0.2M)
 - **Trealosio (α 1C6- α 1C6)**
 - Si lega alle membrane al posto dell'acqua



gs © 2001-2012 ver 2.0

N01 - Adattamento alla temperatura

44

Come fanno i pesci a sopravvivere?

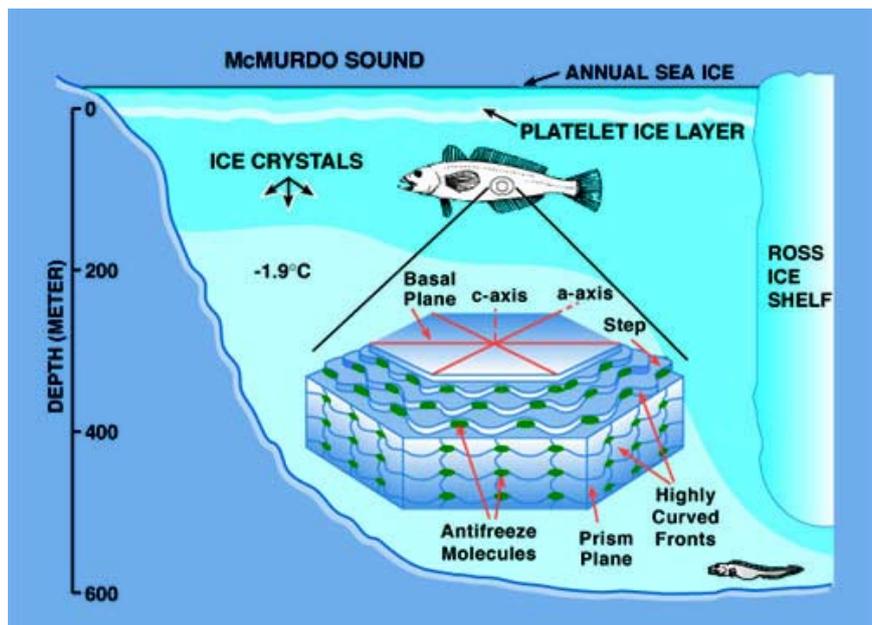
- Nel 1960 Arthur DeVries scoprì che i nototenoidi sintetizzavano proteine antigelo
- Fino ad ora sono stati scoperti cinque (sei) tipi di proteine antigelo:
 - AFGP,
 - AFP I,
 - AFP II,
 - AFP III,
 - AFP IV.
 - (AFPP)

gs © 2001-2012 ver 2.0

N01 - Adattamento alla temperatura

45

Non si gela al polo Sud



gs © 2001-2012 ver 2.0

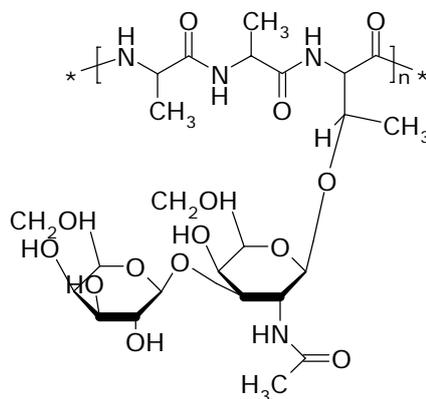
N01 - Adattamento alla temperatura

46

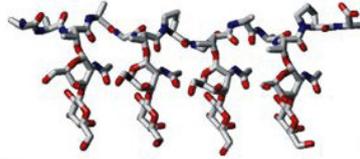
Struttura delle proteine antigelo

- AGFP - Antifreeze Glycoprotein
 - Un tipo
- AFP – Antifreeze protein
 - AFP I,
 - AFP II,
 - AFP III,
 - AFP IV,
 - AFPP (antifreeze-potentiating protein nuova)

AFGP – Antifreeze Glycoprotein (una famiglia di isoforme)



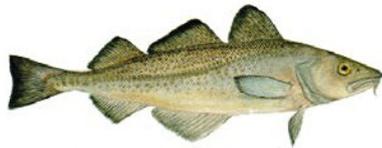
Antifreeze Glycoprotein (AFGP)



Arctic and Northern gadids

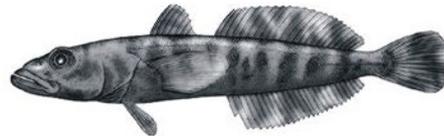


Boreogadus saida (Arctic cod)



Gadus morhua (Atlantic cod)

Antarctic Notothenioid fishes



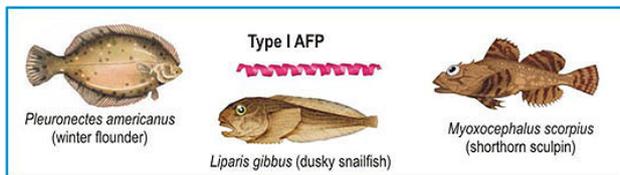
Dissostichus mawsoni (Antarctic toothfish)



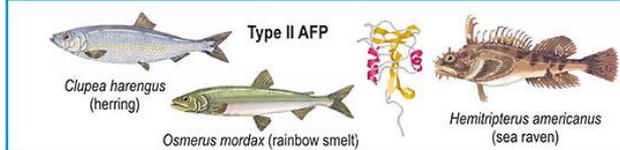
Pagetopsis macropterus (Antarctic icefish)

