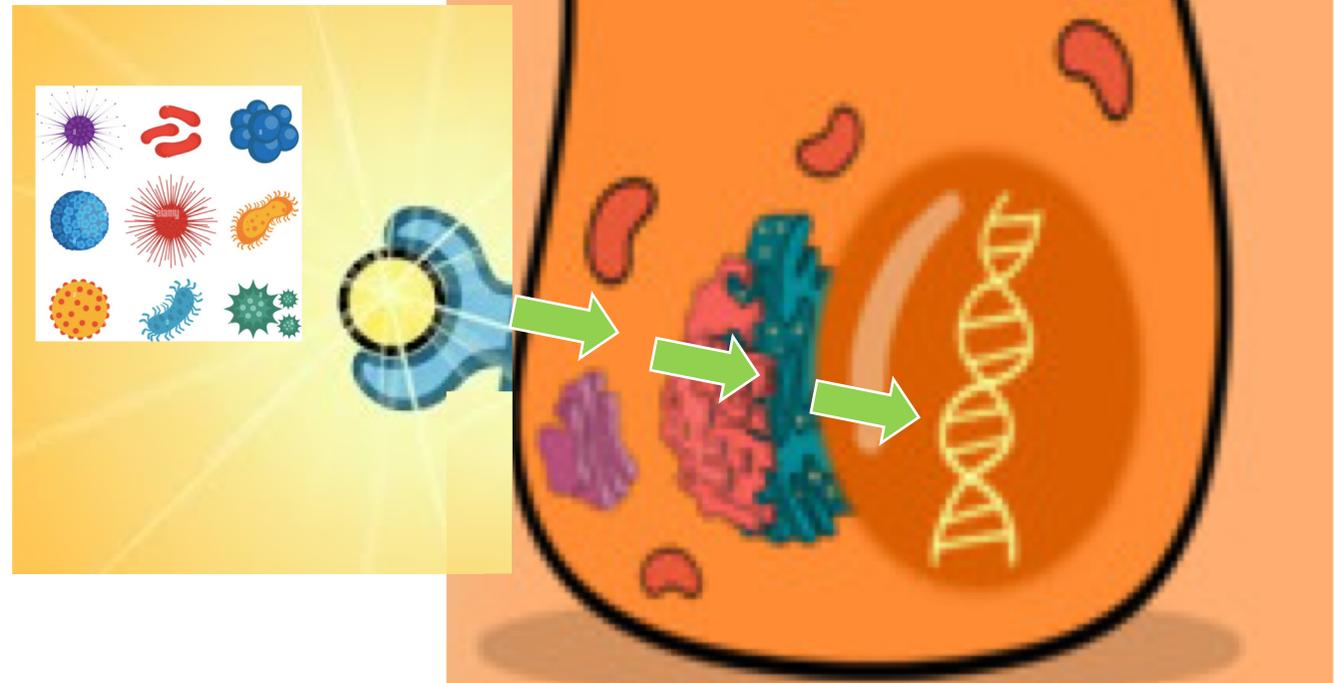


# Vie di trasduzione del segnale nelle cellule del sistema immunitario



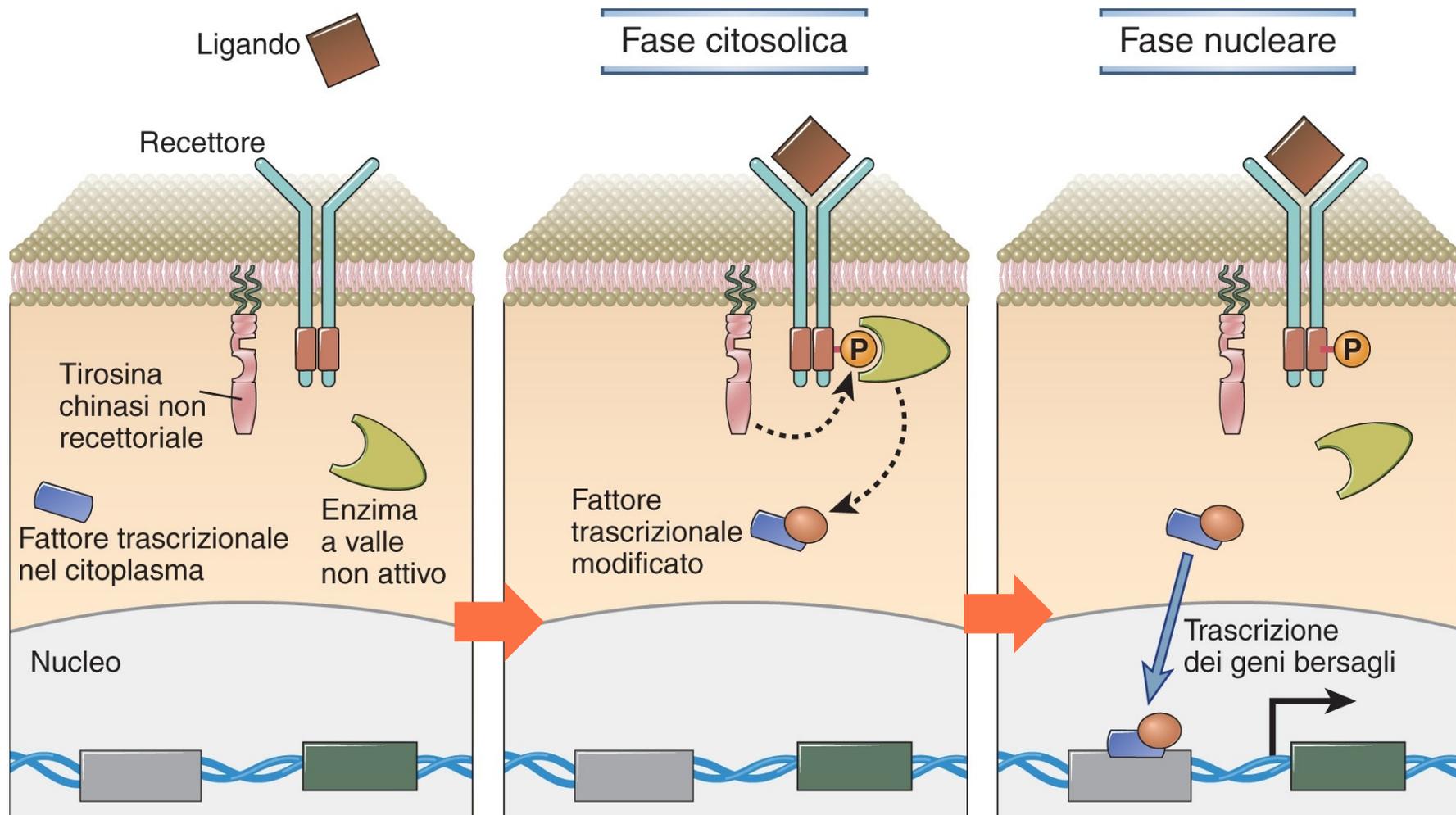
# Basi della trasduzione del segnale

Insieme di risposte biochimiche intracellulari che si attivano in seguito al riconoscimento di ligandi da parte di recettori specifici

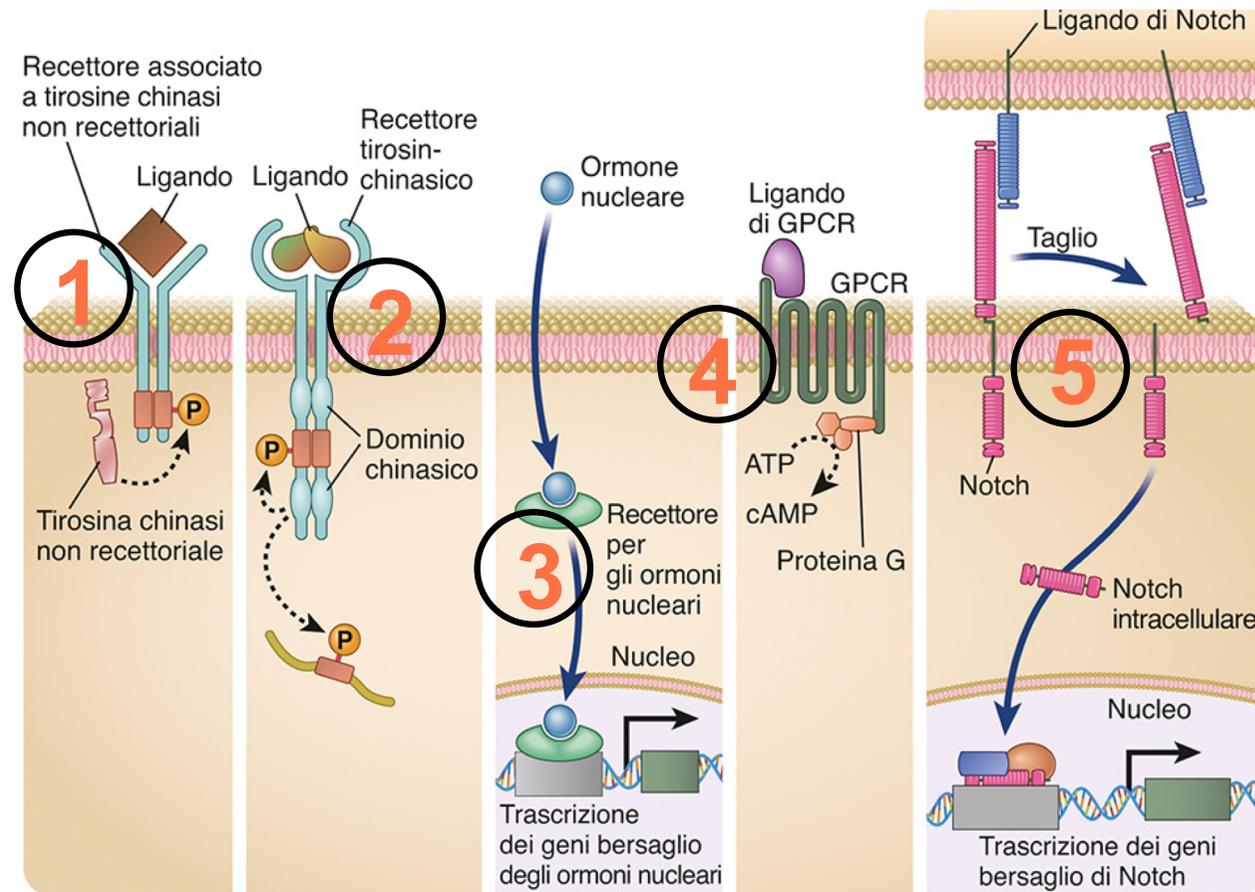
- **Fase membranaria:** interazione recettore-ligando con conseguenti modificazioni del recettore e delle proteine ad esso associate (es. fosforilazione su tirosina)
- **Fase citosolica:** reclutamento in membrana e attivazione di proteine citosoliche per indurre riorganizzazione citoscheletrica, attivazione di specifiche vie di segnalazione (es. PLC, PKC, MAPK)
- **Fase nucleare:** attivazione dei fattori di trascrizione (es. NF-AT, AP-1, NF- $\kappa$ B) e traslocazione nucleare con induzione dell'espressione di geni bersaglio (target)

# Caratteristiche generali

- Interazione recettore-ligando innesca la cascata di trasduzione del segnale
- Aggregazione dei recettori (cross-linking) o modificazione conformazionale del recettore necessari per l'attivazione

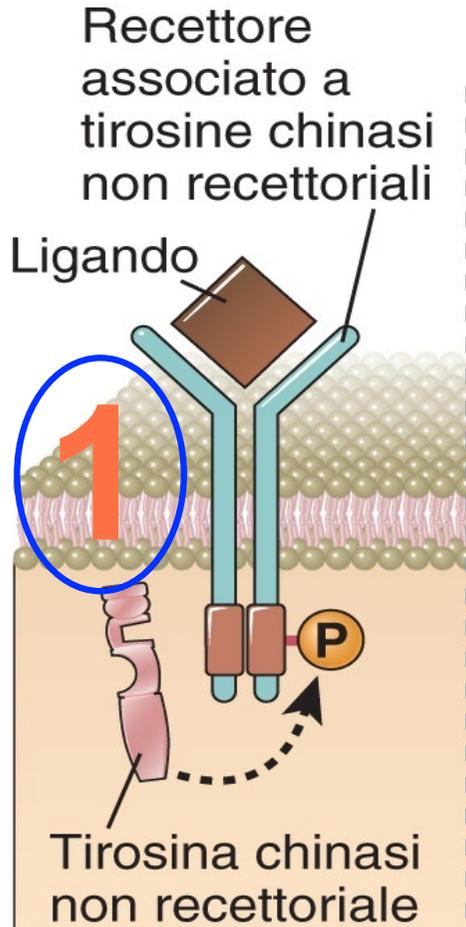


# Principali categorie di recettori del sistema immunitario

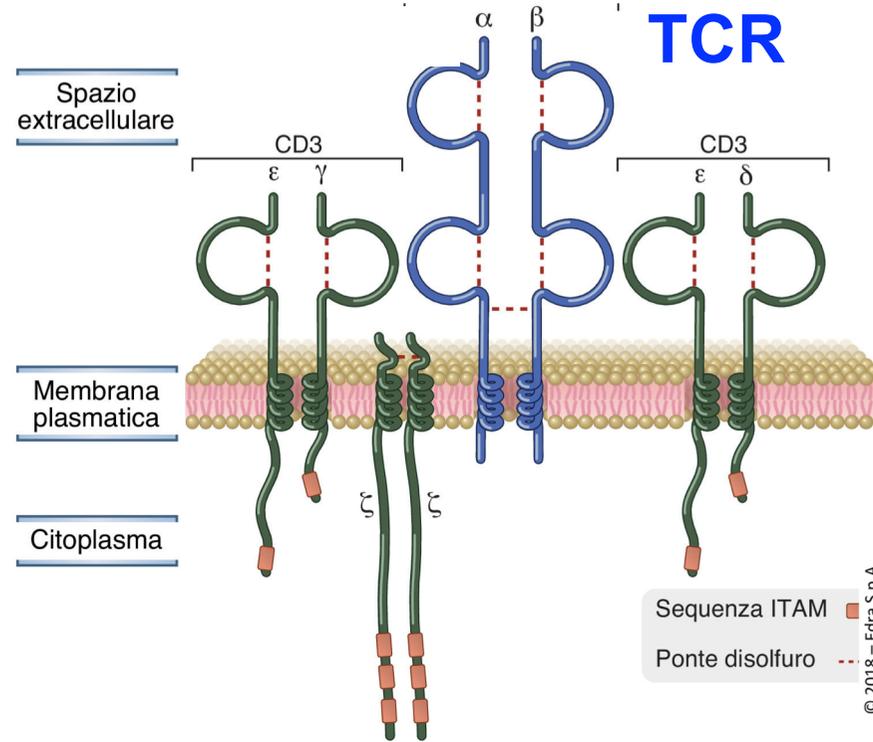


1. Recettore che utilizza una tirosin-chinasi non recettoriale
2. Recettore tirosin-chinasico
3. Recettore nucleare che in seguito a legame con ligando attiva la trascrizione genica
4. Recettori a serpentina (sette domini transmembranari) accoppiati a proteine G
5. Proteine della famiglia Notch che dopo riconoscimento del ligando sono tagliate e producono un frammento che attiva la trascrizione genica

