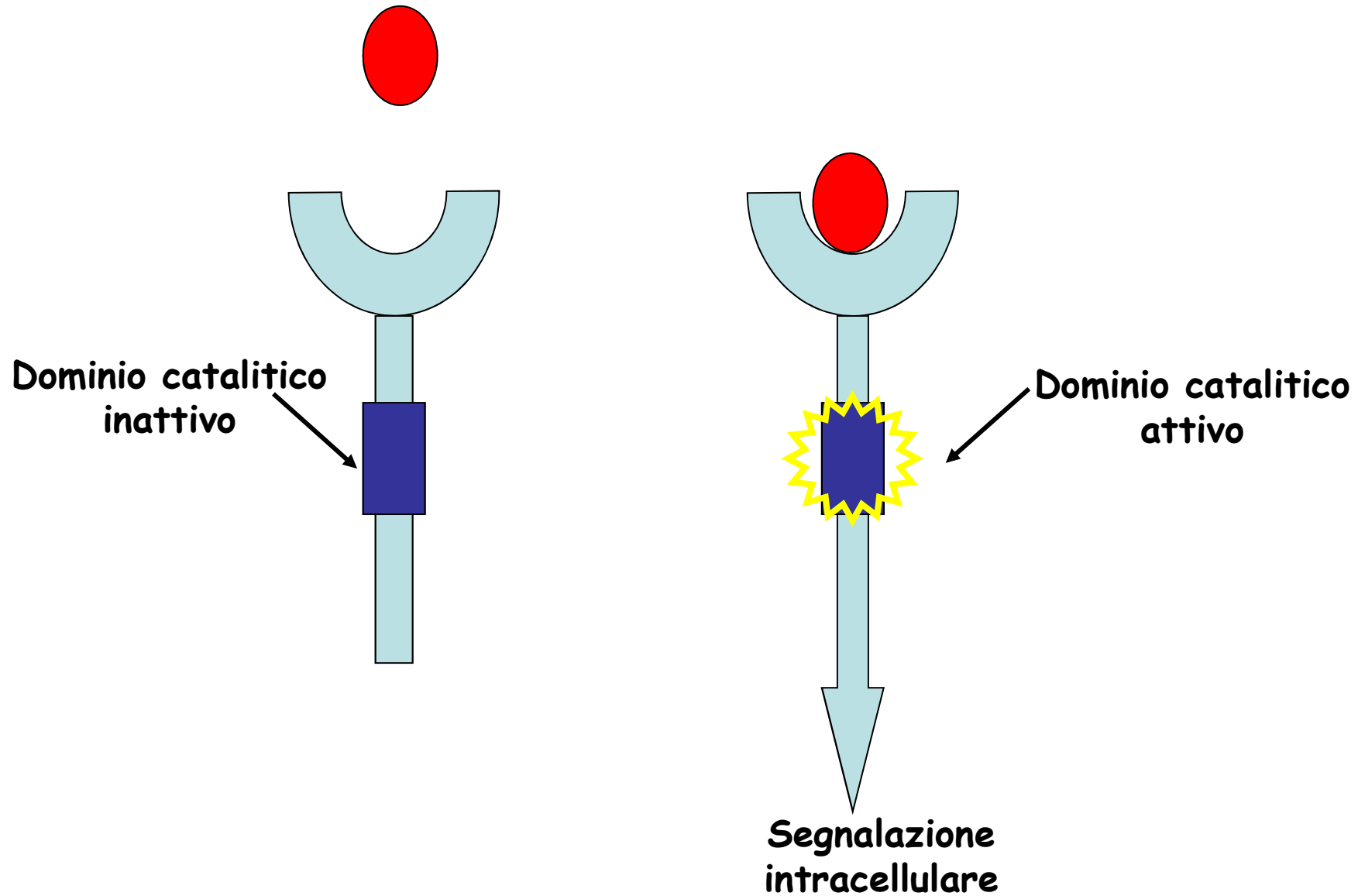
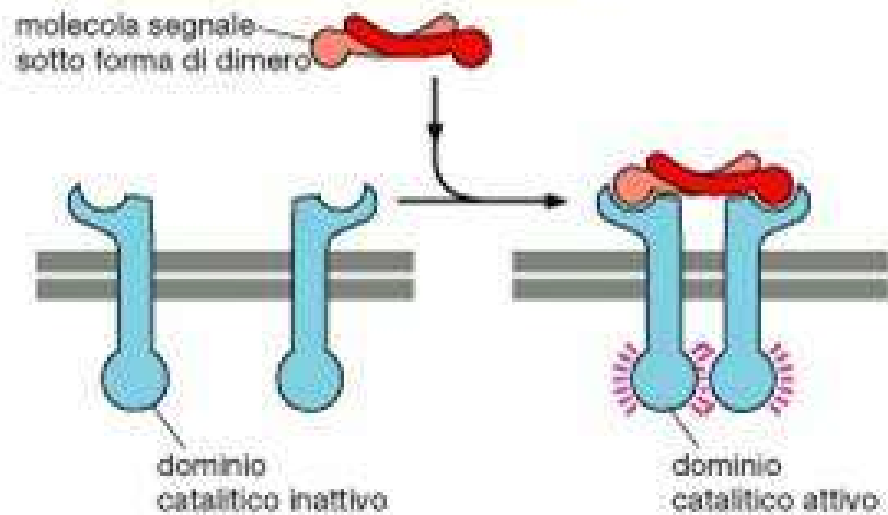


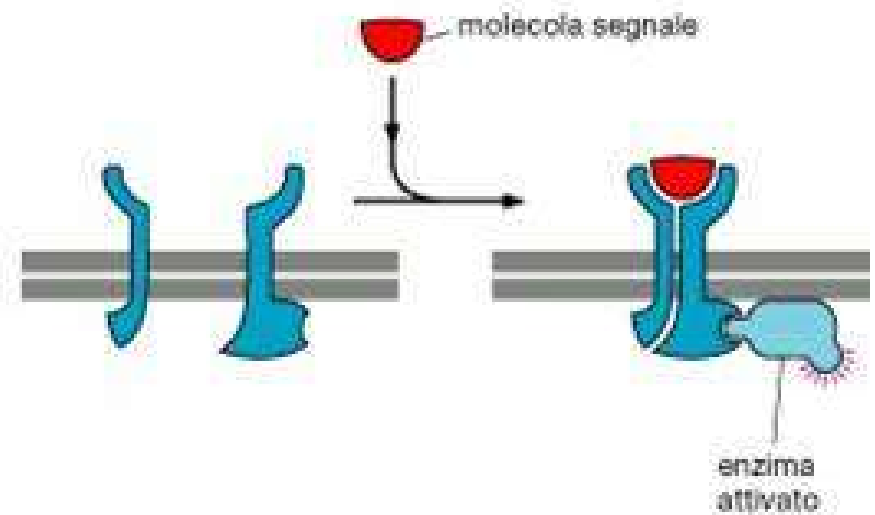
Recettori con attività enzimatica



RECETTORI CON ATTIVITA' ENZIMATICA INTRINSECA



RECETTORI COLLEGATI AD ENZIMI



Classi di recettori con attività enzimatica

Recettori tirosina-chinasi

Recettori serina-treonina chinasi

Recettori guanilico ciclasi

Recettori tirosina-fosfatasi

Classi di recettori associati ad attività enzimatica

Recettori associati a tirosina-chinasi

Recettori associati a istidina-chinasi

La **fosforilazione in tirosina** coinvolge una minima parte del fosfato legato alle proteine (la maggior parte di questo modifica post-traduzionalmente le proteine su serina e treonina):

Le proteine fosforilate in tirosina sono generalmente coinvolte nel controllo della **proliferazione** e del **differenziamento**.

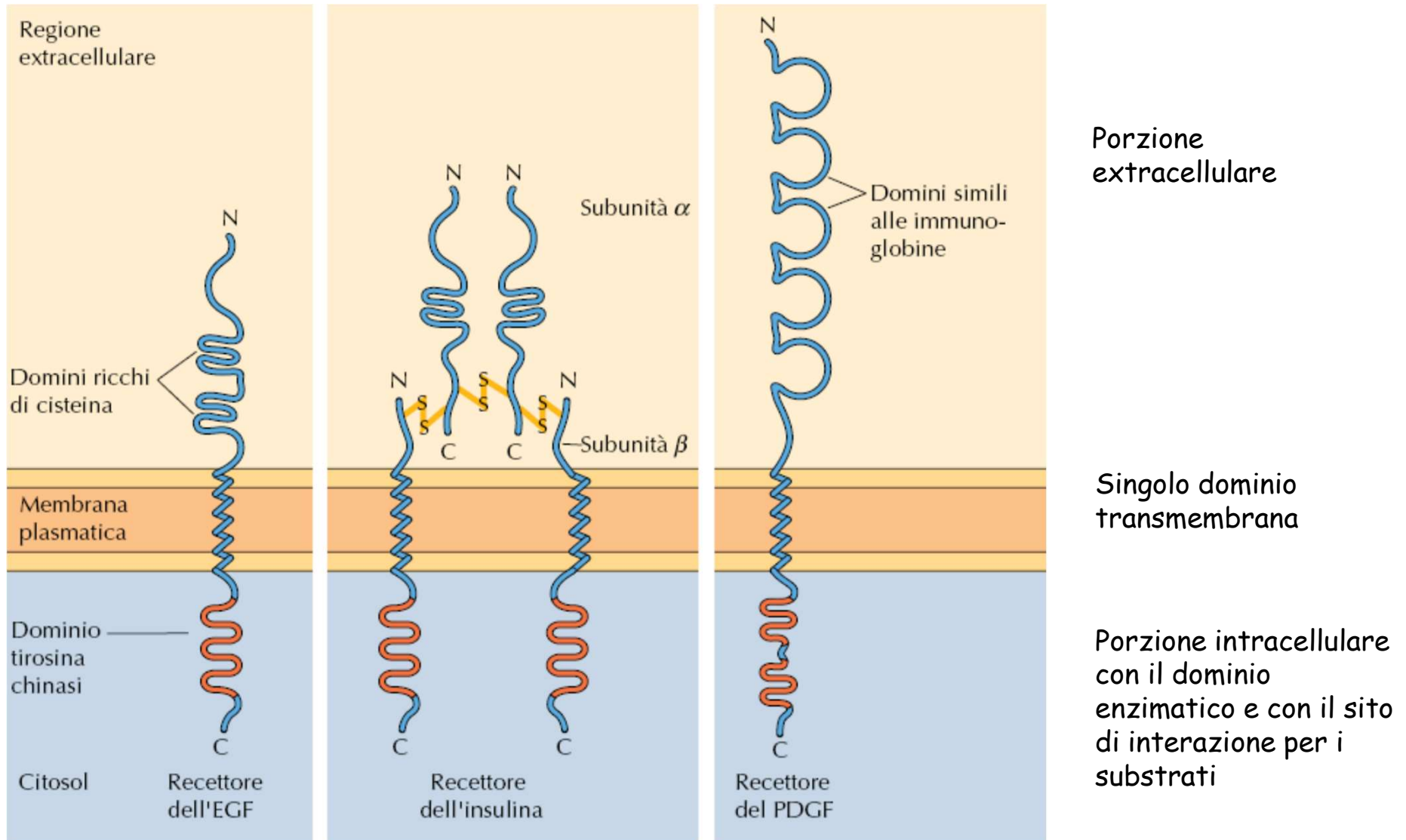
La prima chinasi specifica per la fosforilazione di questo aa fu identificata negli anni '80. Da allora, per omologia di sequenza, sono state identificate **decine e decine di tirosin-chinasi**, tutte coinvolte in proliferazione e differenziamento.

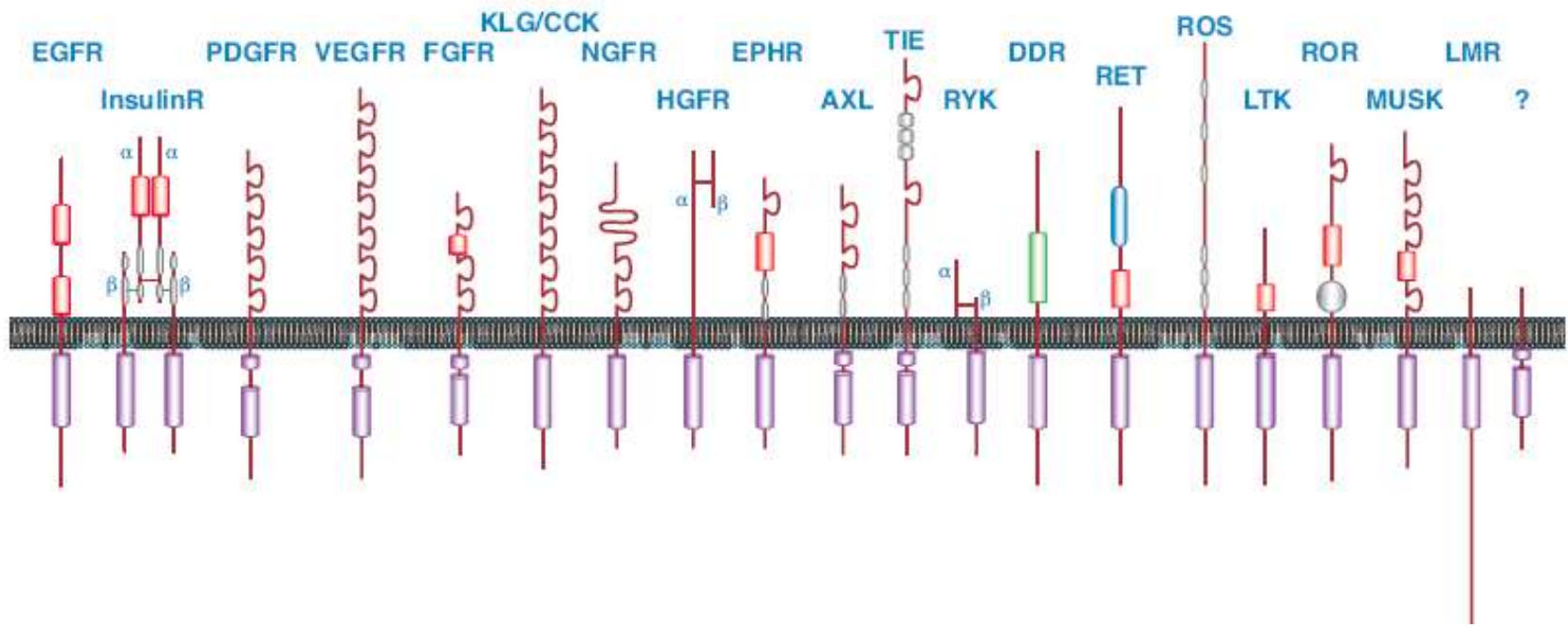
Recettori con attività
tirosin-chinasica

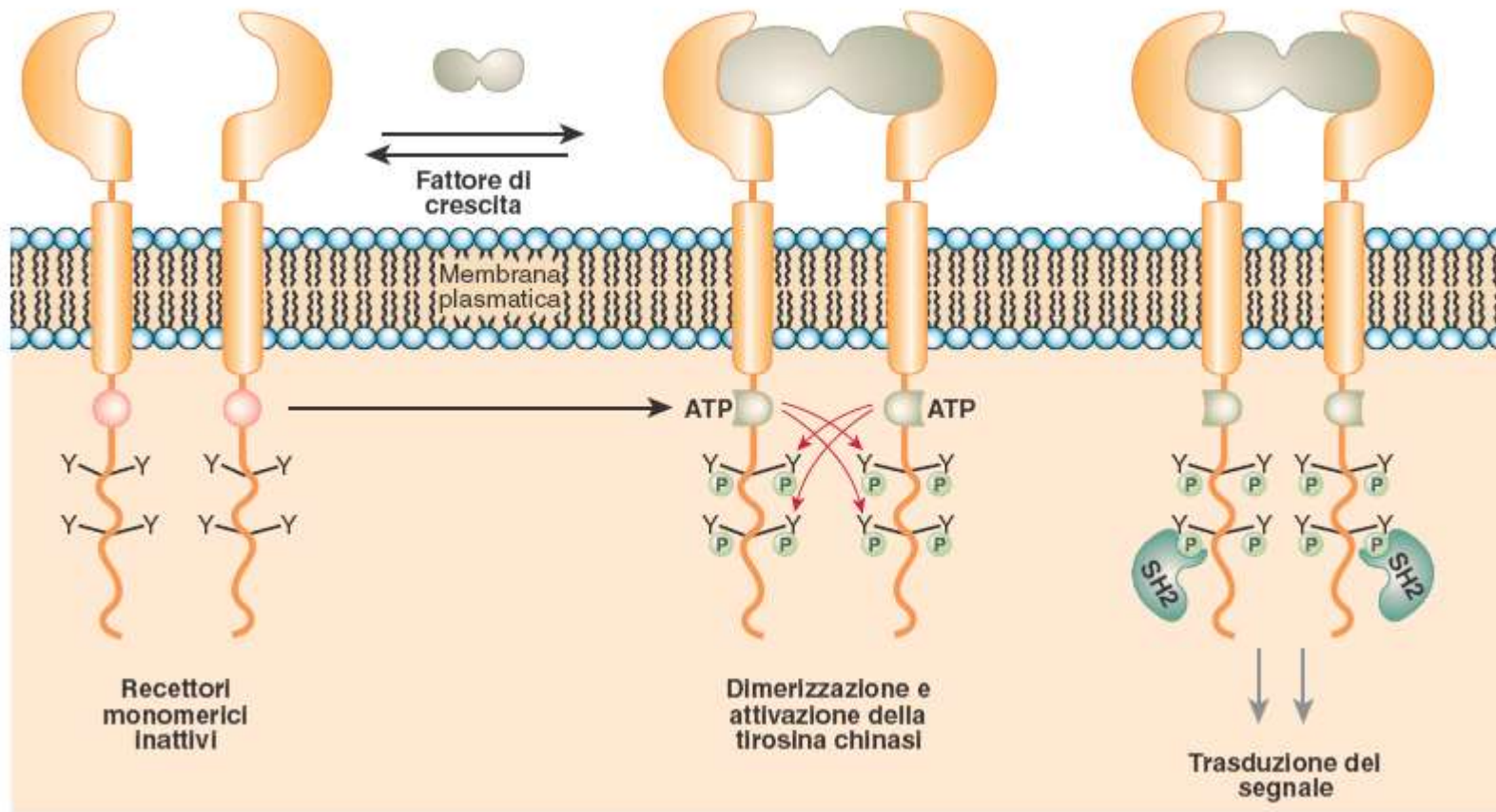
Molti fattori di crescita agiscono tramite recettori tirosin-chinasici (RTK)