Proteine antigelo

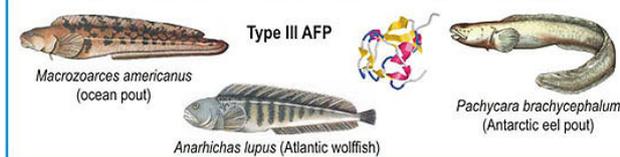
- Tipo I: 3-4 kDa



- Tipo II: ~14 kDa

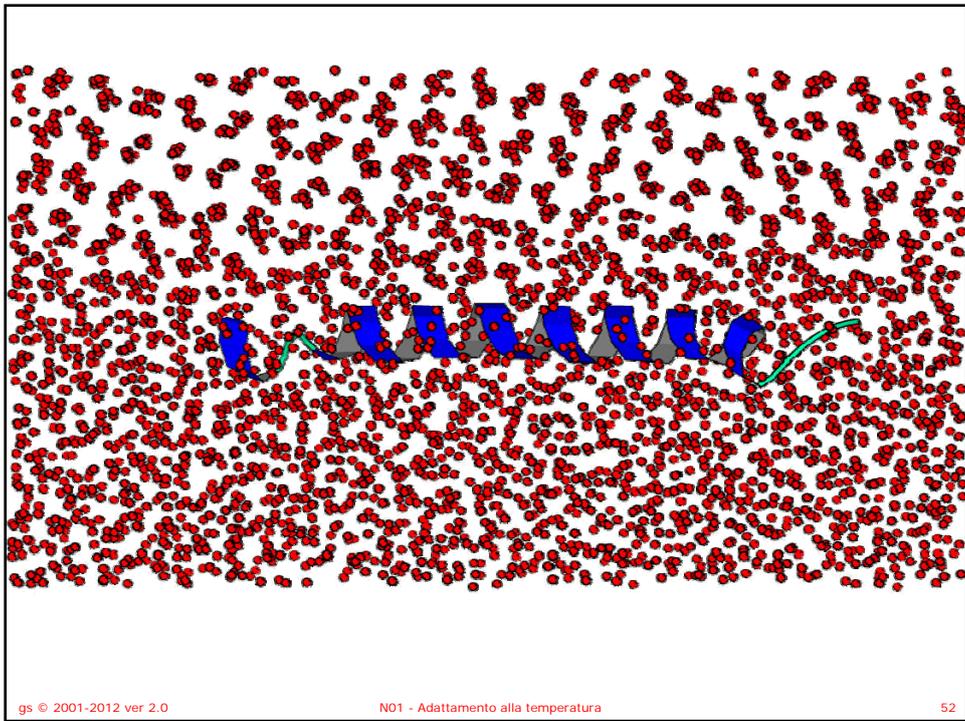
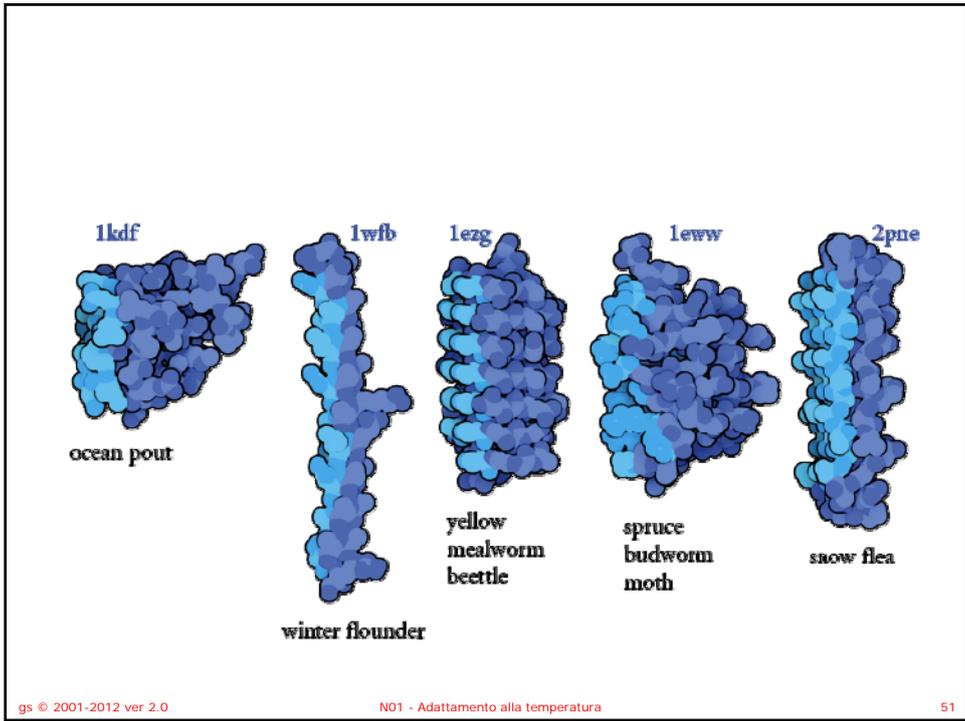