# Recettori del sistema immunitario

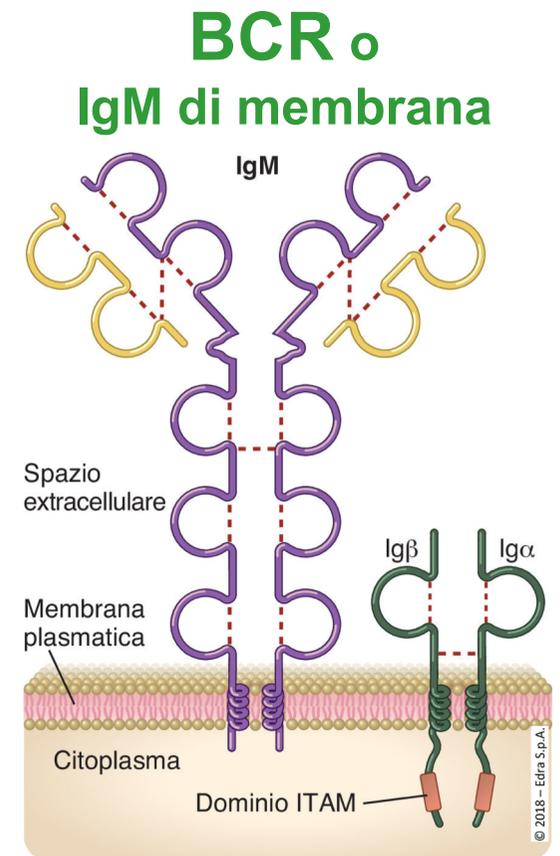


- TCR
- BCR
- FcR
- Recettori x citochine
- Integrine

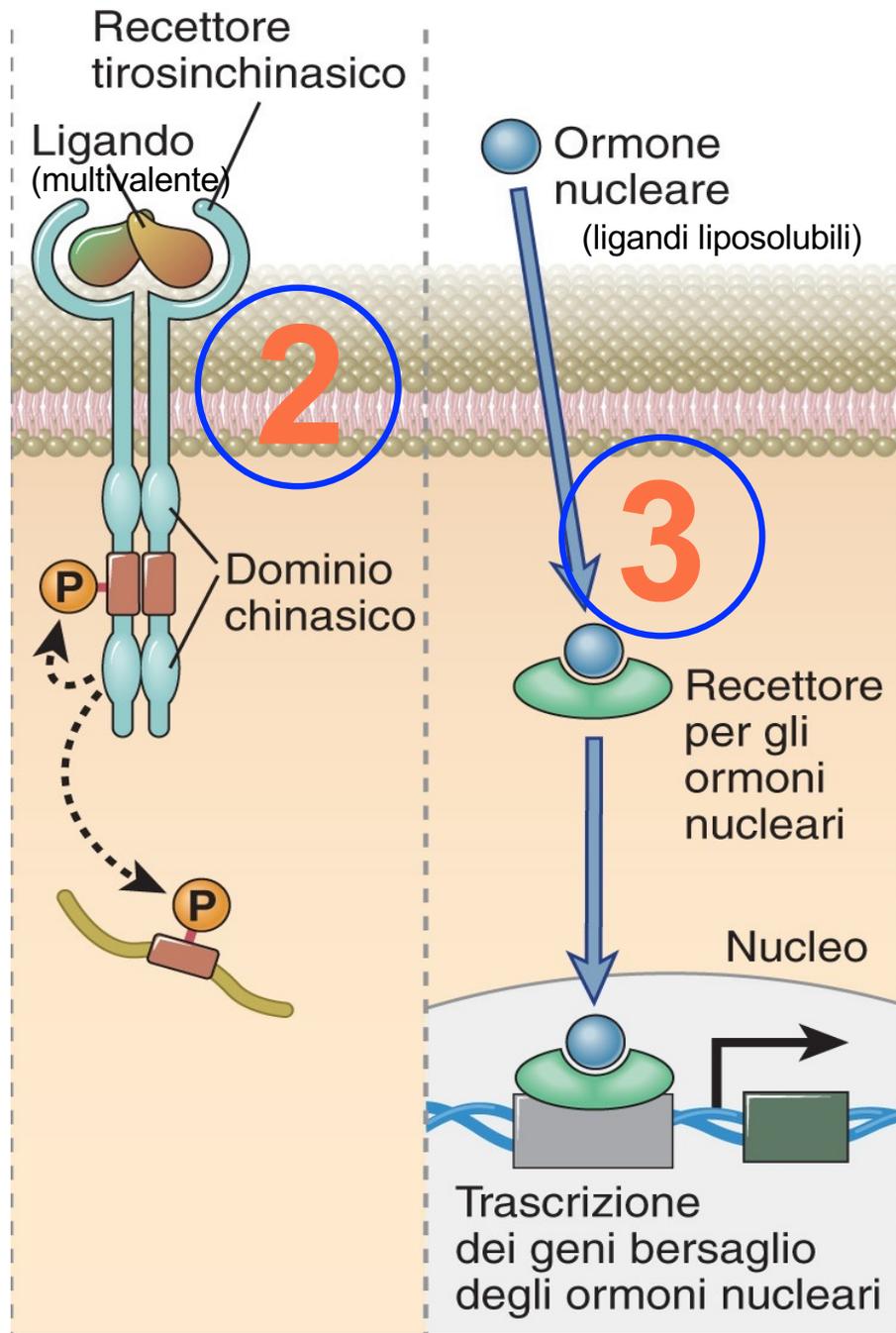


## Componenti del complesso del TCR

## Complesso recettoriale per l'antigene dei linfociti B



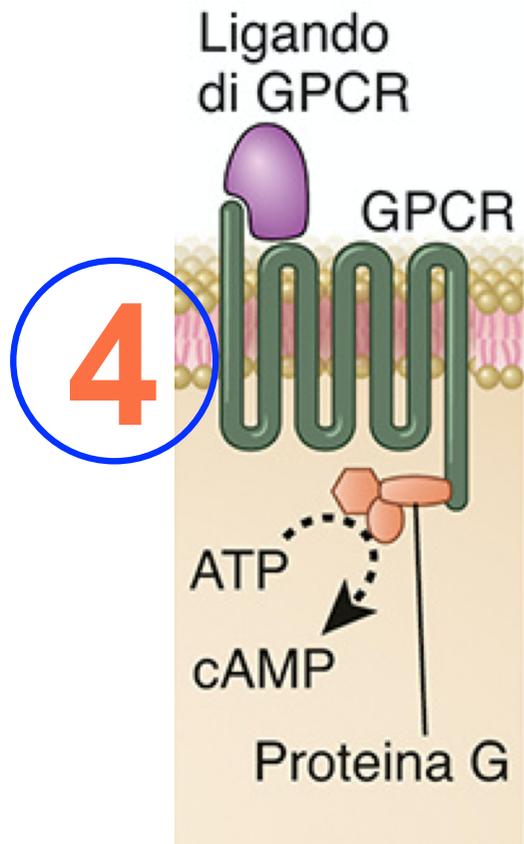
# Recettori del sistema immunitario



- ❖ c-Kit
- ❖ EGF-R
- ❖ PDGF-R
- ❖ IR

- ❖ Recettore della Vitamina D
- ❖ Recettore dei glucocorticoidi

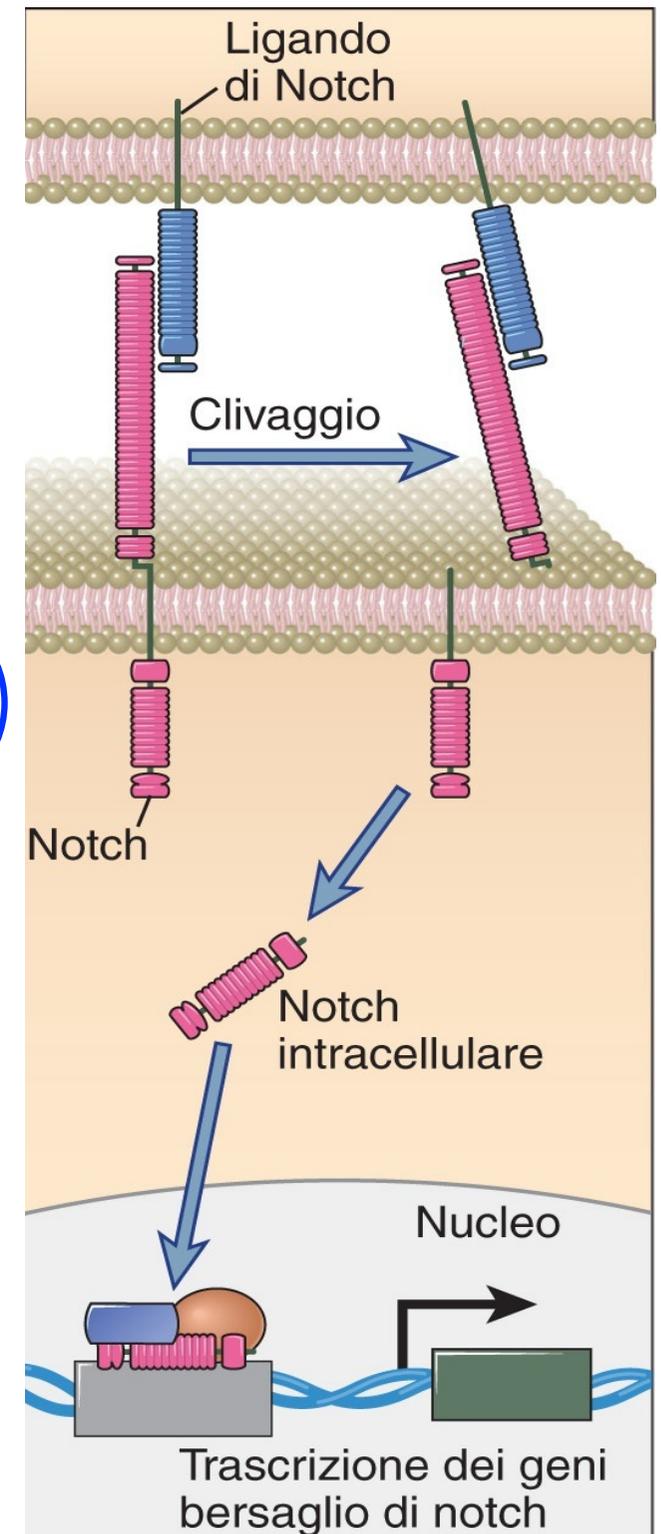
# Recettori del sistema immunitario



Recettori per:

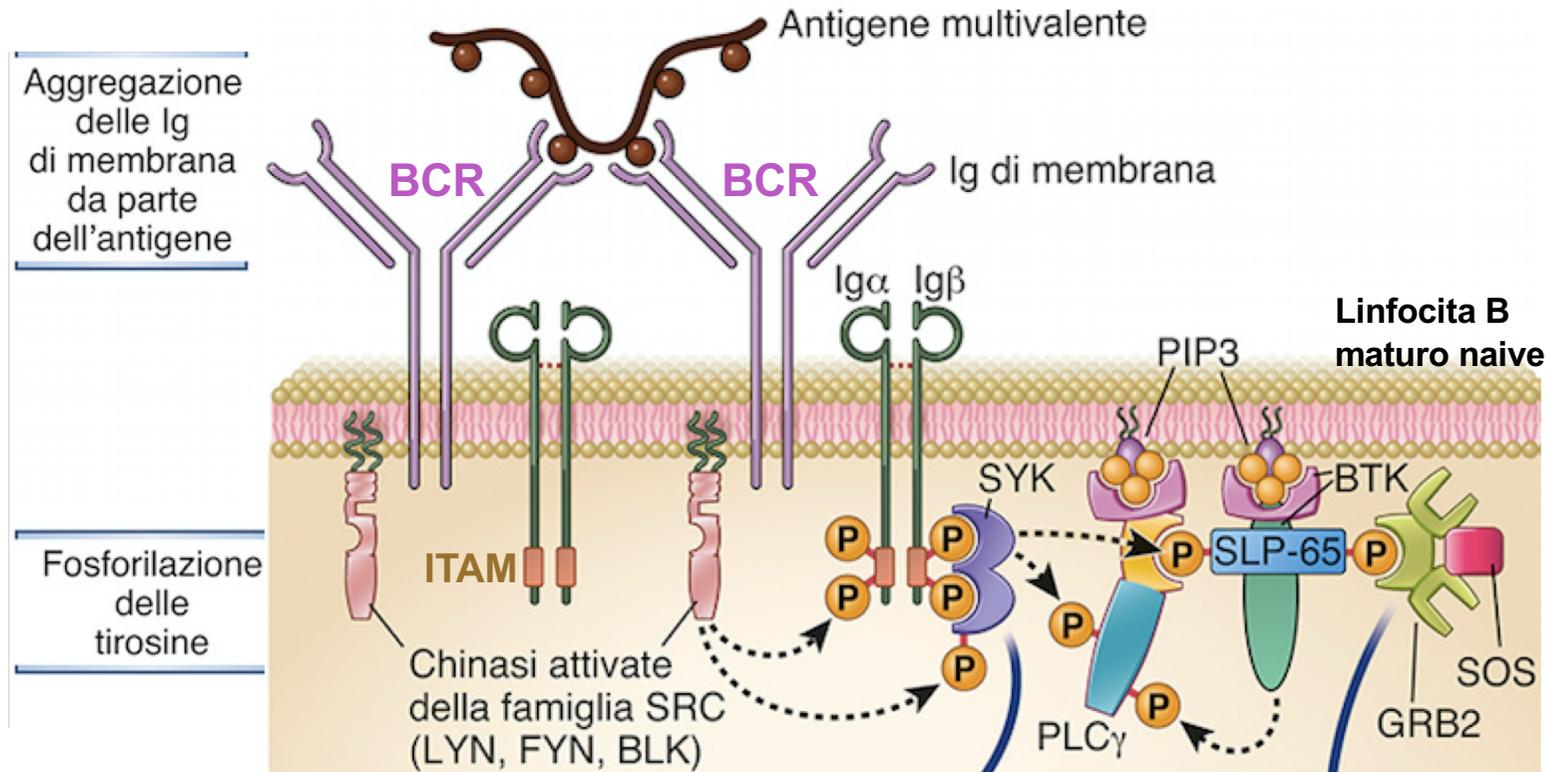
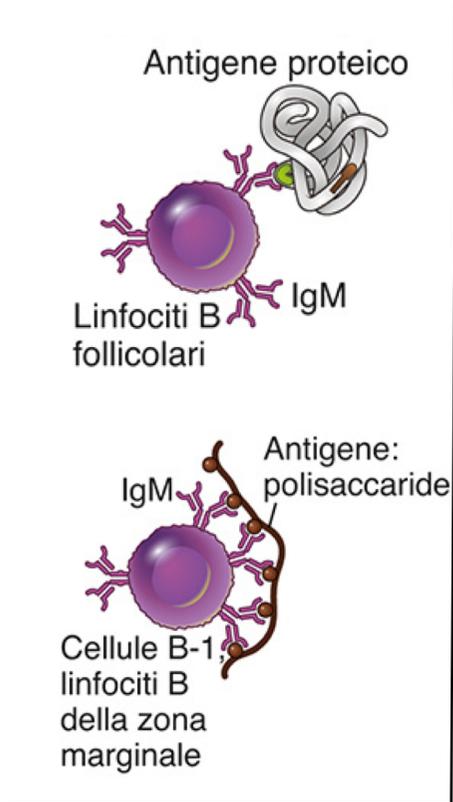
- Chemochine
- Leucotrieni
- Prostaglandine
- istamina
- C3a, C5a (frammenti del Complemento)