- **Fattore di crescita dell'epidermide (EGF)** Stimola la proliferazione di vari tipi cellulari
- **Insulina** Stimola l'utilizzo dei carboidrati e la sintesi proteica
- **Fattore di crescita insulino-simile (IGF-1)** Stimola la crescita e la sopravvivenza di molti tipi cellulari
- **Fattore di crescita neuronale (NGF)** Stimola la crescita e sopravvivenza dei neuroni
- **Fattore di crescita dei fibroblasti (FGF)** Stimola la proliferazione di fibroblasti e altri tipi cellulari
- **Fattore che stimola le colonie macrofagiche (M-CSF)** Stimola la proliferazione e il differenziamento dei macrofagi
- **Fattore di crescita derivato dalle piastrine (PDGF)** Stimola sopravvivenza e proliferazione di vari tipi cellulari
- **Fattore vascolare endoteliale (VEGF)** Stimola l'angiogenesi

Finora sono stati individuati circa cinquanta RTK che condividono parti della loro struttura





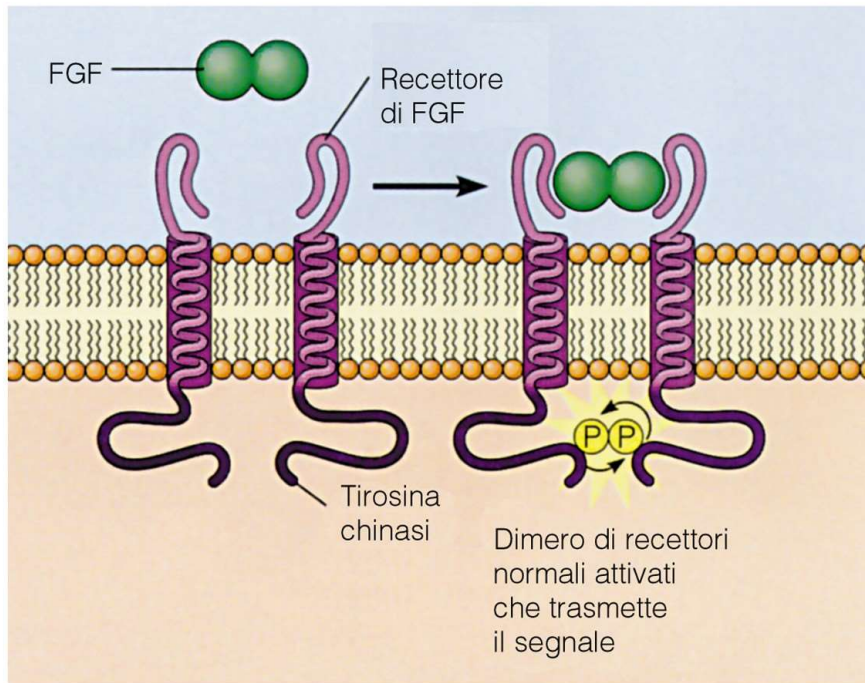


Il ligando si lega simultaneamente a due catene recettoriali adiacenti provocando la **dimerizzazione** e **attivazione** del recettore con **legame di ATP** in siti specifici.

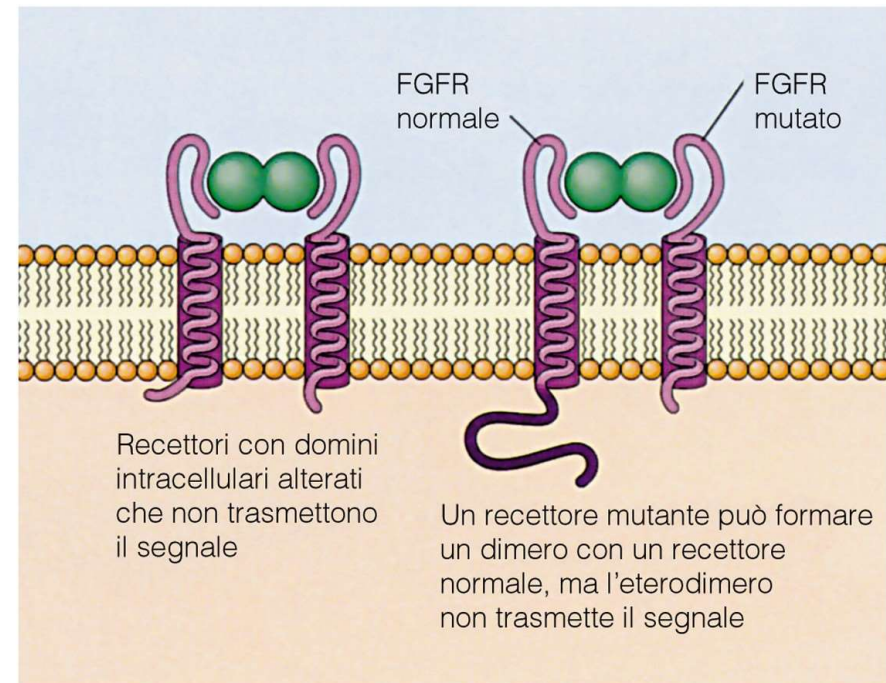
Una volta attivato, il dominio chinasi su un emirecettore trasferisce gruppi fosfato su residui di tirosina dell'altra catena recettoriale (**auto-trans-fosforilazione**).

Le tirosine fosforilate vengono riconosciute da **molecole citoplasmatiche dotate di particolari domini** e comincia la trasduzione del segnale

La dimerizzazione e la trans-fosforilazione spiegano il comportamento **dominante-negativo** di alcune mutazioni nei geni per i RTK



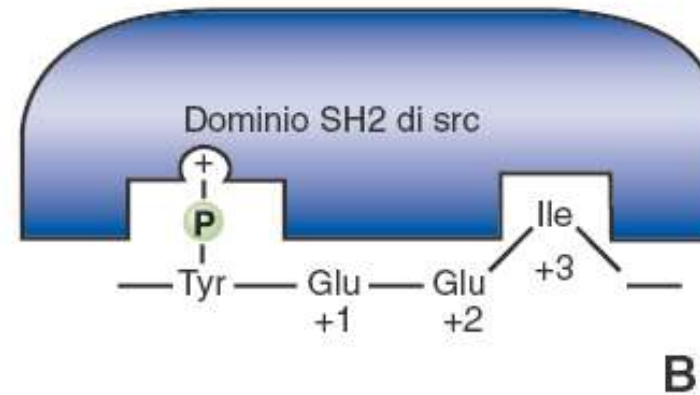
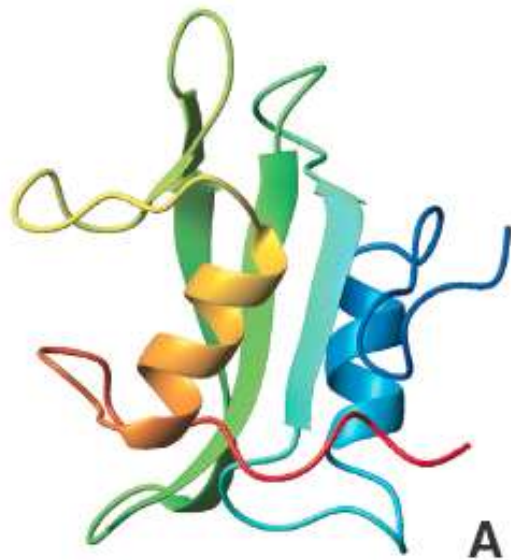
(a) FGFR normale: legame di FGF; due molecole di FGFR formano un dimero



(b) Mutazione dominante negativa



Mutazioni dominanti nel gene *FGFR-3* sono responsabili dell'**acondroplasia** (mancato sviluppo armonico della cartilagine di accrescimento delle ossa lunghe degli arti).

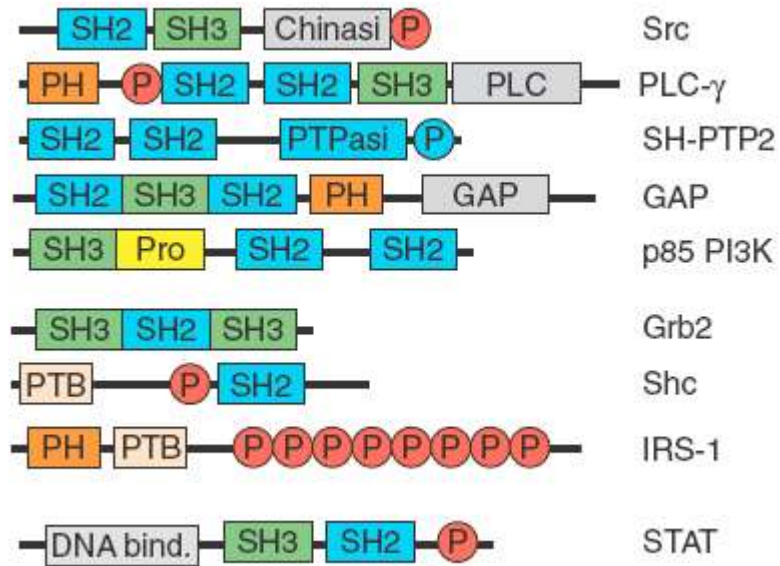


Il **dominio SH2** (Src Homology 2) è una sequenza di circa 100 aa contenenti, nella porzione centrale, un aa basico in grado di interagire con la carica negativa del fosfato.

Gli aa circostanti la tirosina fosforilata stabilizzano l'interazione.

Dalla sequenza aa del dominio recettoriale si può dedurre la molecola segnale con cui interagisce.

I domini SH2 sono presenti in proteine cellulari con diversa funzione

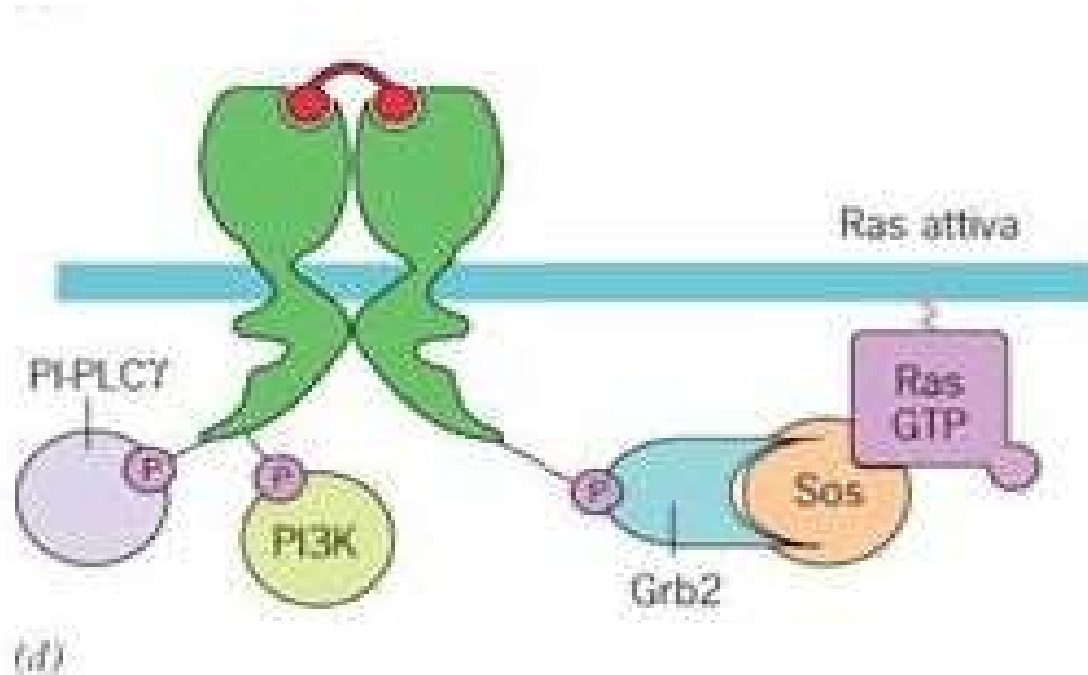


Chinasi
Proteine che modificano i lipidi
Tirosoina fosfatasi
Inibitori delle proteine G

Adattatori

Fattori trascrizionali

Alcune delle proteine reclutate dai recettori RTK che attivano diverse vie di segnalazione



