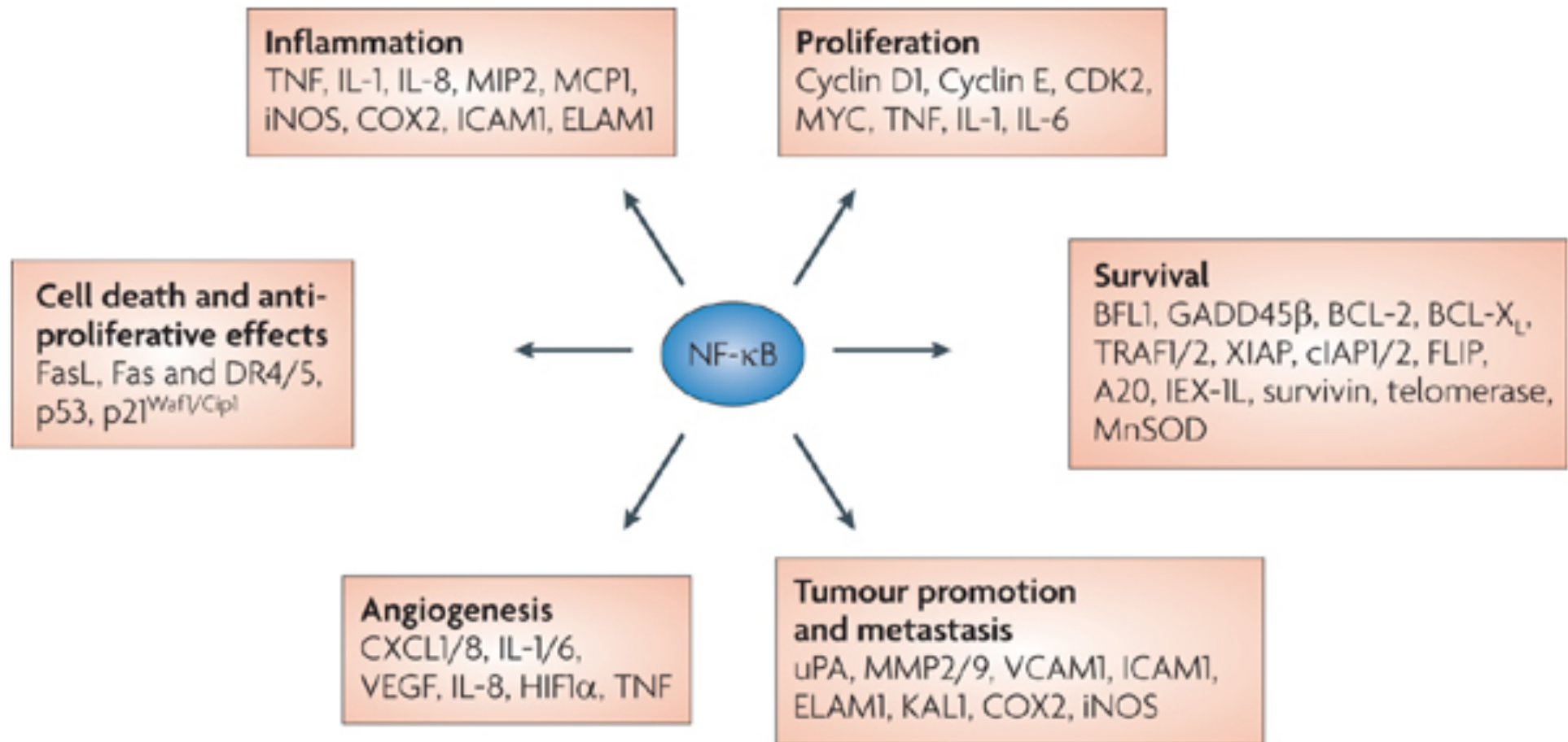


# Il ruolo cruciale di NFκB: più di 150 geni target

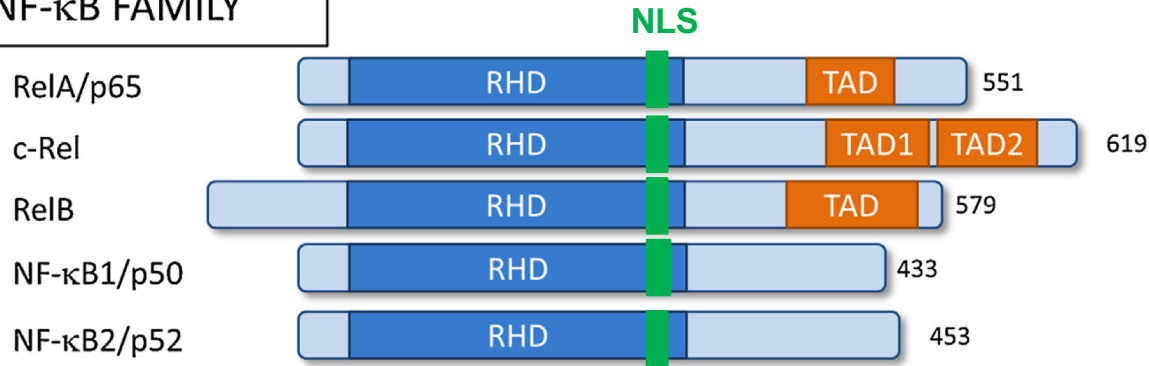


Nature Reviews | **Drug Discovery**

**NFκB** identifica un gruppo di fattori di trascrizione che promuovono **crescita e sopravvivenza cellulare**, **infiammazione**, **attivazione linfocitaria** e **formazione degli organi linfoidi secondari**. Un'attivazione costitutiva ed aberrante induce però disordini autoimmuni e neoplastici.

# NF- $\kappa$ B family

## NF- $\kappa$ B FAMILY



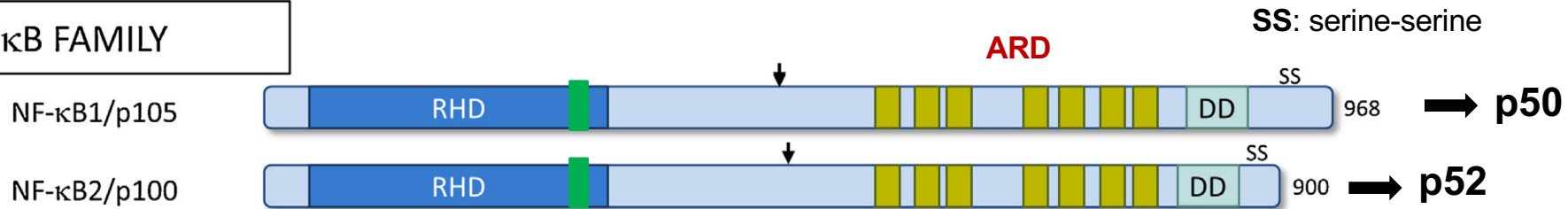
**RHD:** Rel homology domain (dimerization and binding to DNA)

**TAD:** transactivation domain (transcriptional activity)

**NLS:** nuclear localization sequence

**ARD:** ankyrin repeat domain (binding to RHD)

## I $\kappa$ B FAMILY



**SS:** serine-serine

I $\kappa$ B $\alpha$

I $\kappa$ B $\beta$

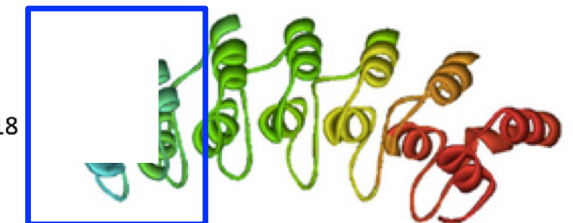
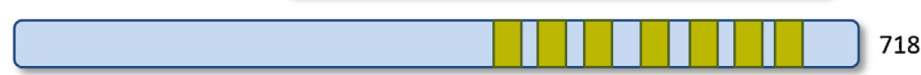
I $\kappa$ B $\epsilon$

BCL3

I $\kappa$ B $\zeta$

Stimulus dependent degradation

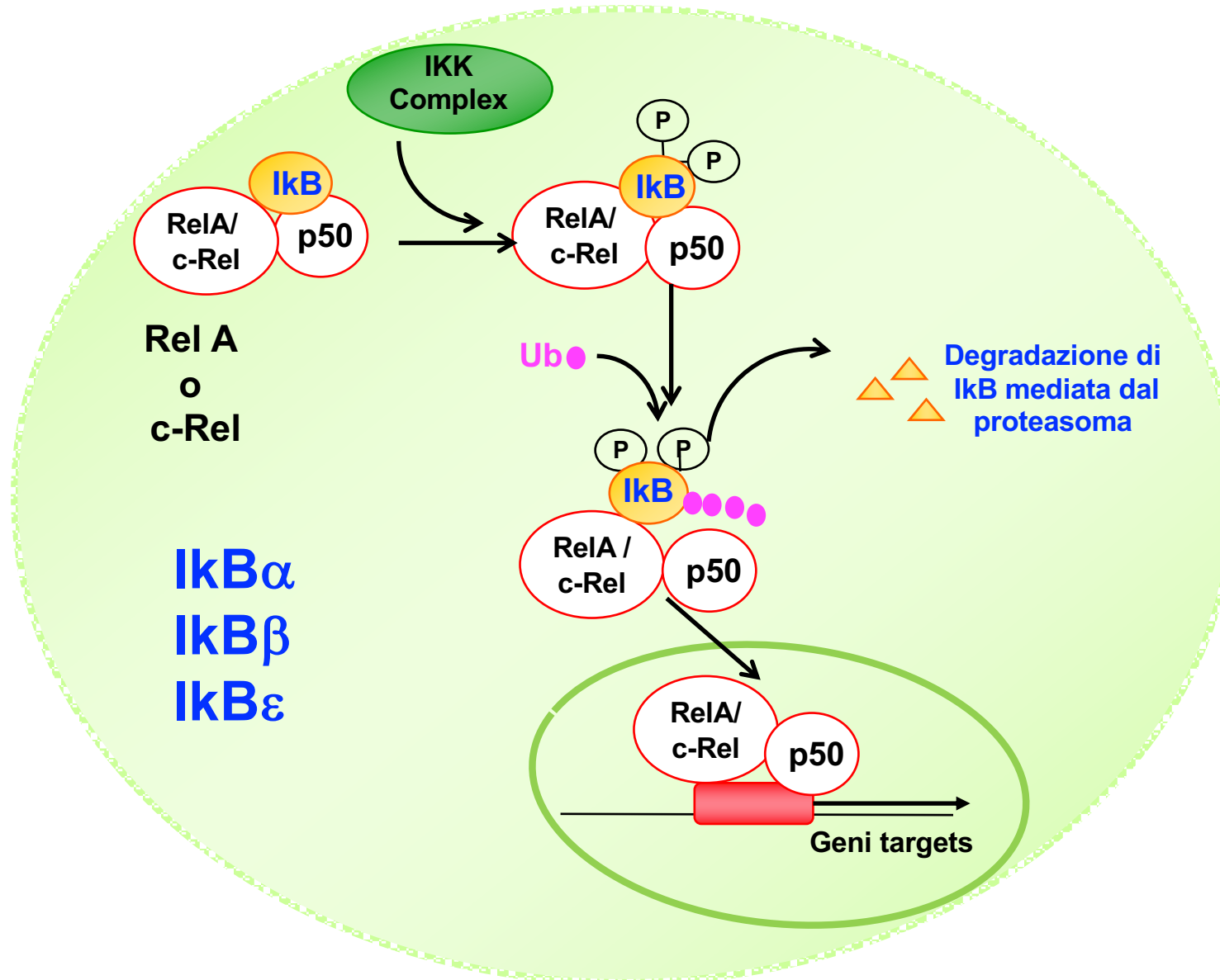
Binds p50/p50 and p52/p52 dimers in the nucleus