- Tipo III: 7 kDa
14 kDa

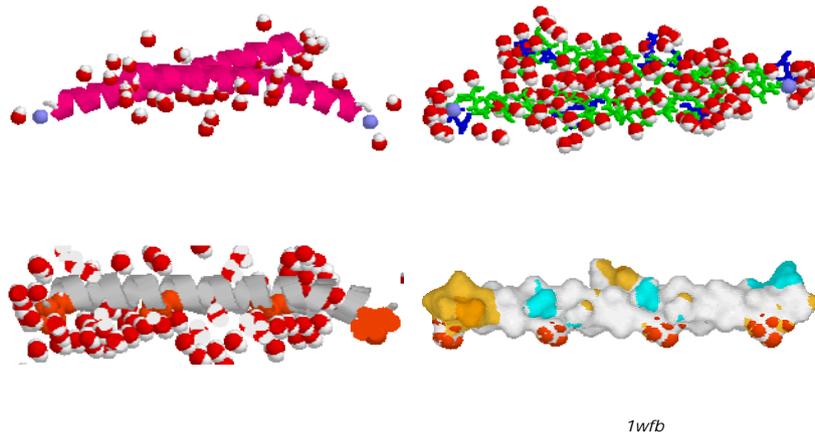


- Tipo IV: ~15 kDa





AFP tipo I

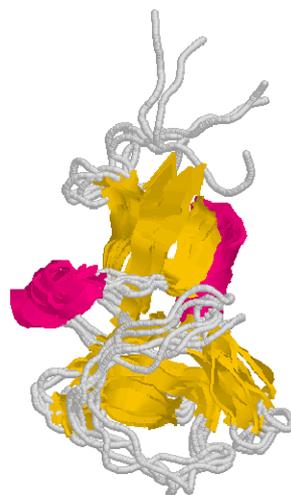


gs © 2001-2012 ver 2.0

N01 - Adattamento alla temperatura

53

AFP tipo II



gs © 2001-2012 ver 2.0

N01 - Adattamento alla temperatura

54

AFP tipo III

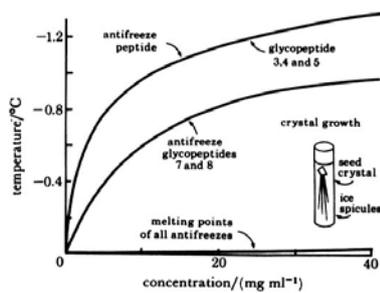


gs © 2001-2012 ver 2.0

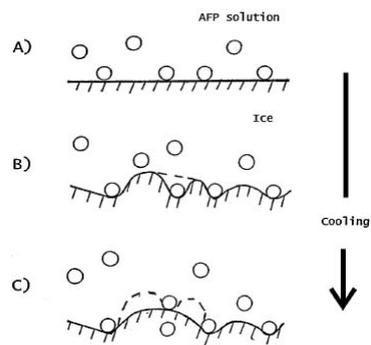
N01 - Adattamento alla temperatura

55

Come funzionano le proteine antigelo



Freezing and melting points of peptide and glycopeptides at several concentrations. The large glycopeptides and the polypeptides have similar antifreeze activity, low molecular weight glycopeptides (numbers 7 and 8) have less action in lowering freezing points. Melting points are the same for all sizes of antifreezes. [DeVries (34b).]



Inhibition of ice crystal growth following AFP adsorption. (A) AFP (open circles) in solution and in contact with the ice front (hatched line) at 0°C. (B) The ice-water interface at an undercooling approaching the non-equilibrium freezing point, where the curvature between bound AFPs leads to ice growth inhibition by the Kelvin effect. The dotted line represents the overgrowth of a bound AFP. (C) Binding of an AFP from solution to the point of overgrowth in (B). Here the dotted line represents subsequent stabilization of the ice-water interface around the newly bound AFP. This figure is based on the two-dimensional representations of ice-growth inhibitions displayed in Knight & DeVries (15) and Knight (17).

Interferiscono con la cristallizzazione del ghiaccio nei tessuti.

gs © 2001-2012 ver 2.0

N01 - Adattamento alla temperatura

56

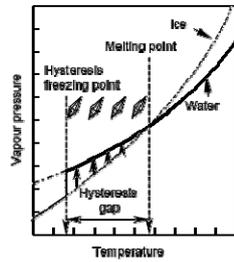


Fig. 2. Vapour pressure as a function of temperature. Within the hysteresis gap, antifreeze proteins elevate the vapour pressure of ice to correspond to the vapour pressure of the surrounding supercooled solution. The elevation changes with temperature. At the hysteresis freezing point the sample freezes and the vapour pressure of the ice will return to that of bulk ice. Solid line represents the acting vapour pressure. For further explanation, see text.