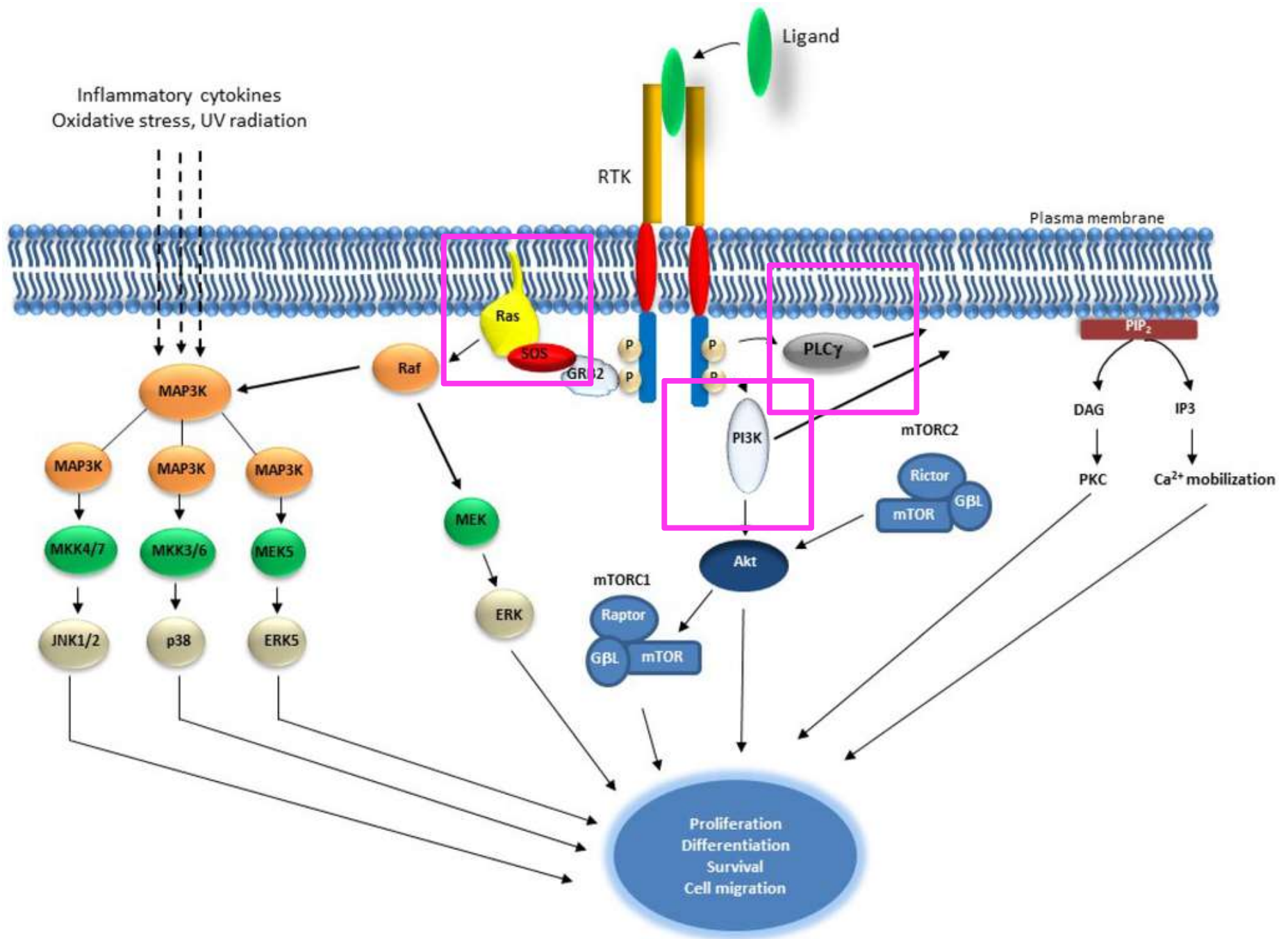
Via della
fosfolipasi C

Attivata anche dalle
proteine G
trimeriche

Via della
fosfatidil-
inositolo 3-chinasi

Attivata anche dalle
proteine G
trimeriche

Via di Ras

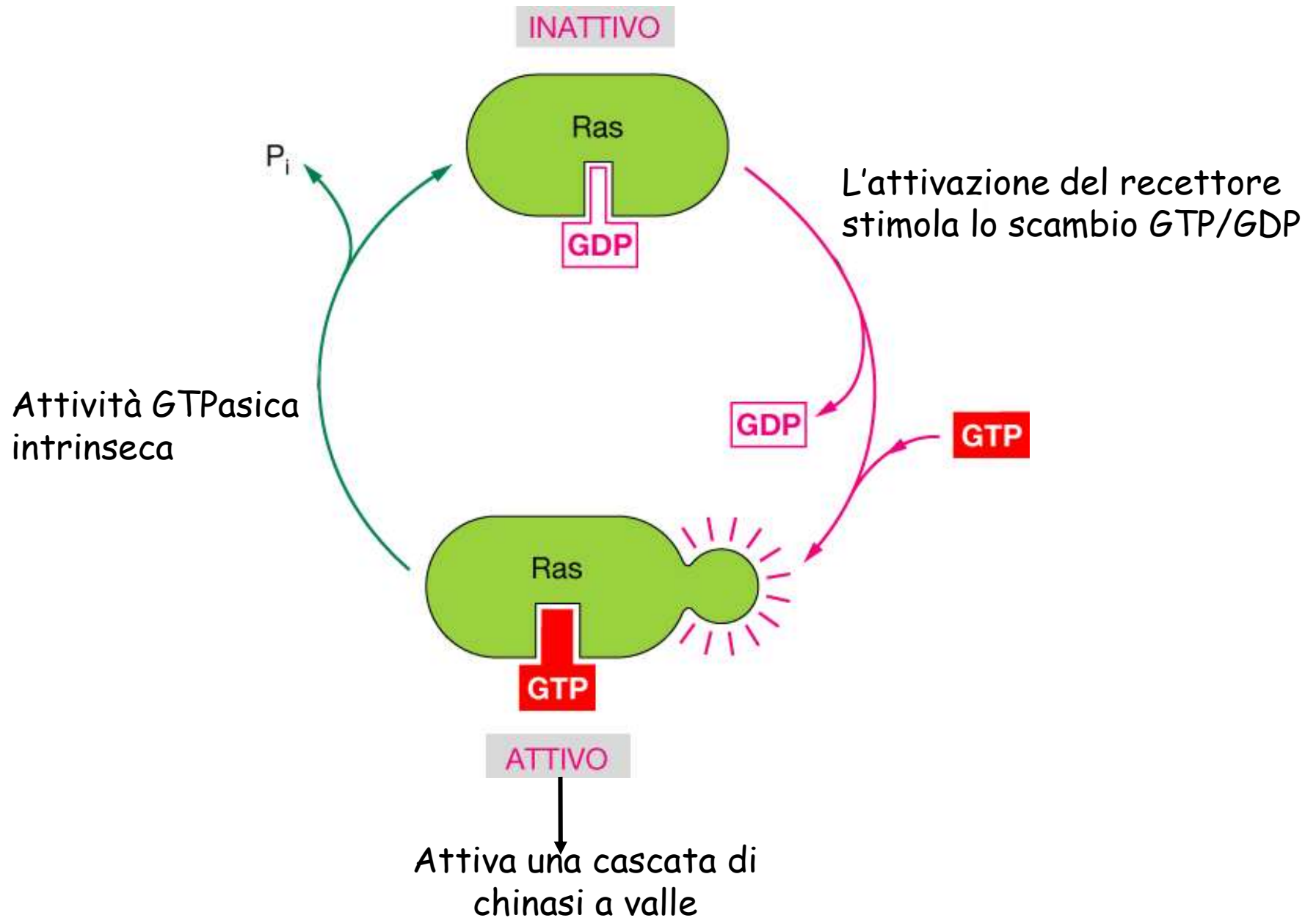


L'attivazione della via di **Ras** ha un ruolo importante nella **mitogenesi** (altamente conservata nel corso dell'evoluzione dal lievito ai mammiferi)

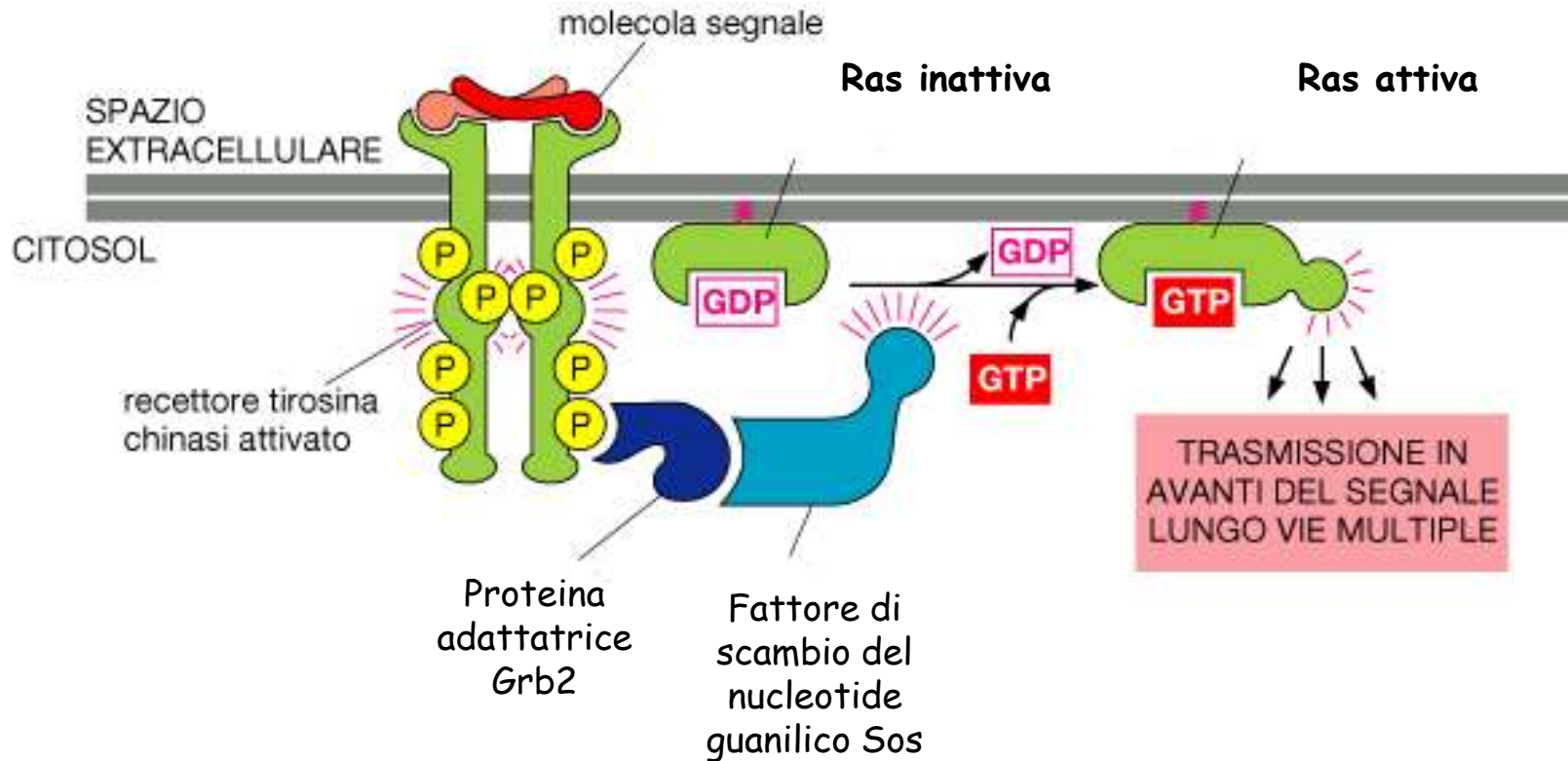
L'attivazione della via della **PI3K** ha un ruolo importante nella **sopravvivenza** e nella **crescita** cellulare

Via di Ras

La proteina **Ras** è una proteina G monomerica, che si attiva per legame di GTP ed ha attività GTPasica



L'attivazione di Ras da parte di un recettore tirosina chinasi attivato



Ras non è in grado da sola di sostituire il GDP con il GTP. Per questo utilizza il fattore di scambio **Sos**.

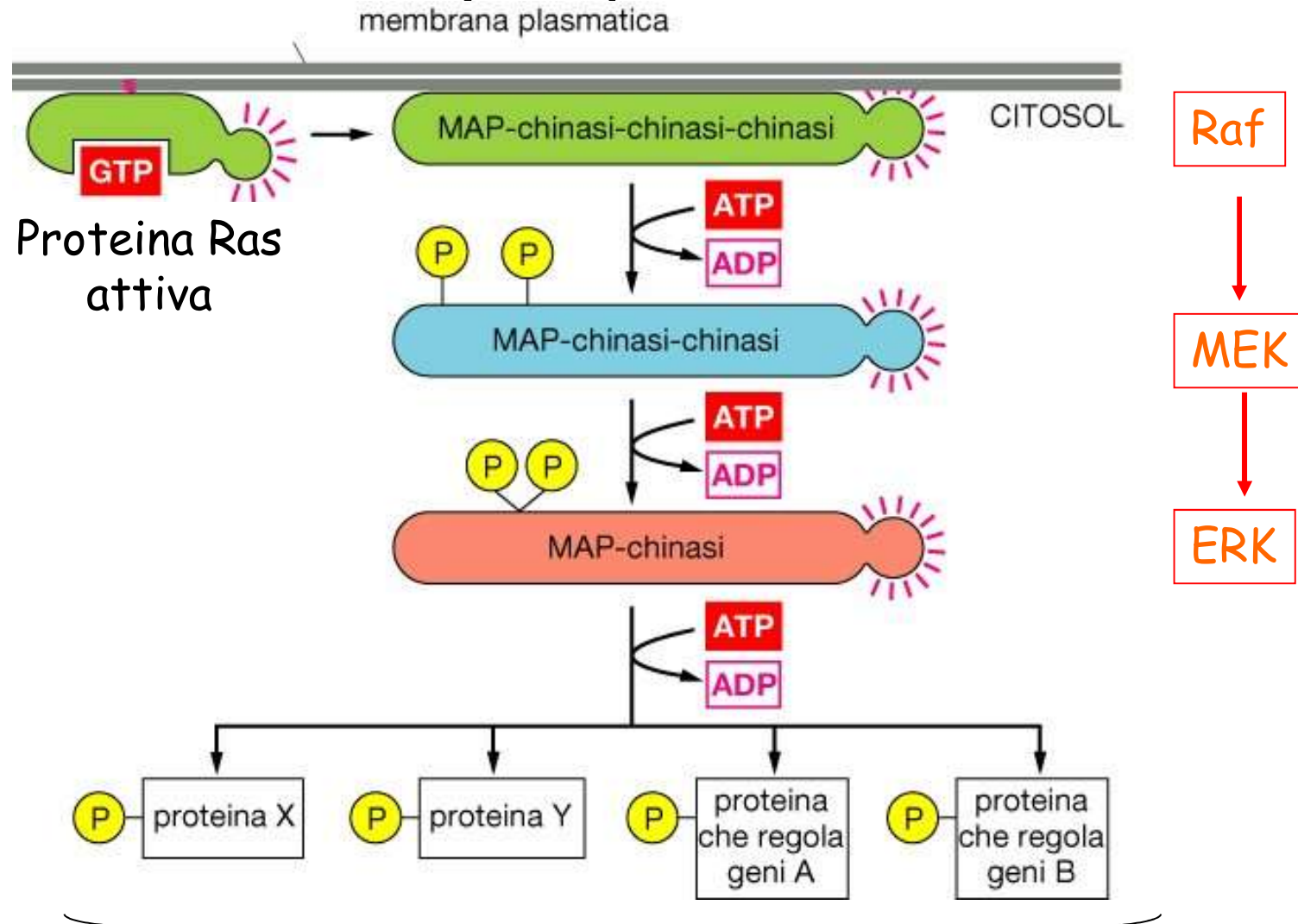
Sos è una proteina citoplasmatica presente in un complesso con la proteina adattatrice **Grb2**. Il complesso è reclutato dal recettore attivato tramite i domini SH2 di Grb2.

Ras attiva la via delle MAP chinasi (Mitogen Activated Protein Kinases)

Le MAP chinasi sono una famiglia di enzimi che si fosforilano e si attivano in cascata in risposta alla via di Ras

L'ultimo elemento della catena, dopo fosforilazione, entra nel nucleo, e fosforila fattori trascrizionali, attivandoli

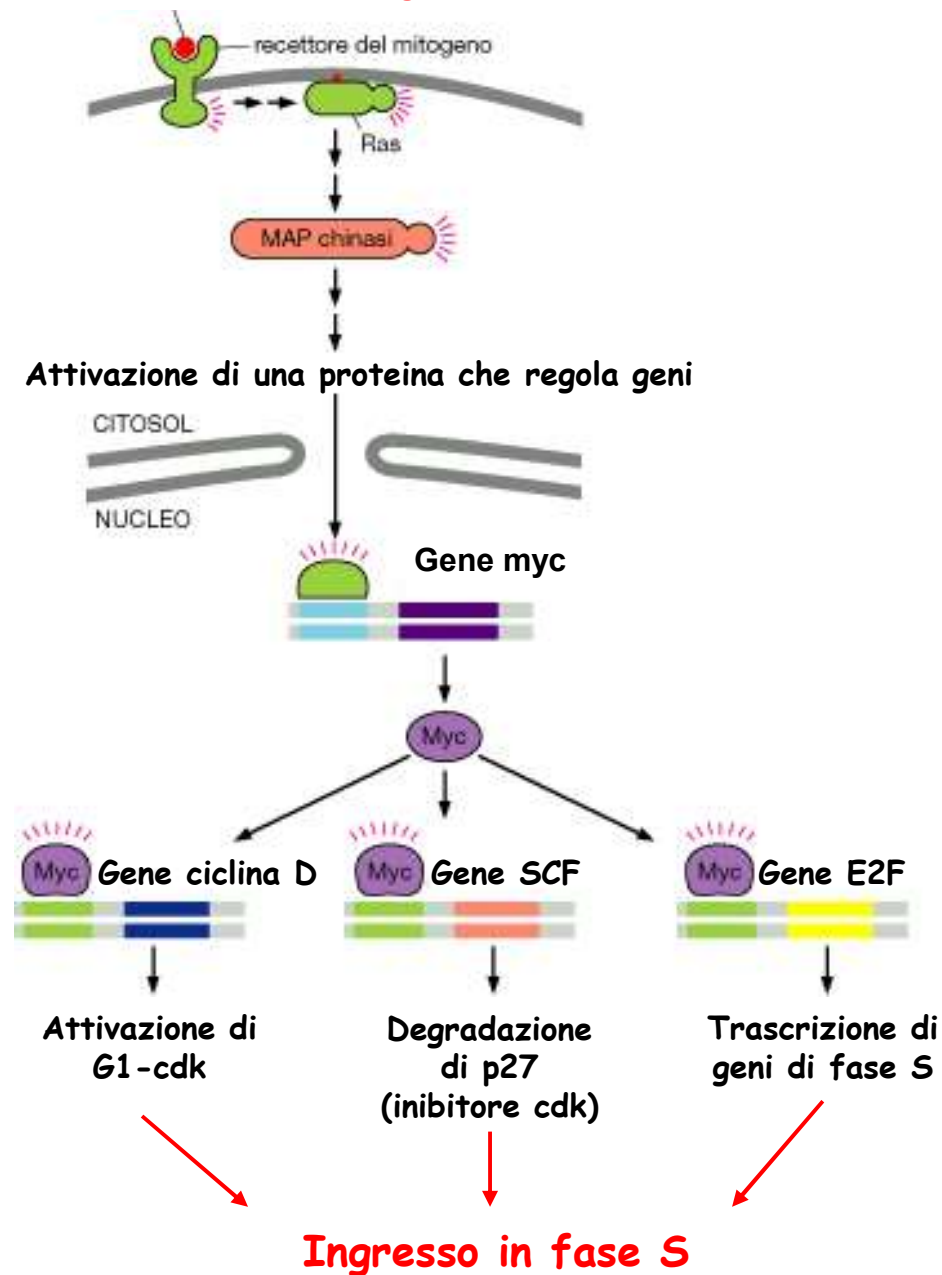
La cascata delle MAPK (Mitogen Activated Protein Kinases)