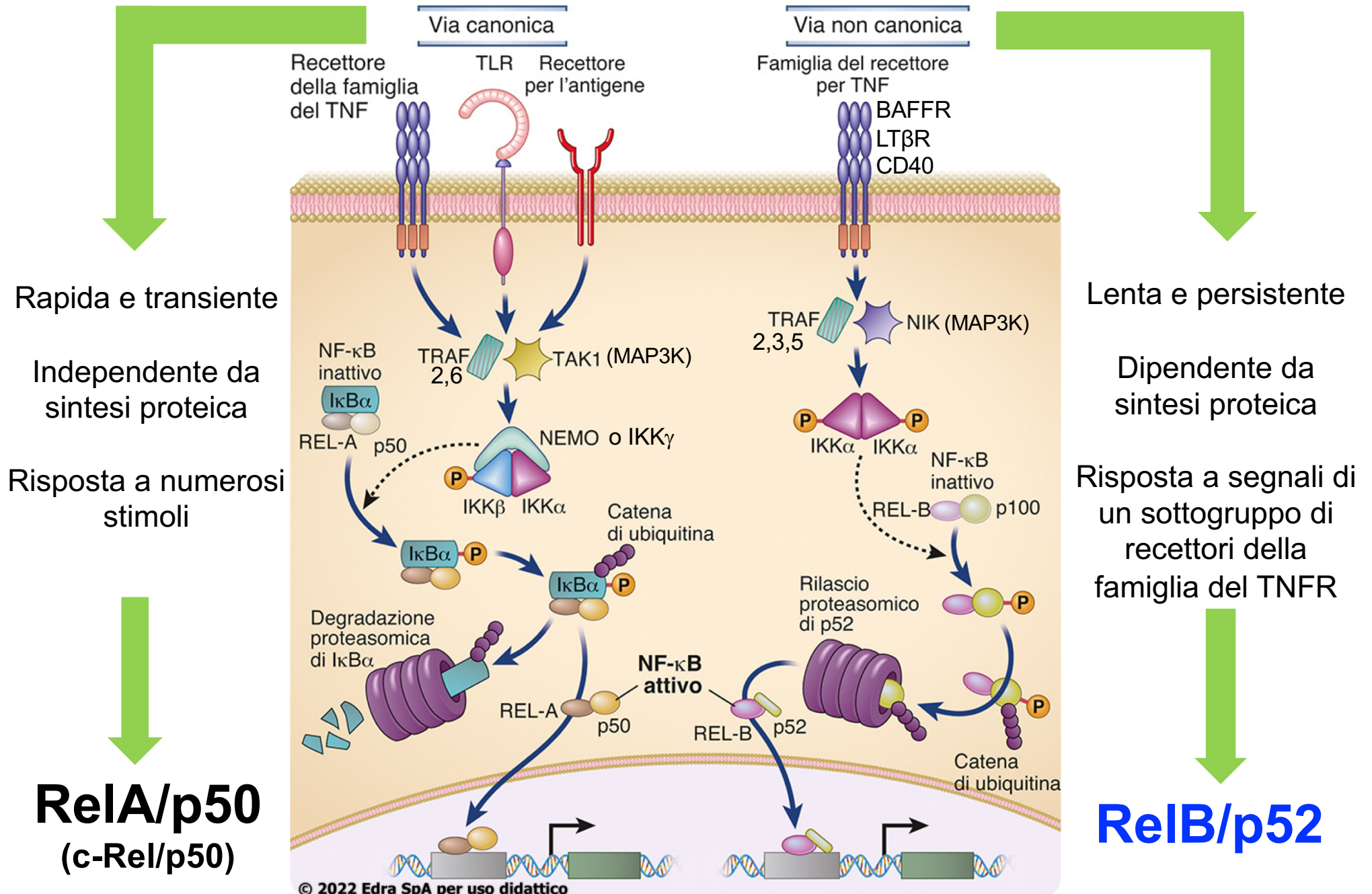
**ARD**=ankyrin repeats domain

# Pathway canonico di NF- $\kappa$ B: RelA/p50 o c-Rel/p50

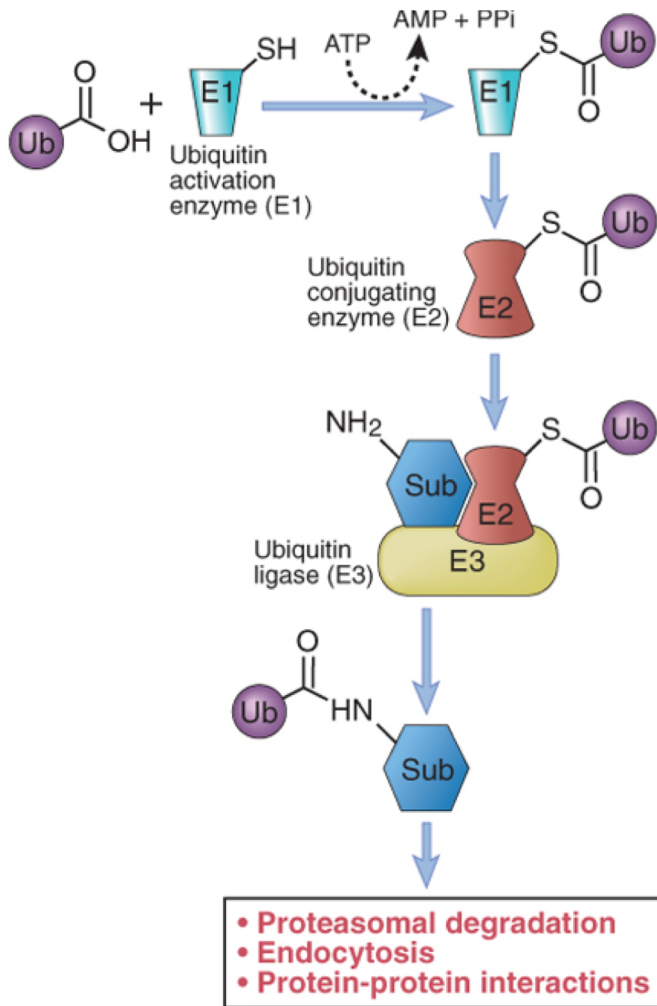
NF- $\kappa$ B1/p105 è costitutivamente processato non appena sintetizzato e rilascia p50



# Attivazione di NF- $\kappa$ B: via canonica e non-canonica



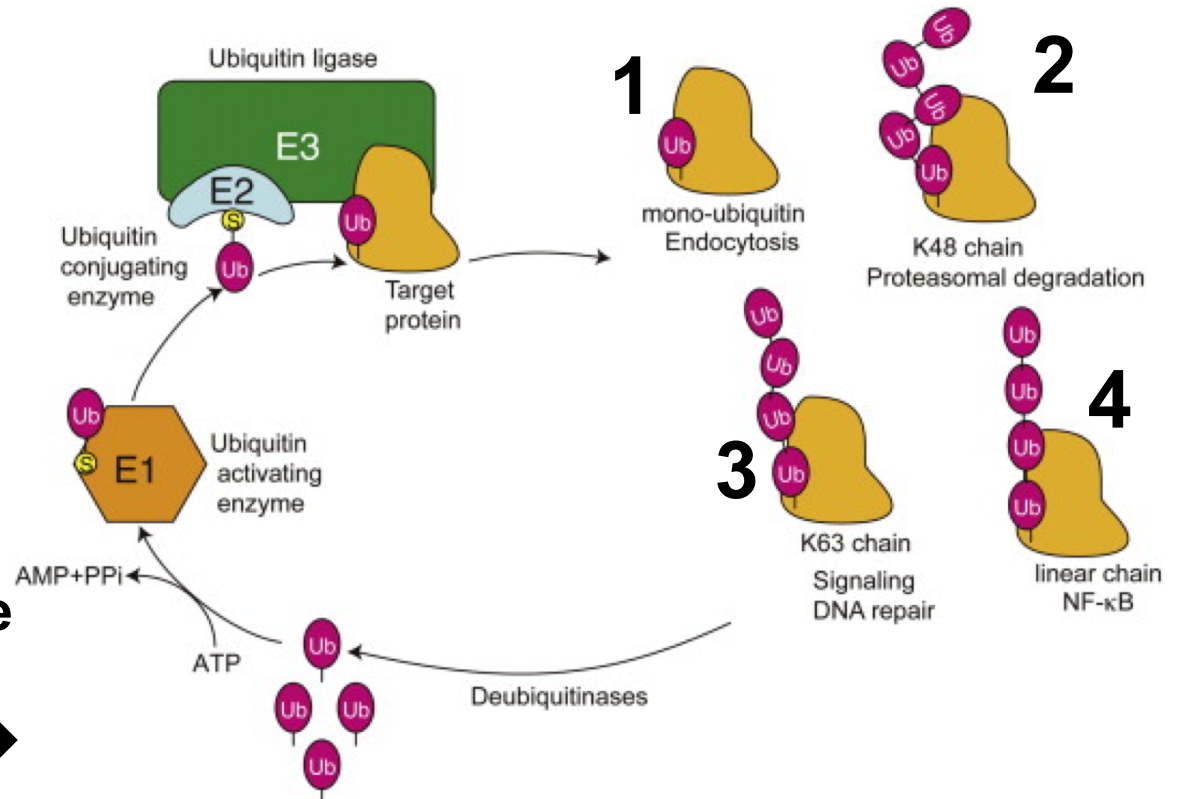
# Meccanismo di ubiquitinazione delle proteine



L'Ubiquitina (Ub; proteina di 76 aa) è attivata dall'**enzima di attivazione dell'Ubiquitina (E1)** che forma un legame tioestere con la glicina dell'estremità C-terminale di Ub in un processo ATP-dipendente.

L'Ub attivata viene trasferita ad un **enzima di coniugazione dell'Ub (E2)** al quale si lega, ancora una volta con un legame tioestere.

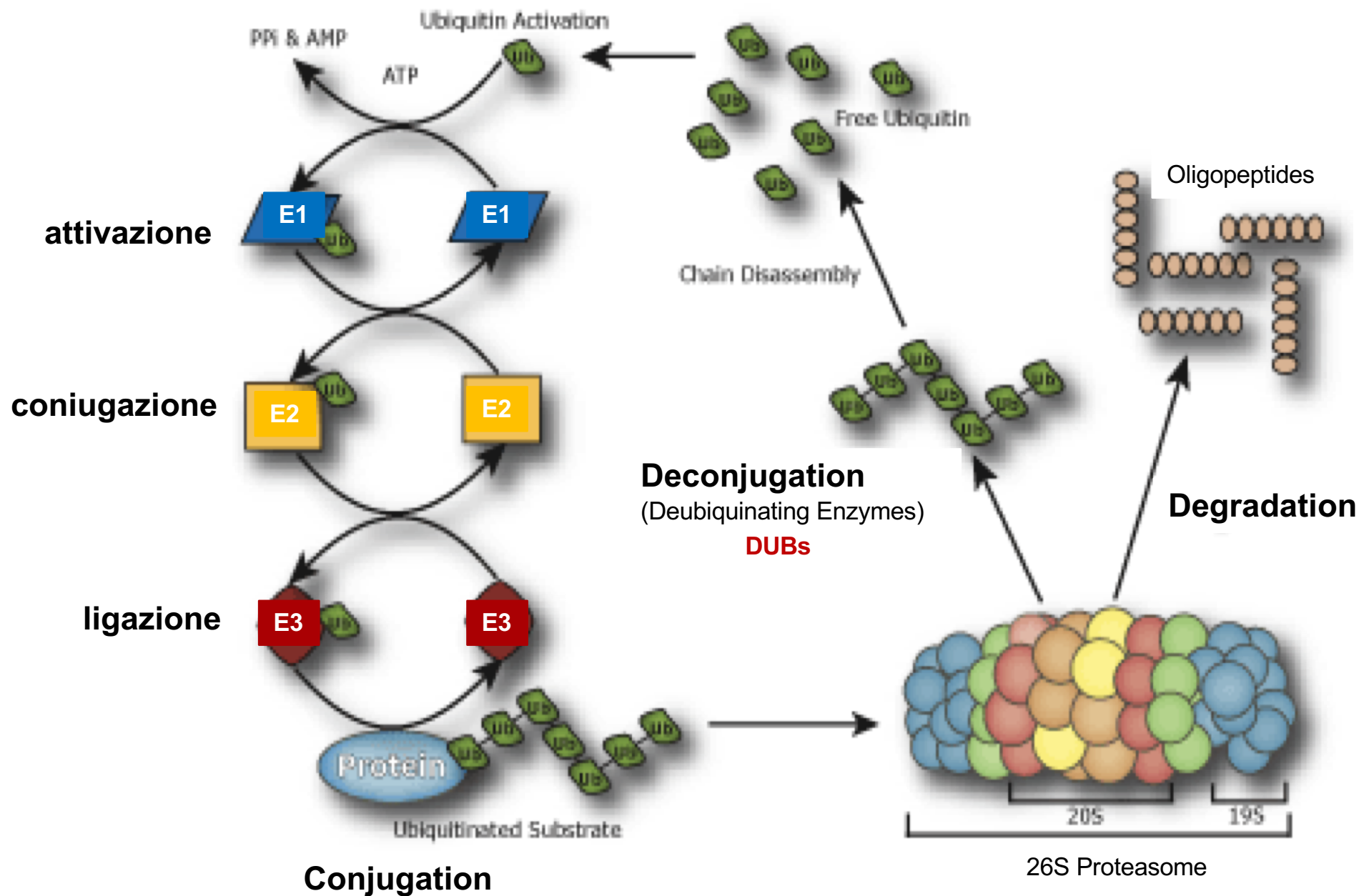
E2 è coadiuvato da una **E3 Ubiquitina ligasi (E3)** nell'identificazione di specifiche proteine bersaglio (substrati). L'Ub viene legata covalentemente ad un residuo di **lisina** del substrato (**sub**).