5



# **Proteine per la trasduzione del segnale e proteine adattatrici**

# Trasduzione del segnale da parte del complesso del recettore dei linfociti B (BCR)

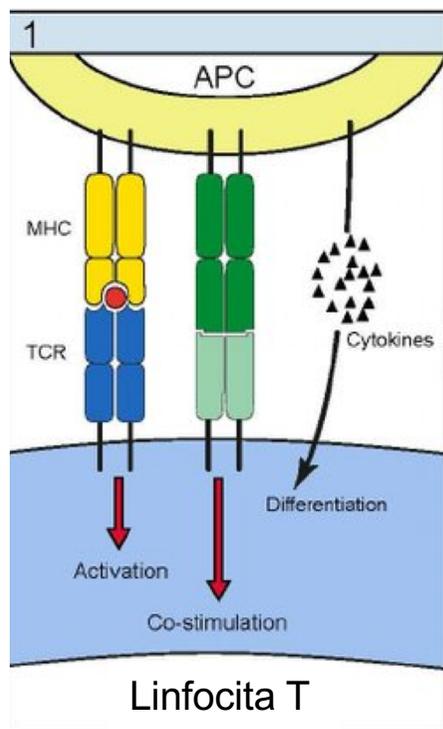


Intermedi biochimici

Enzimi attivati

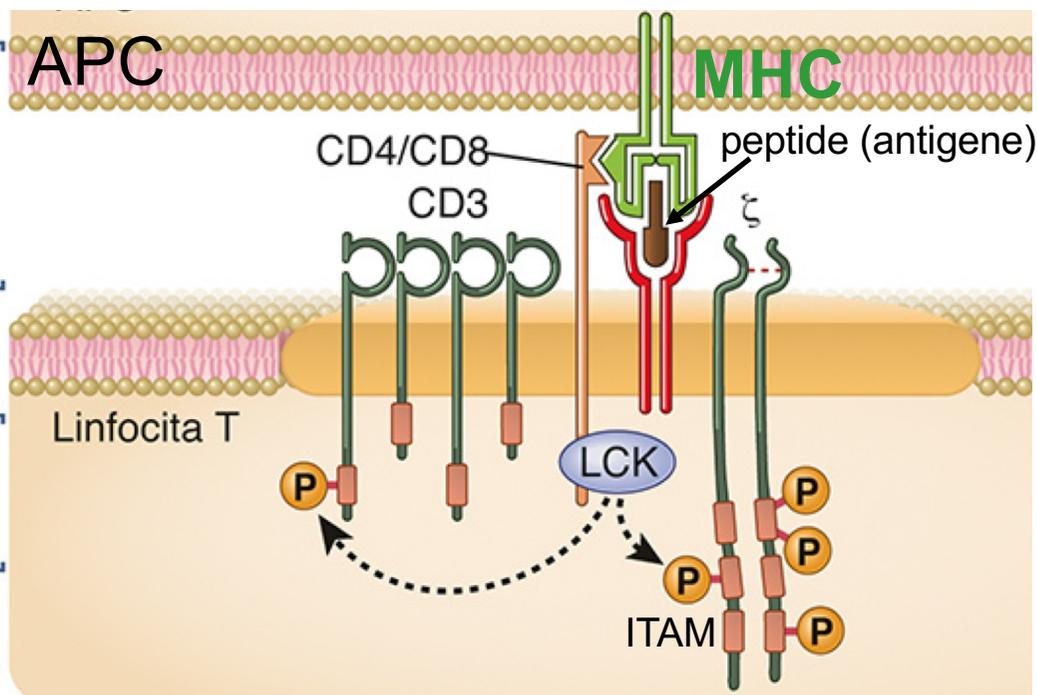
Attivazione di fattori di trascrizione

# Eventi precoci di trasduzione del segnale da parte del complesso del recettore dei linfociti T (TCR)



In seguito al riconoscimento dell'antigene il complesso del TCR e i corecettori vengono raggruppati nei raft di membrana

LCK fosforila le tirosine presenti nelle ITAM della catena  $\zeta$



Fosforilazione delle tirosine

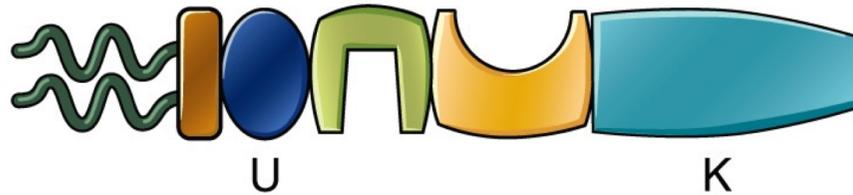
Intermedi biochimici

Enzimi attivati

Attivazione di fattori di trascrizione

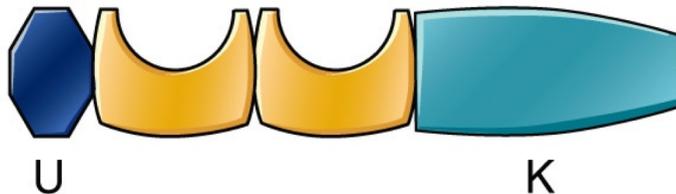
# Proteine di trasduzione (TIROSIN CHINASI)

## Chinasi della famiglia Src



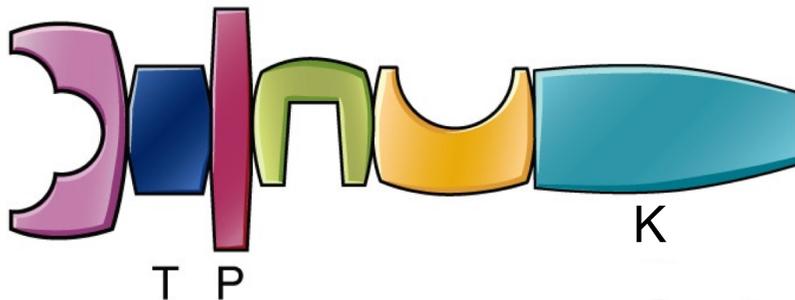
**Src Family:** p56 Lck; p59 Fyn; Lyn; Blk, miristilate all'N-terminale → localizzazione nei **raft lipidici**, fosforilano le **ITAM**

## Chinasi della famiglia Syk



**Syk family:** Syk e Zap-70, legano le sequenze **ITAM fosforilate** e vengono così reclutate al recettore e attivate

## Chinasi della famiglia Tec



**Tec family:** Itk, Btk e Tec: vengono reclutate in membrana tramite l'interazione con i fosfolipidi (PIP3) e attivate

U: dominio unico  
T: dominio di omologia TEC  
K: dominio chinasico  
P: peptide ricco di residui di prolina



**SH2:** (100 aa): il dominio SH2 riconosce sequenze comprendenti **tirosine fosforilate (fosfotirosine)**

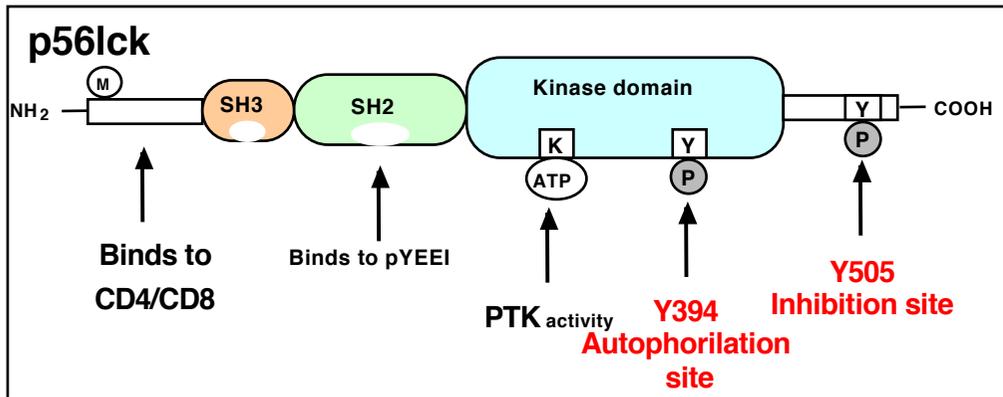


**SH3:** (100 aa): il dominio SH3 riconosce sequenze **ricche in prolina**



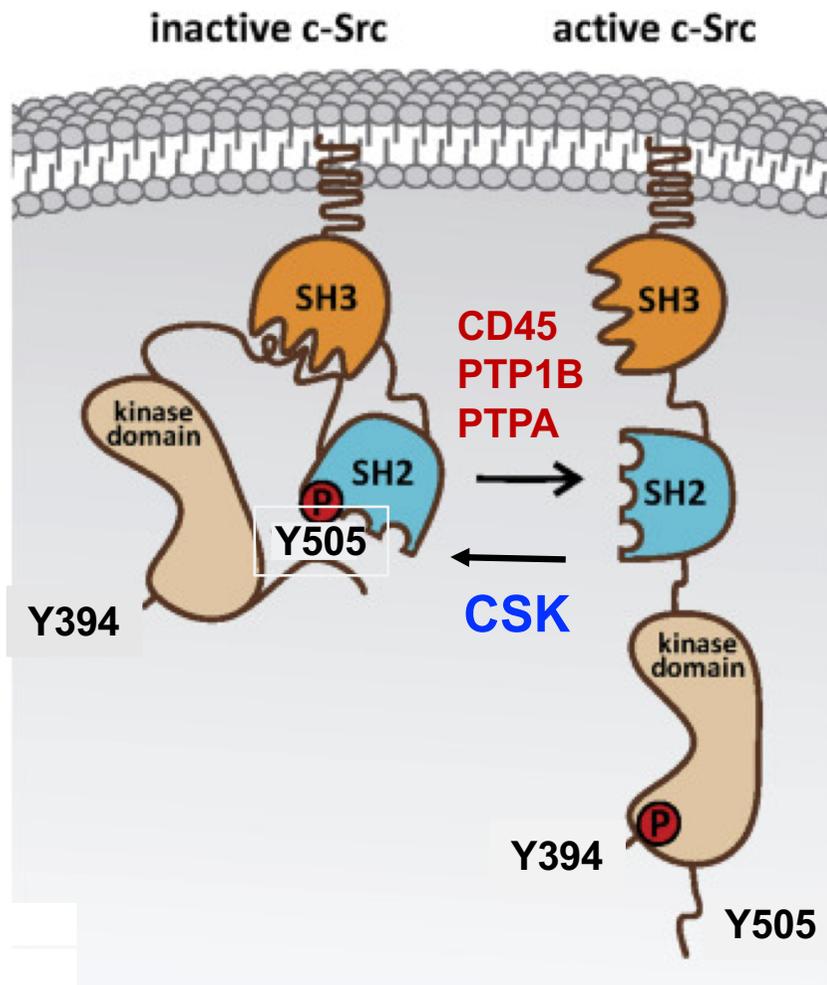
**PH:** il dominio PH (Pleckstrin homology domain) riconosce **inositol-fosfolipidi** (es. **PIP3**)