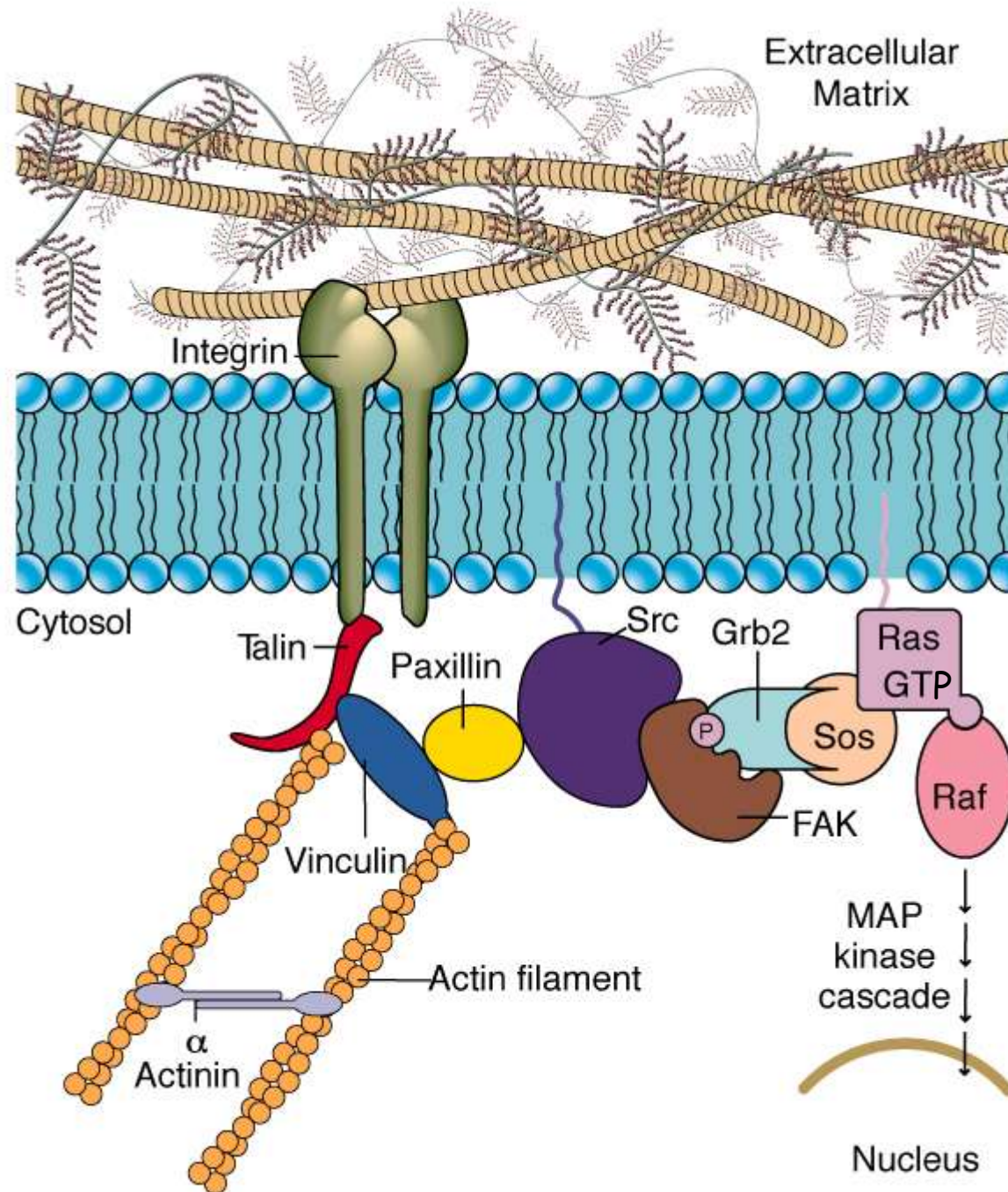
Attivazione di proteine e geni coinvolti nella crescita e nella proliferazione cellulare

Un modello semplificato di un modo in cui i mitogeni stimolano la divisione cellulare

Fattore di crescita (mitogeno)



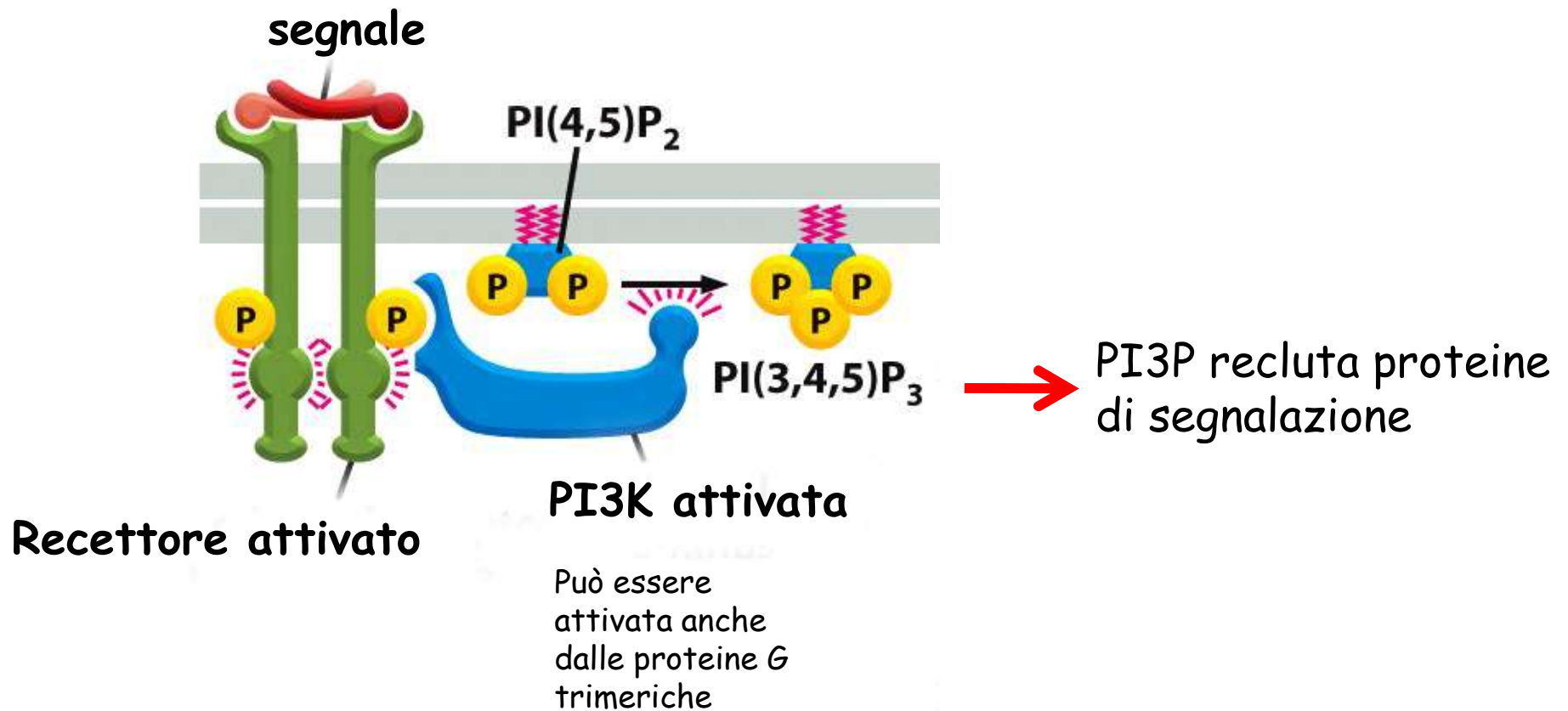
la via delle MAPK è attivata anche dalle integrine



Via della fosfatidil-inositolo 3-
chinasi

L'attivazione della via della fosfatidil-inositolo 3 chinasi (PI3K) ha un ruolo importante nella sopravvivenza e nella crescita cellulare

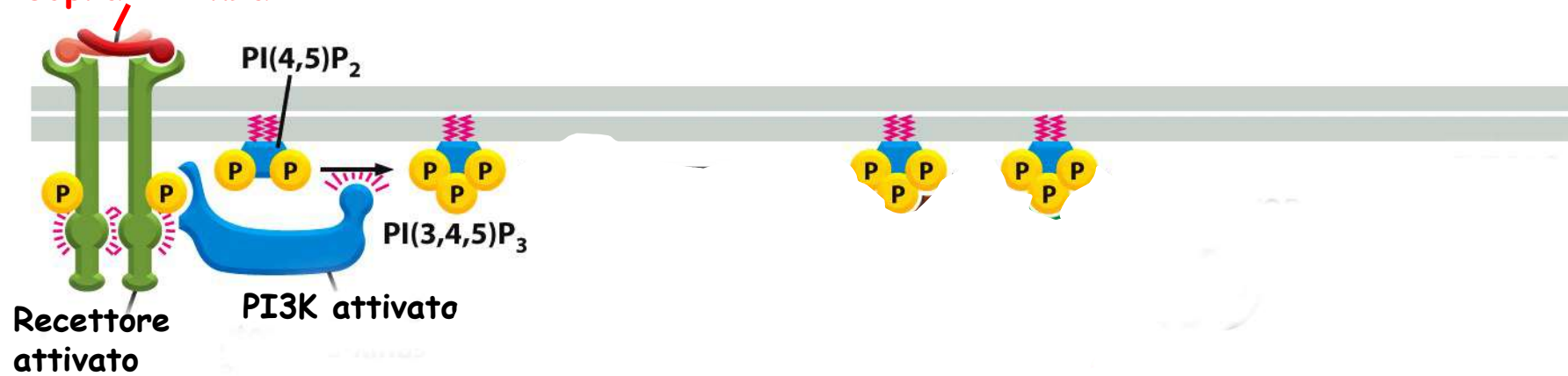
La PI3K fosforila il lipide fosfatidil inositolo



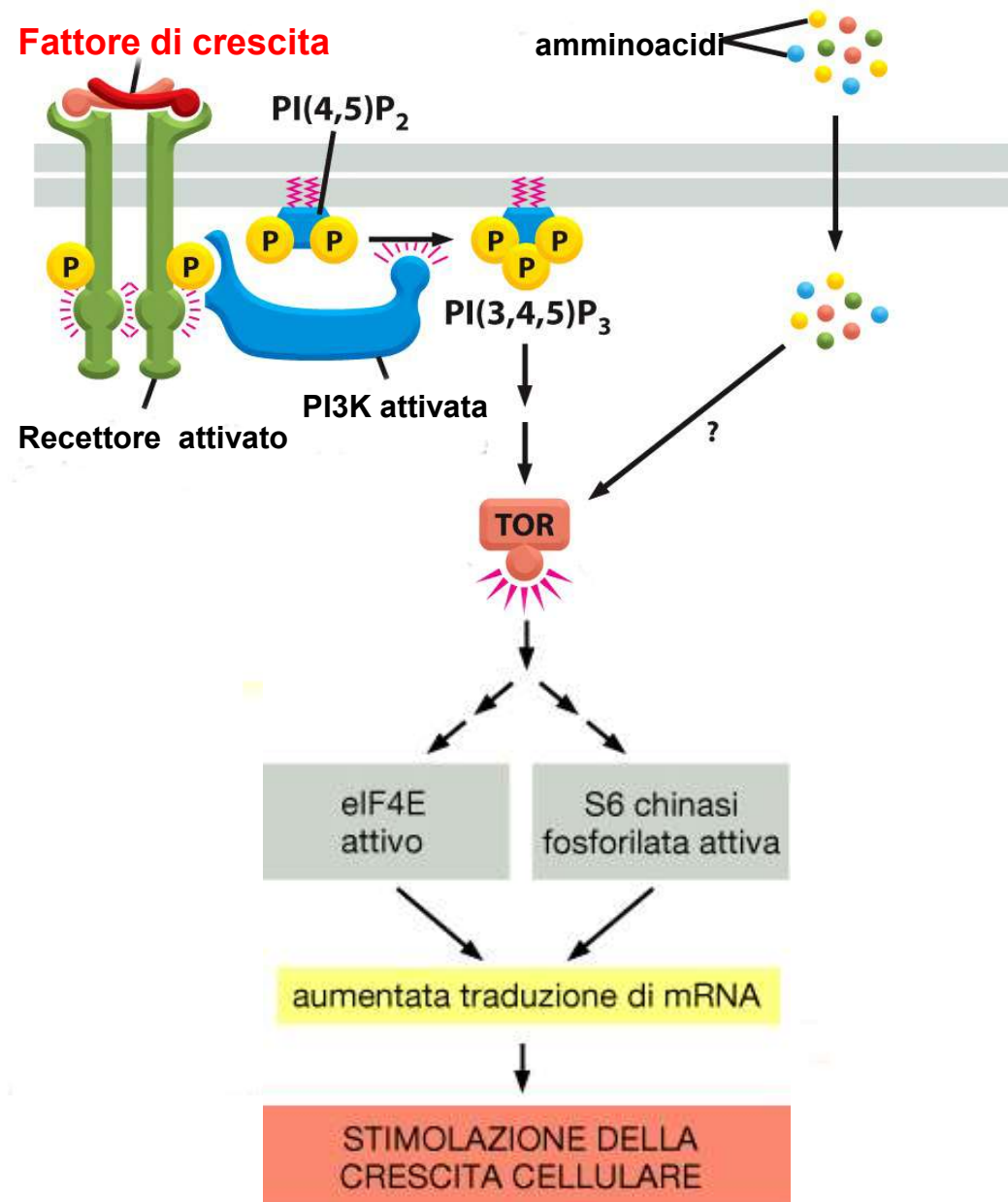
Un proteina chiave reclutata dal PI3P, critica per segnali di sopravvivenza cellulare, è la **serina/treonina chinasi AKT**

Un modo in cui la segnalazione tramite PI3K promuove la sopravvivenza (Chinasi Akt)

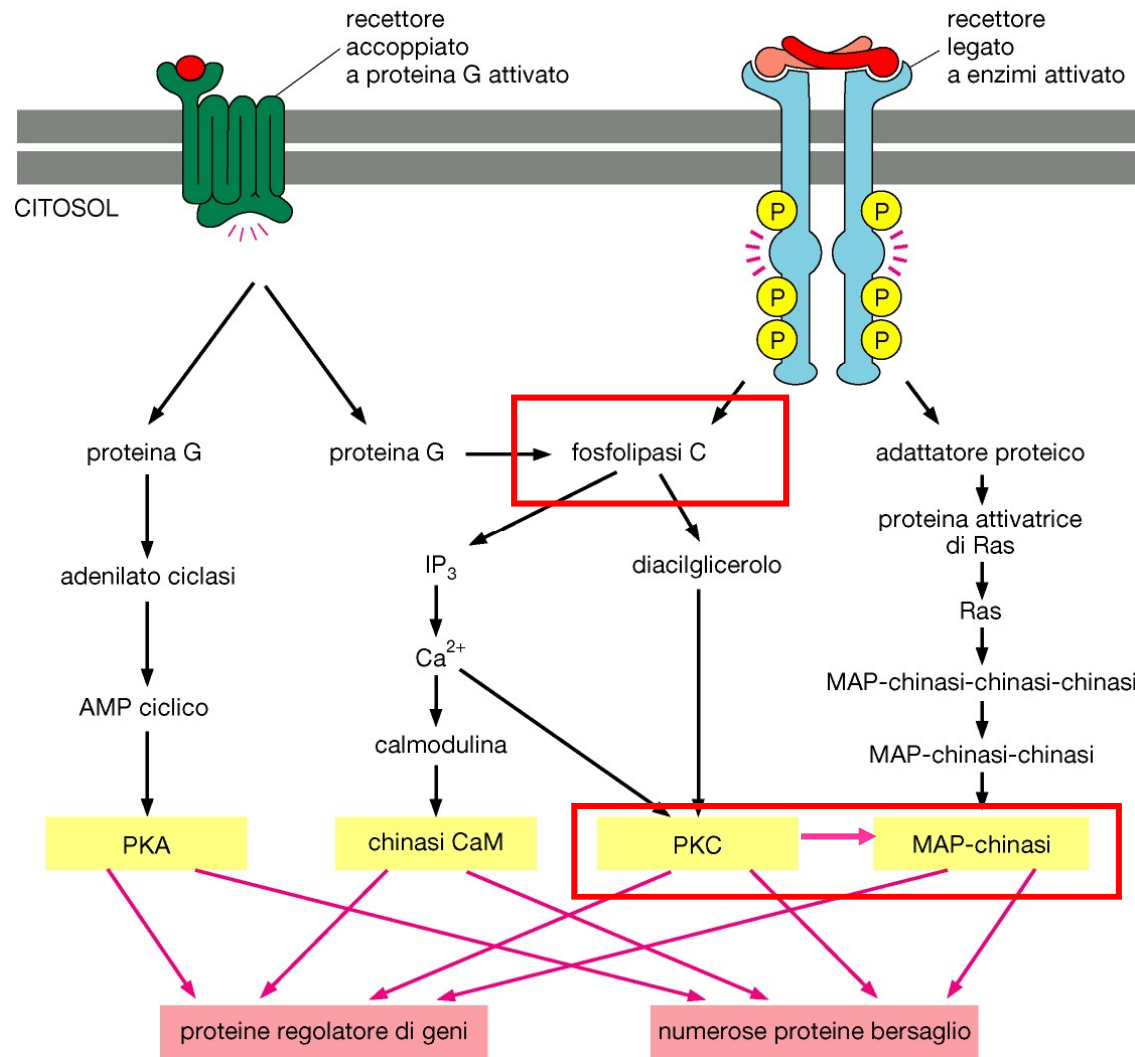
Segnale di sopravvivenza



Un altro modo con cui la segnalazione tramite PI3K promuove la sopravvivenza (chinasi TOR)