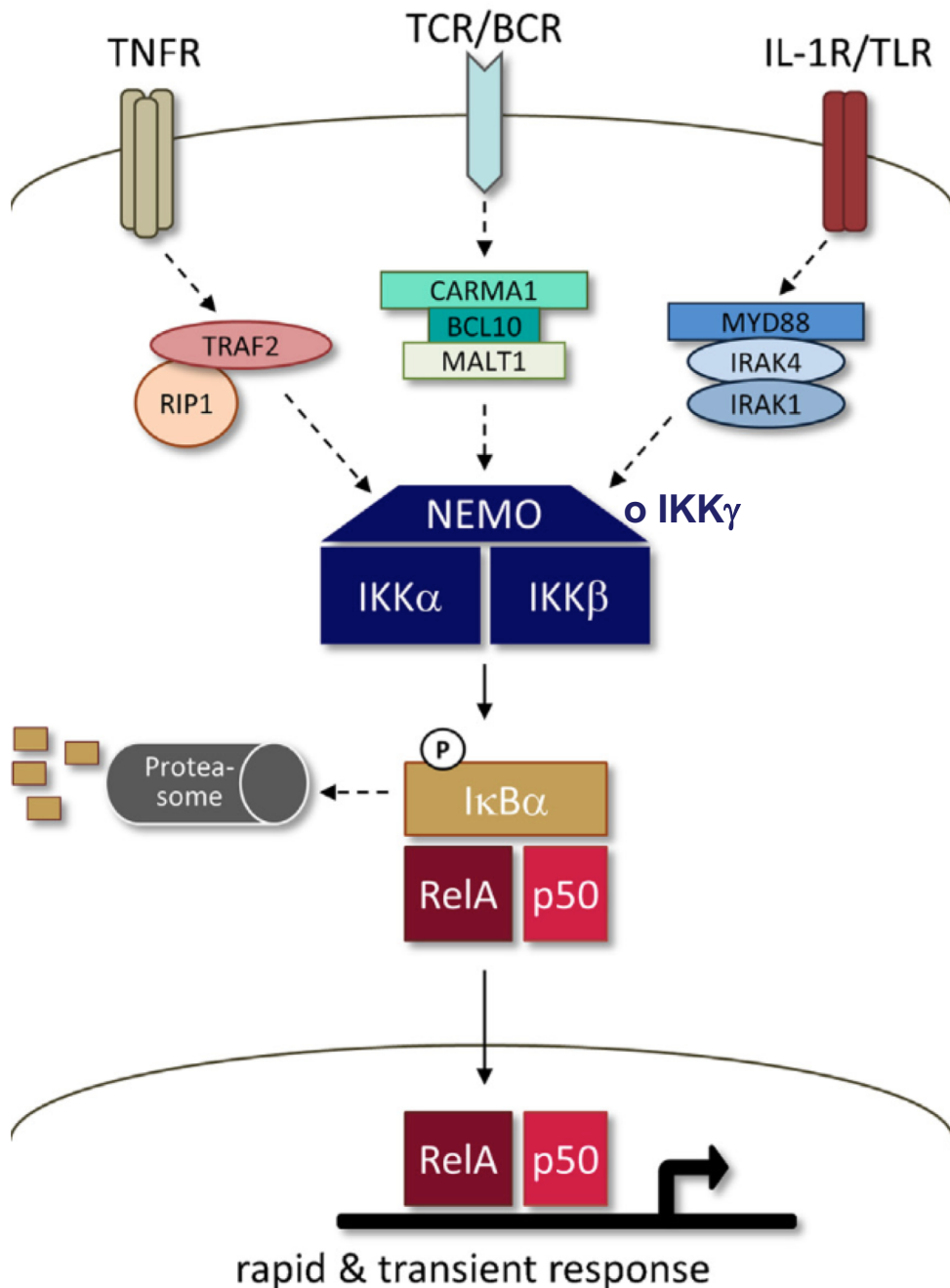
**L'ubiquitinazione delle proteine ha effetti funzionali diversi**



# Ubiquitin Cycle and Protein Degradation

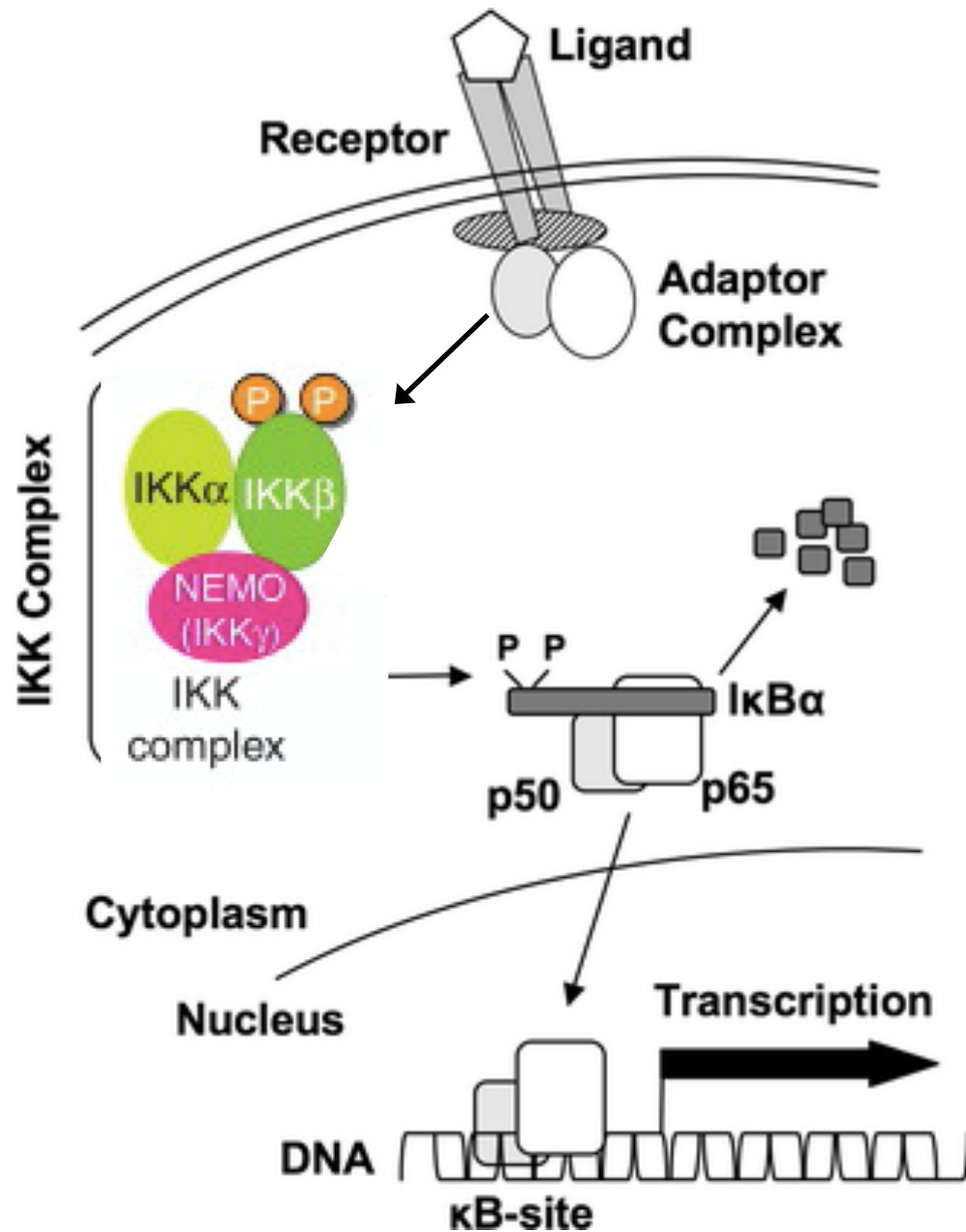


# Signaling canonico di NFκB



- Attivazione dei **recettori delle citochine** (ad es. TNFR, IL1R), **recettori Toll-like** (TLR) o **recettori per l'antigene** (BCR o TCR).
- Diversi adattatori impegnano il complesso IKK costituito da NEMO (IKK $\gamma$ )/IKK $\alpha$ /IKK $\beta$ .
- IKK $\beta$  fosforila i residui di serina di I $\kappa$ B citosolico consentendo la sua ubiquitinazione e la degradazione proteasomale.
- I dimeri della via classica di NF- $\kappa$ B come p50/RelA e p50/c-Rel vengono rilasciati ed entrano nel nucleo per indurre la trascrizione dei geni bersaglio.
- Risposta trascrizionale rapida ma transitoria

# Complesso IKK



**IKK $\alpha$**  e  **$\beta$** : serina/treonina chinasi

**IKK $\gamma$  (NEMO)**: subunità regolatoria e non-catalitica

Una protein kinase (**TAK1**) a monte fosforila IKK $\beta$  nel suo dominio chinamico

**IKK $\beta$**  fosforila I $\kappa$ B $\alpha$  (I $\kappa$ B $\beta$ )



# Modello di attivazione di IKK

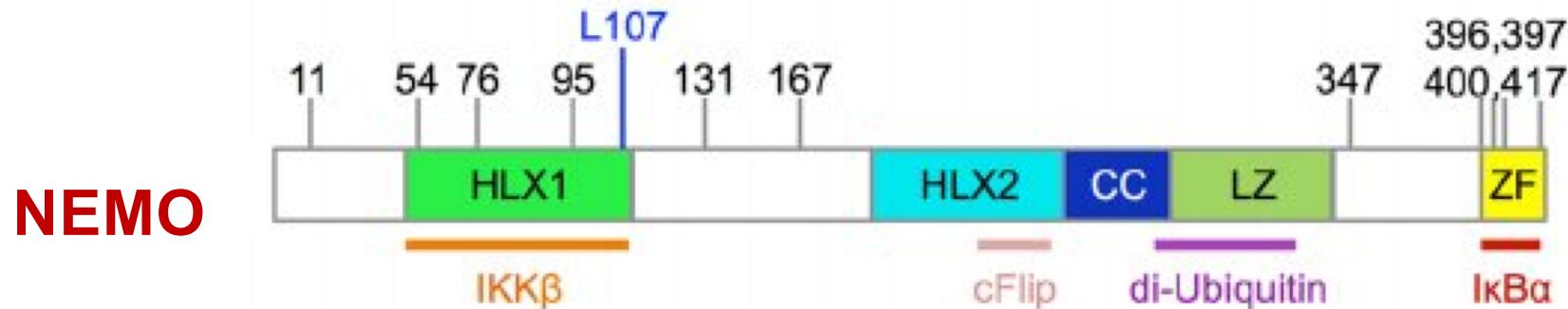
- Il reclutamento da parte di recettori o di adattatori porta il complesso IKK in contatto con le **MAP3K** specifiche (**l'ubiquitina media l'associazione**)
- Cambio conformazionale del complesso IKK → fosforilazione di residui di Ser
- Diverse **MAP3K** (es. **TAK1, MEKK1, Cot1, MEKK3**) fosforilano IKKs

# NEMO (IKK $\gamma$ ) è cruciale per l'attivazione del complesso IKK

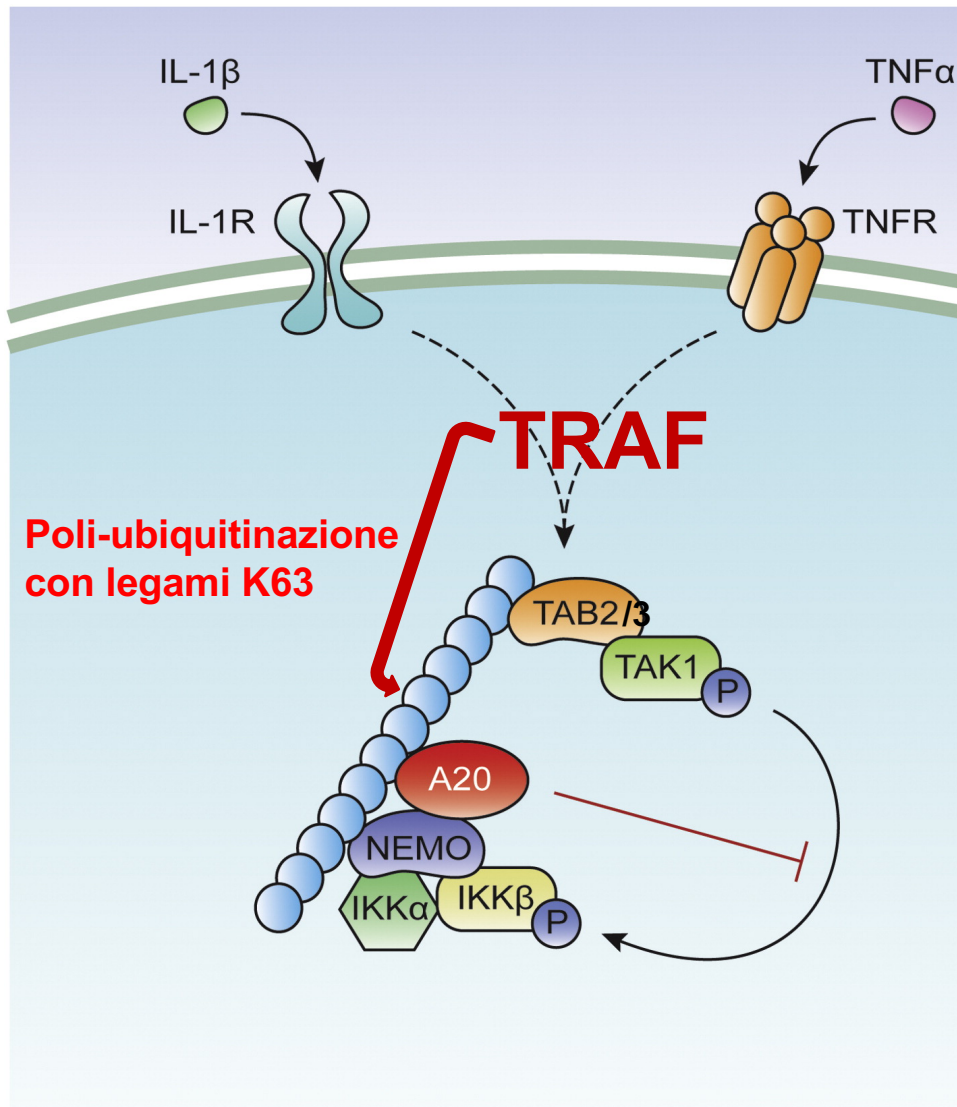
Topi knockout per NEMO (simili a knockout per p65/RelA):