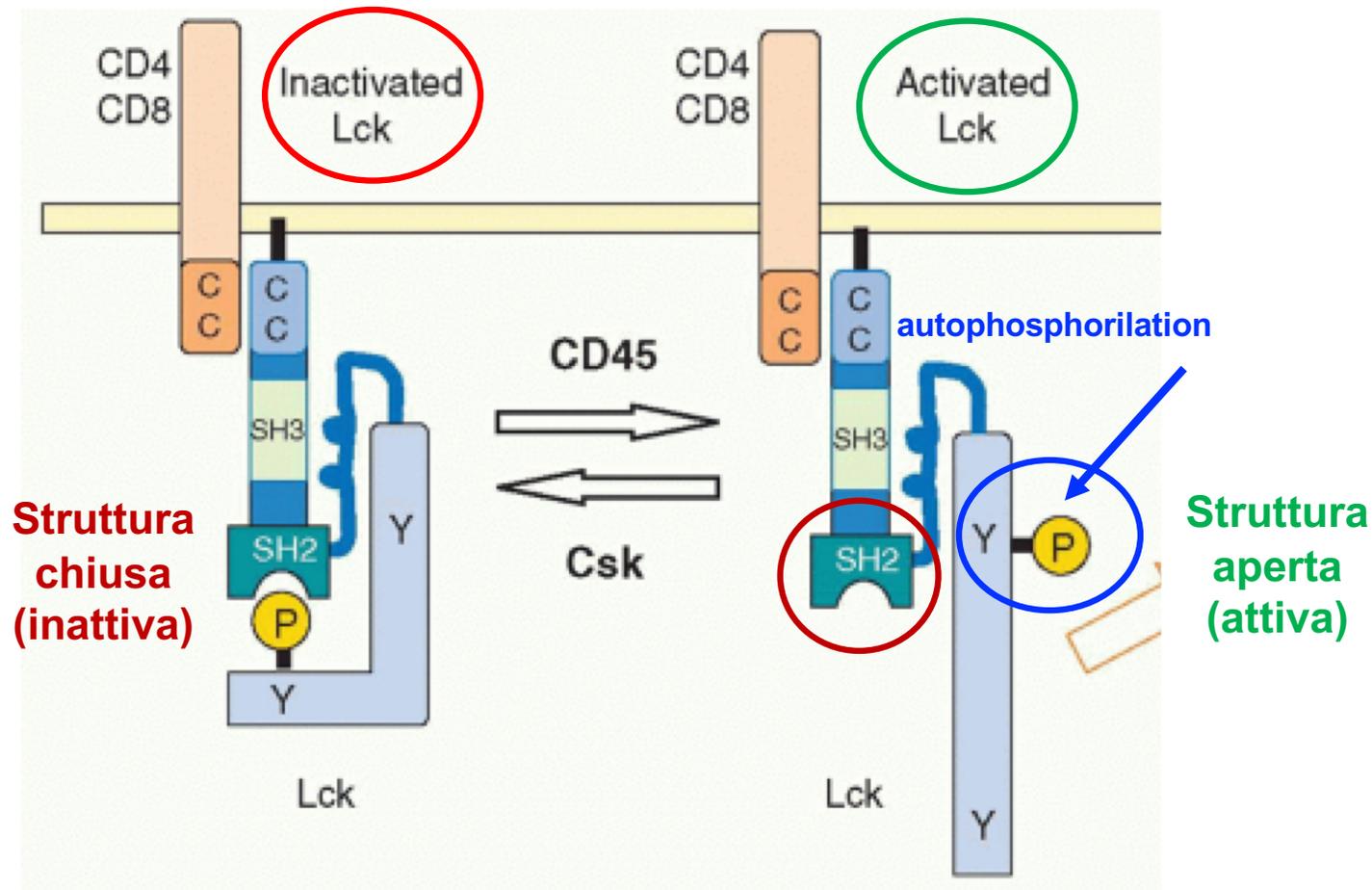


## Regolazione delle Src chinasi

- Tirosina C-terminale (regolazione negativa):** quando fosforilata mantiene la chinasi in uno stato inattivo e chiuso
- Tirosin chinasi come **p50Csk** fosforilano la Tyr C-terminale (inattivazione) → il dominio SH2 della chinasi lega la Tyr fosforilata C-terminale chiudendo il sito chinasico
- Fosfatasi come **CD45** o PTP1B, PTPA defosforilano la Tyr C-terminale (attivazione) → la chinasi si apre e si autofosforila
- Tirosina del dominio chinasico (positiva):** sito di autofosforilazione

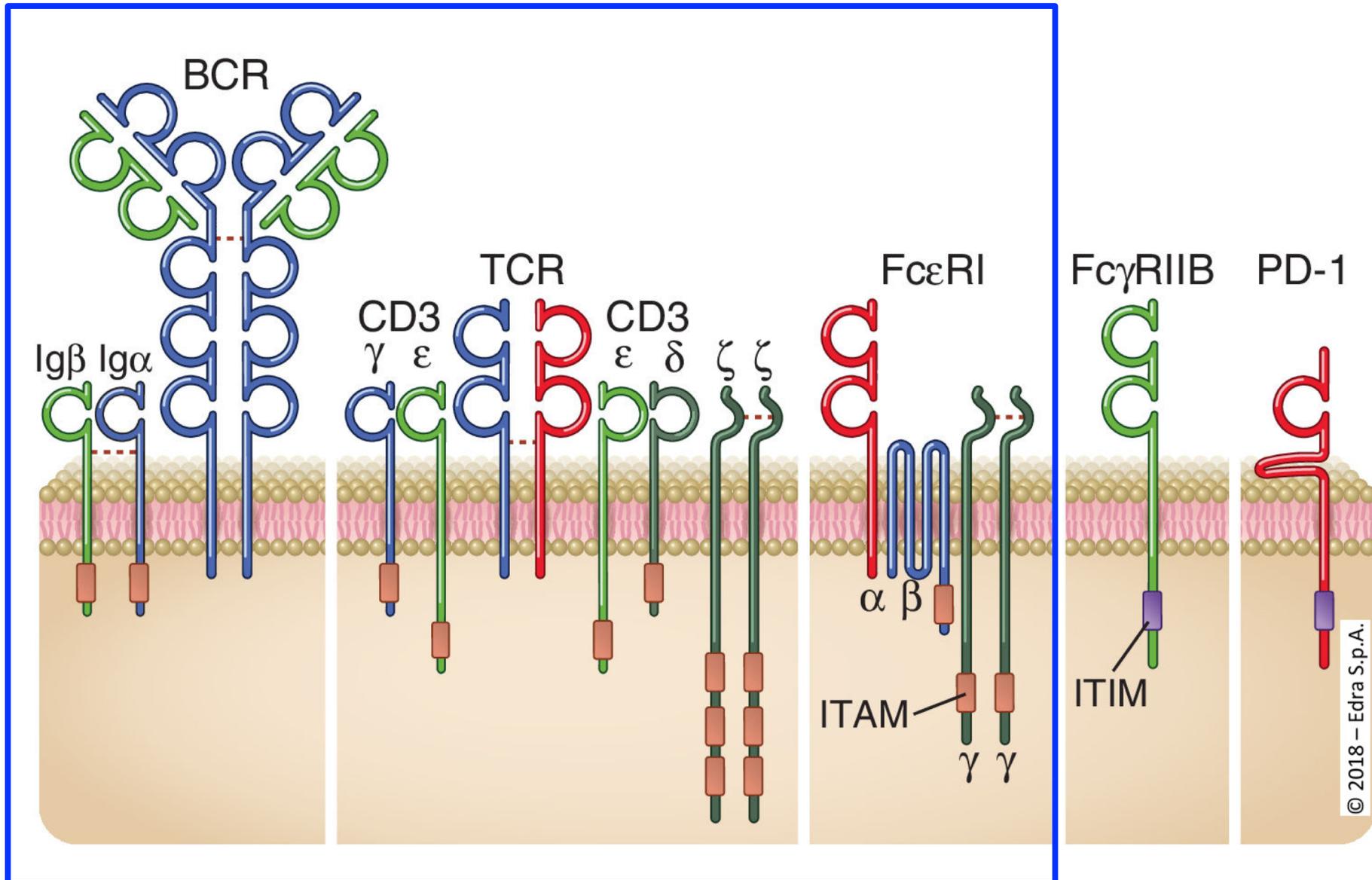


## Regolazione della Src chinasi Lck



Regulation of the Src Kinase Lck activation by the **Tyrosine Kinase Csk** and the **Phosphatase CD45**. In resting T cells, Lck has a closed configuration through the intra-association between the phosphorylated tyrosine at the C terminus and the Src-homology 2 domain. C-terminus src kinase (**Csk**) phosphorylates this regulatory tyrosine residue. The association between CD4 and Lck is mediated by the interaction of the cysteine-containing regions of both molecules. CD45 dephosphorylates the C-terminus tyrosine, which alters the configuration from the closed structure as the “**inactivated Lck**” to an open shape as the “**activated Lck**” with active kinase function.

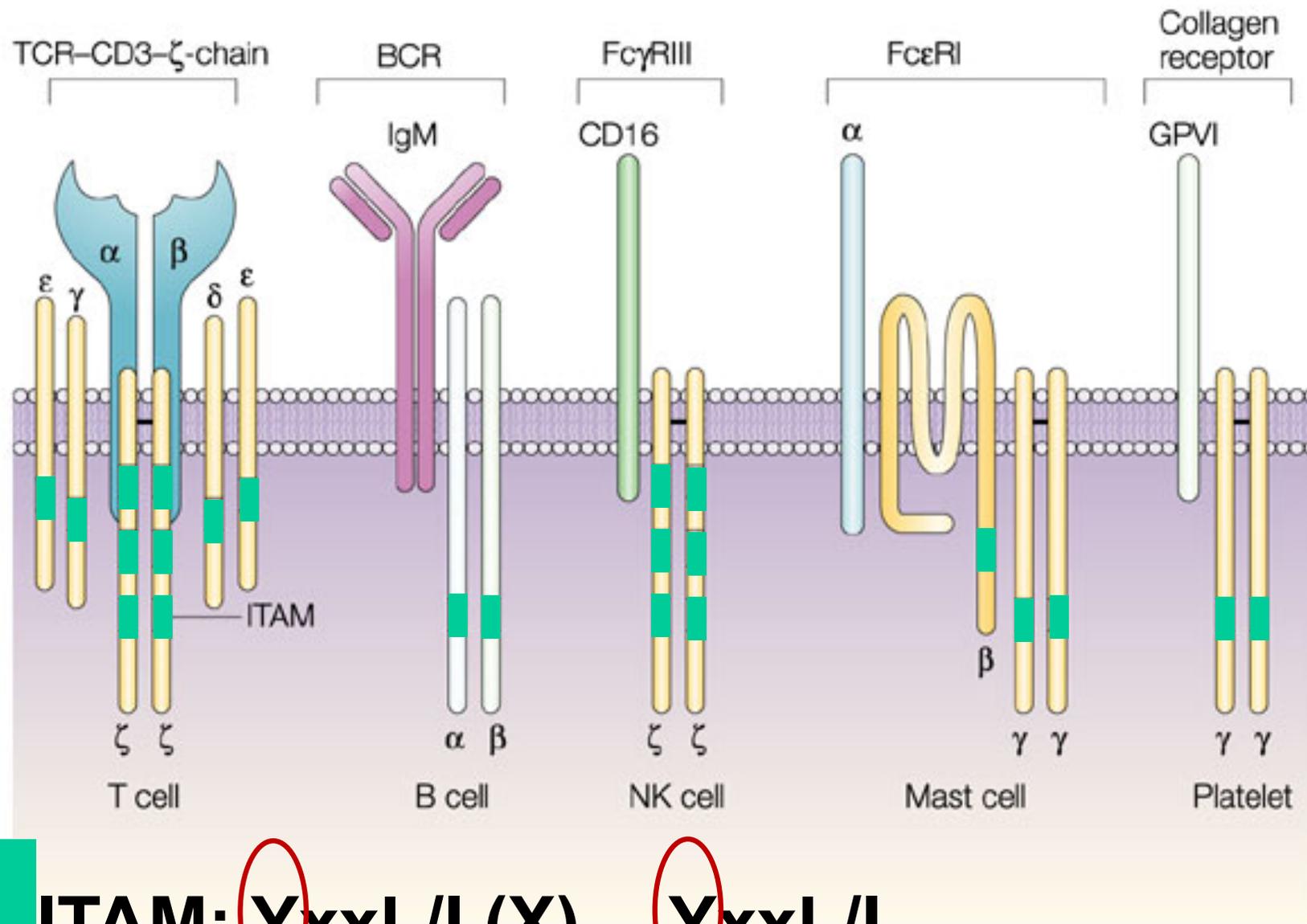
## Alcuni membri della famiglia degli immunorecettori



© 2018 – Edra S.p.A.

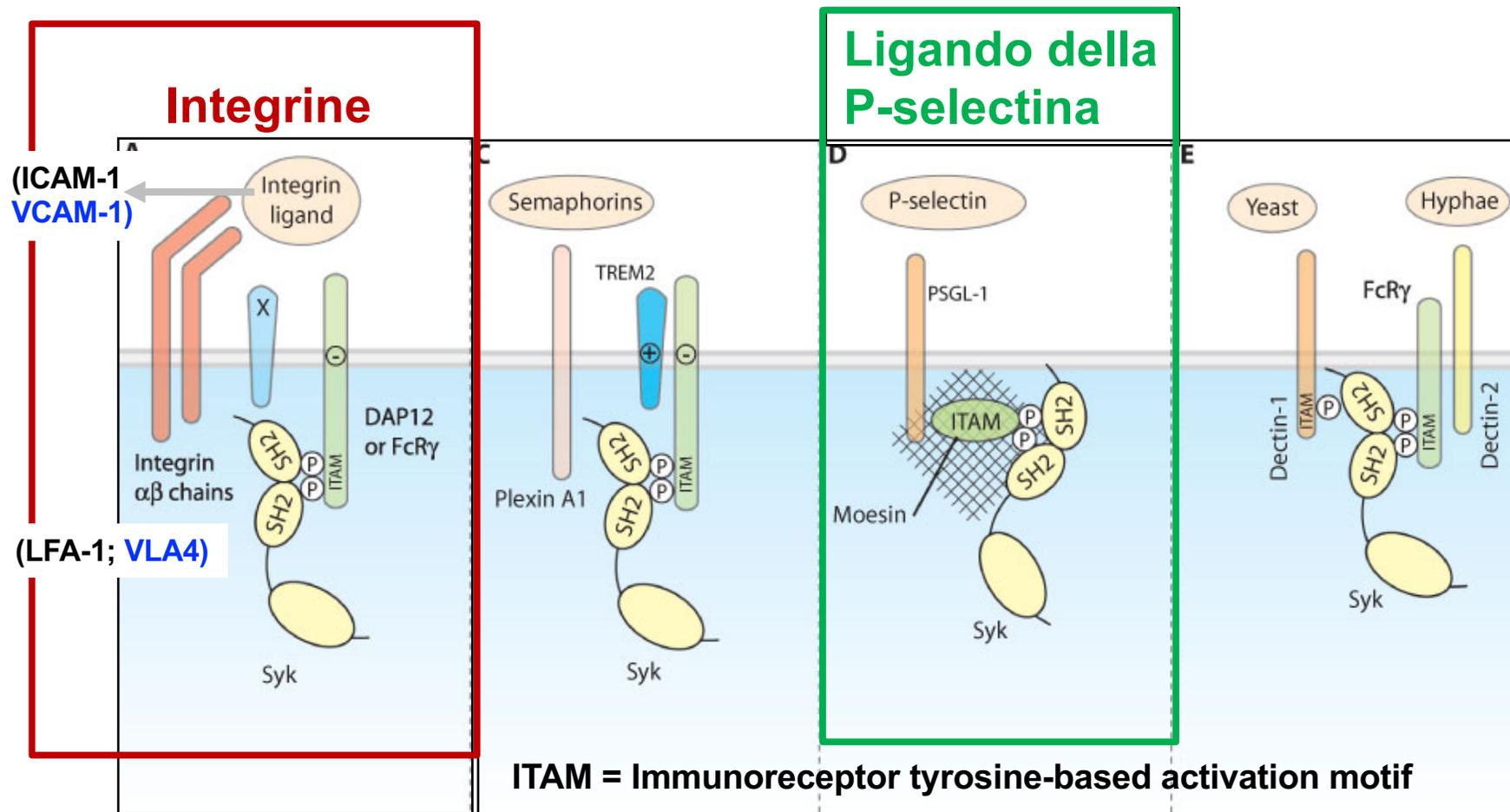
Complessi recettoriali composti da catene deputate al riconoscimento del ligando e catene contenenti **motivi ITAM citoplasmatici** responsabili della trasduzione del segnale