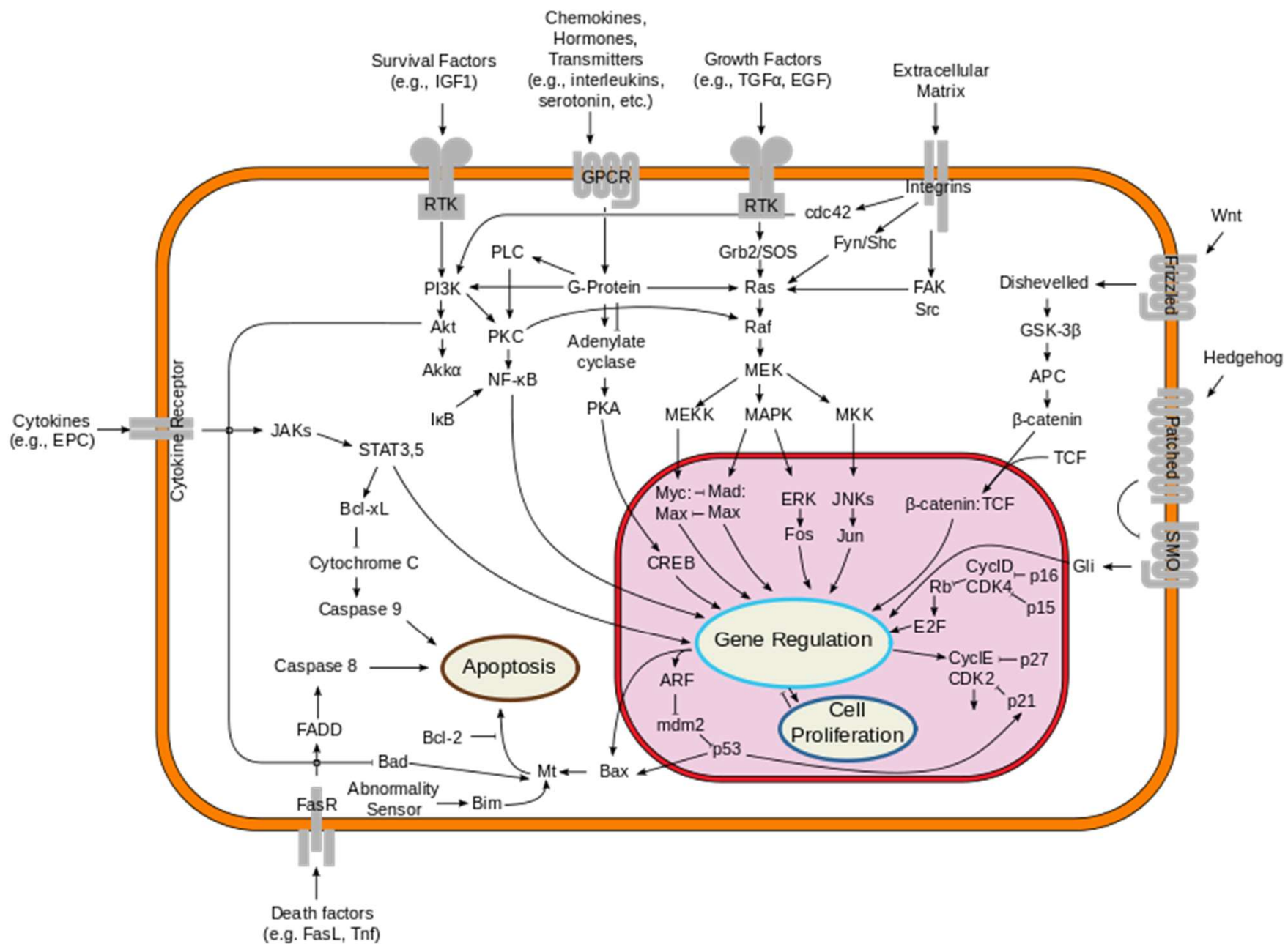


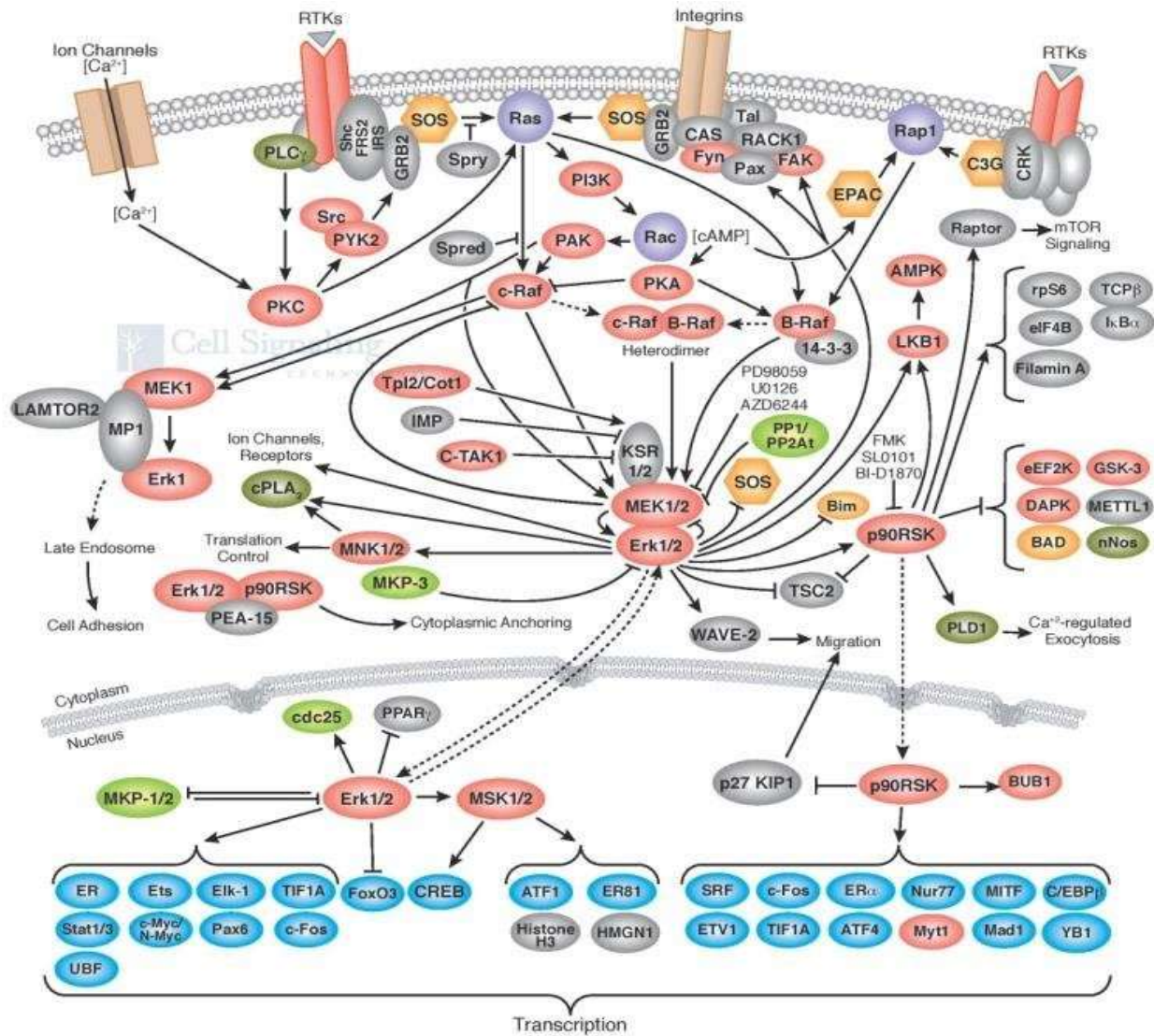
Convergenza, divergenza e interazione tra diverse vie di trasduzione del segnale



La **fosfolipasi C** è una proteina con dominio SH2, attivata anche dalla via dei recettori accoppiati a proteine G.

La PKC, attivata da Ca⁺⁺ e DAG, della via delle proteine G trimeriche, fosforila anche le MAPK, che solo così sono competamente attivate.





Pathway Diagram Keys

Kinase	Enzyme	G-protein	Direct Inhibitory Modification	Tentative Inhibitory Modification	Translocation
Phosphatase	pro-apoptotic	Acetylase	Multistep Stimulatory Modification	Separation of Subunits or Cleavage Products	Transcriptional Stimulatory Modification
Transcription Factor	pro-survival	Deacetylase	Multistep Inhibitory Modification	Joining of Subunits	Transcriptional Inhibitory Modification
Caspase	GAP/GEF	Ribosomal subunit	Direct Stimulatory Modification	Tentative Stimulatory Modification	
Receptor	GTPase				

Recettori associati a tirosin-chinasi
non recettoriali

RECETTORI ASSOCIATI A TIROSIN-CHINASI NON RECETTORIALI

- Sono recettori privi di attività chinastica intrinseca, ma associati a tirosi-chinasi citoplasmatiche.
- Comprendono i recettori per le **Interleuchine**: citochine attive su leucociti che controllano ampie parti della risposta immune.
(Interleuchina-2, Interleuchina-6, Interleuchina 10 Interferone a-b
Interferone g).

RECETTORI PER INTERLEUCHINE

(Interleuchina2, Interleuchina-6, Interferon gamma)

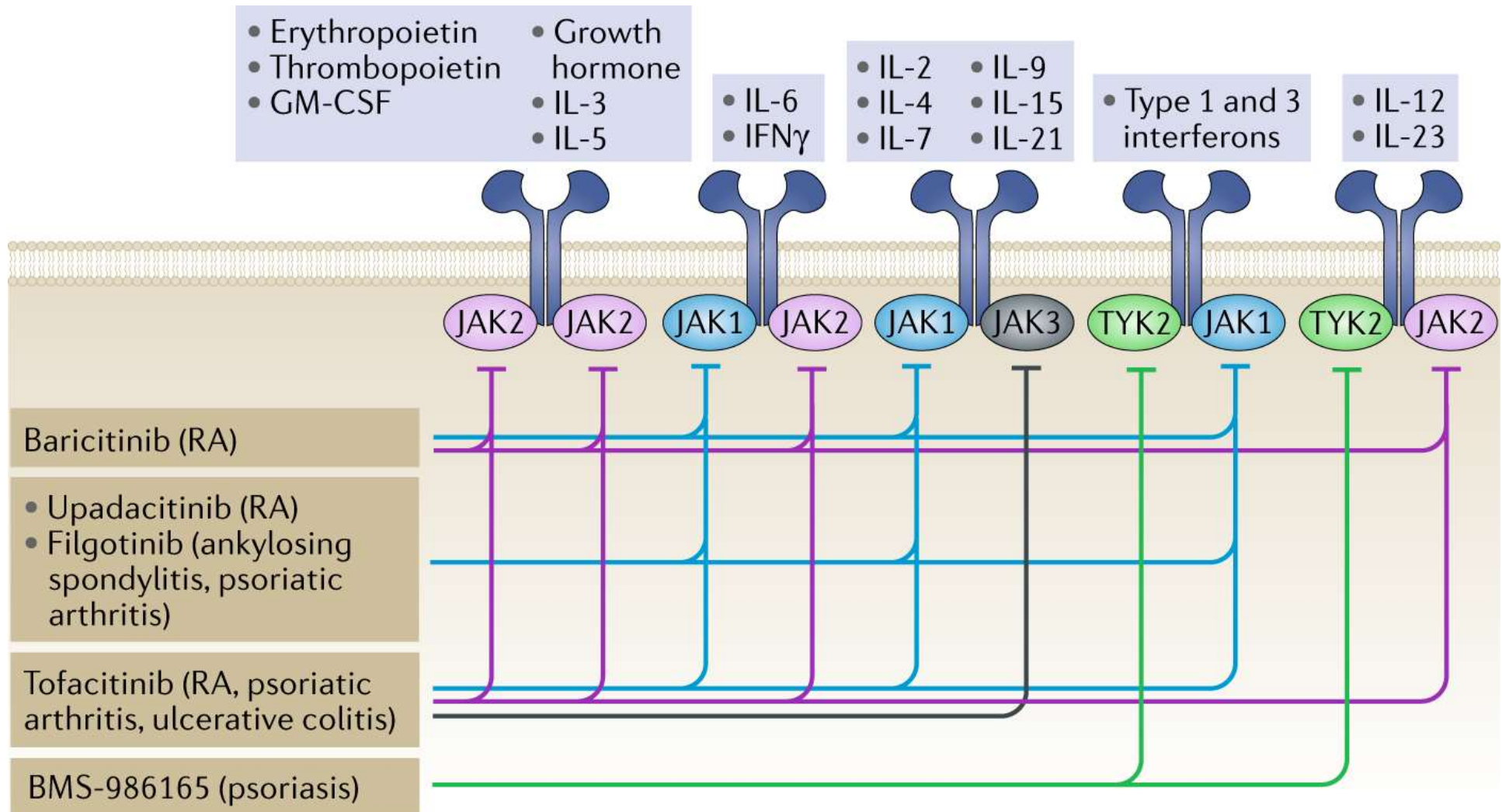
-
JAK (Janus kinase) è la tirosin-chinasi che si attiva a seguito della dimerizzazione del recettore e si trans-fosforila

Reclutamento e fosforilazione di **STAT** (Signal Transducer and Activator of Translation) che in seguito a fosforilazione dimerizza e trasloca al nucleo dove regola espressione

JAK heterodimers and homodimers important for the signalling of particular cytokines.

Cytokines		IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15, IL-21	EPO, TPO, GH	IL-3, IL-5, GM-CSF	IL-13, IL-6	IL-12, IL-23	Type 1 IFN (α/β)	Type 2 IFN (γ)
JAK heterodimers and homodimers*		JAK1 JAK3	JAK2 JAK3	JAK2 JAK2	JAK1 TYK2 JAK2	JAK2 TYK2	JAK1 TYK2	JAK1 JAK2
Inhibition†	JAK1	+	-	-	+	-	+	+
	JAK2	-	+	+	+	+	-	+
	JAK3	+	-	-	-	-	-	-
	TYK2	-	-	-	+	+	+	-

Le JAK lavorano come omo- ed eterodimeri



Selective Janus kinase inhibitors come of age

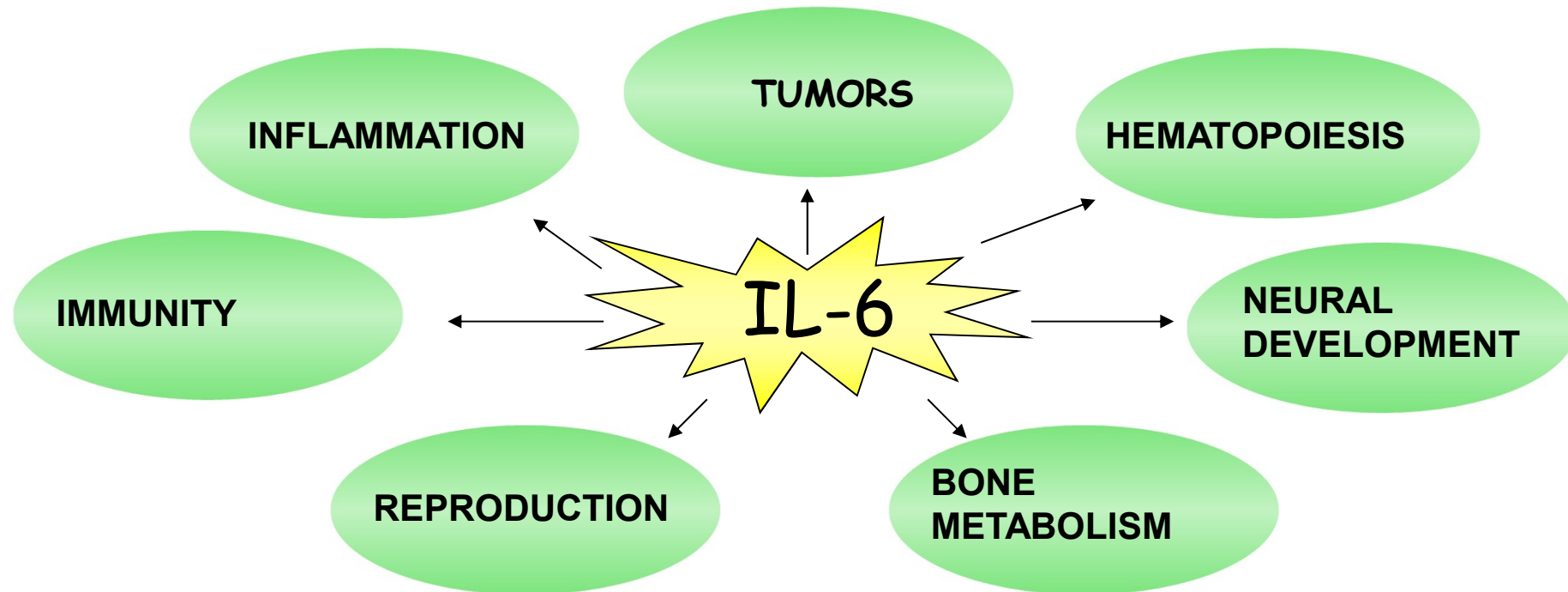
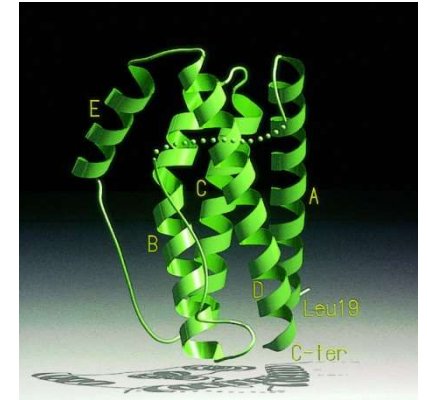
John J. O'Shea & Massimo Gadina

Nature Reviews Rheumatology volume 15, pages74-75(2019)