ISTERESI

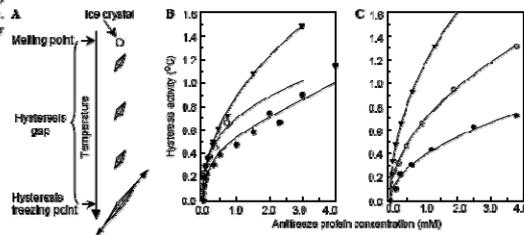
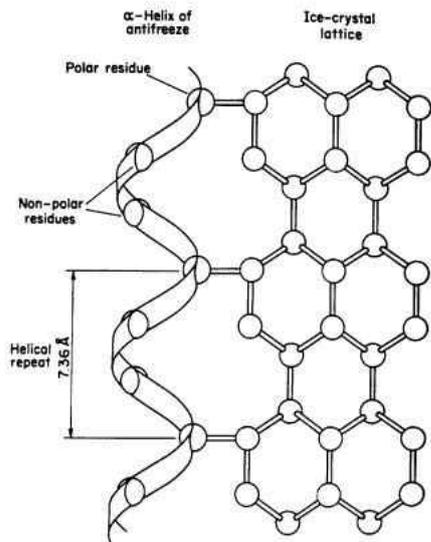


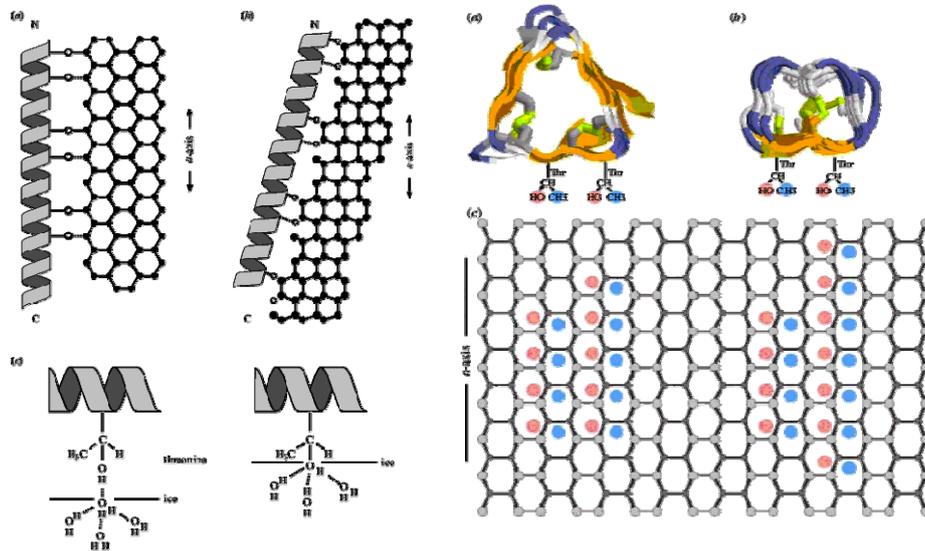
Fig. 1. (A) Illustration of the phenomenon of thermal hysteresis as expressed in diluted samples of body fluid from polar fish. (B, C) Hysteresis activity as a function of concentration of antifreeze proteins: (B) antifreeze proteins: (●) type I from winter flounder [2,17] (relationship is determined up to 7.5 mM, but is omitted here for scaling reasons); (C) recombinant type II from Sea Raven [31], and (▼) synthetic type III [7,13]. (C) Antifreeze glycoproteins, (●) 7900 Da, (○) 10,500 Da, (▼) 28,800 Da [64]. For further explanation, see text.

Come funzionano le proteine antigelo

- Sono prodotte dal fegato e secrete nel sangue
- Le proteine circondano I piccoli cristalli di ghiaccio impedendo la crescita di altro ghiaccio.



Come funzionano le proteine antigelo

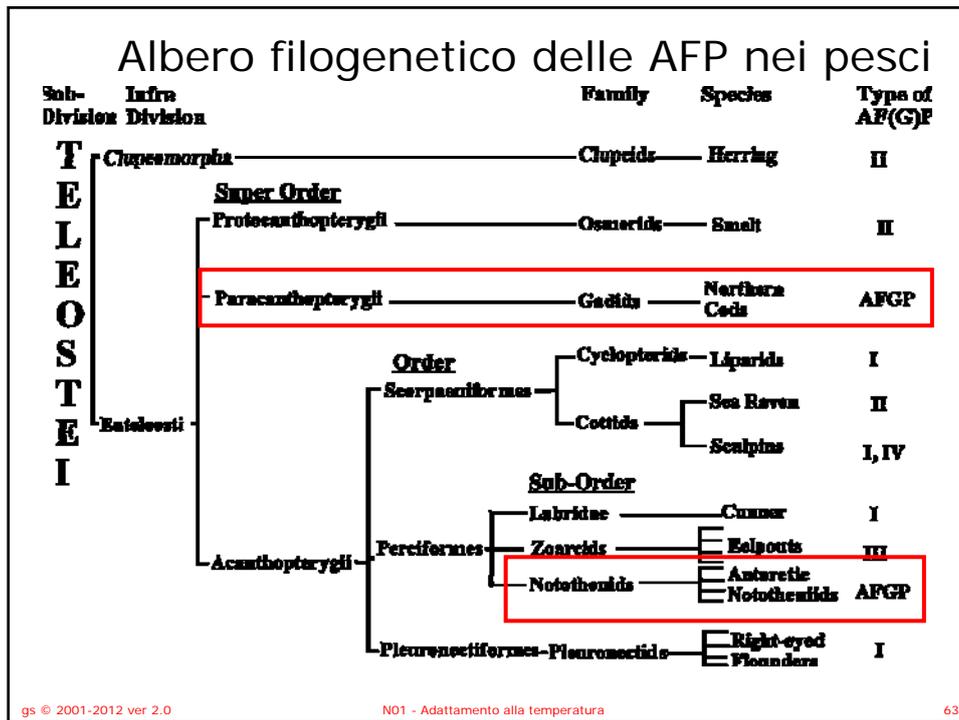


Origine delle proteine antigelo

- L'antartico iniziò a gelare circa 14 milioni di anni fa.
- Il congelamento pose una forte pressione selettiva.
- Le prime "versioni" delle AFGP probabilmente furono sintetizzate per prevenire il congelamento dei fluidi intestinali.