- Incapaci di attivare NF- $\kappa$ B in risposta all'infiammazione e a immunorecettori

Infatti l'**ubiquinazione di NEMO** permette che IKK $\beta$  sia fosforilata da MAP3K (TAK1 o altre)



# TNFR e IL-1R nell'attivazione del complesso IKK



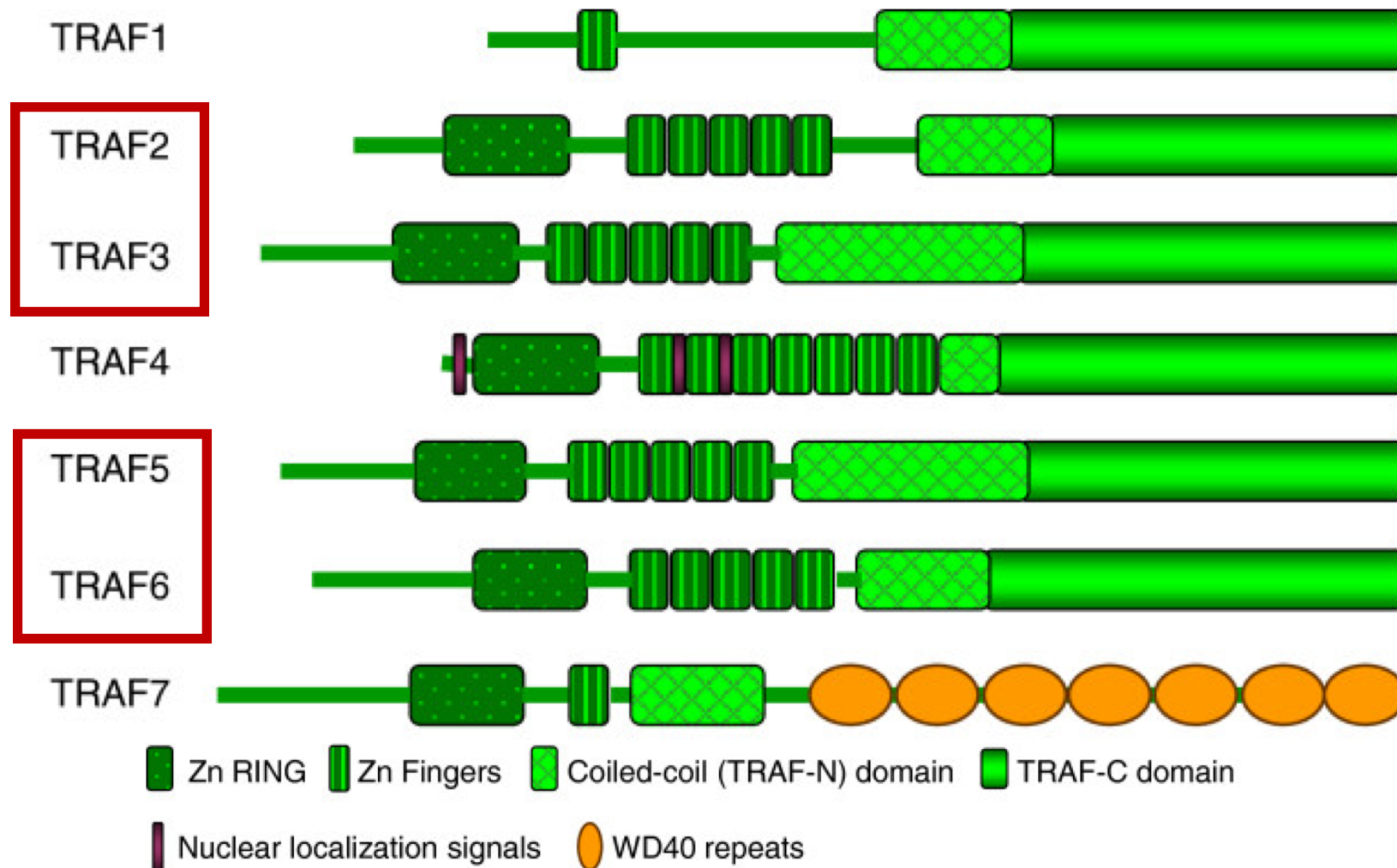
TNFR e IL-1R reclutano TRAF, un adattatore molecolare con attività E3 ubiquitino-ligasi che organizza a valle un “**signalling scaffold**”.

Dopo reclutamento e attivazione, **TRAF** poli-ubiquitina se stesso e **NEMO/IKK $\gamma$**  portando in prossimità il **complesso IKK** con il **complesso TAB2/3** che lega **TAK1**

**TAK1** è una MAP3K\* che fosforila **IKK $\beta$**  inducendone la sua attivazione

**A20** è una deubiquitinasi che inibisce l'attivazione del complesso

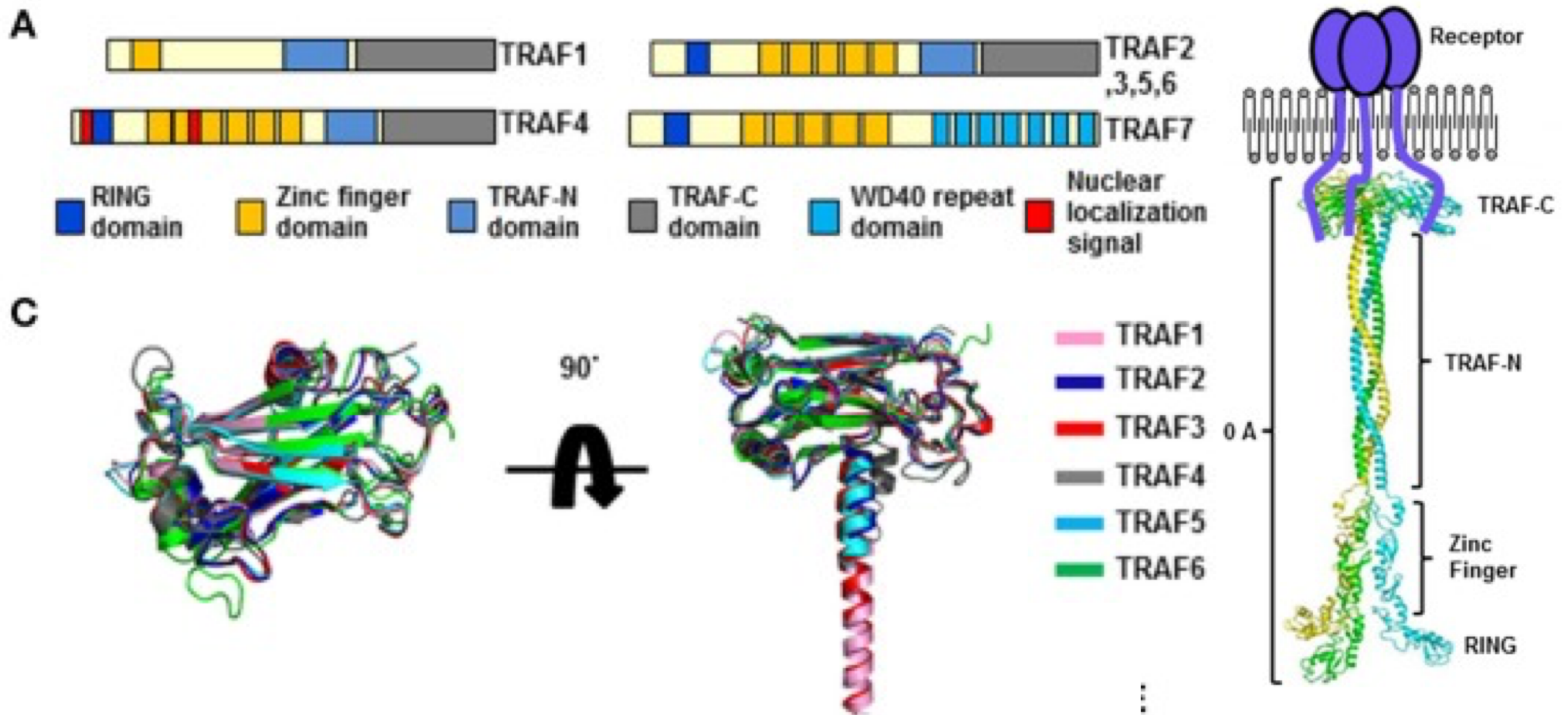
# TNF receptor-associated factor (TRAF) family



Le proteine TRAF sono adattatori molecolari che collegano un'ampia varietà di recettori espressi sulla superficie cellulare (recettore del  $\text{TNF}\alpha$ , IL-1, TLR, altri) a diverse cascate di segnalazione, che portano all'attivazione di NF- $\kappa$ B e di proteine chinasi attivate dai mitogeni (MAPK). **Nei riquadri rossi membri con attività ubiquitina-ligasi**

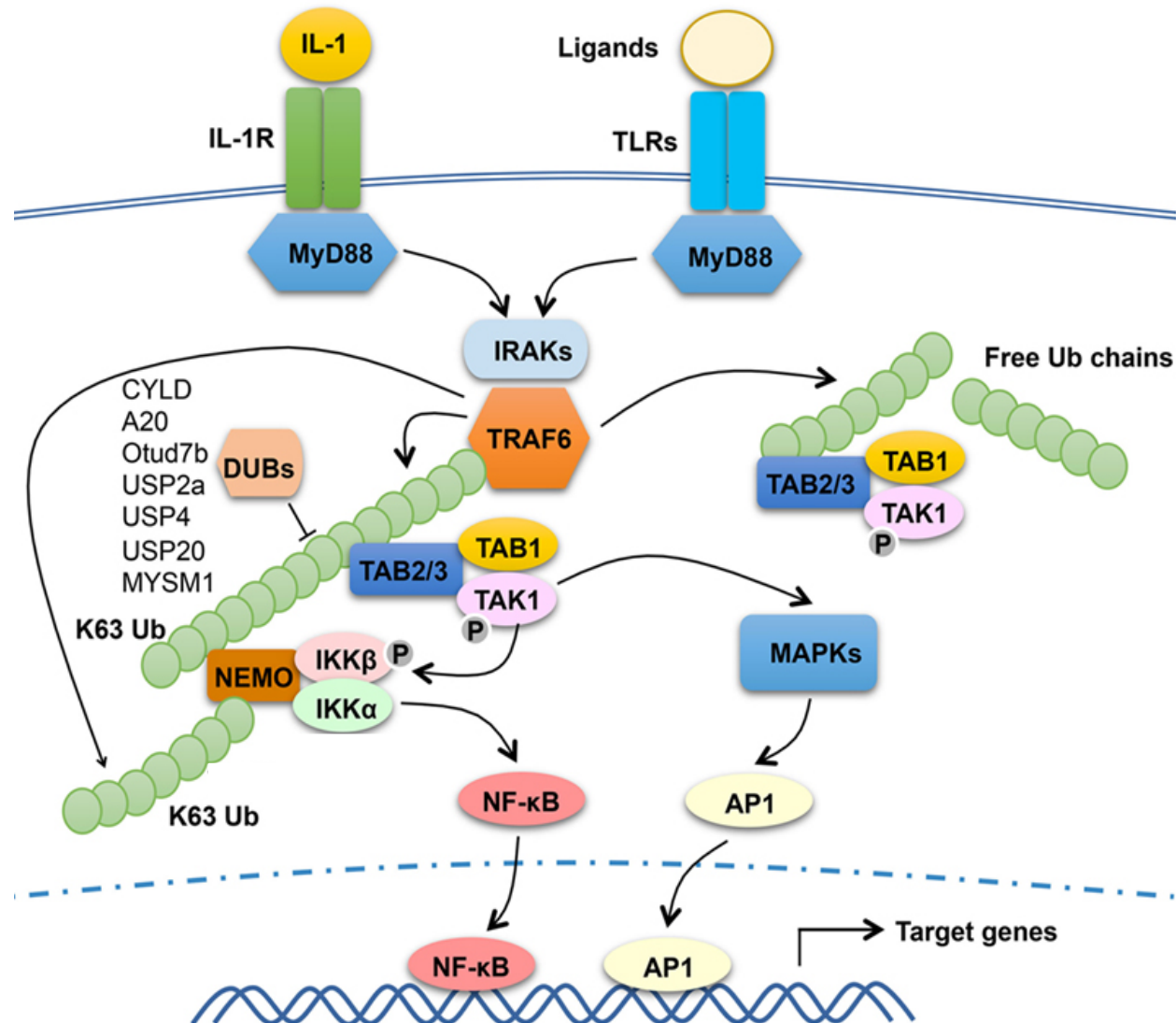
# TNF receptor-associated factor (TRAF) family

Oltre al loro ruolo di proteine adattatrici, la maggior parte dei TRAF (2, 3, 5 e 6) agisce anche come E3-ubiquitina ligasi per attivare eventi di segnalazione a valle



Structure of the TRAF family. **(A)** The domain boundary in TRAF family members **(C)** Superposition of the structures of the TRAF domain. **(F)** A model of the full-length structure of TRAF family members.