Interleukin-6

Pleiotropic cytokine with multiple functions

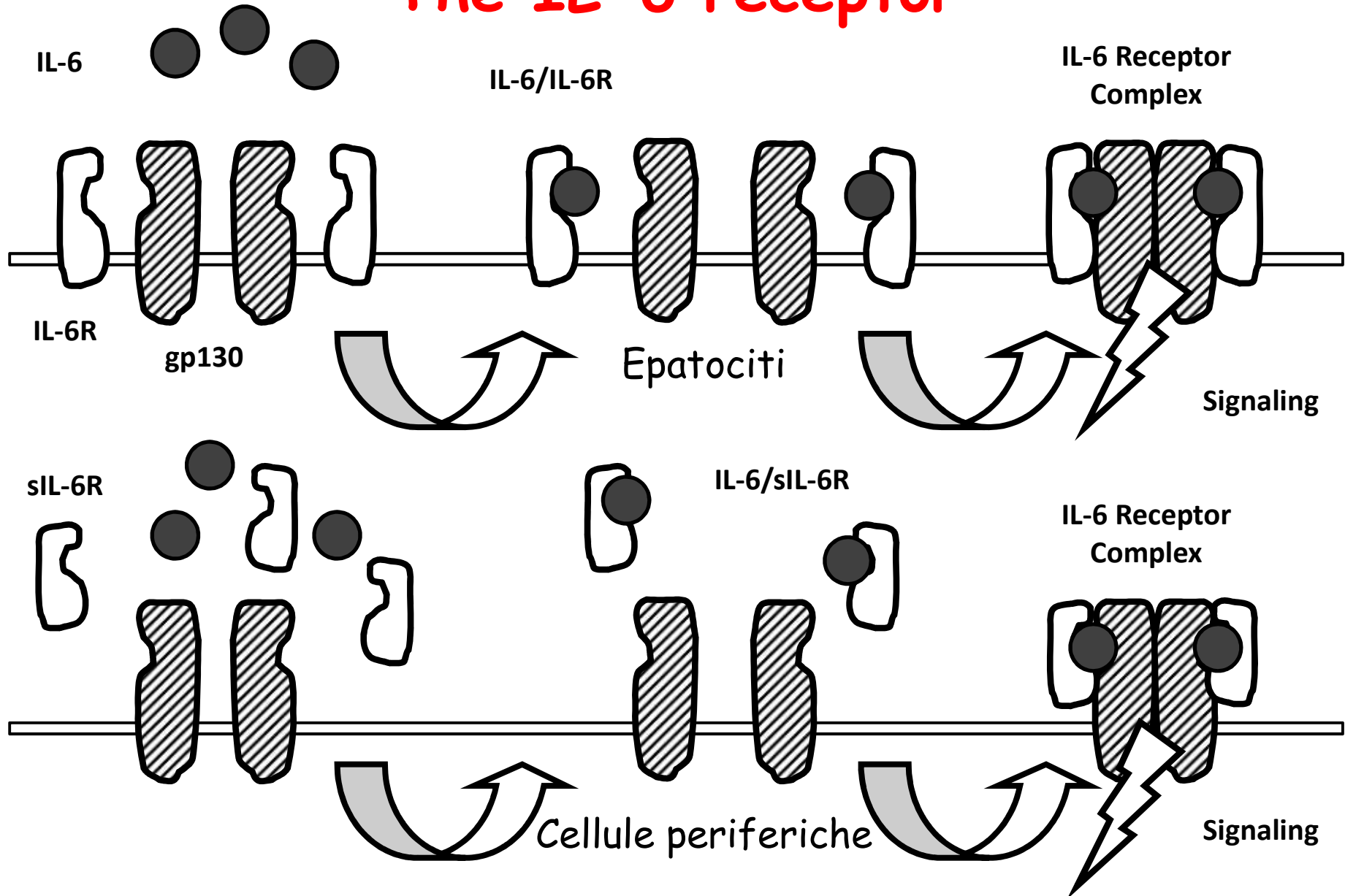
Pivotal role in both innate and adaptive immune responses



Phase acute response

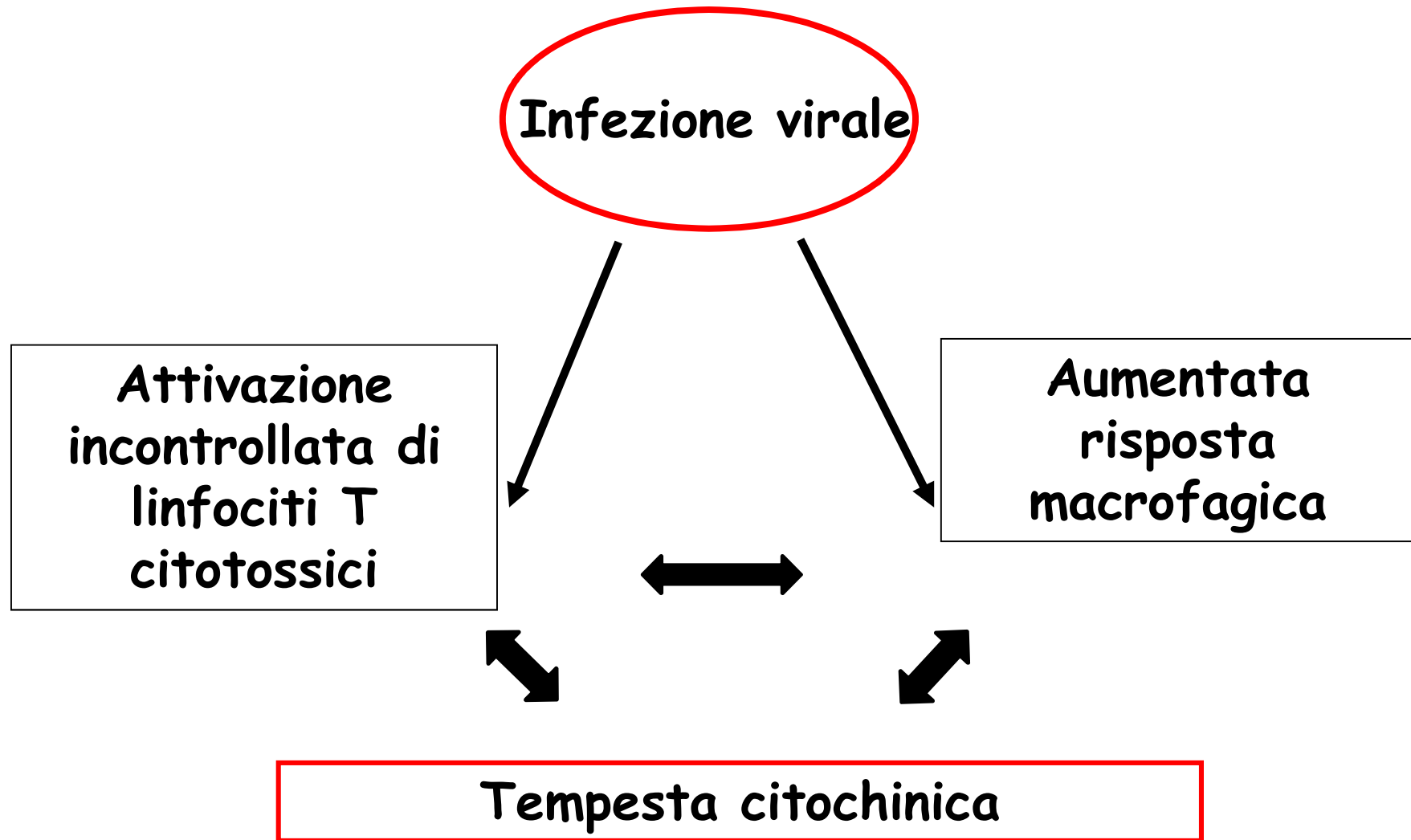
Transition between acute and chronic inflammation

The IL-6 receptor



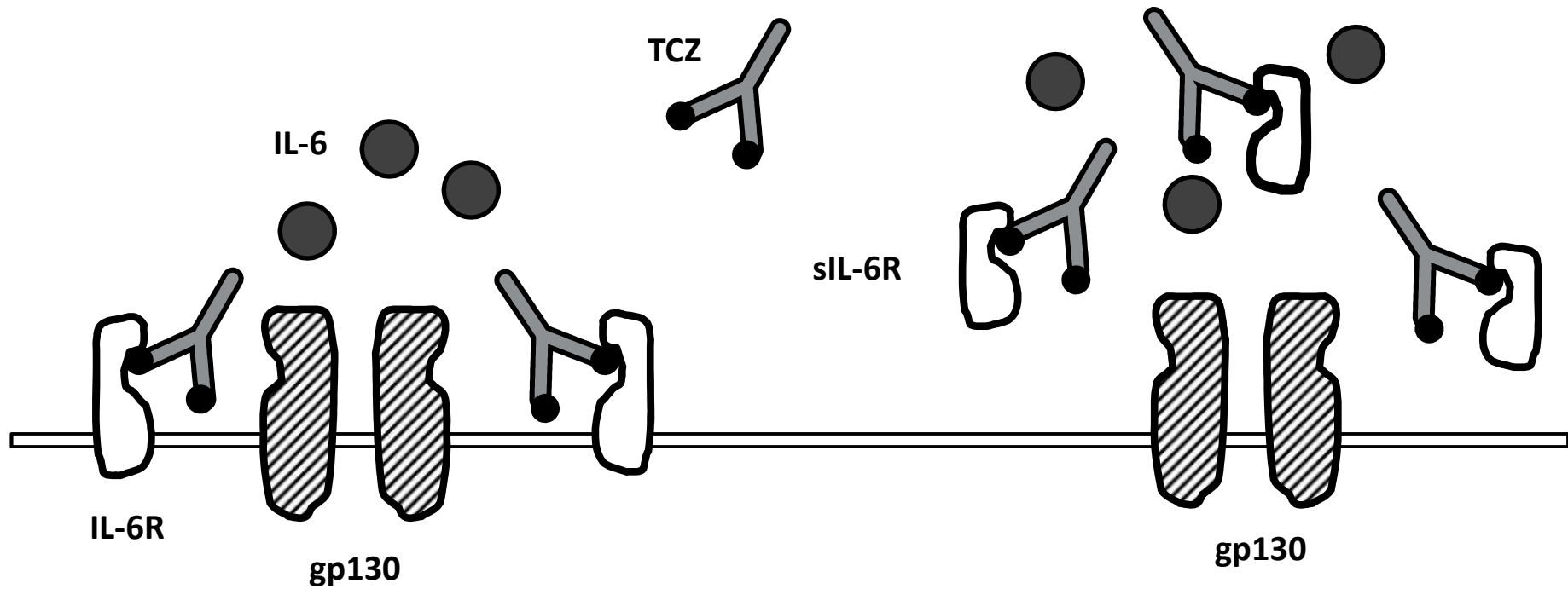
Linfoistocitosi Emofagocitica

(with possible implication in COVID-19 infection)



Tocilizumab (TCZ)

A humanized MoAb against the IL-6R



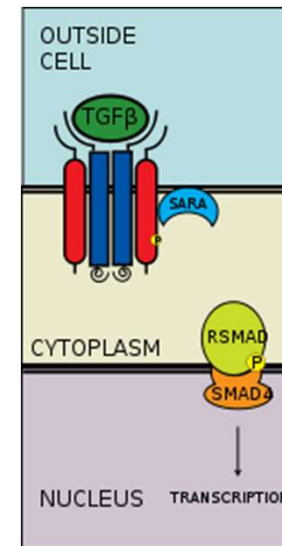
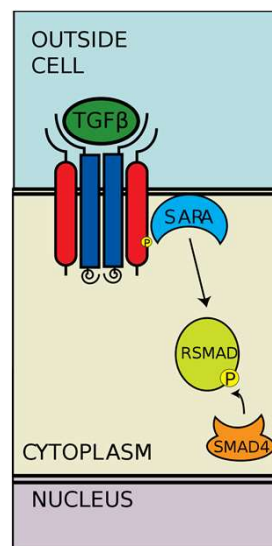
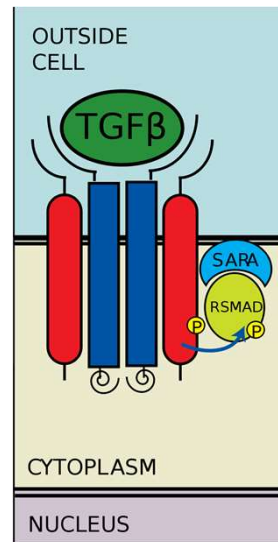
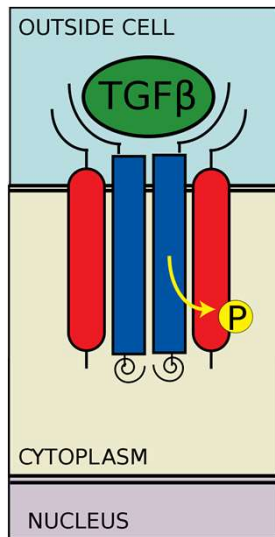
MoAb = monoclonal antibody

Based on: De Benedetti F, & Martini A, *Arthritis Rheum* 2005; **52**:685–693.

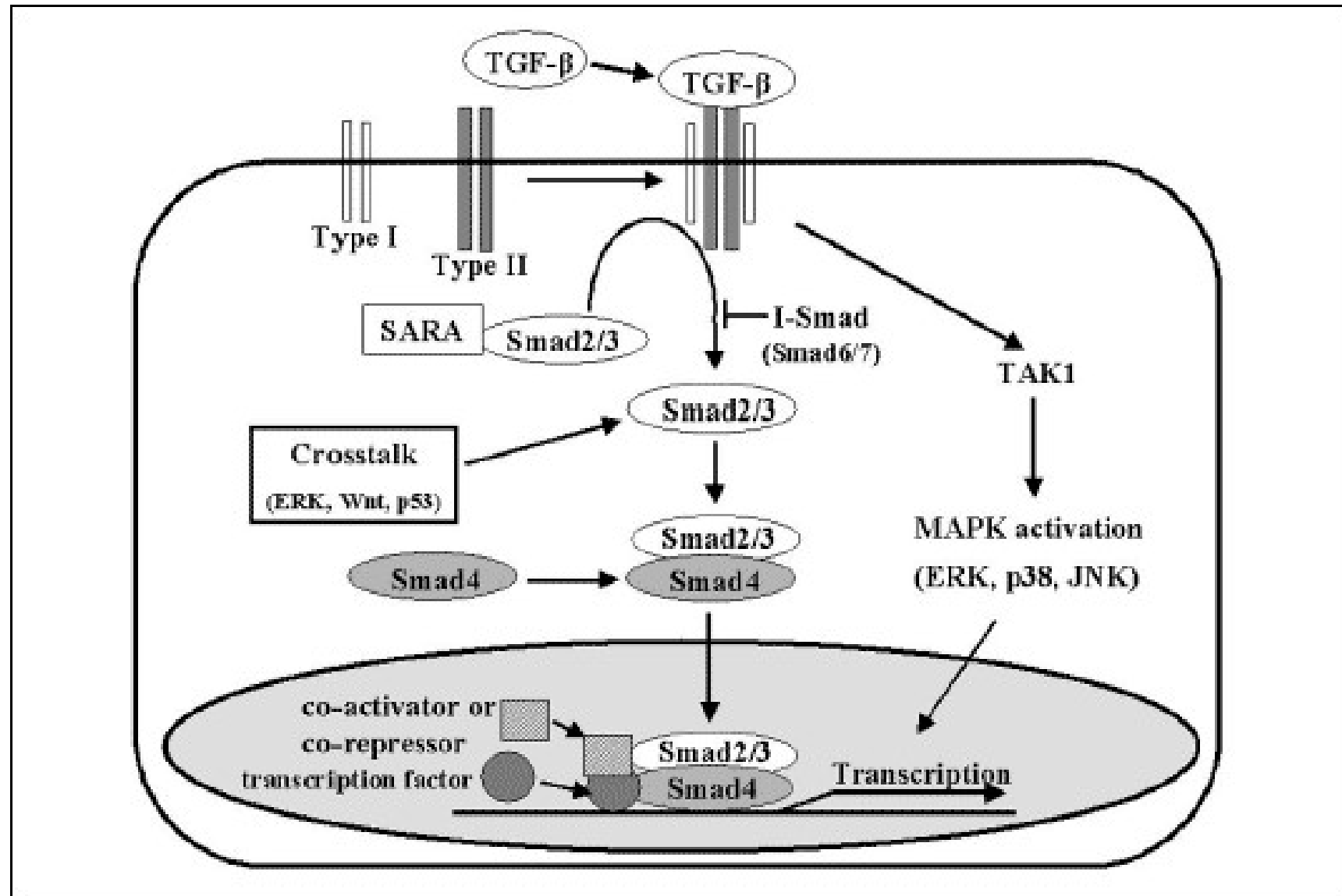
Recettori con attività serina-treonina
chinasi

- Il Transforming growth factor β (TGF β) è la citochina principale che regola la produzione di matrice extracellulare (ECM)
- Regola genesi della FIBROSI in tutti gli organi.
- Induce transizione epitelio mesenchima (EMT).
- Ha un ruolo importante nella tumorigenesi.

Il recettore per il TGF β è un eterodimero composto di due subunità, RI e RII. Una volta attivati, si trans-fosforilano in serina e reclutano e fosforilano le SMADs che traslocano al nucleo e agiscono come fattori di trascrizione.



La famiglia di recettori TGF β regola sviluppo, fibrosi, sviluppo del sistema immunitario e ha un ruolo nella tumorigenesi



Mutazioni a carico della fibrillina, una proteina che controlla l'attivazione di $TGF\beta 1$ inducono la sindrome di Marfan (Autosomica dominante)

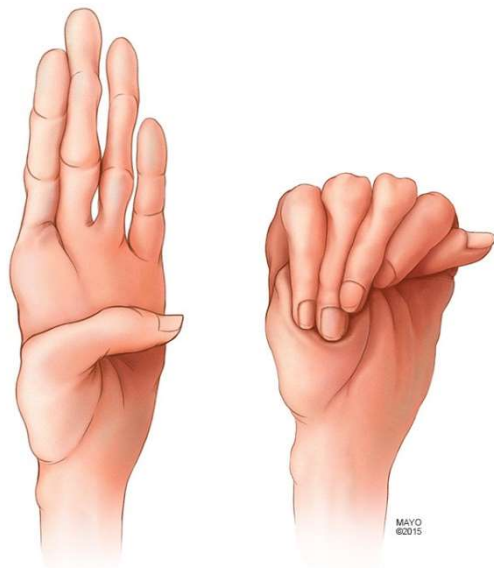
Loeys-Dietz syndrome: alterazione a carico di TGFBR2

Sindrome di Marfan:

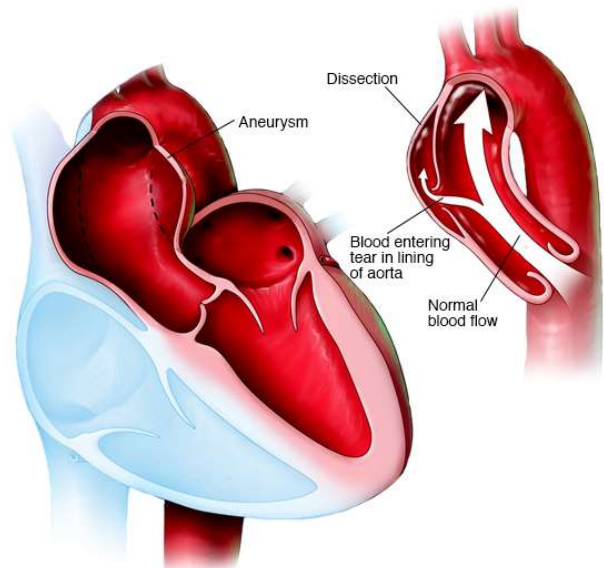
Dislocazione del cristallino
Ipermobilità delle articolazioni
Aracnodattilia
Aneurisma dissecante dell'aorta

Sindrome di Marfan

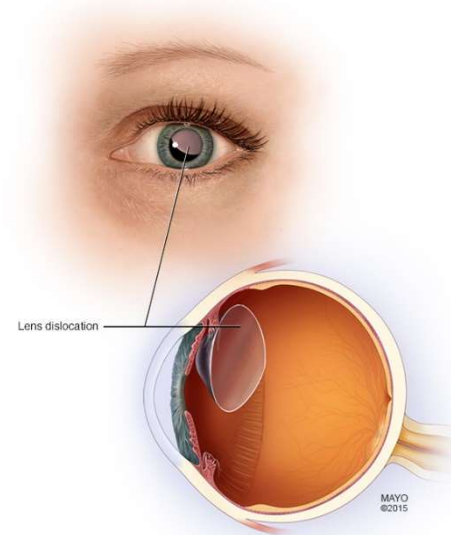
Aracnodattilia



Aneurisma dissecante aortico



Dislocazione del cristallino



© MAYO FOUNDATION FOR MEDICAL EDUCATION AND RESEARCH. ALL RIGHTS RESERVED.