Evoluzione convergente delle proteine antigelo

- L'evoluzione delle proteine antigelo non concorda con le relazioni tassonomiche.
- Si sono evolute molte volte in specie diverse.
- I nototenioidi antartici (Perciformi) e il merluzzo artico (Gadiformi) contengono proteine antigelo che sono pressoché identiche nella composizione aminoacidica anche se gli ordini si separarono circa 40 milioni di anni fa.



Proteina	Precursore/Omologo	Meccanismo evolutivo
Tipo I AFP	??	
Tipo II AFP	lectine	Duplicazione del dominio
Tipo III AFP	C-terminale di Acido sialico sintasi	Duplicazione del dominio
Tipo IV AFP	apolipoproteina	Duplicazione del dominio
AFPP di Nototenoioide	Dominio globulare del complemento C1Q	Duplicazione del dominio

gs © 2001-2012 ver 2.0 N01 - Adattamento alla temperatura 64

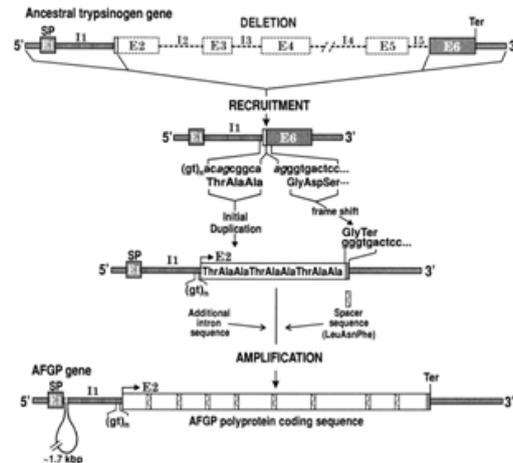
Proteina	Precursore/Omologo	Meccanismo evolutivo
AFGP <i>Di</i> Nototenioido Antartico	serina proteasi Tripsinogeno-like (TLP)	Reclutamento del segmento del gene TLP e amplificazione <i>de novo</i> del nono ThrAlaAla elemento codificante
AFGP di merluzzo artico	?? (non TLP)	???

gs © 2001-2012 ver 2.0

N01 - Adattamento alla temperatura

65

Likely mechanism by which an ancestral trypsinogen gene was transformed into an AFGP gene



©1997 by The National Academy of Sciences of the USA

PNAS

gs © 2001-2012 ver 2.0

N01 - Adattamento alla temperatura

66



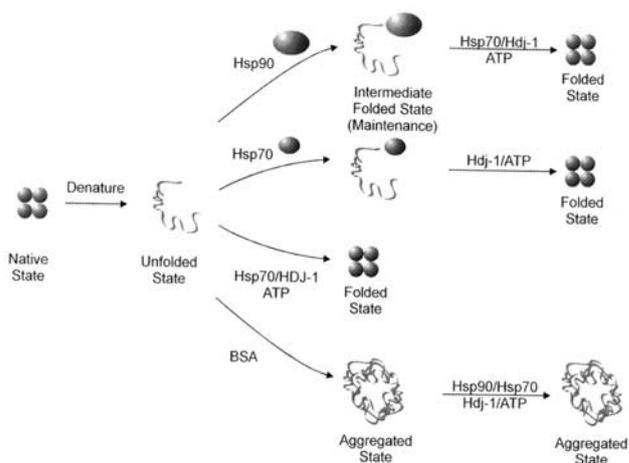
gs © 2001-2012 ver 2.0

N01 - Adattamento alla temperatura

67

Resistenza alle alte temperature Heat-Shock Proteins (HSPs)

- Questa classe di proteine sono prodotte rapidamente in condizione di elevata temperatura, prevengono l'aggregazione di proteine denaturate e assistono la rinaturazione.



Functions of molecular chaperones in preventing aggregation of denatured proteins and in assisting refolding to the native state.

gs © 2001-2012 ver 2.0

N01 - Adattamento alla temperatura

68

Classificazione delle HSP

Famiglia	Nome	Altri nomi	Localizzazione subcellulare	Livello di espressione	
				Normale	Stress
hsp 100	hsp 110		Nucleo/nucleolo	+	++
	hsp 104		citosol	+	+++
	grp 100		ER/Golgi	+	++
hsp 90	hsp 90	hsp 82, HtpG	Citosol/nucleo	++	+++
	grp 94	Erp90	ER	+	++
hsp 70	hsp 70	hsp 72, DnaK	Citosol/nucleo	-	+++
	hsc 70	hsp 73	Citosol/nucleo	++	?
	grp 78	BIP, Kar2p	ER	++	+++
	mtp 70	Ssc1p, grp 75	Mitocondrio	+	++
hsp 60	hsp60	GroEL, cpn60	Citosol	+	+
	hsp 58	HuChA 60	Mitocondrio	+	+
hsp 40	hsp 40	DnaJ, hdj-1	Citosol/nucleo	+	++
					++
hsp 30	hsp 32	eme-ossigenasi	Citosol	+	++
	hsp 35	G3PDH	Citosol	+	++
Piccole hsp	hsp 27	α -cristallino	Citosol/nucleo	+	?
	hsp42p			+	++
	hsp 10	GroES, cpn-10	Mitocondrio	+	++
Ubiquitina	Ubiquitina		Citosol	+	++