## TLRs and IL-1R in the activation of IKK complex



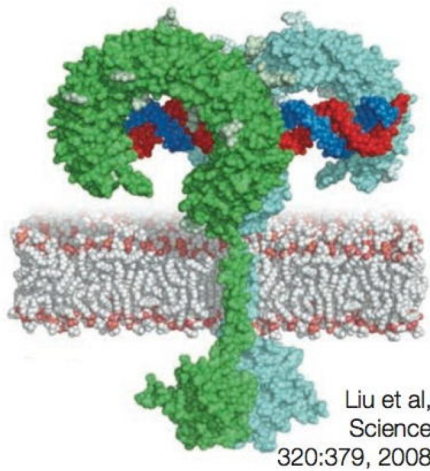
The function and regulation of tumor necrosis factor receptor-associated factor (**TRAF6**) in **MyD88** signaling pathway.

Upon stimulation with IL-1 or toll-like receptor (TLR) ligands, MyD88 recruits IL-1R-associated kinases (**IRAKs**) (including IRAK1, IRAK2, and IRAK4) and TRAF6 to assemble a MyD88 signaling complex.

Once activated in the MyD88 complex, **TRAF6** functions as an **E3 ubiquitin ligase** that catalyzes the synthesis of K63-linked polyubiquitin chains conjugated to itself or NF-κB essential modulator (**NEMO**) or existing as free ubiquitin chains. The self-ubiquitinated TRAF6 recruits the ubiquitin-dependent kinase transforming growth factor beta-activated kinase 1 (**TAK1**) and its downstream kinase IκB kinase (IKK) to assemble a signaling complex that facilitates TAK1 and IKK activation.

This process requires the **TAK1 regulatory subunit TAB2** (or TAB3) and the IKK regulatory subunit NEMO, both have ubiquitin-binding functions. Activated TAK1 mediates activation of IKK and mitogen-activated protein kinases (MAPKs), which further activate nuclear factor κB (NF-κB) (RelA- and c-Rel-containing complexes) and AP1. TRAF6 mediated NEMO ubiquitination also contributes to the activation of IKK and NF-κB. Several DUBs have been shown to negatively regulate TRAF6 function through deconjugation of its K63 polyubiquitin chains.

# Toll-like receptors (TLRs)

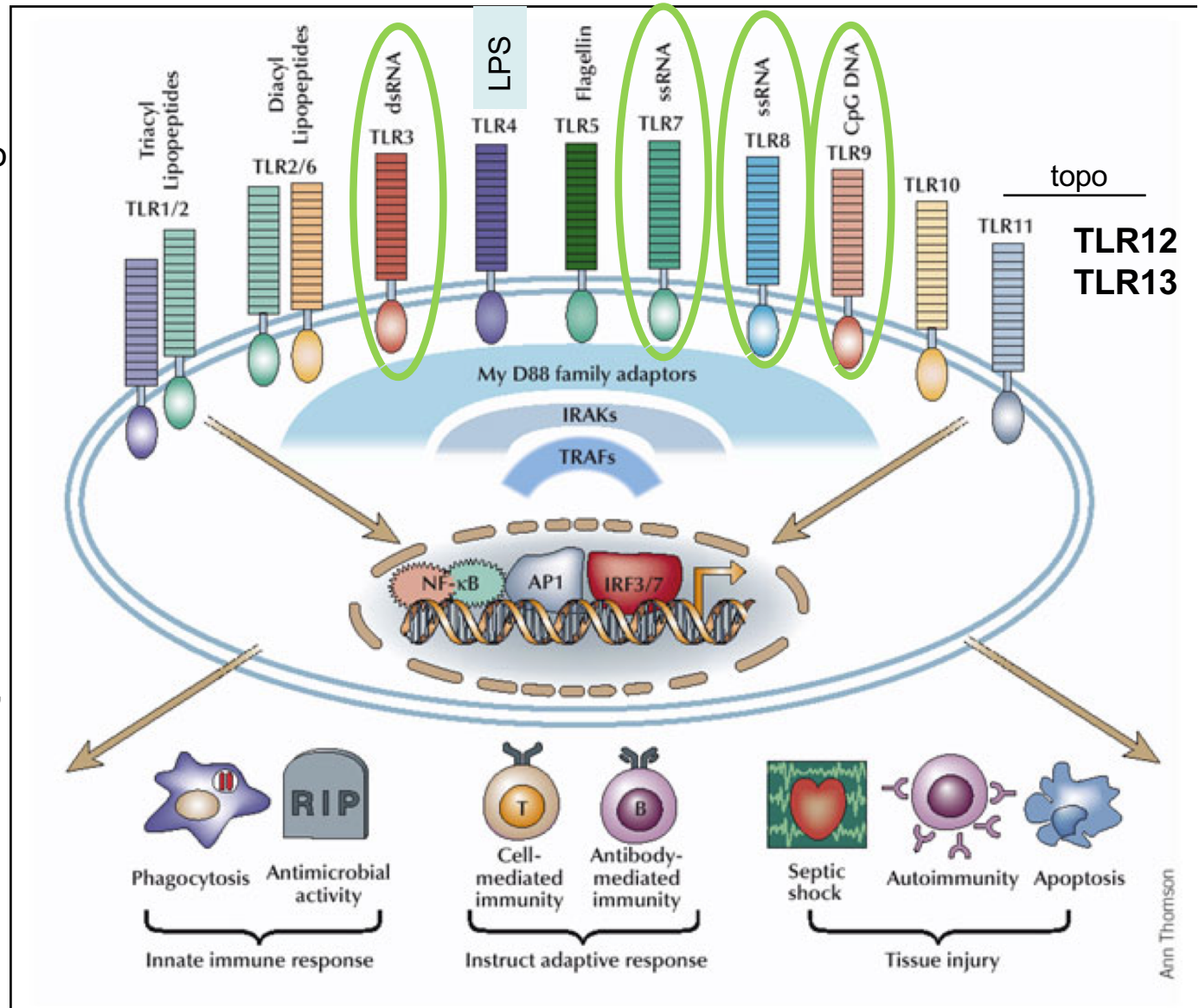


Liu et al,  
Science  
320:379, 2008

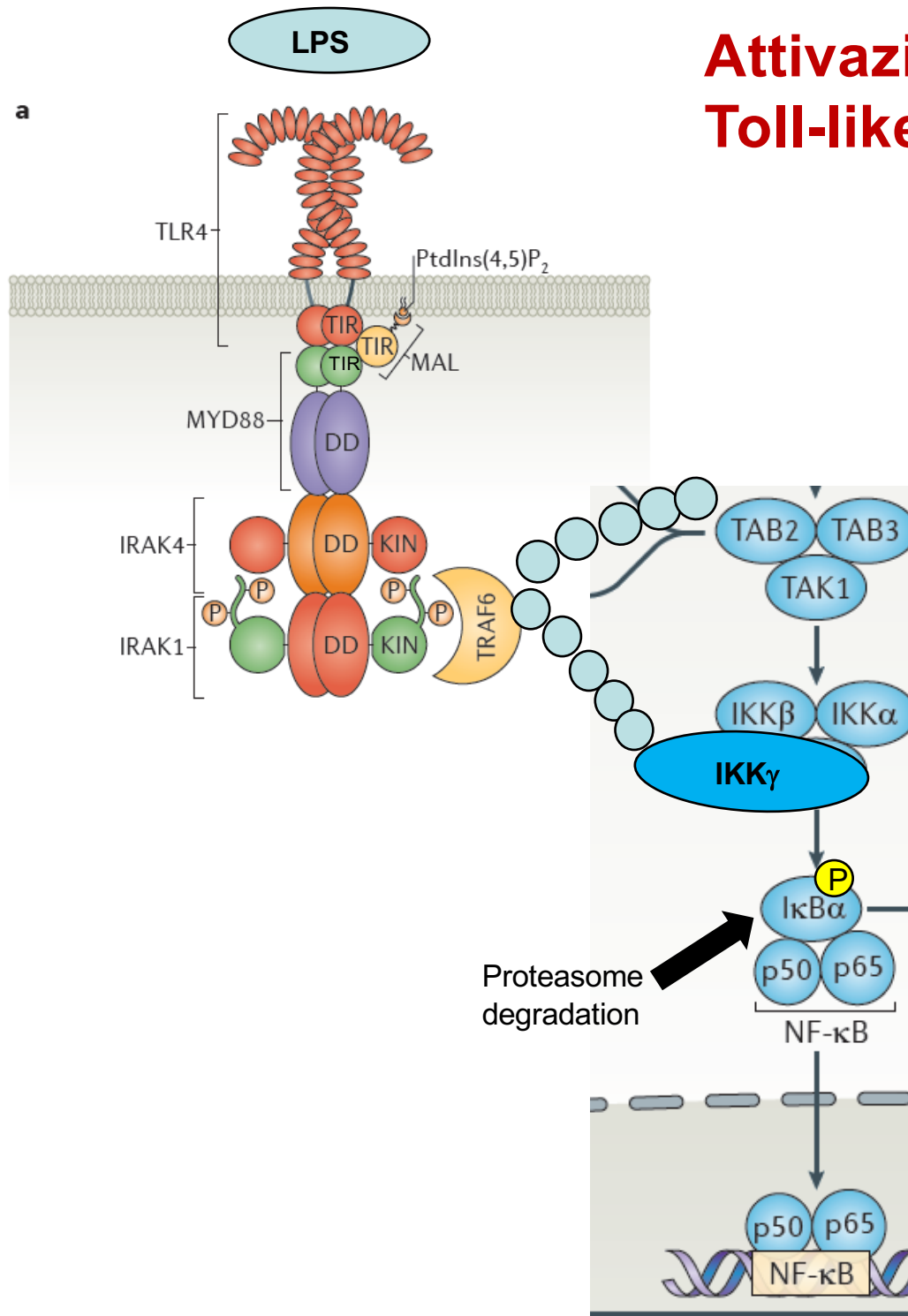
Appartengono alla famiglia dei PRR (pattern recognition receptors) e riconoscono i profili molecolari associati ai patogeni (PAMPs)

In *Drosophila*: gene Toll importante per la polarizzazione dorso-ventrale e resistenza ai microbi

- **10 TLRs** nell'uomo e 12 nel topo
- Regione extracellulare motivi ripetuti ricchi di **Leu**
- Code citoplasmatiche dominio **TIR (Toll/IL-1 Receptor)**
- Attivazione della risposta anti-microbica
- Espressi nelle cellule dell'immunità innata (**DC, macrofagi, neutrofili**, mastociti, cellule endoteliali etc)
- Alcuni sui linfociti T e B
- Stimolano risposta immune innata e adattativa