Distacco della retina

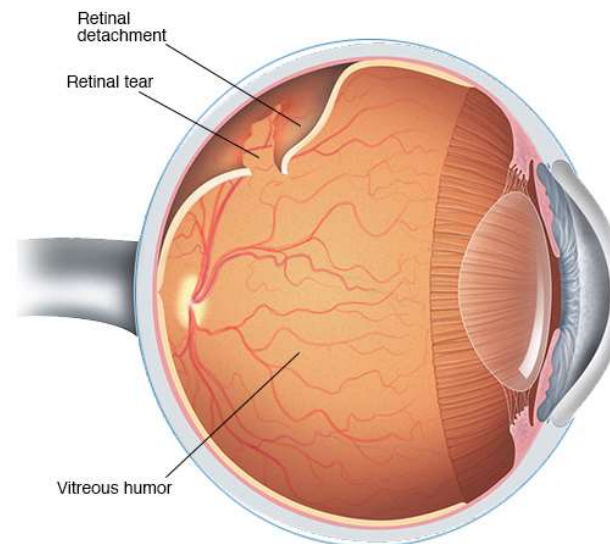
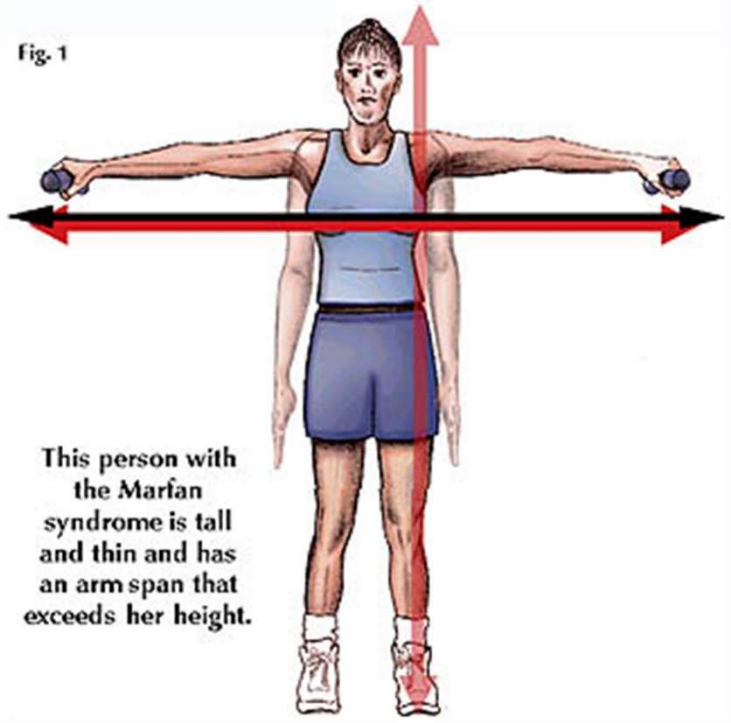
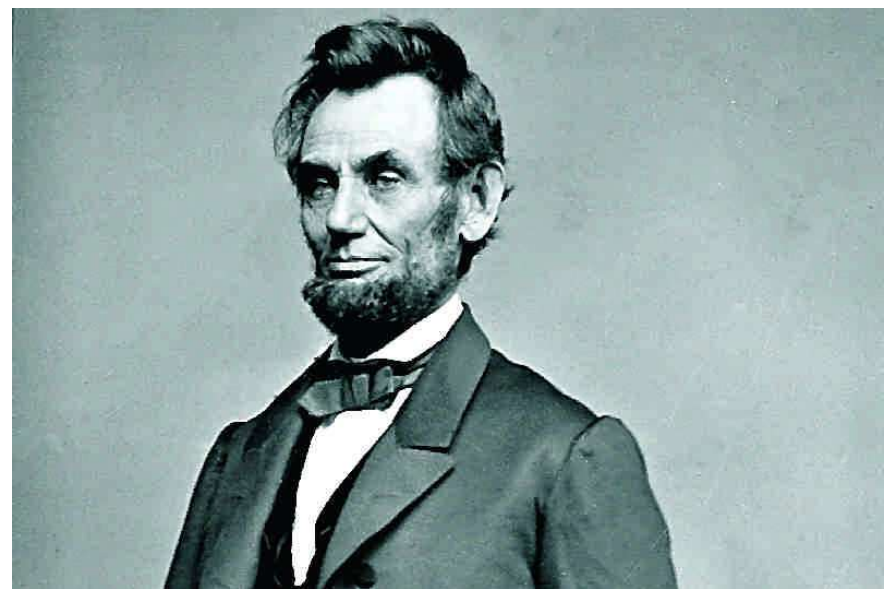


Fig. 1



This person with the Marfan syndrome is tall and thin and has an arm span that exceeds her height.



Lezione 15 maggio 2023

Token 32137

APOPTOSI

La **morte cellulare programmata** è regolata da una complessa rete di segnali

alcuni agiscono inducendo la morte della cellula mentre altri ne promuovono la sopravvivenza

Ruolo della Morte Cellulare

- Danno cellulare e infezione
- Risposta allo stress e al danno DNA
- Regolazione del sistema immunitario
- Sviluppo
 - Morfogenesi
 - Organogenesi
- Mantenimento dell'omeostasi tissutale
 - Intestino, Pelle, Sangue, etc..

Ruolo della Morte Cellulare

- **Malattie**
 - Cancro
 - Neurodegenerazione, Alzheimer's, Parkinson's
 - Autoimmunità, Lupus
- **Infezioni**
 - HIV, Influenza, EBV
- **Infarto**
 - Cardiaco, Ischemia

Morte Cellulare e Patologie

Diminuzione della Morte Cellulare

- **Cancro** (incontrollata proliferazione cellulare)
- **Infezioni Croniche** (Adenovirus ed Herpes virus)

Morte Cellulare e Patologie

Aumento della Morte Cellulare

- **Neurodegenerazione** (Parkinson ed Alzheimer)
- **Ischemia Cerebrale** (in seguito a riperfusione)
- **Autoimmunità** (Lupus; linfociti B producono anticorpi che riconoscono il self)
- **AIDS**

Necrosi

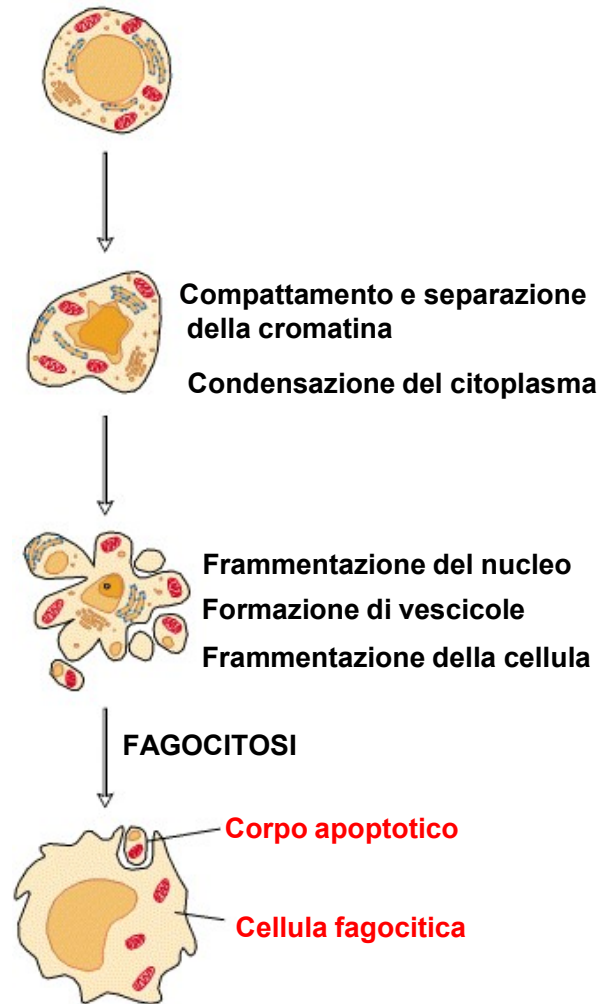
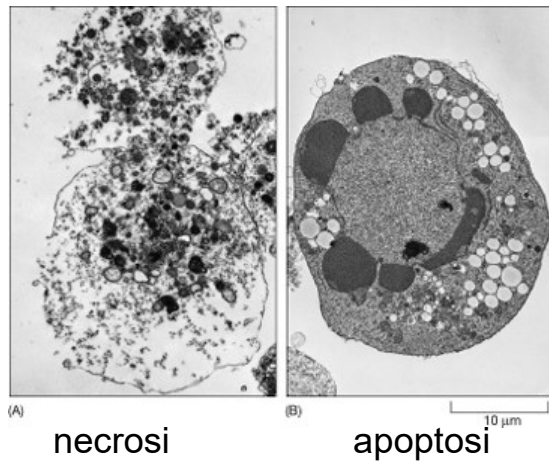
Morte cellulare incontrollata

- Rigonfiamento cellulare e di tutti i compartimenti
- Permeabilità alterata della membrana
- Lisi cellulare con rilascio di enzimi lisosomiali nel fluido extracellulare
- **Infiammazione**

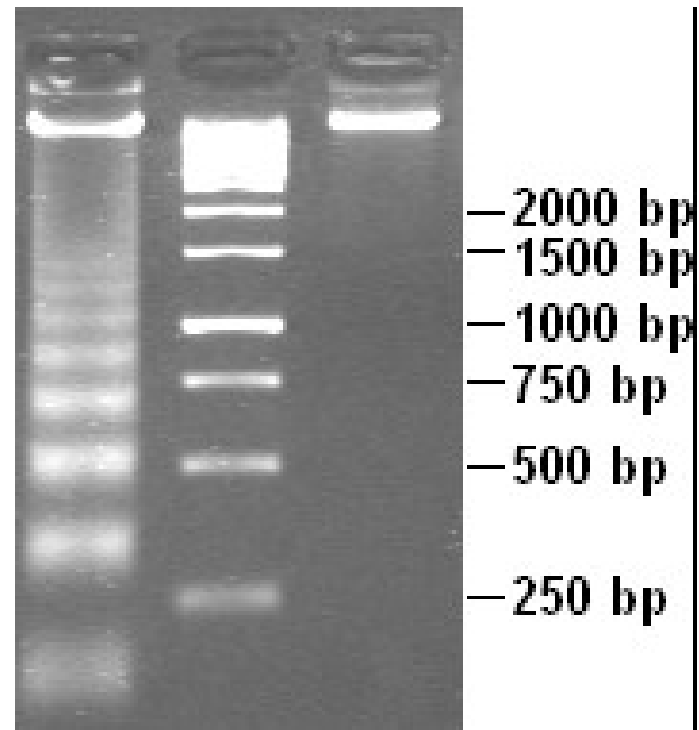
Apoptosi

Morte cellulare programmata

- Perdita dei contatti cellulari
- Condensazione citoplasmatica e riduzione del volume cellulare
- Permeabilità normale della membrana
- Cromatina condensata in tipici aggregati granulari
- Frammentazione tipica della cromatina
- Frammentazione della cellula in corpi apoptotici senza rilascio di citoplasma
- Esposizione della fosfatidilserina
- **Infiammazione assente**



Ladder apoptotico

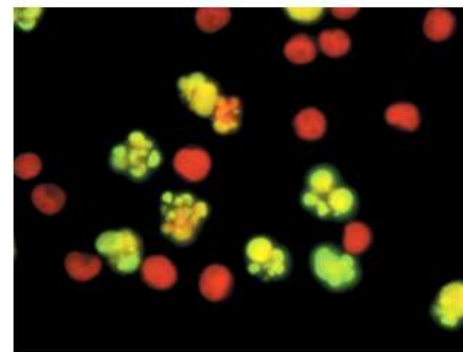
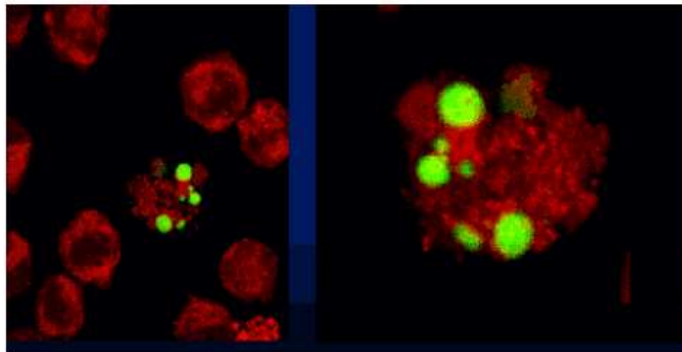
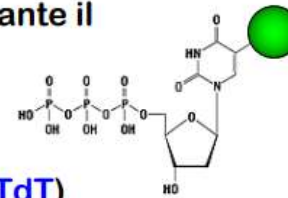


Saggio TUNEL (TdT-mediated dUTP Nick End Labelling)

Marcatura delle **estremità dei frammenti di DNA** generati durante il processo apoptotico con **dUTP** coniugato ad un **fluorocromo** (ad es. **FLUORESCEINA verde = FITC**).

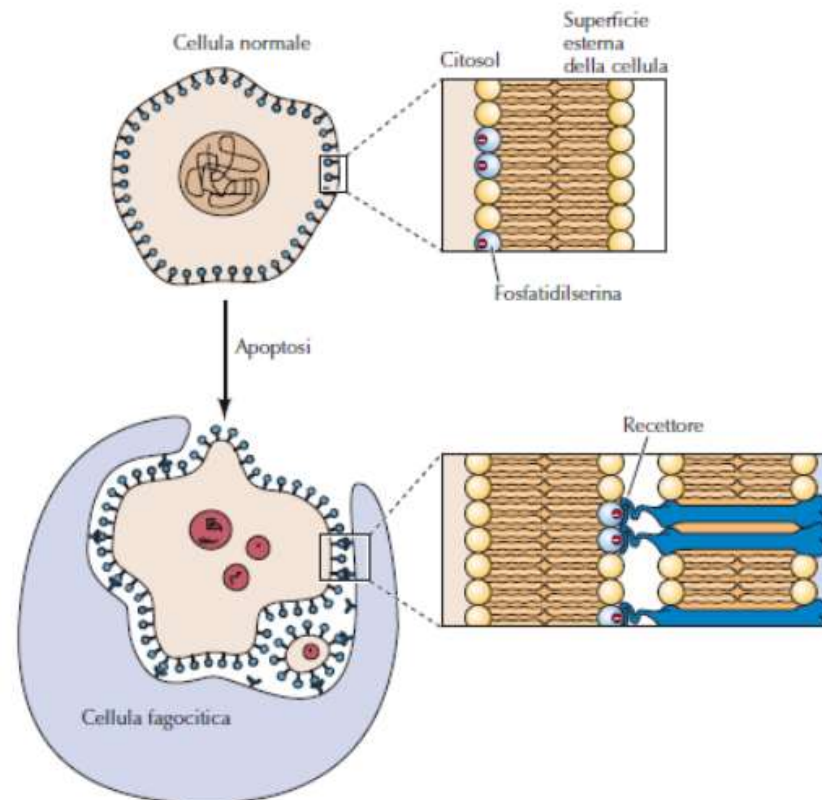
Viene fornito l'**enzima terminal desossinucleotidil transferasi (TdT)**

La fluorescenza può poi essere visualizzata al **microscopio**, oppure mediante lettore o **FACS**