# Le sequenze ITAM



ITAM = Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif

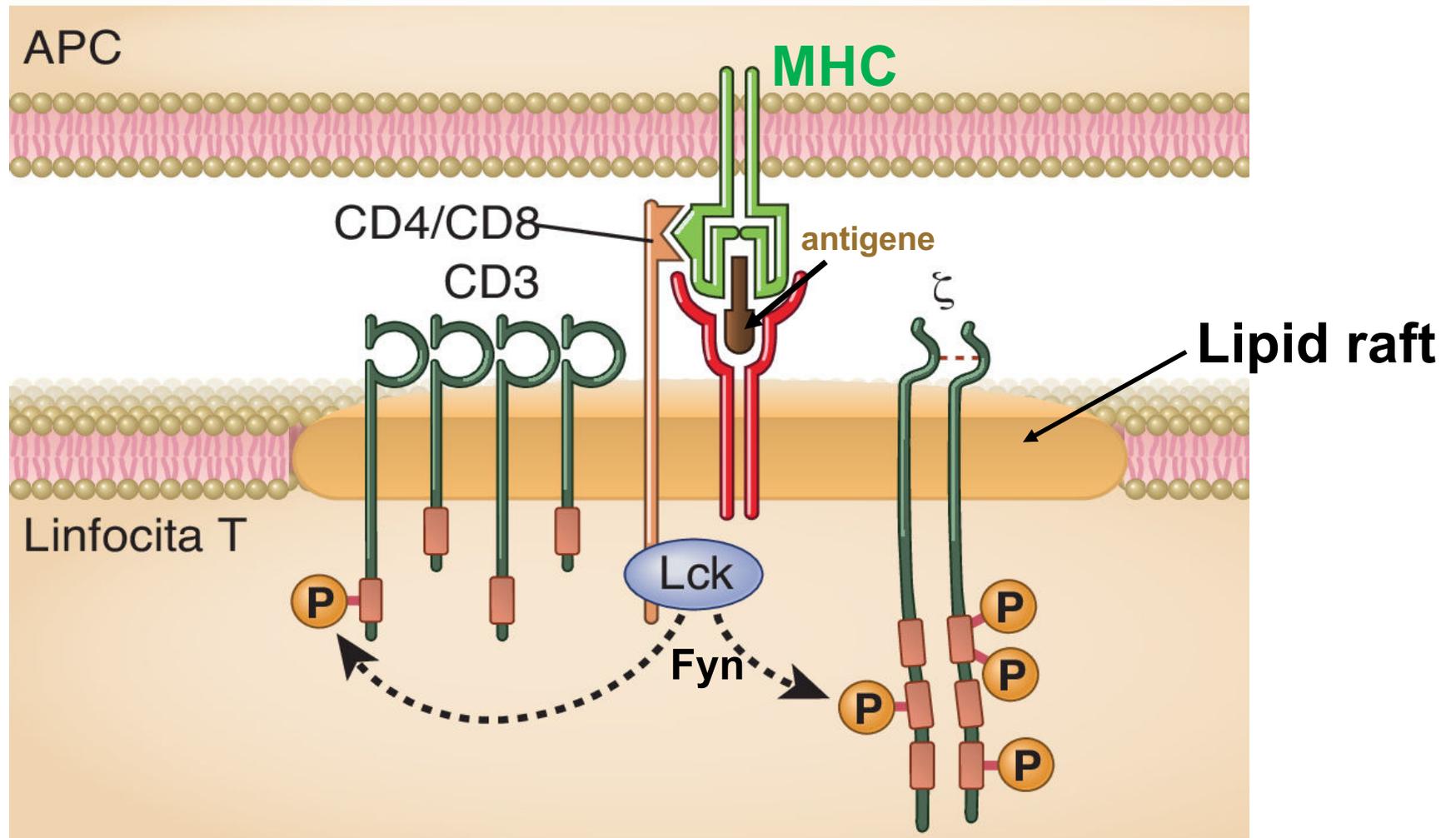
# Altri recettori che utilizzano le ITAM



**Integrine:** Es **LFA-1** e **VLA-4** coinvolte nell'adesione stretta dei leucociti all'endotelio durante il reclutamento o nell'adesione cellula-cellula o con la matrice extracellulare. Ligandi **ICAM-1** e **VCAM-1**.

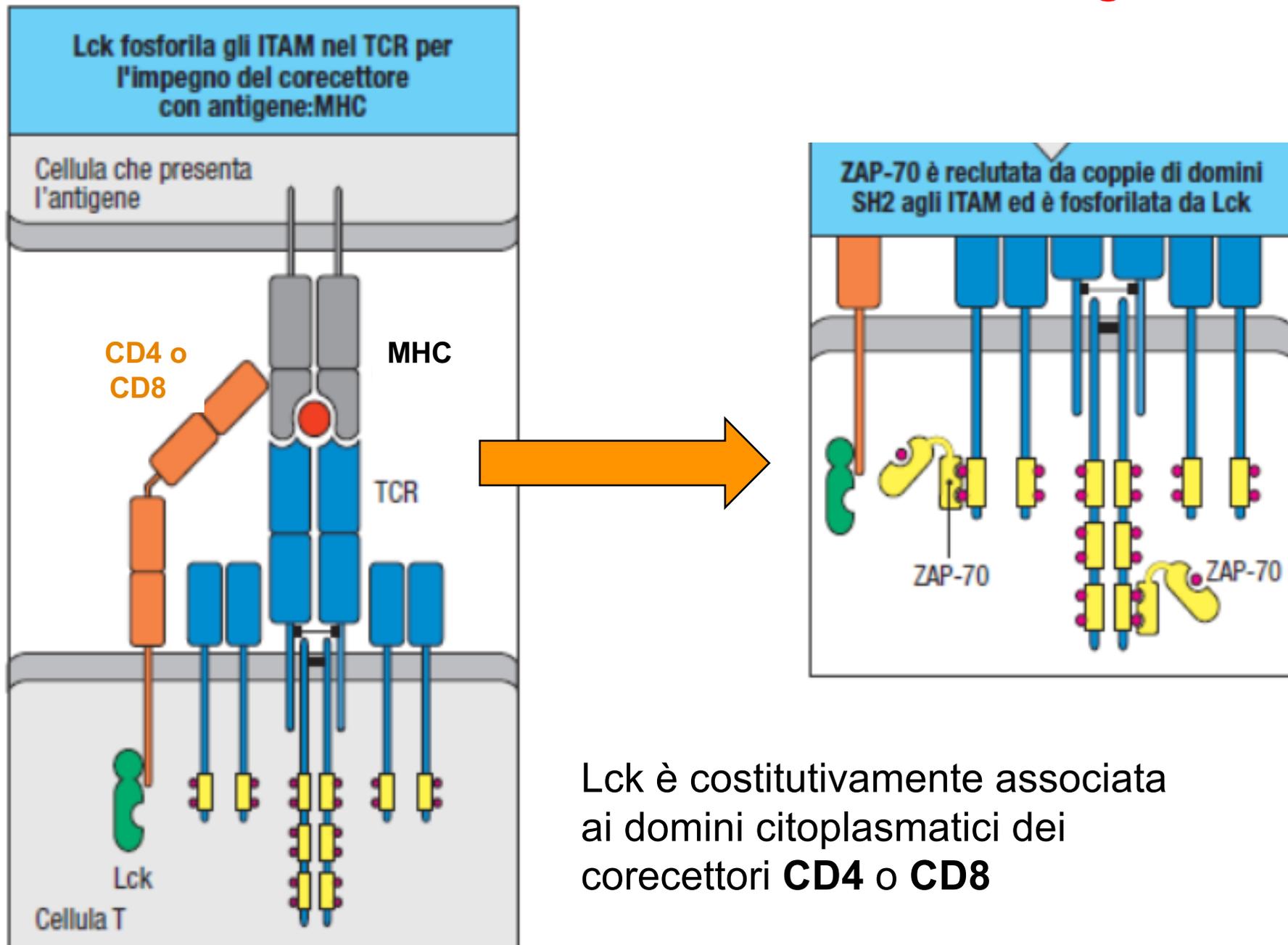
**Ligando della P-selectina (PSGL1):** espresso dai leucociti lega la P-selectina presenti sulle cellule endoteliali promuovendone l'adesione blanda durante il reclutamento.

## Eventi precoci di fosforilazione delle Tyr delle ITAM durante l'attivazione dei linfociti T

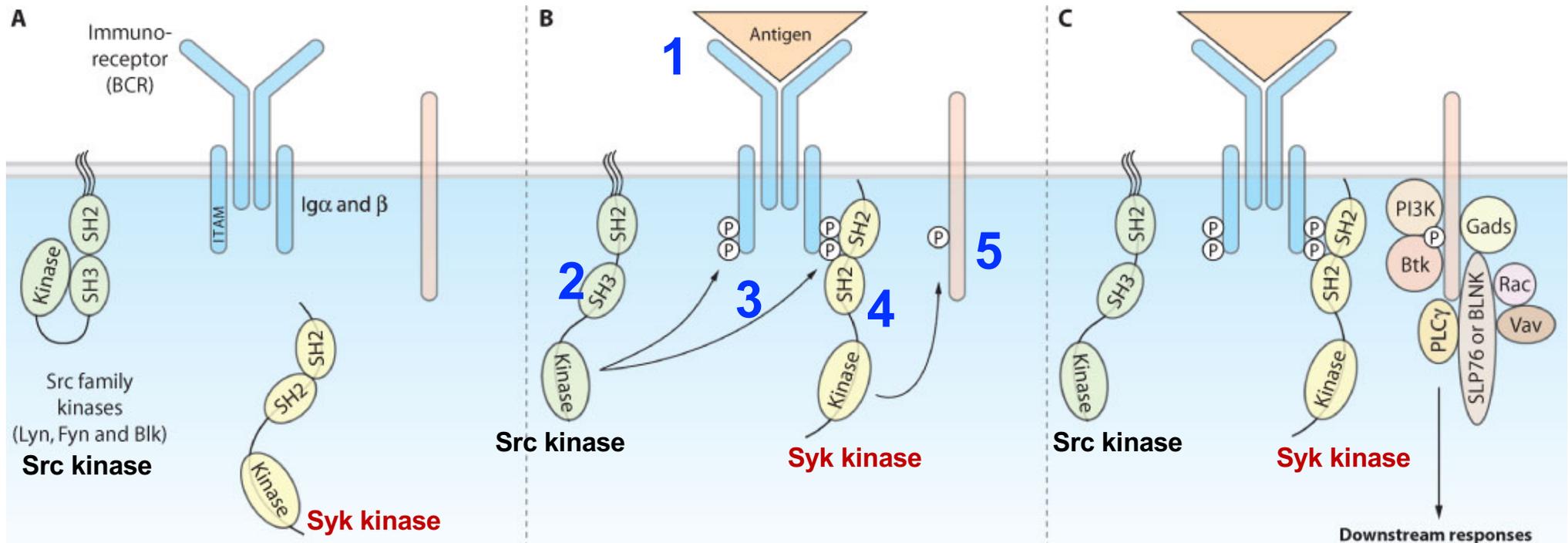


- In seguito al riconoscimento dell'antigene il TCR e il corecettore CD4/CD8 vengono raggruppati nei raft lipidici di membrana.
- Lck (o anche Fyn) fosforila le Tyr nelle sequenze ITAM nel CD3 e delle catene zeta