gs © 2001-2012 ver 2.0

N01 - Adattamento alla temperatura

69

Ruolo delle HSP

- **Costitutivo**
 - Le HSP presenti costitutivamente nelle cellule hanno un ruolo fondamentale nei processi fisiologici di ripiegamento trasferimento e degradazione delle proteine.
- **Citoprotettivo**
 - Il ruolo delle HSP indotte in cellule sottoposte ad insulto è quello di minimizzare i danni arrecati ai processi di sintesi, traslocazione, ripiegamento, di proteine cellulari.

gs © 2001-2012 ver 2.0

N01 - Adattamento alla temperatura

70

Table 1 Major Hsp families (modified from Lindquist 1992)

Protein	Members	Monomer mass (kDa)	Cell localization	Function
Hsp100	ClpA ClpB ClpC Hsp104	80-110	Cytoplasm, nucleolus, nucleus, chloroplast	Thermotolerance, ethanol tolerance, long-term spore viability
Hsp90	Hsp82 Grp94 Htp9	82-96	Cytoplasm, nucleus	Essential for viability; increased concentration required for growth at high temperatures
Hsp70	DnaK, grp78, hsc70, BiP, Kar2, ssa, sab, sac, sad	67-76	Cytoplasm, nucleus, mitochondria, chloroplasts, endoplasmic reticulum	Chaperone required for protein assembly, secretion, protein import into the endoplasmic reticulum and organelles; growth at high temperature
Hsp60	GroEL, Hsp65, cpn60, Rubisco-binding protein	55-55	Mitochondria, chloroplasts	Chaperonin, assembly of oligomeric proteins and folding of monomeric proteins; high concentration required for growth at elevated temperature
α Hsps	Many	16-40	Cytoplasm, nucleus	Protection from stress, apoptosis inhibition

Journal of Fish Diseases 2010, 33, 789-801

R J Roberts et al. *Heat shock proteins in fish and shellfish*

gs © 2001-2012 ver 2.0

N01 - Adattamento alla temperatura

71

HSP ad alto peso molecolare

- HSP-60 ,
 - Costituiscono la famiglia delle "chaperonine".
 - Tutte le HSP-60 sono costitutive, ATP dipendenti, e vanno incontro ad un marcato aumento in seguito a stress (shock, termico, infezioni endocellulari).
 - Sono presenti nei mitocondri partecipano al trasporto delle proteine mitocondriali dalla matrice al citosol e al trasporto delle proteine dimeriche attraverso la membrana mitocondriale senza che le stesse vengano preventivamente disassemblate.
- HSP-70
 - Sono presenti costitutivamente ed aumentano dopo lo stress.
 - Si ritrovano nel citoplasma, nel nucleo e nel reticolo endoplasmatico (questo dà ragione alla molteplicità di funzioni da esse espletate). "PARTECIPAZIONE AL FENOMENO DELLA TERMORESISTENZA".
 - Sono ATP dipendenti ed hanno struttura dimerica.
 - Partecipano al processo di assemblaggio delle proteine del citoscheletro
 - Favoriscono il trasporto post-trasduzionale di proteine attraverso il doppio strato lipidico della membrana, dei mitocondri e dei lisosomi, all'assemblaggio ed il ri-assemblaggio o la stabilizzazione di varie proteine.

gs © 2001-2012 ver 2.0

N01 - Adattamento alla temperatura

72

Risposta heat shock

- La risposta heat shock è un evento comune a tutti gli organismi, caratterizzato dall'aumentata sintesi di HSP in risposta ad un numero molto elevato di stimoli:
 - aumento di temperatura,
 - ipossia,
 - shock osmotico,
 - metalli pesanti, ischemia,
 - invecchiamento
 - ...
- L'espressione di geni HSP 70 è assente in pesci antartici

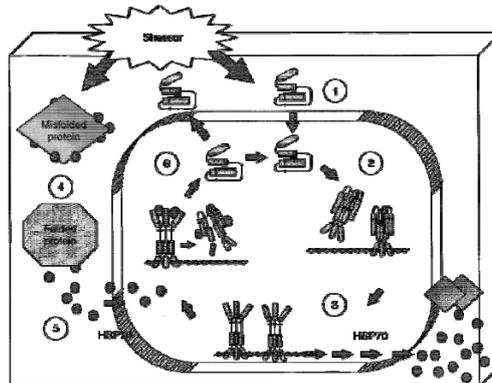


Fig. 2. Model of the role of heat shock factor (HSF1) in the regulation of heat shock protein expression. Drawing was made after diagrams in Morimoto *et al.* (1996). (1) Inactive monomeric form of HSF1 in cytoplasm or nucleus. (2) Activation by stressor leads to translocation of HSF1, which undergoes binding to heat shock element of the HSP70 gene promoter. (3) Phosphorylation and activation of HSF1 transcription leads to HSP70 expression. (4) Increase in cytoplasmic HSP70 binds to damaged proteins, along with other HSPs. (5) Subsequent repair of damaged proteins results in higher levels of free HSP70 in cytoplasm. (6) Higher concentration of HSP70 results in binding to HSF1, releasing it from DNA, and dissociation of HSF1 back to the monomeric form.