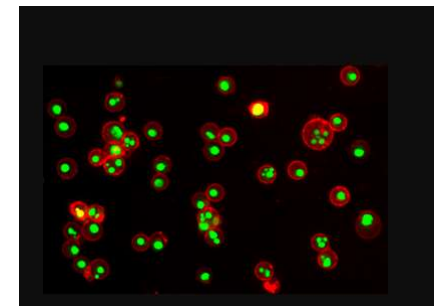
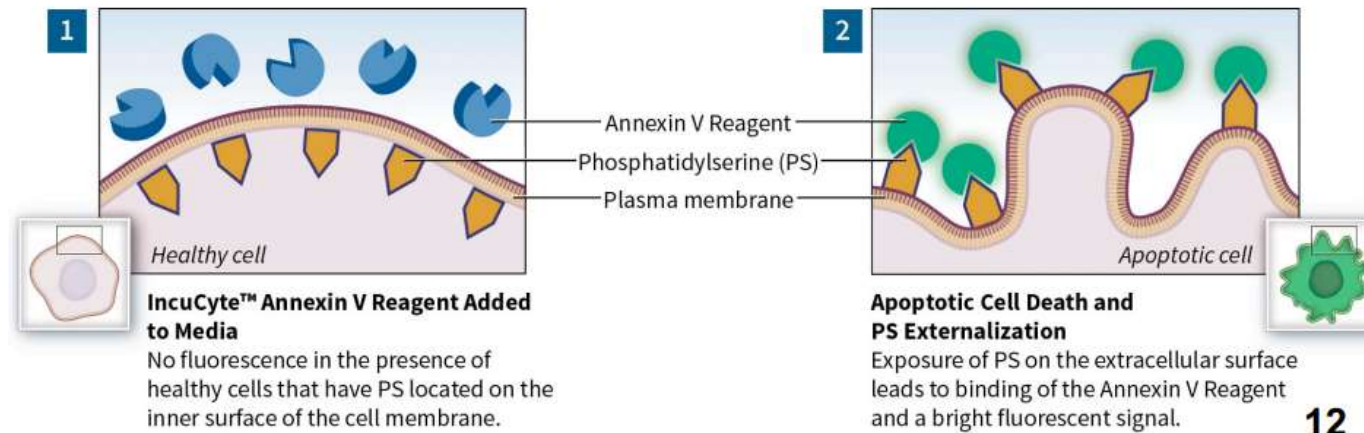


Il **DNA** è contro-colorato con **Propidio Ioduro (rosso)** per visualizzare tutti i nuclei

L'esposizione della **fosfatidil-serina** sul versante extracellulare della membrana funziona da segnale "eat me"



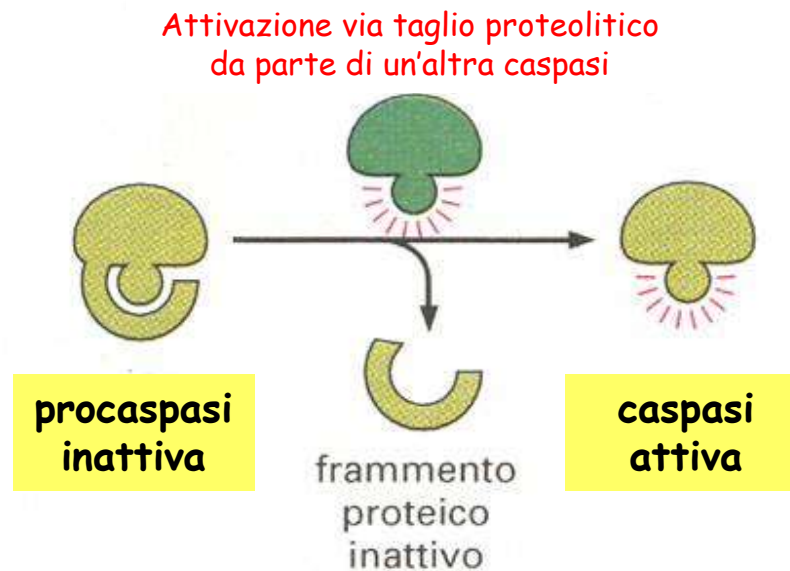
Le cellule apoptotiche espongono **fosfatidilserina** (PS) sul foglietto esterno della membrana plasmatica. L'**annexina V** lega la PS
Visualizzazione della PS mediante colorazione con **ANNEXINA V** coniugata a un fluorocromo (qui FITC)



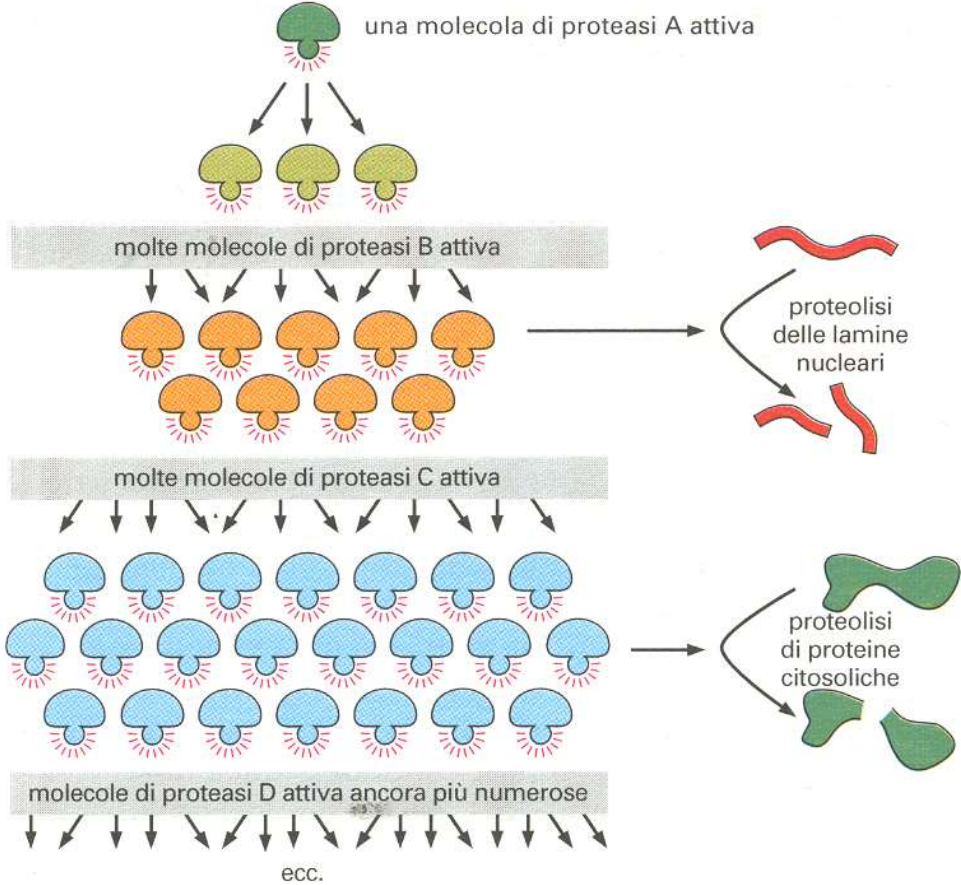
Annexina V: proteina calcio dipendente ad alta affinità per la PS

Il macchinario intracellulare responsabile dell'apoptosi dipende dall'attivazione di una famiglia di proteasi chiamate **caspasi**

C = cisteina nel centro reattivo; **ASP** = riconoscono un residuo di acido aspartico nell'ambito di una sequenza di 4 amminoacidi; **ASI** = sono enzimi proteolitici



La cascata delle caspasi attiva l'apoptosi



L'attivazione delle caspasi può essere innescata attraverso
due strade

LA VIA ESTRINSECA

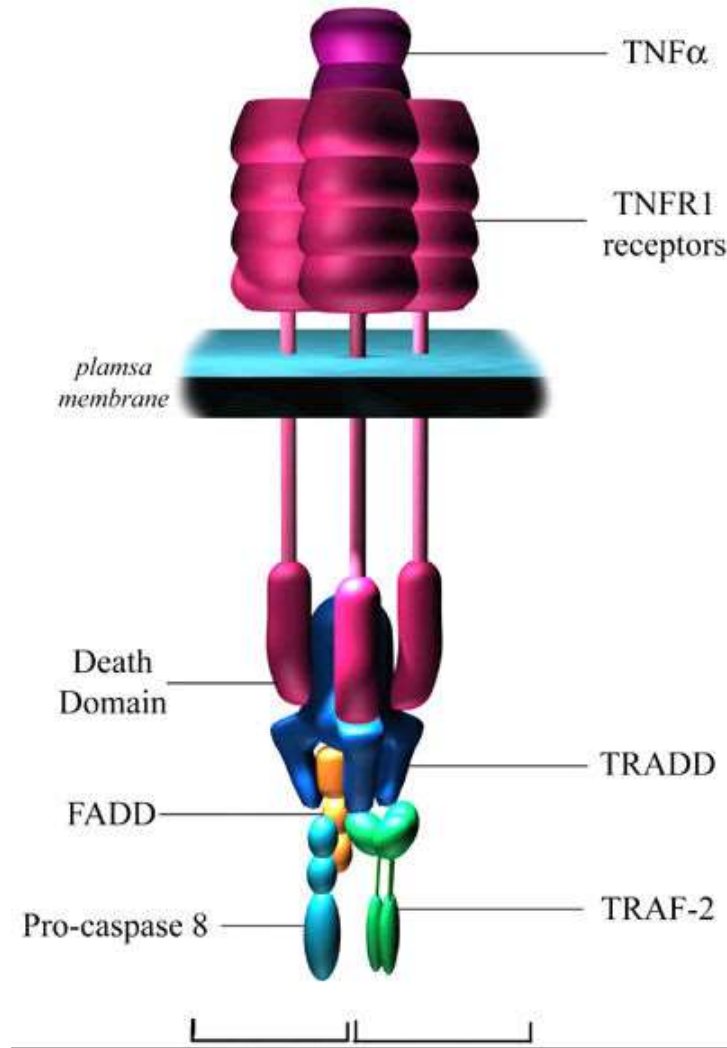
Segnali extracellulari e recettori di superficie

LA VIA INTRINSECA

Segnali endogeni regolati dai mitocondri

Una via di trasduzione del segnale apoptotico è indotta da una molecola extracellulare solubile, il **TNF (Tumor Necrosis Factor)**.

LA VIA ESTRINSECA

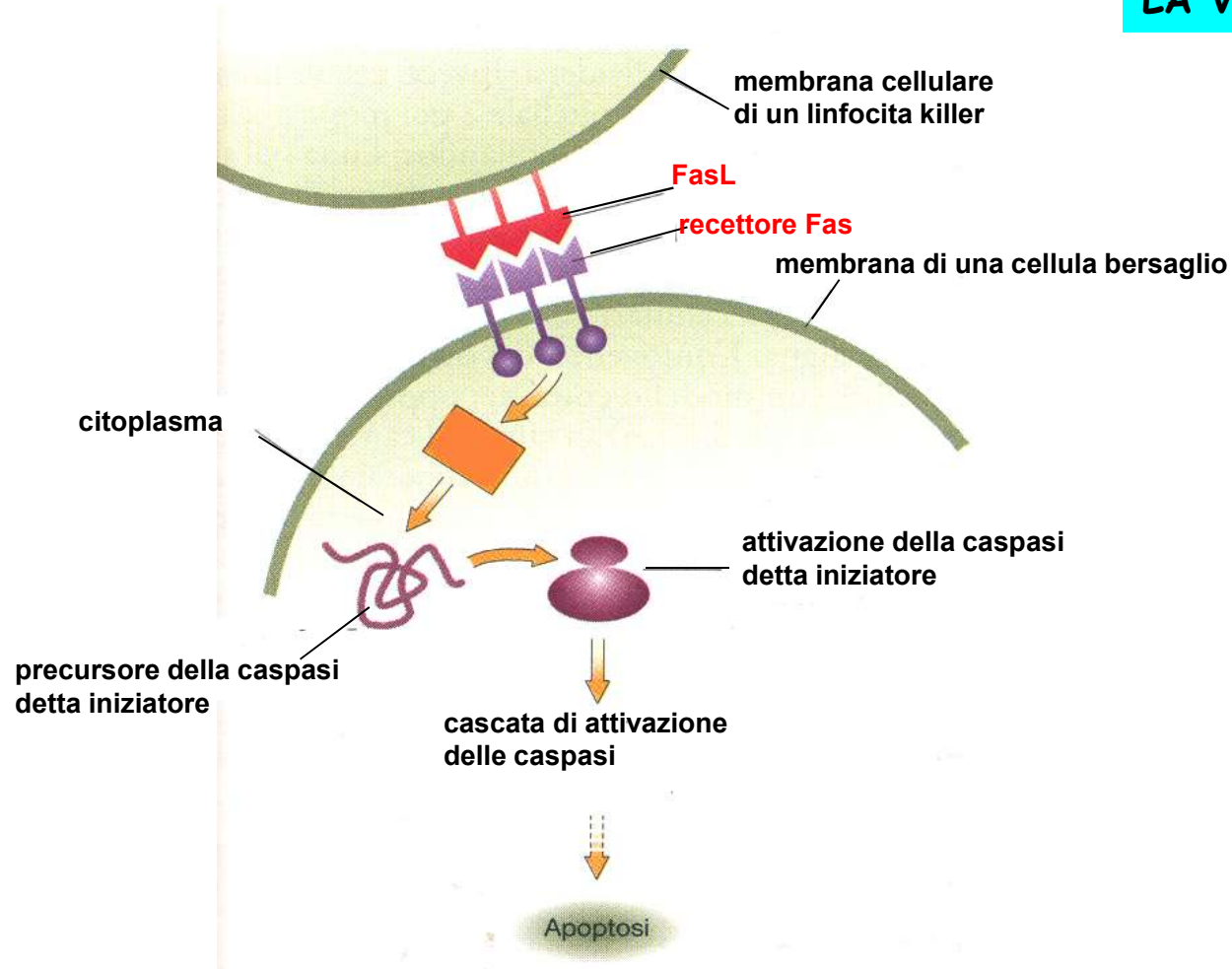


TRADD lega FADD, che recluta la proteasi caspasi-8.

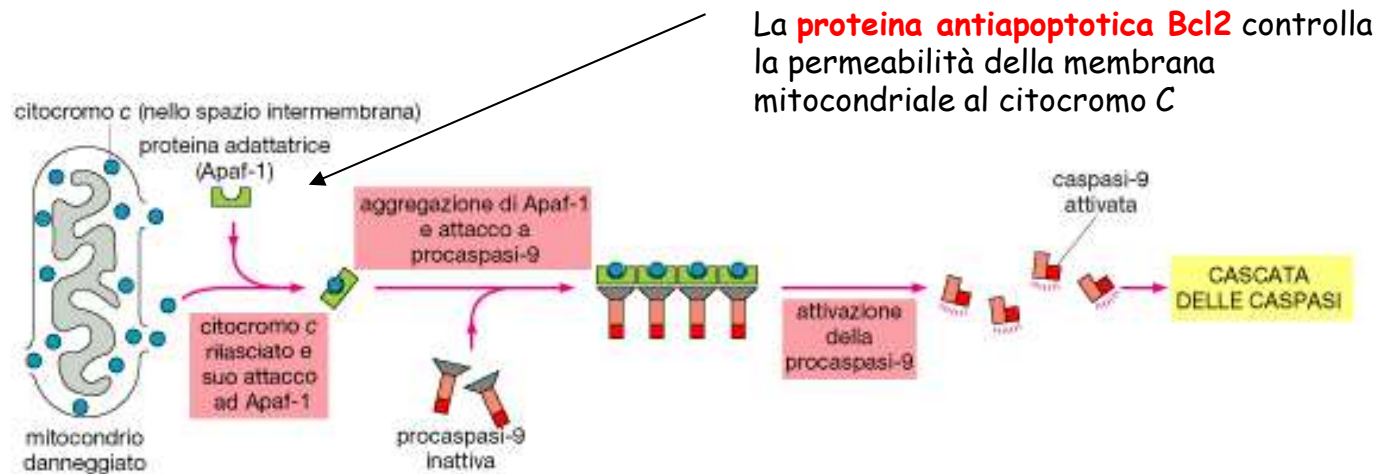
Ma TRADD recluta TRAF2 che attiva il FT NFKB che media risposte infiammatorie e proliferative.

Una via di trasduzione del segnale apoptotico è indotta da una molecola extracellulare di membrana, il **FAS ligand**

LA VIA ESTRINSECA



ATTIVAZIONE DELL'APOPTOSI DALL'INTERNO DELLA CELLULA (via intrinseca)

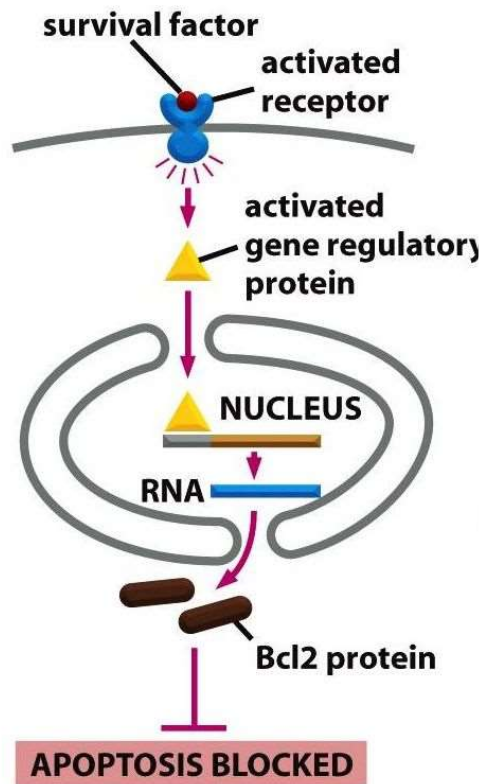


La via intrinseca è indotta in seguito a vari stress, come danni al DNA, scompensi nella progressione del ciclo, mancanza di sostanze nutritive, ipossia ecc.

In molti tipi cellulari la via intrinseca dell'apoptosi è costitutivamente attiva in assenza di fattori di sopravvivenza, che quindi agiscono come fattori anti apoptotici

Due modi in cui i fattori di sopravvivenza possono inibire l'apoptosi

(A) Produzione aumentata della proteina anti-apoptotica Bcl2



La proteina anti-apoptotica Bcl2 impedisce il rilascio di citocromo c dai mitocondri

Un esempio:
la sopravvivenza dei neuroni dipende da una molecola segnale secreta dalle
cellule bersaglio