# L'impegno dei corecettori con il complesso MHC:antigene aiuta inizialmente la trasduzione del segnale

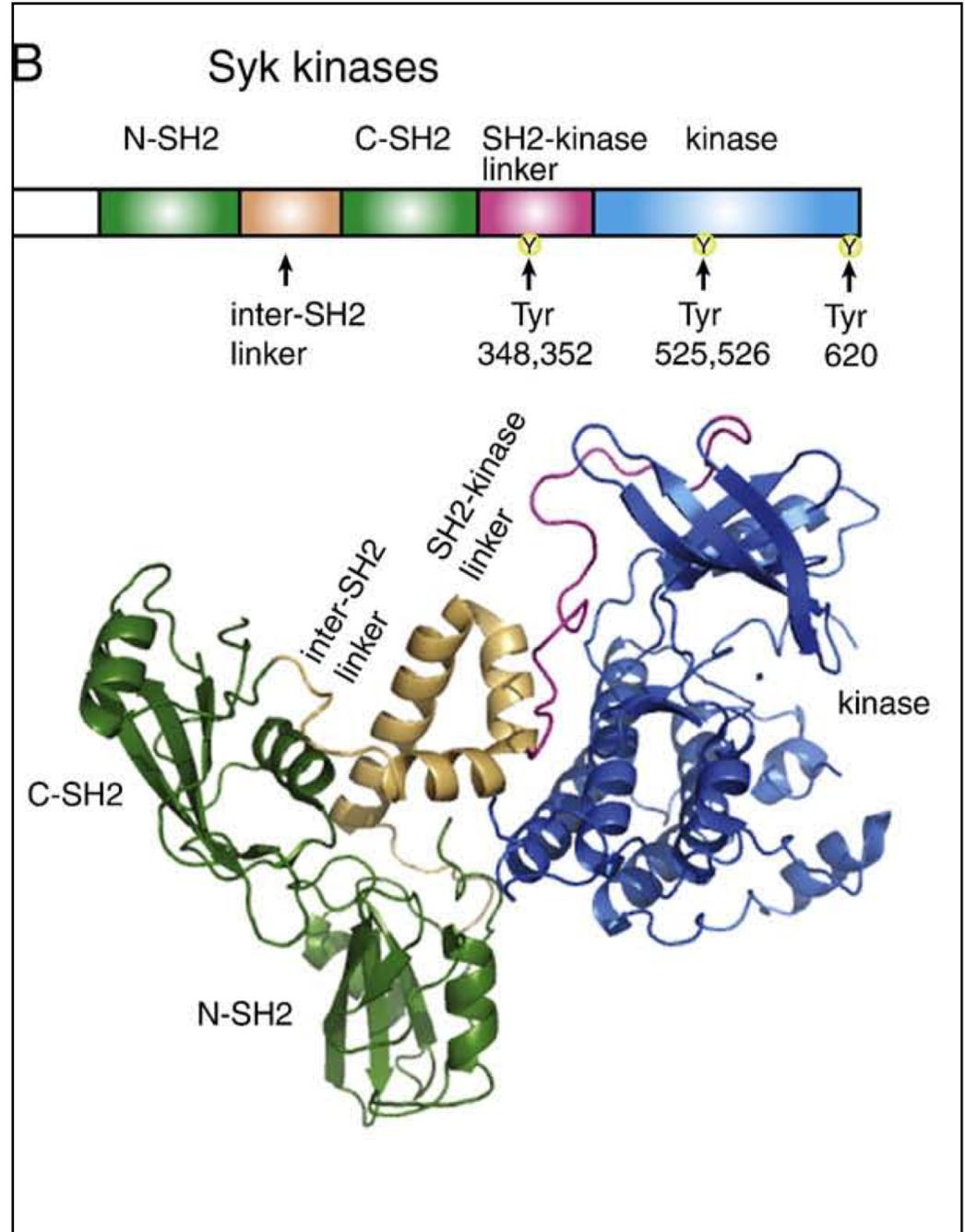
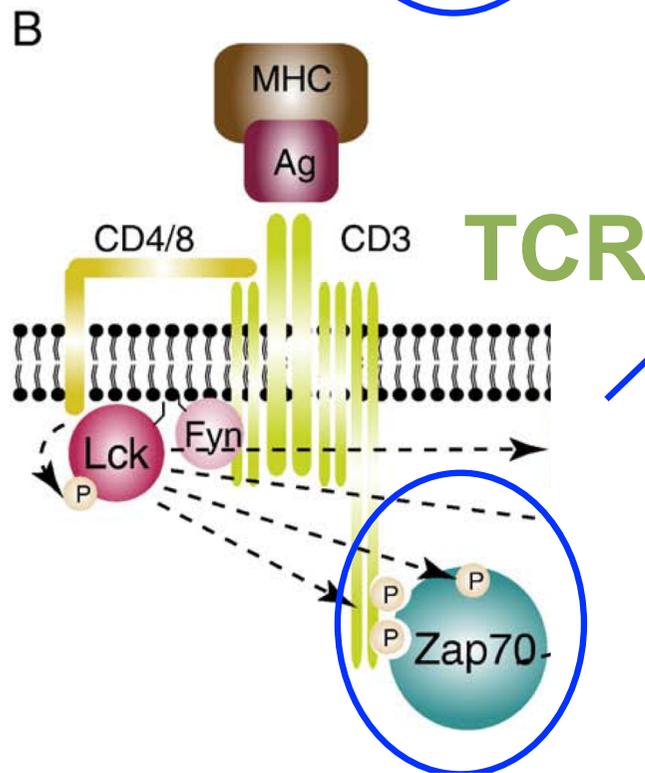
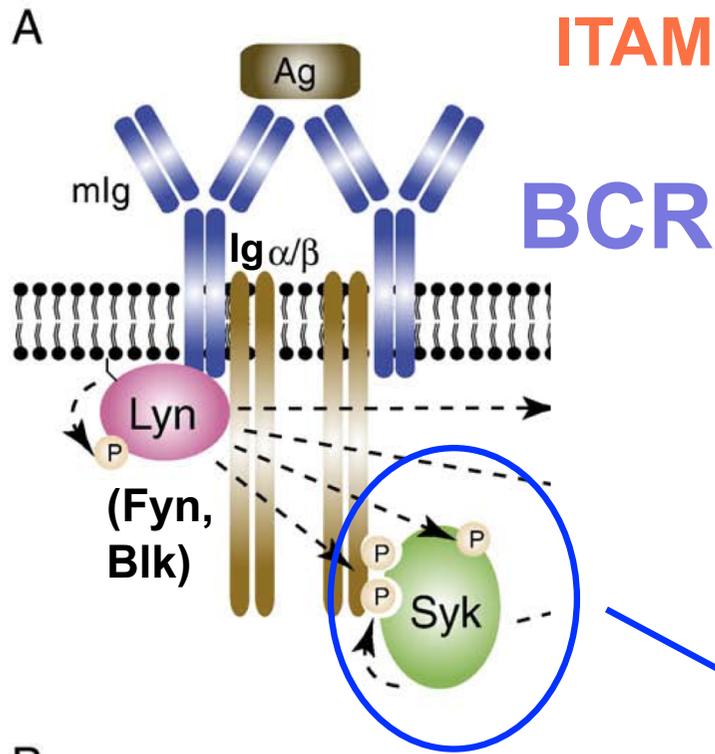


# Immune receptors: BCR or TCR and ITAMs

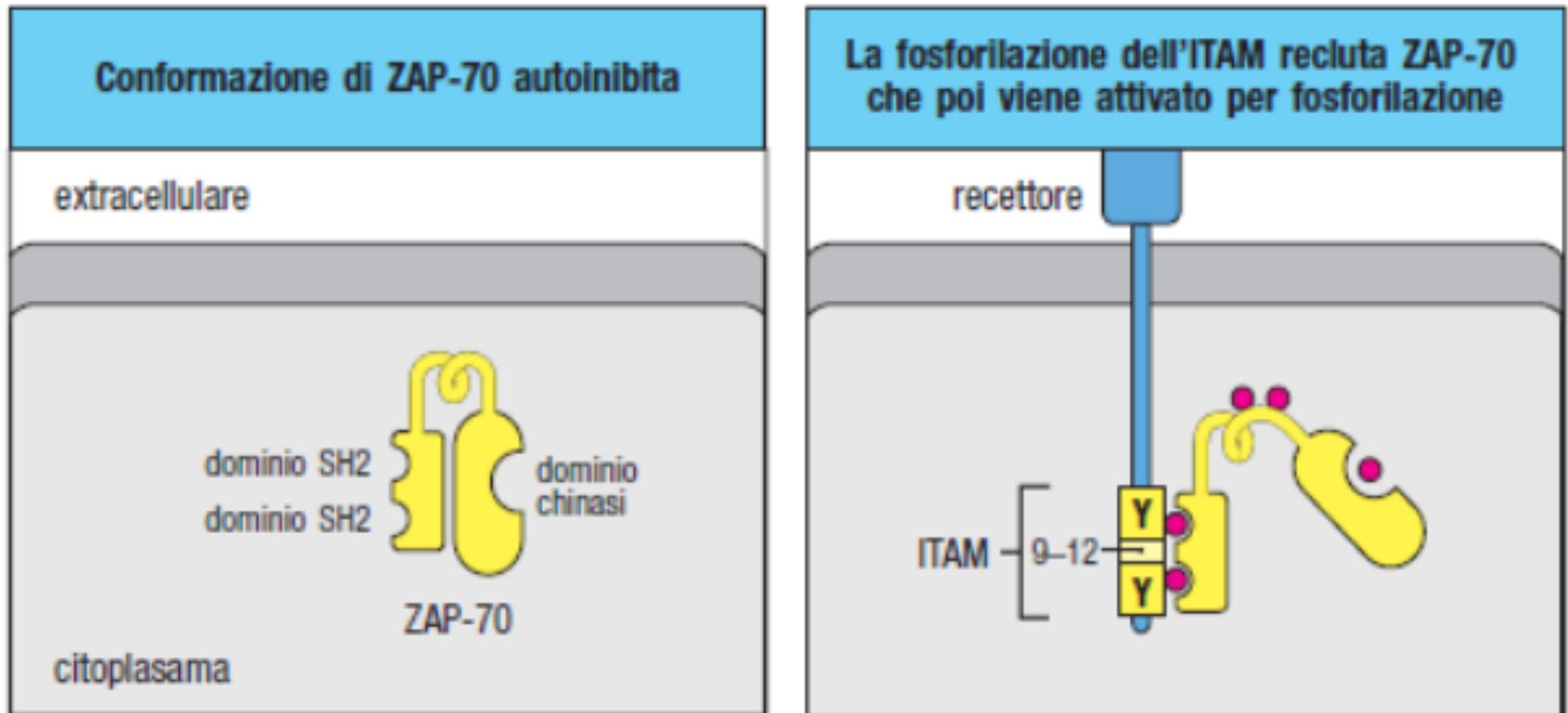


- Antigen binding to **TCR** or **BCR** leads to activation of **Src family kinases** (in B cells, **Lyn**, **Fyn**, and **Blk**, in T cells **Lck** and **Fyn**) that in turn phosphorylate the ITAMs of the receptor-associated Igα and Igβ (BCR) or CD3 and ζ (TCR) subunits.
- This phosphorylation creates a docking site for **Syk family kinases** (in B cells --> **Syk**, in T cells --> **ZAP70**), which then associates with the phosphorylated ITAM through the SH2 domains of the kinase.
- Binding of phosphorylated ITAMs to Syk or ZAP70 SH2 domains activates the enzymatic activity of the kinases, leading to phosphorylation of other signaling adapter proteins, such as **LAT** (in T cells) or **BLNK** (or SLP-65 in B cells). These phosphorylated adapters then recruit a number of downstream molecules.

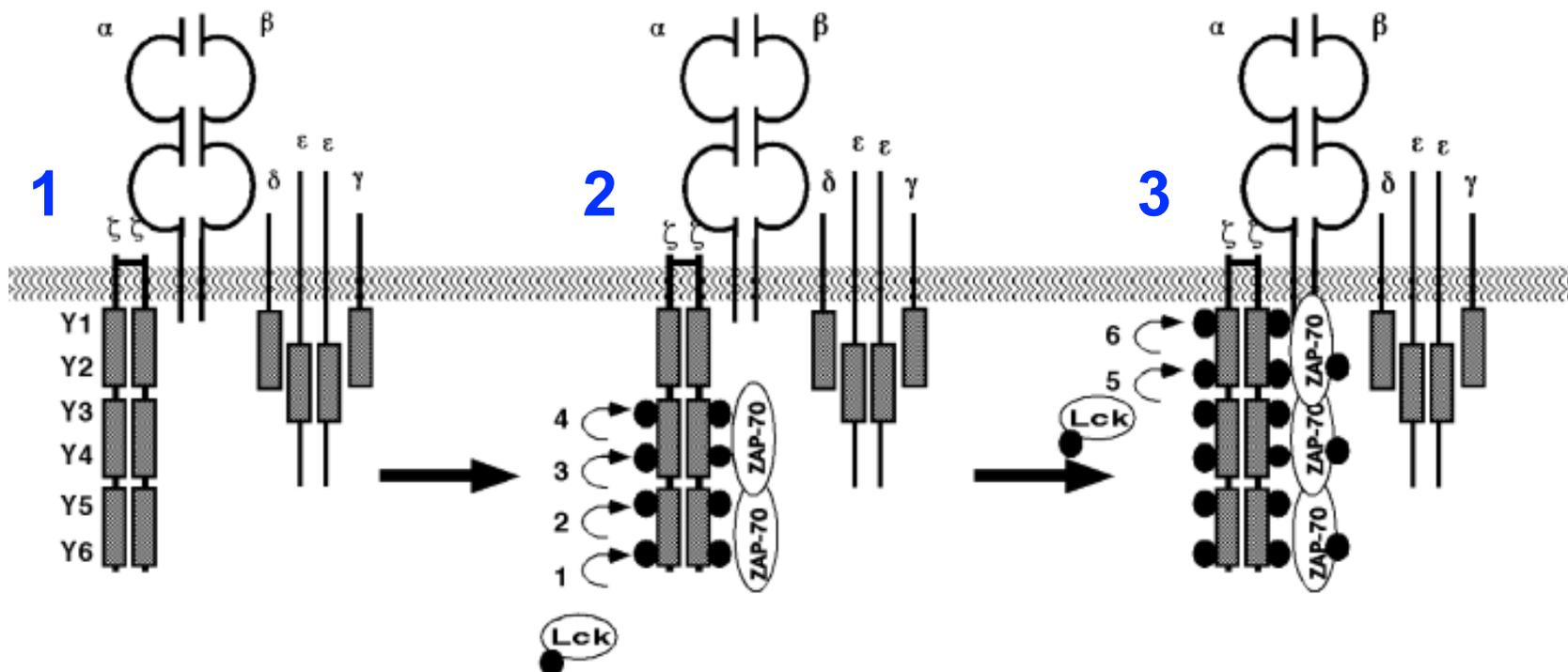
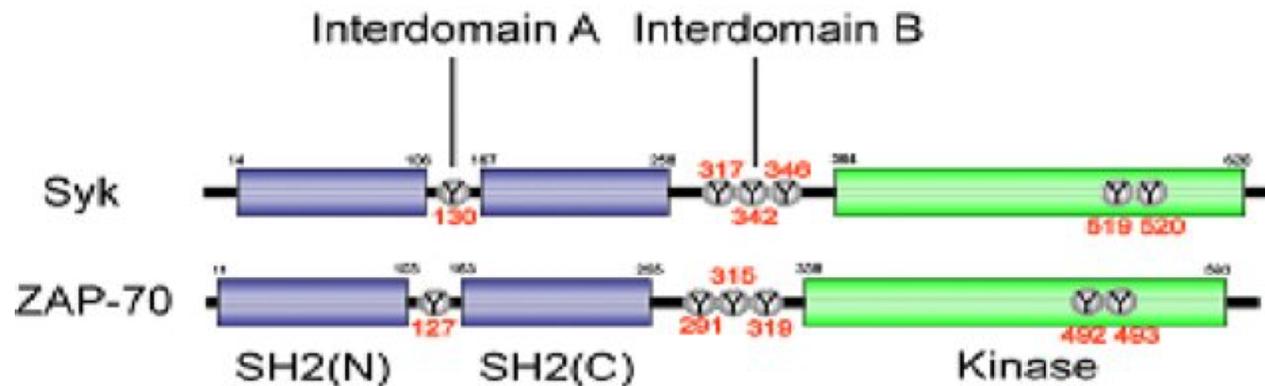
# ITAM fosforilate reclutano le TYR CHINASI della famiglia SYK