# Attivazione di NF- $\kappa$ B mediate dai Toll-like receptors (TLR)

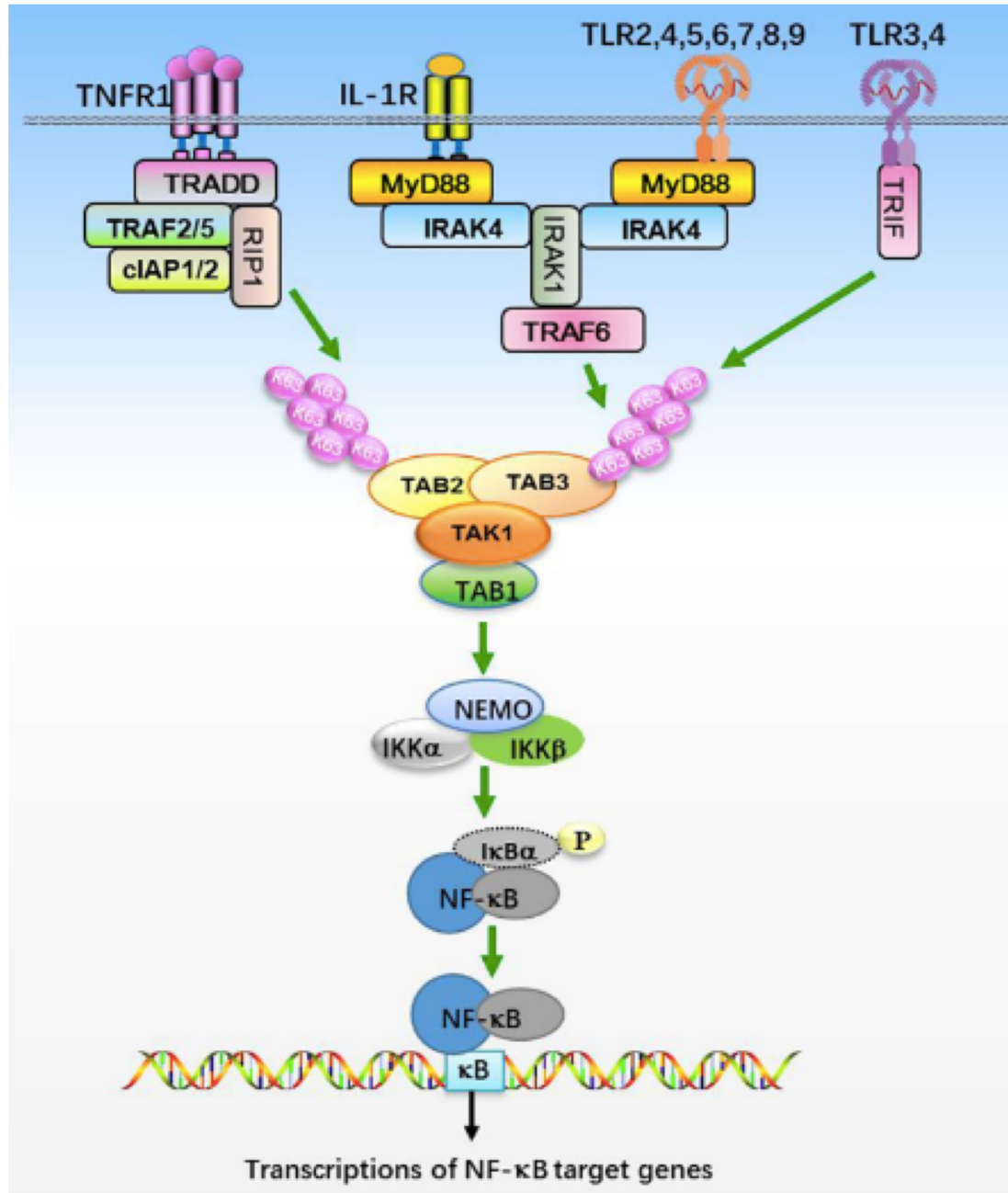


Le chinasi **IRAK** si legano a **TRAF6** che lega e attiva **TAK1** (MAP3K) e **IKK $\gamma$**  attraverso meccanismi ubiquitina-dipendenti

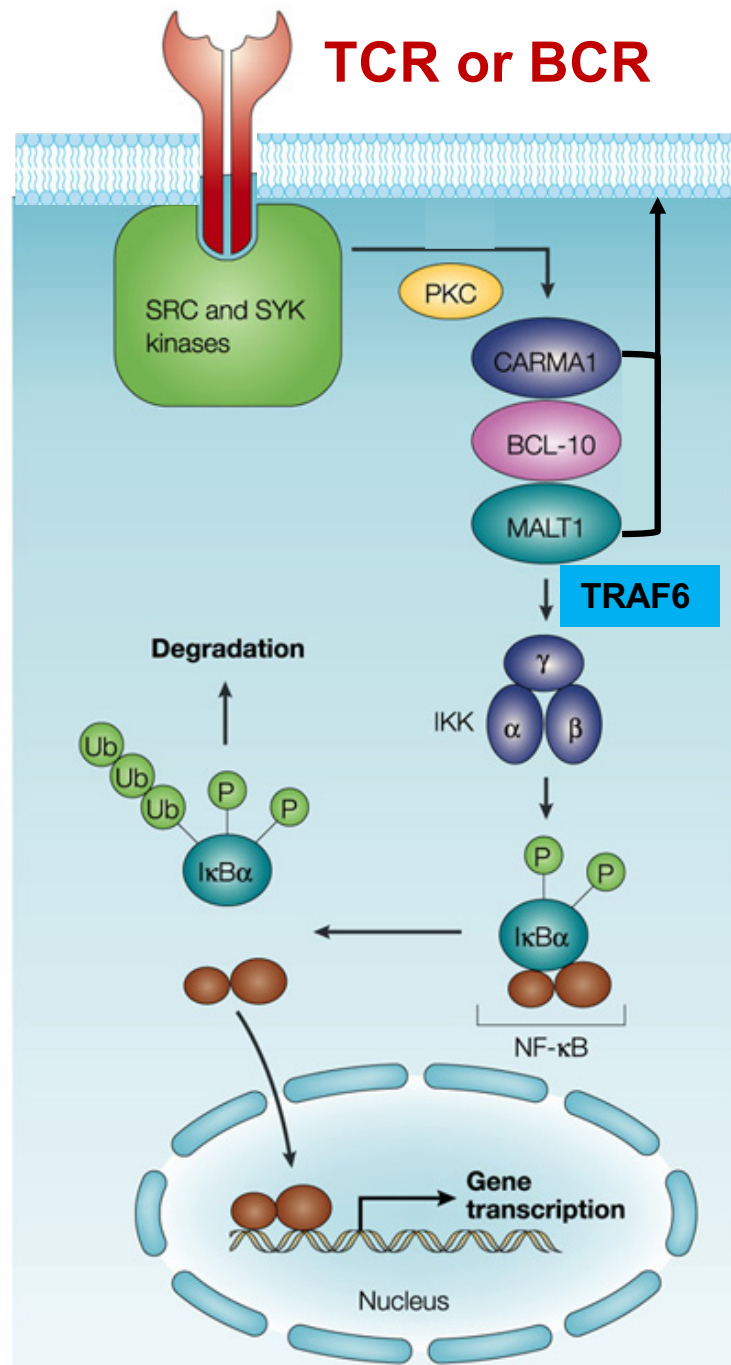
**TAK1** fosforila **IKK $\beta$**  che fosforila **I $\kappa$ B** inducendone la degradazione ubiquitina-dipendente  $\rightarrow$  Traslocazione nucleare RelA/p50 e trascrizione genica



# NF- $\kappa$ B signaling pathway



La stimolazione di TNFR1, IL-1R e TLR da parte dei rispettivi ligandi promuove il reclutamento delle proteine adattatrici indicate e delle ubiquitino-ligasi E3, che catalizzano la sintesi delle catene di poliubiquitina legate a K63 che si legano preferenzialmente alle subunità TAB2 e TAB3, determinando l'assemblaggio e l'attivazione del complesso TAK1-TAB. TAK1-TAB quindi fosforila il complesso IKK, che attiva il fattore di trascrizione NF- $\kappa$ B e induce la trascrizione dei geni a valle.



**TCR or BCR**

## Attivazione di NF- $\kappa$ B via TCR o BCR

**PKC $\theta$**  è coinvolta nell'attivazione di NF- $\kappa$ B indotta dal TCR

**PKC $\beta$**  è coinvolta nell'attivazione di NF- $\kappa$ B indotta dal BCR

Attivazione di NF- $\kappa$ B attraverso il complesso **CARMA/Bcl10/MALT1**

## **CARMA1: CARD recruited membrane associated protein**

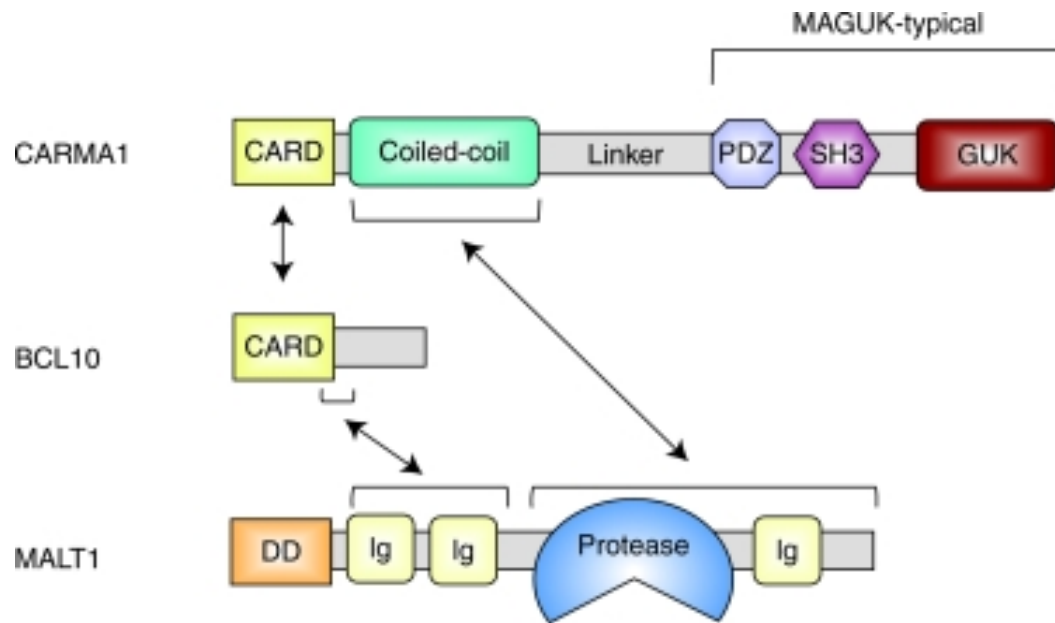
- Proteina scaffold implicata nella regolazione dell'attivazione di NF- $\kappa$ B
- Costitutivamente associata ai **rafts** interagisce con **Bcl-10** attraverso il dominio CARD in seguito alla stimolazione di TCR/BCR
- CARMA accoppia PKC a Bcl10

**Bcl10:** si associa a CARMA1 e MALT-1 in seguito alla stimolazione di TCR/BCR

topi Bcl10 knockout: difetti nell'attivazione di NF- $\kappa$ B indotta da TCR/BCR (IL-1, LPS e TNF normali), difetti nella maturazione delle cellule B (riduzione delle cellule B della zona follicolare e marginale)

**MALT-1:** membro della famiglia delle paracaspasi  
Interagisce fisicamente e funzionalmente con **Bcl-10** per attivare **NF- $\kappa$ B**

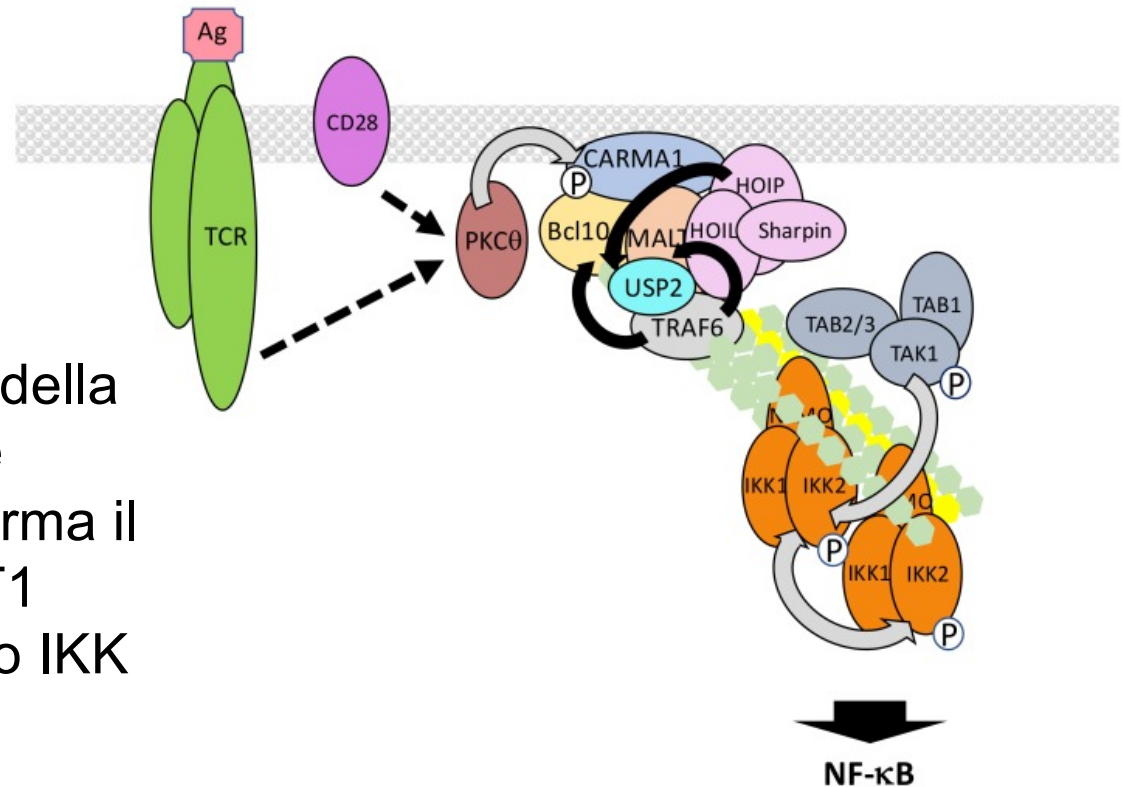
# CARMA1/Bcl10/MALT1



Il dominio CARD (Caspase activation and recruitment domain) (CARD) nella proteina CARMA 1 si lega al dominio CARD di BCL10.