Reviews in Fish Biology and Fisheries 8, 35-56 (1996)

Heat shock protein expression in fish

GEORGE K. IWAMA^{1,4*}, PHILIP J. THOMAS², ROBERT B. FORSYTH¹
and MATHILAKATH M. VIJAYAN^{1,5}

¹Department of Animal Sciences, and the Canadian Bacterial Diseases Network, University of British Columbia, Vancouver, BC, Canada V6T 1Z4

Degradazione delle proteine

- Ci sono tre principali sistemi di degradazione delle proteine (nel muscolo):
 - Ubiquitina-proteosoma
 - Le proteine sono marcate per la degradazione da unità di ubiquitina.
 - I proteosoma 20S inattivo viene attivato da una proteina regolatrice diventando proteosoma 26S
 - Il proteosoma 26S rompe la proteina in peptidi
 - I peptidi sono scissi in aminoacidi liberi da altri processi nella cellula
 - Lisosomi
 - Le proteine entrano nei lisosomi via endocitosi
 - La cathepsina e le proteasi degradano i legami peptidici.
 - Calpaina
 - Proteasi attivate da calcio nel citosol della cellula
 - I differenti isomeri sono attivati da differenti concentrazioni di calcio.

Sistema Ubiquitina-proteosoma

- Ubiquitina:
 - Le proteine sono marcate per la proteolisi selettiva dall'ubiquitina, una proteina ubiquitaria altamente conservata.
 - Si forma un legame isopeptidico tra il carbossiterminale dell'ubiquitina e un gruppo NH_2 di una lisina della proteina da degradare.
 - Il processo è ATP dipendente.
 - Sono coinvolti tre enzimi (E1, E2 e E3).

Sistema Ubiquitina-proteosoma

- Inizialmente il carbossiterminale dell'ubiquitina è legato con un legame tioestere al *Ubiquitin-Activating Enzyme* (E1) attraverso una reazione ATP dipendente
- L'ubiquitina vien quindi trasferita ad un gruppo sulfidrilico del *Ubiquitin-Conjugating Enzyme* (E2).
- Una *Ubiquitin-Protein Ligase* (E3) trasferisce l'ubiquitina attivata al gruppo ϵ -amino di una lisina formando un legame isopeptidico.
- Ci sono diverse ligasi dell'ubiquitina che differiscono per la specificità.

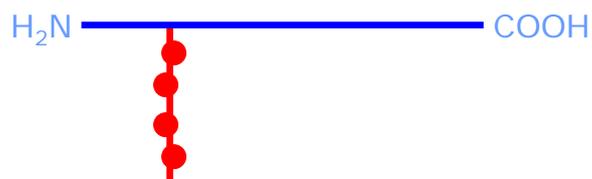
gs © 2001-2012 ver 2.0

N01 - Adattamento alla temperatura

77

Sistema Ubiquitina-proteosoma

- Più ubiquitine sono legate per formare una catena.
- Il **carbossiterminale** forma un legame con il gruppo ϵ -amino della **Lys48** di una catena adiacente di ubiquitina.



gs © 2001-2012 ver 2.0

N01 - Adattamento alla temperatura

78

Sistema Ubiquitina-proteosoma

- Alcune proteine (per esempio le cicline, coinvolte nella regolazione del ciclo cellulare) presentano una sequenza chiamata *destruction box*, riconosciuta da un dominio del corrispondente E3.
- L'interazione dell'ubiquitina ligasi con il suo bersaglio è regolata, in alcuni casi, dalla fosforilazione della proteina bersaglio e può coinvolgere altre proteine adattatrici.



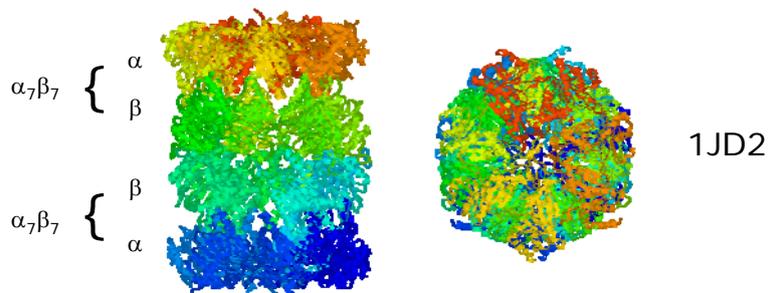
gs © 2001-2012 ver 2.0

N01 - Adattamento alla temperatura

79

Sistema Ubiquitina-proteosoma

- La degradazione selettiva di una proteina avviene nel proteosoma. Un complesso proteico presente nella cellula.
- Il *core complex* del proteosoma, ha un coefficiente di sedimentazione di 20S ed è costituito di 14 subunità di due tipi ($\alpha_7\beta_7$).
 - Le sette subunità α formano un anello a struttura cilindrica.
 - Le sette subunità β formano l'anello centrale.