## Le ITAM fosforilate reclutano proteine di trasmissione del segnale che hanno domini SH2 accoppiati

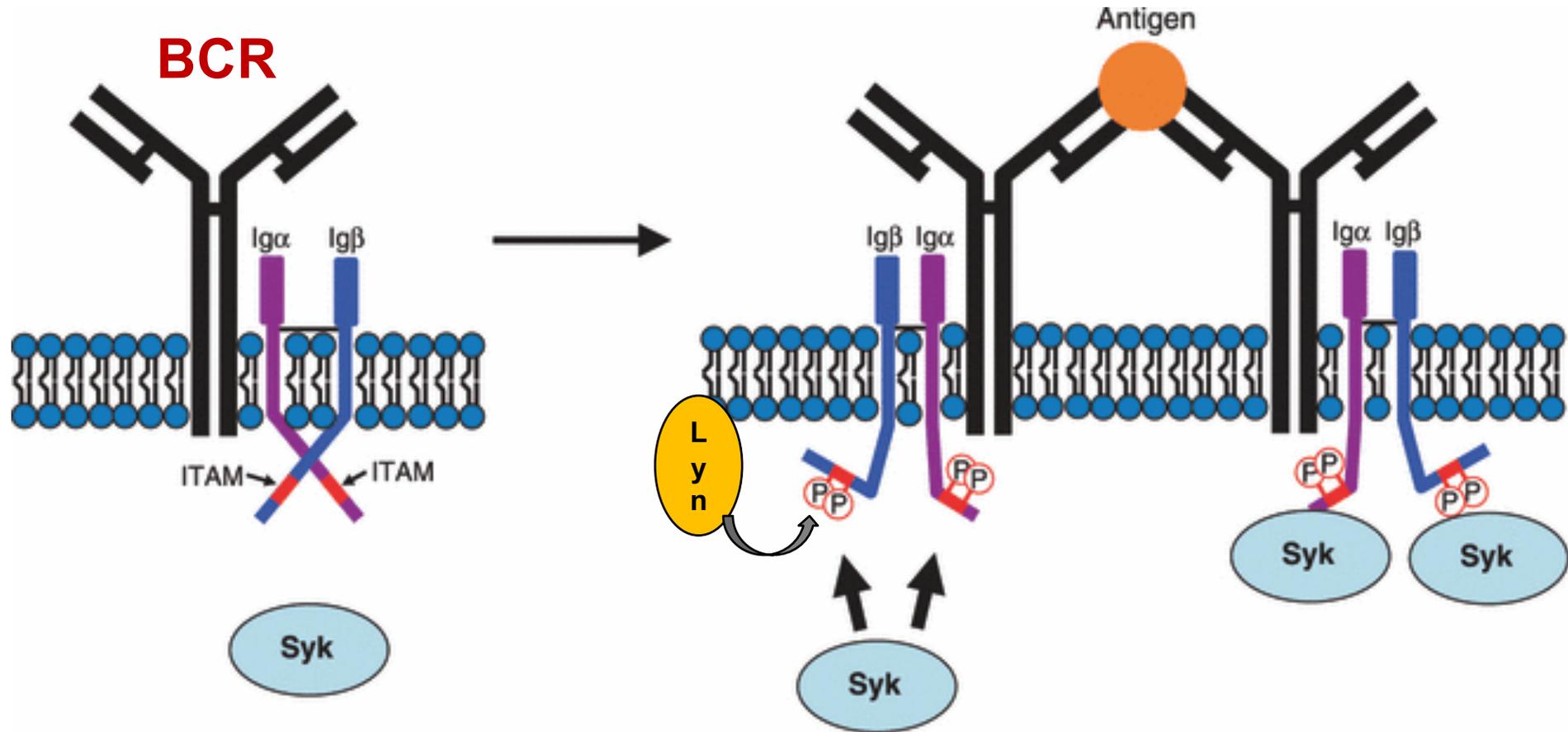


# Reclutamento ed attivazione di ZAP-70 nei linfociti T



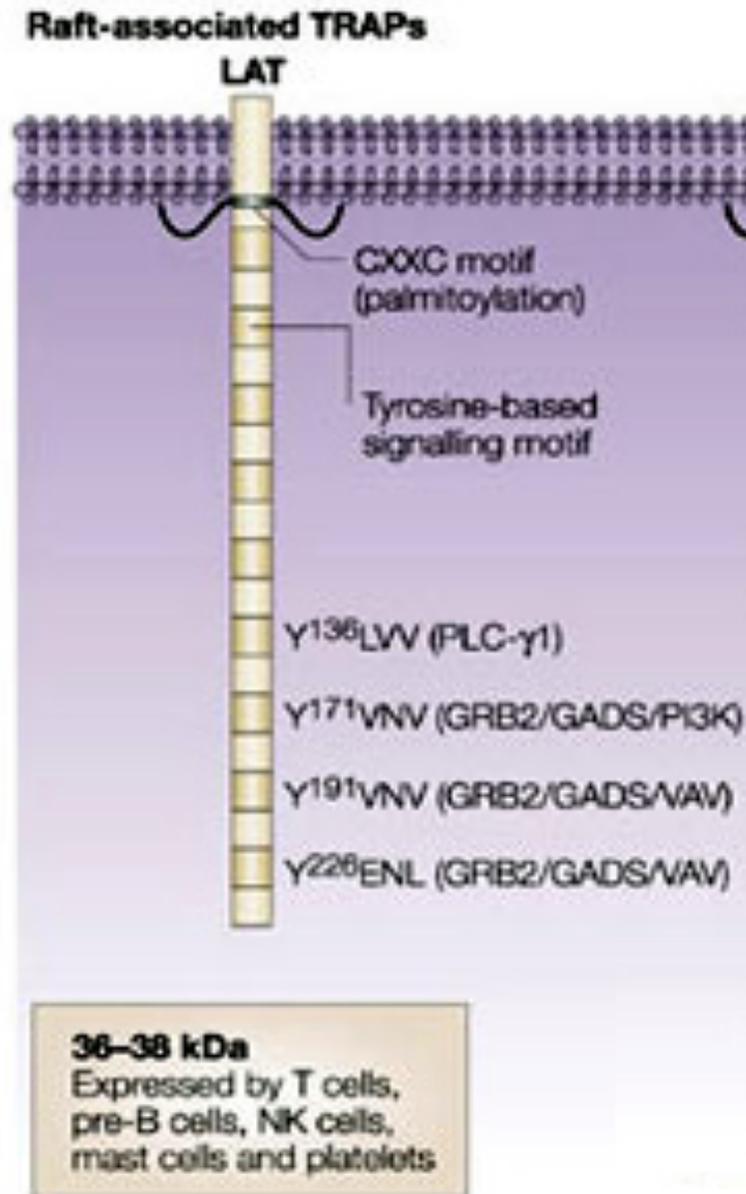
**Lck (Src chinasi)** fosforila le ITAM nel dominio intracitoplasmatico delle catene del CD3 e di zeta → **ZAP-70** lega le ITAM, viene **fosforilata da Lck (o si auto/transfosforila)** e si attiva.

## Attivazione di SYK nei LINFOCITI B



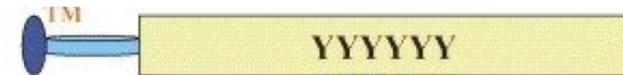
**Lyn** (Src chinasi) fosforila le ITAM nel dominio intracitoplasmatico di  $Ig\alpha$  e  $Ig\beta$  → Syk lega le ITAM e viene attivata

# Le Tyrosin CHINASI della famiglia SYK fosforilano proteine adattatrici e altre proteine di trasduzione



## Proteine adattatrici:

**LAT**



**GADS**



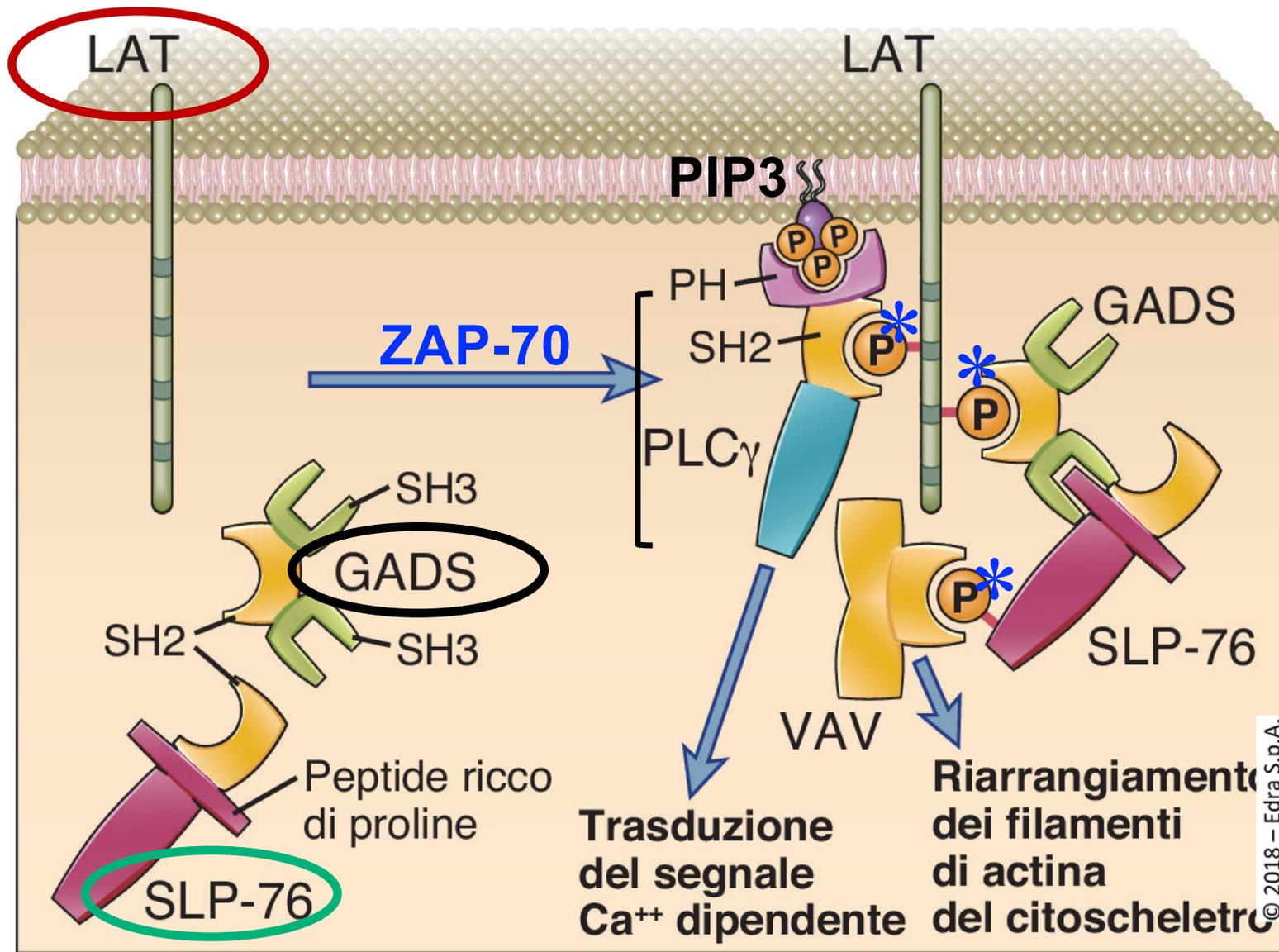
**SLP-76**



**Sono siti di attracco molecolare**

TRAPs=transmembrane adaptor proteins

# Proteine adattatrici coinvolte nell'attivazione linfocitaria



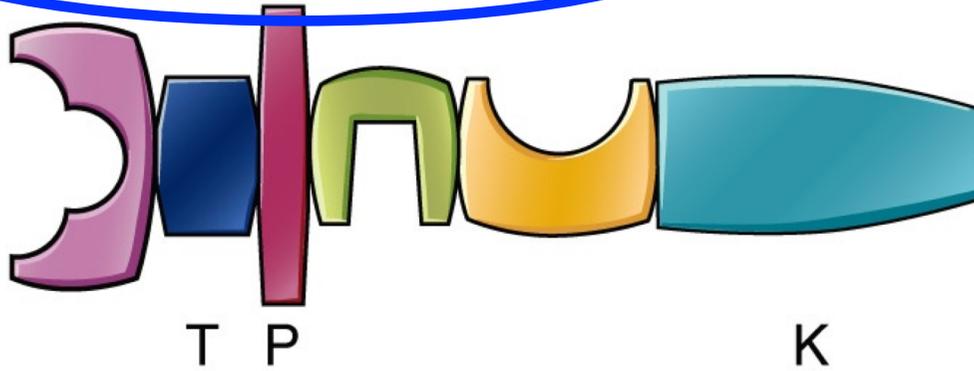
LAT e SLP-76  
sono  
fosforilate da  
ZAP-70 \*

LAT= linker for the activation of T cells    SLP-76=SH2 domain-containing linker protein of 76 kD

GADS= Grb-2-related adaptor protein downstream of Shc

# Proteine di trasduzione (TIROSIN CHINASI)

## Chinasi della famiglia Tec



**Tec family: Itk, Btk e Tec:** vengono reclutate in membrana tramite l'interazione con i fosfolipidi (PIP3) e attivate

U: dominio unico  
T: dominio di omologia TEC  
K: dominio chinasicco  
P: peptide ricco di residui di prolina