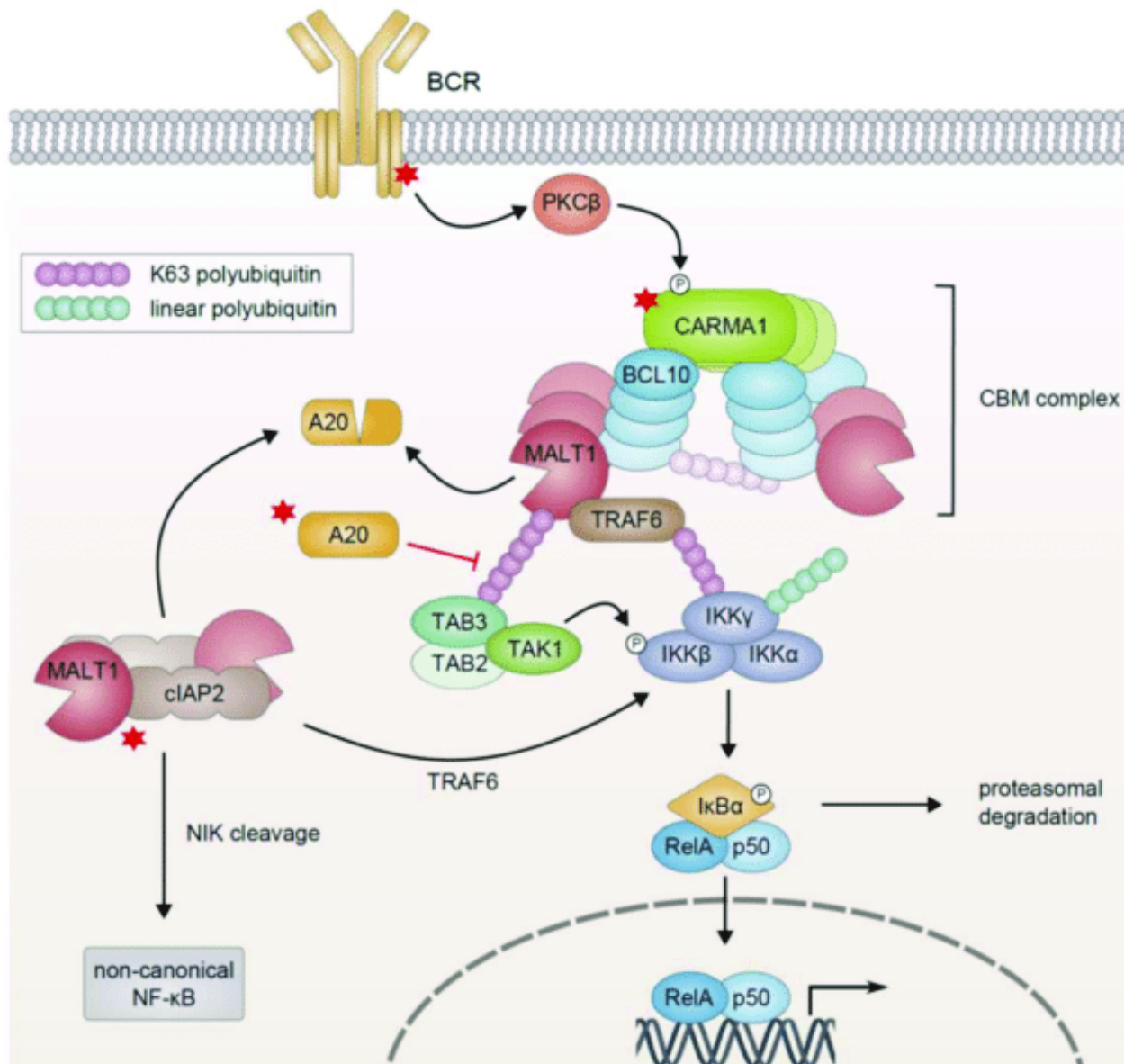
Due "Ig-like domains" in MALT1 mediano il legame a BCL10

Il riconoscimento dell'antigene da parte del TCR induce attivazione della PKC $\theta$  che fosforila CARMA 1 che oligomerizzando in membrana forma il complesso CARMA1/Bcl10/MALT1 che a sua volta attiva il complesso IKK



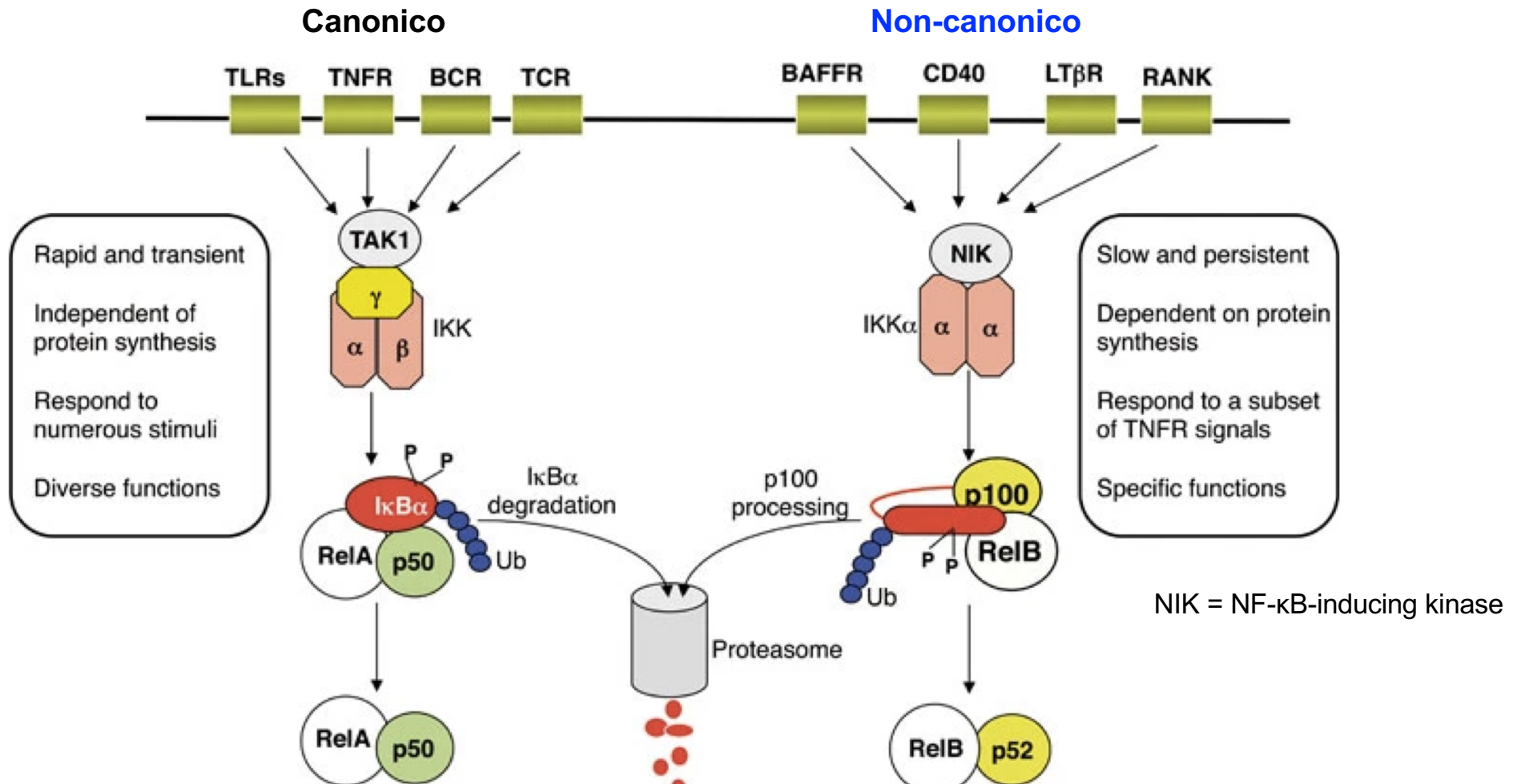
**NF-κB**

# Attivazione della via canonica di NF- $\kappa$ B mediata da BCR



1. PKC $\beta$  attiva il complesso CARMA1/Bcl10/MALT1 che a sua volta recluta e attiva TRAF6 che a sua volta attiva il complesso IKK attraverso il reclutamento di TAK1
2. Il complesso IKK induce la degradazione fosforilazione-dipendente di I $\kappa$ B, consentendo la traslocazione nucleare dei dimeri RelA/p50.

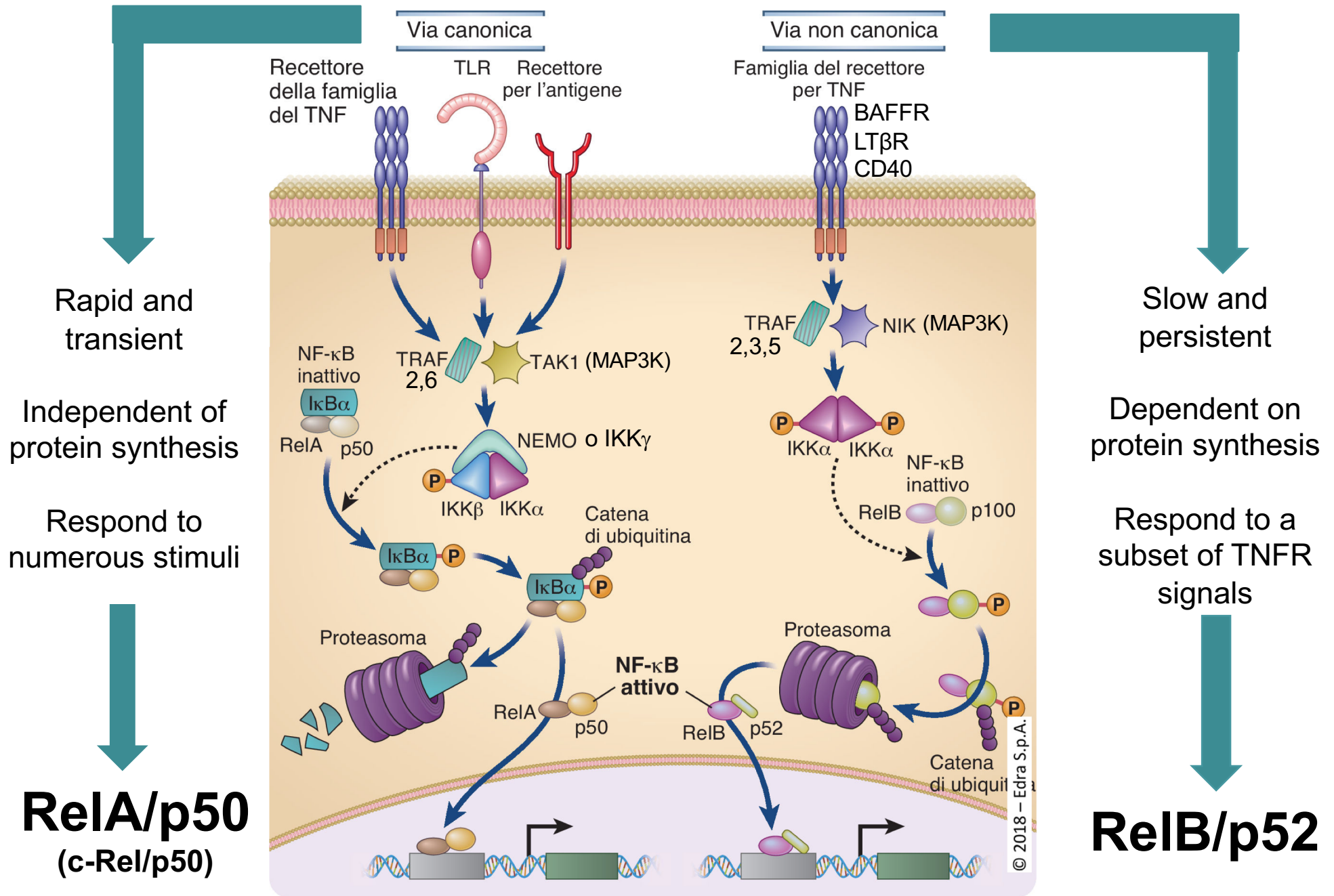
# Pathway canonico e non-canonico di attivazione di NF- $\kappa$ B