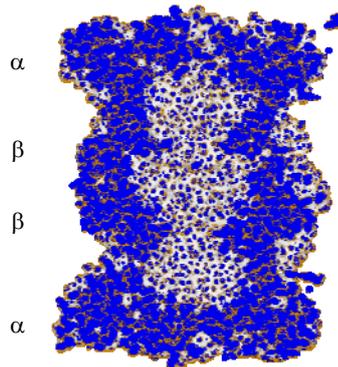
gs © 2001-2012 ver 2.0

N01 - Adattamento alla temperatura

80

Sistema Ubiquitina-proteosoma

- Il *core complex* del proteosoma racchiude una cavità fatta di tre compartimenti collegati da uno stretto passaggio.
- L'attività proteasica è associata a tre delle subunità β ognuna con differente specificità per il substrato.



gs © 2001-2012 ver 2.0

N01 - Adattamento alla temperatura

81

Sistema Ubiquitina-proteosoma

1. Una subunità β ha una attività simile alla chimotripsina con preferenza per Tyr o Phe come AA al carbonile del legame peptidico.
2. Una subunità β ha una attività simile alla tripsina con preferenza per Arg o Lys al carbonile del legame peptidico.
3. Una subunità β ha una attività post-glutamil con preferenza per glutamato o altro residuo acido.
 - Non sono coinvolti residui di cisteina o serina.
 - L'attività idrolasica del proteosoma costituisce una famiglia di proteasi a treonina.

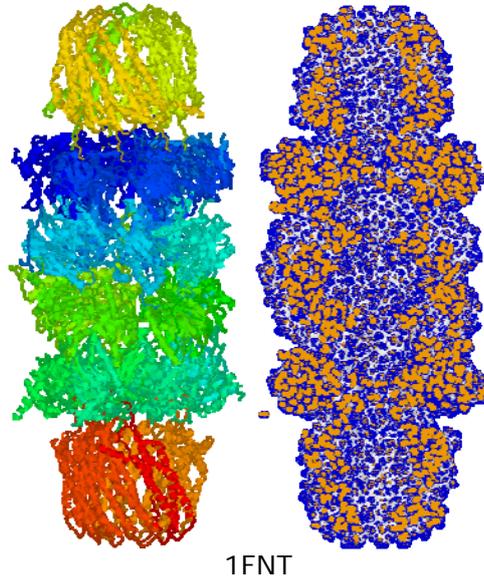
gs © 2001-2012 ver 2.0

N01 - Adattamento alla temperatura

82

Sistema Ubiquitina-proteosoma

- Nella struttura del *core complex* del proteosoma non ci sono apparenti aperture verso l'esterno.
- Si è postulata l'interazione con un *cap complex* che apra il passaggio verso l'esterno.
- È stato cristallizzato il *core complex* 20S del proteosoma con il *cap complex* 11S.
- L'interazione del *cap complex* 11S altera la conformazione del dominio N-terminale delle subunità α del *core complex* permettendo l'accesso dall'esterno.



gs © 2001-2012 ver 2.0

N01 - Adattamento alla temperatura

83

Referenze sul WEB

- Vie metaboliche
 - KEGG: <http://www.genome.ad.jp/kegg/>
 - Degradazione degli xenobiotici: <http://www.genome.ad.jp/kegg/pathway/map/map01196.html>
- Struttura delle proteine:
 - Protein data bank (Brookhaven): <http://www.rcsb.org/pdb/>
 - Hexpasy
 - Expert Protein Analysis System: <http://us.expasy.org/sprot/>
 - Prosite (protein families and domains): <http://www.expasy.org/prosite/>
 - Enzyme (Enzyme nomenclature database): <http://www.expasy.org/enzyme/>
 - Scop (famiglie strutturali): <http://scop.berkeley.edu/>
- Enzimi:
 - Nomenclatura - IUBMB: <http://www.chem.qmw.ac.uk/iubmb/>
 - Proprietà - Brenda: <http://www.brenda.uni-koeln.de/>
 - Expasy (Enzyme nomenclature database): <http://www.expasy.org/enzyme/>
- Database di biocatalisi e biodegradazione: <http://umbbd.ahc.umn.edu/>
- Citocromo P450: <http://www.icgeb.org/~p450srv/>
- Metallotioneine: <http://www.unizh.ch/~mtpage/MT.html>
- Tossicità degli xenobiotici: Agency for Toxic Substances and Disease Registry <http://www.atsdr.cdc.gov>

gs © 2001-2012 ver 2.0

N01 - Adattamento alla temperatura

84

Crediti e autorizzazioni all'utilizzo

- Questo ed altro materiale può essere reperito a partire da:
<http://www.ambra.unibo.it/giorgio.sartor/>
- Il materiale di questa presentazione è di libero uso per didattica e ricerca e può essere usato senza limitazione, purché venga riconosciuto l'autore usando questa frase:

Materiale ottenuto dal Prof. Giorgio Sartor
Università di Bologna a Ravenna

Giorgio Sartor - giorgio.sartor@unibo.it