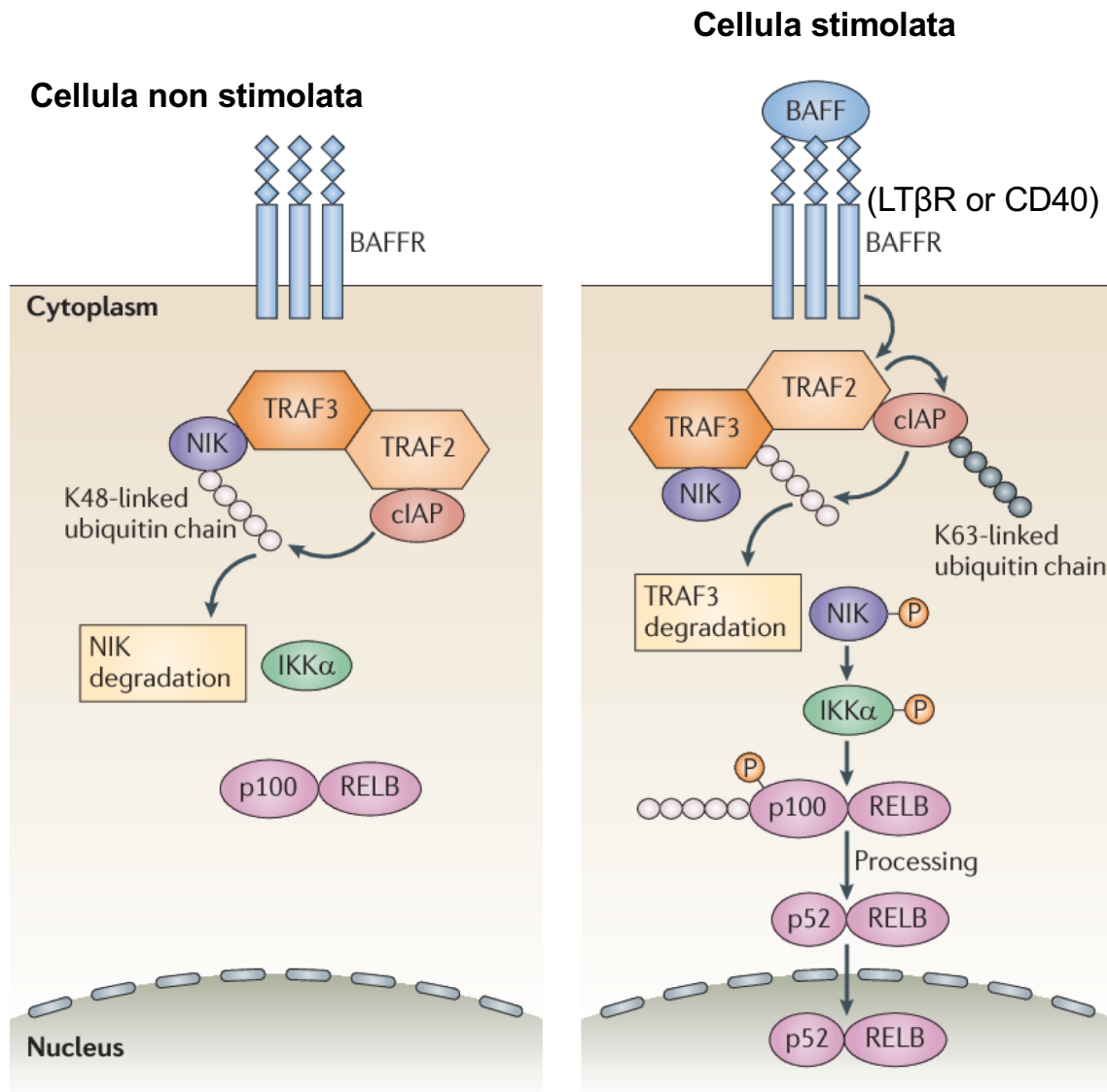
La via canonica è innescata da numerosi segnali, compresi quelli mediati da recettori dell'immunità innata e adattiva. Implica l'attivazione del complesso IKK da parte di TAK1, la fosforilazione di IκBα mediata da IKK e la successiva degradazione, con conseguente traslocazione nucleare rapida e transitoria del prototipo dell'eterodimero NF- $\kappa$ B RelA/p50.

La via non-canonica si basa sul processing di p100 indotta dalla fosforilazione, che viene attivata dalla segnalazione di un subset di membri TNFR. Questo percorso dipende da NIK e IKKα, ma non dal complesso trimetrico IKK e media l'attivazione persistente del complesso RelB/p52.

# Attivazione di NF- $\kappa$ B: via canonica e non-canonica



# NF- $\kappa$ B signaling pathway non-canonico



- **NIK (MAP3K)** viene costantemente degradato nelle cellule quiescenti dalle **c-IAP1/2** (attività E3 ubiquitina ligasi K48-specifica) nel complesso costituito dagli adattatori TRAF3/TRAF2 e c-IAP1/2.
- L'attivazione di **LT $\beta$ R**, **CD40** o **BAFFR** porta alla stabilizzazione di NIK attraverso l'attivazione di TRAF2 (K63 ubiquitina ligasi K63-specifica) che ubiquitina cIAP e re-indirizza l'attività delle c-IAP verso TRAF3 impedendo il reclutamento e la degradazione di NIK appena sintetizzato.
- **Livelli elevati di NIK** catalizzano la fosforilazione di **IKK $\alpha$**  che a sua volta fosforila **NF- $\kappa$ B2/p100** contrassegnandolo per la processazione via proteasoma.
- Rilascio di dimeri **p52/RelB** che traslocano nel nucleo.
- Risposta trascrizionale sostenuta.



# LMP1 del Virus di Epstein-Barr (EBV)

-**LMP1** è una molecola con 6 domini transmembrana che **mima un TNFR costitutivamente attivato** e quindi attiva in modo persistente il pathway di NF- $\kappa$ B attraverso le proteine TRAF

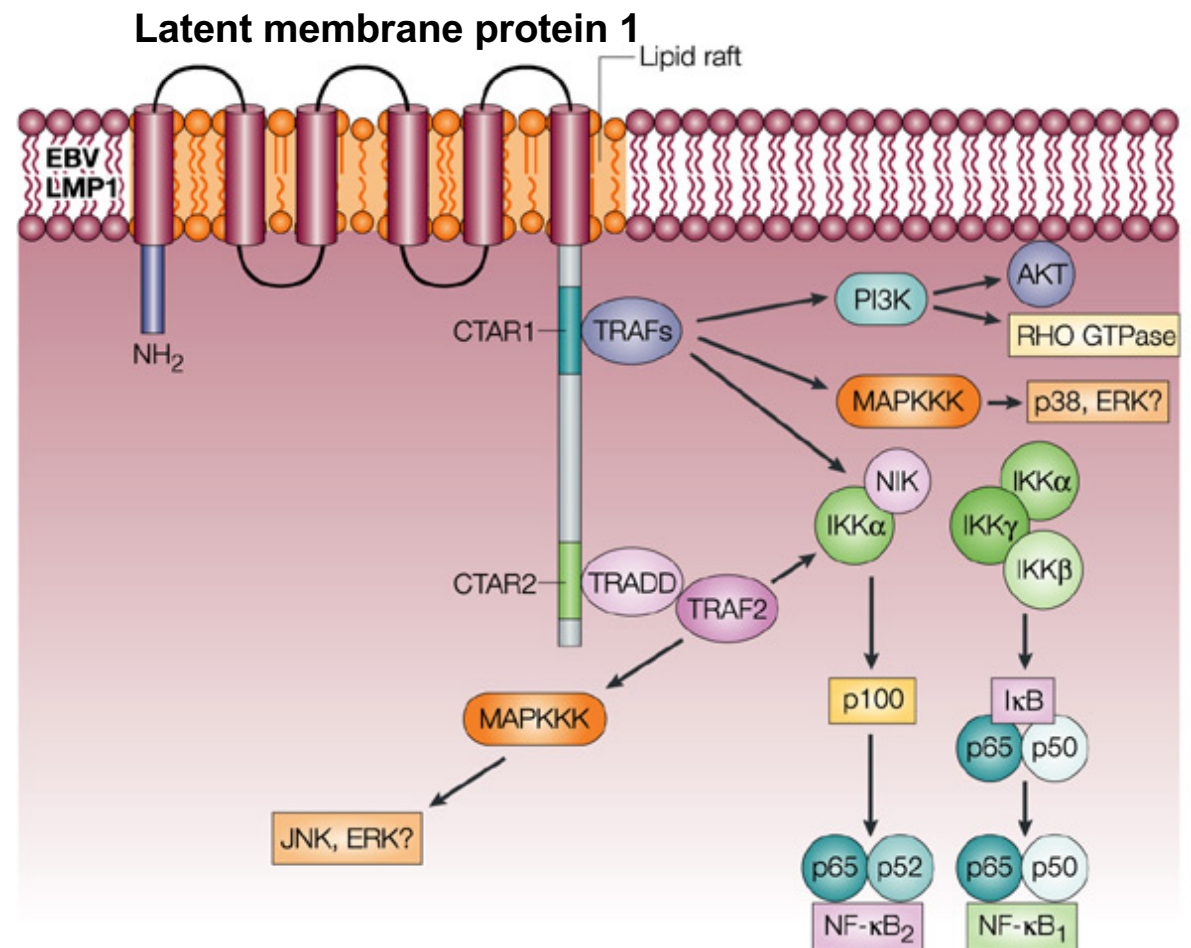
-La proteina latente di membrana 1 (LMP1) del virus Epstein-Barr (EBV) è fondamentale per la trasformazione/immortalizzazione delle cellule B indotta da EBV.

-E' un omologo funzionale di CD40 che è un membro della famiglia del TNFR

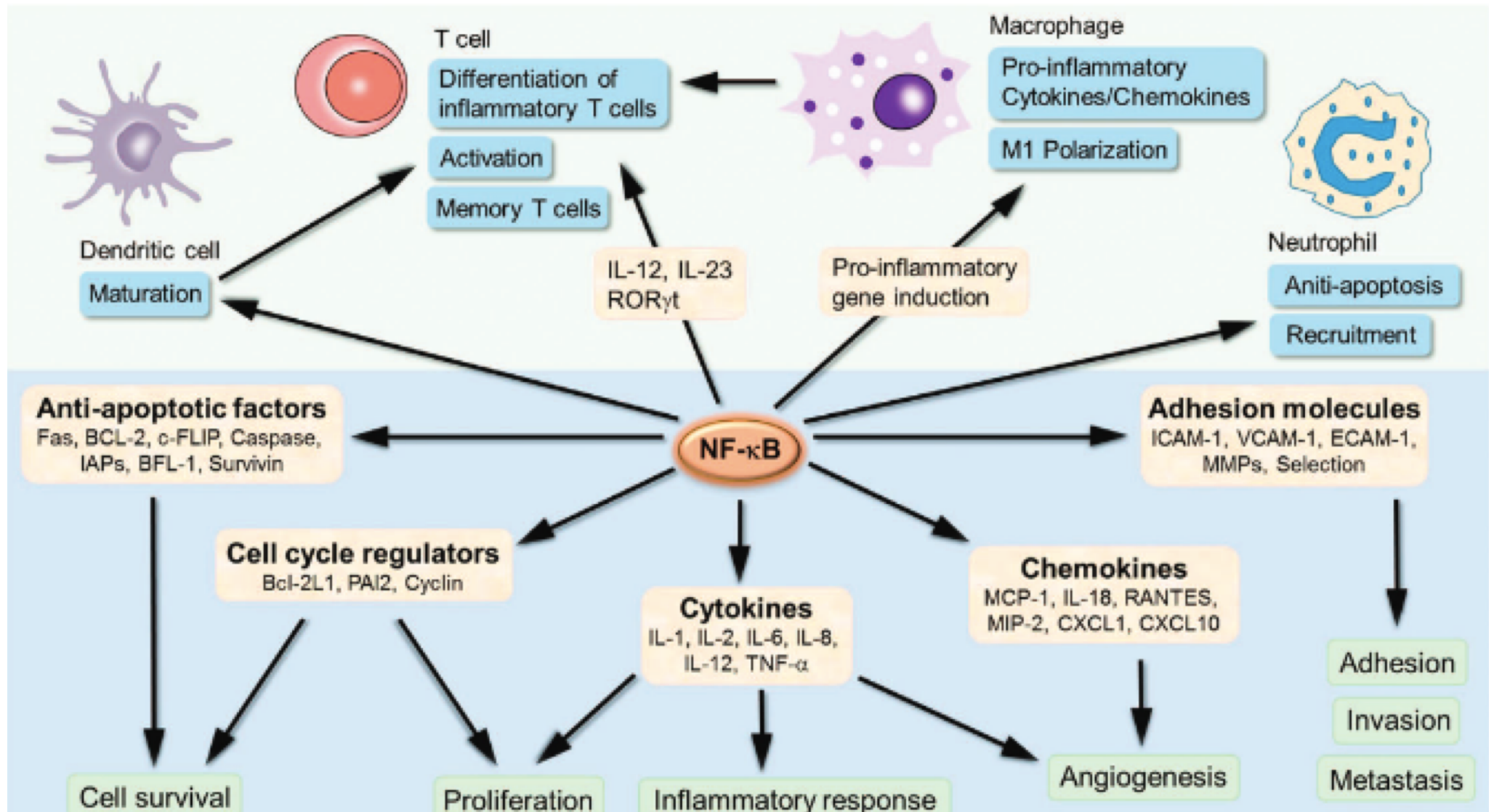
-Ha capacità di trasformare/immortalizzare i linfociti B

-Topi transgenici per LMP1 sviluppano linfomi

-La porzione carbossi-terminale di LMP1 recluta diversi membri della famiglia TRAF permettendo l'attivazione sia della via canonica che non canonica di NF $\kappa$ B.



# Geni bersaglio di NF-κB coinvolti nello sviluppo e nella progressione dell'infiammazione



NF-κB è un fattore di trascrizione inducibile. Dopo la sua attivazione, può attivare la trascrizione di vari geni e quindi regolare l'infiammazione. NF-κB ha effetto sull'infiammazione non solo direttamente aumentando la produzione di citochine infiammatorie, chemochine e molecole di adesione, ma regolando anche la proliferazione cellulare, l'apoptosi, la morfogenesi e la differenziazione.