**SH2:** (100 aa): il dominio SH2 riconosce sequenze comprendenti **tirosine fosforilate (fosfotirosine)**

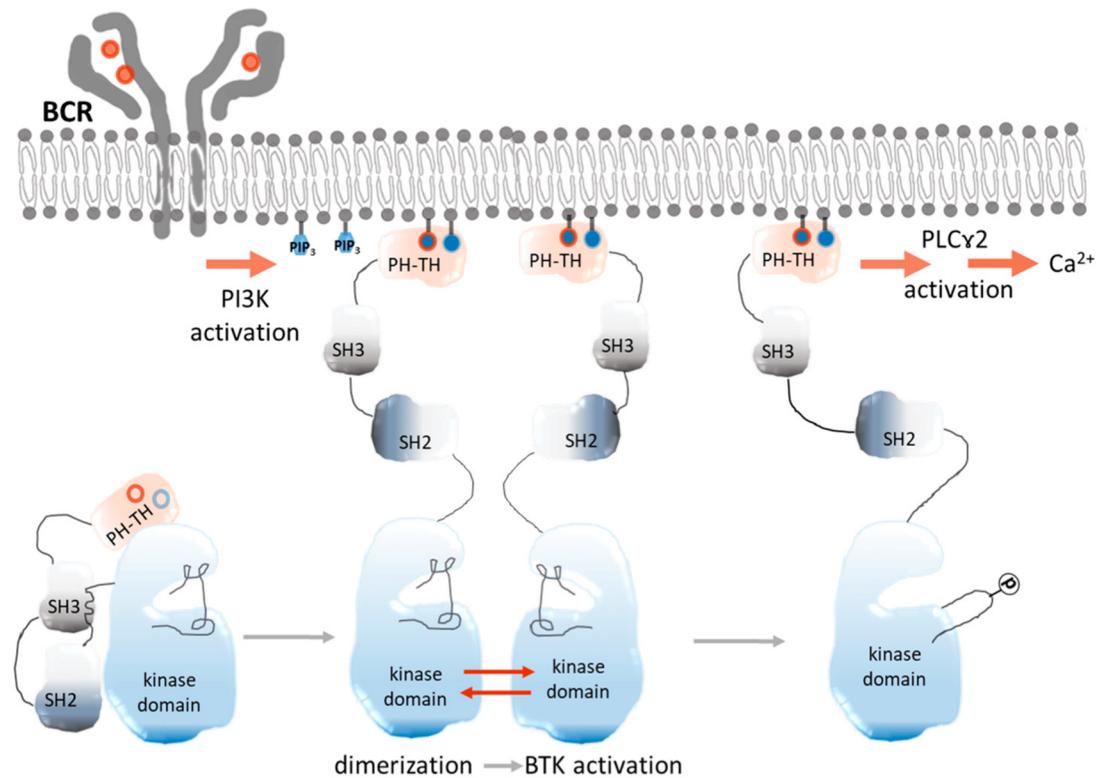
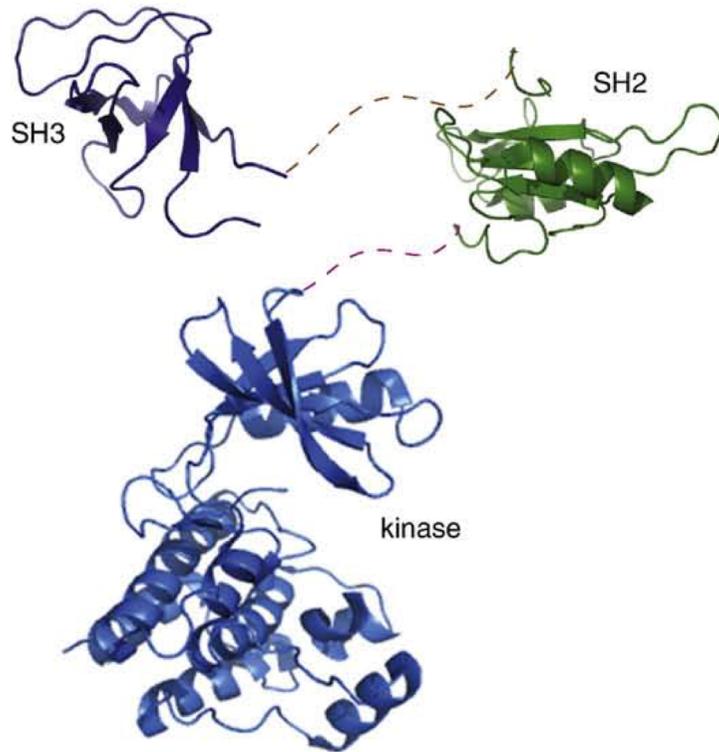
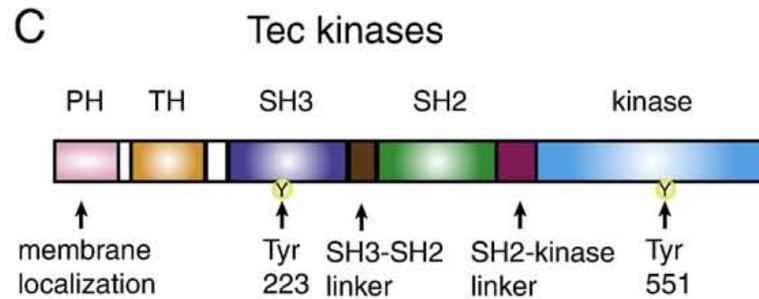


**SH3:** (100 aa): il dominio SH3 riconosce sequenze **ricche in prolina**



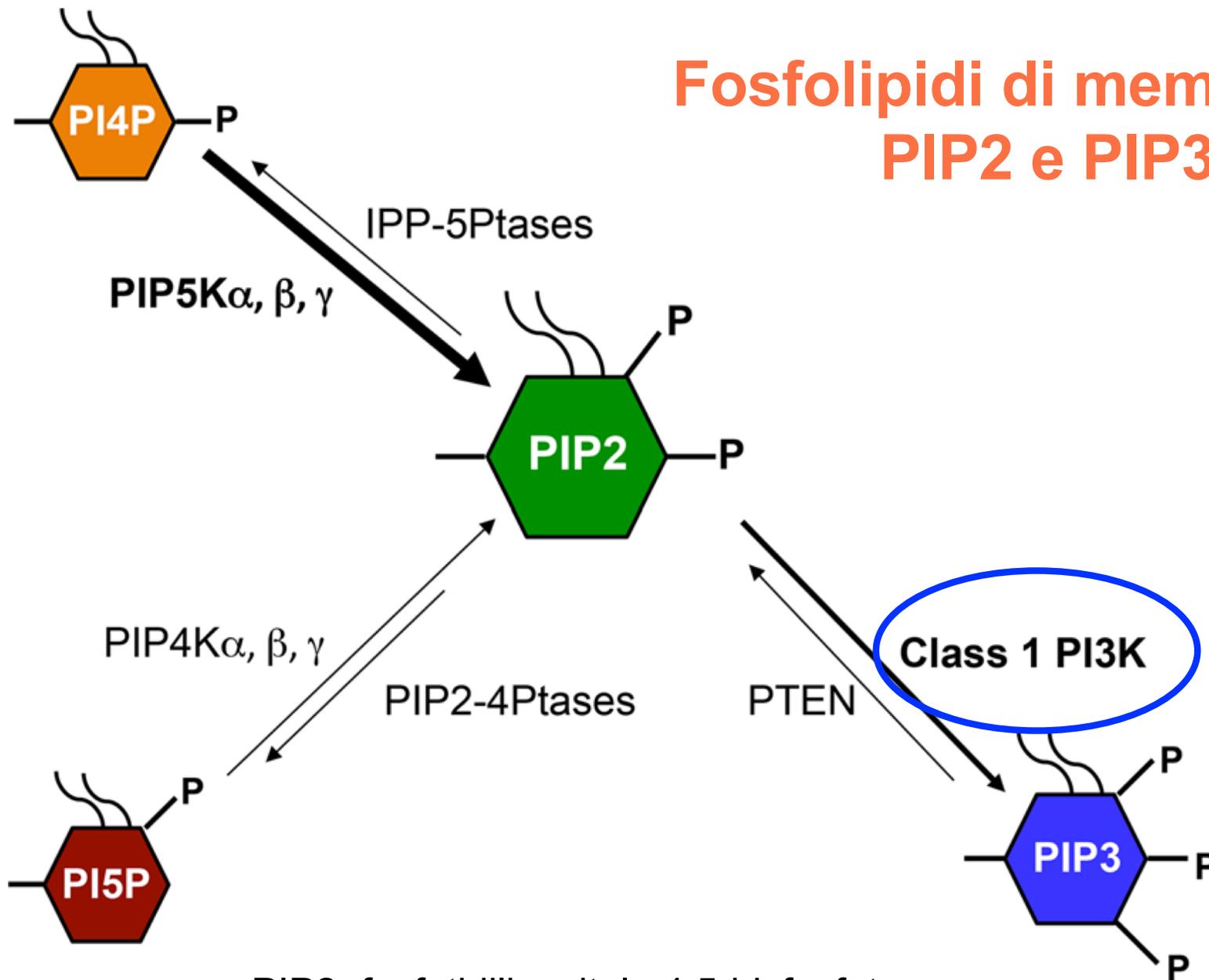
**PH:** il dominio PH (Pleckstrin homology domain) riconosce **inositol-fosfolipidi** (es. **PIP3** in ITK, Tec e Btk)

# Tec CHINASI: Itk, Btk, Tec

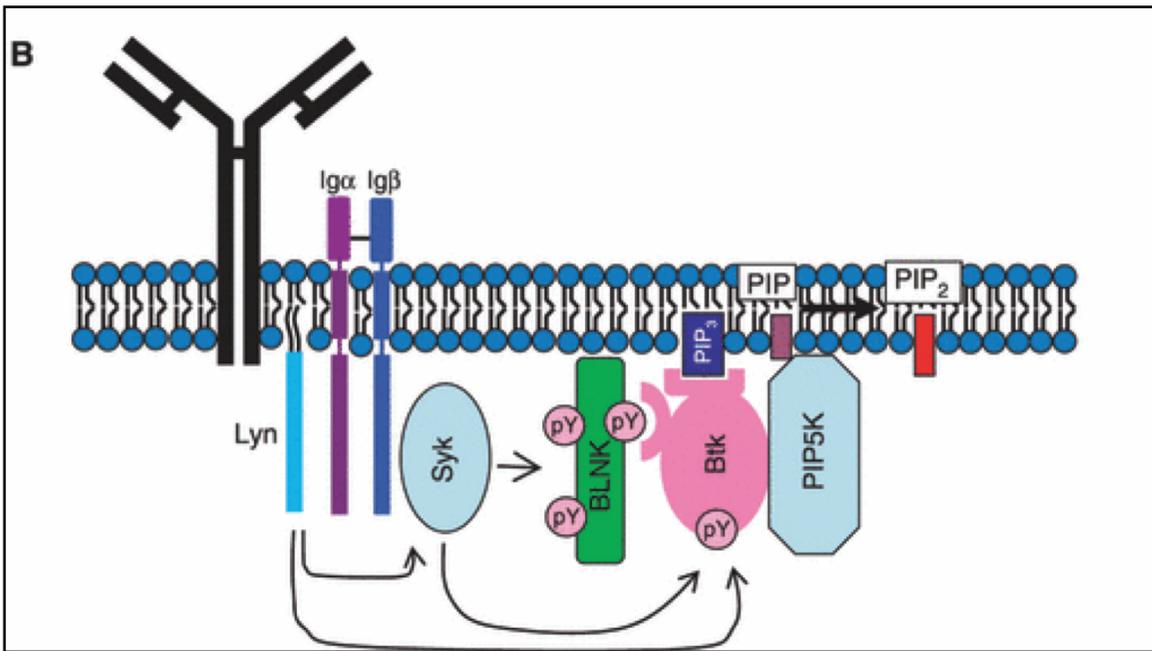


Inattive nel citosol, il legame al fosfatidilinositolo 3,4,5 trifosfato (**PIP3**) induce un cambiamento conformazionale esponendo le Tyr che in seguito a fosforilazione portano all'attivazione della chinasi

# Fosfolipidi di membrana: PIP2 e PIP3



PIP2=fosfatidilinositolo 4,5-bisfosfato  
PIP3=fosfatidilinositolo 3,4,5-trifosfato

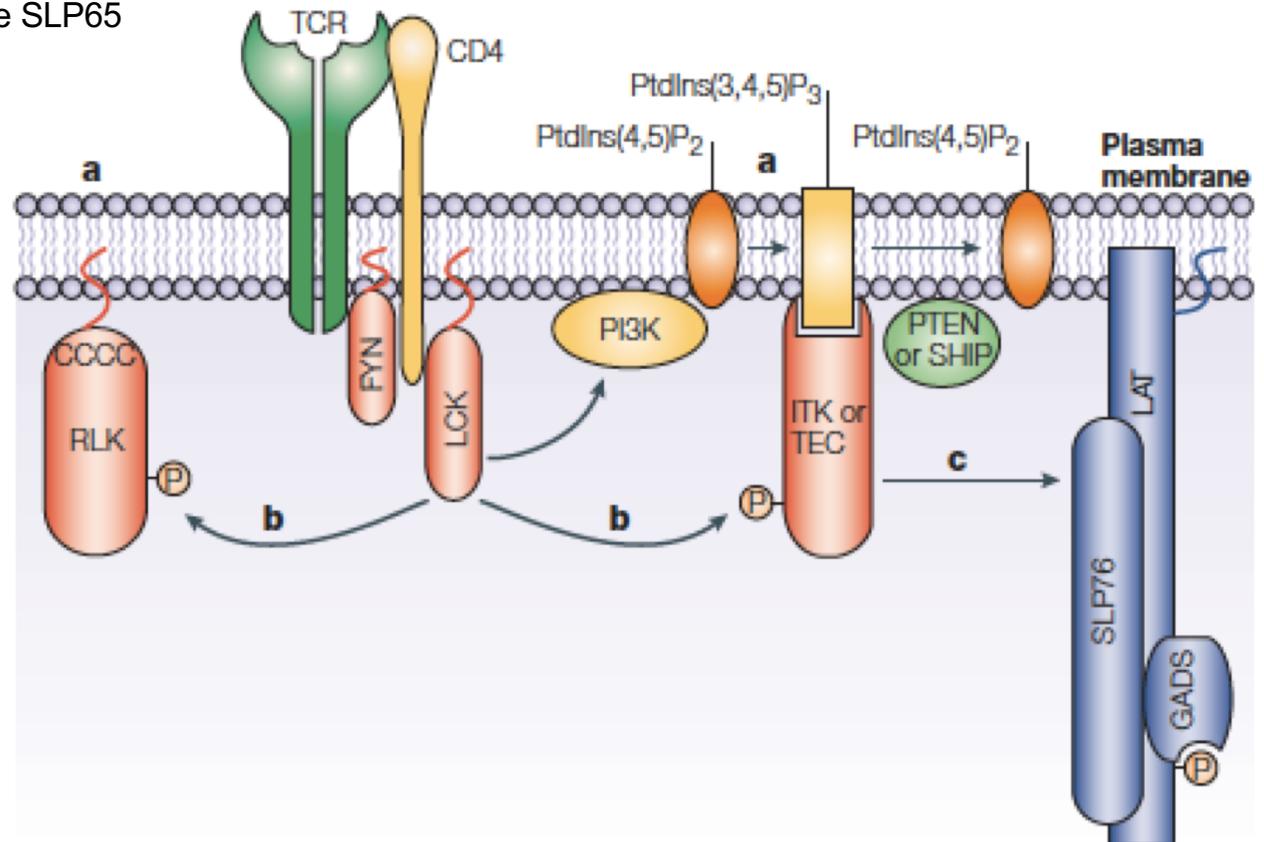


BLNK detta anche SLP65

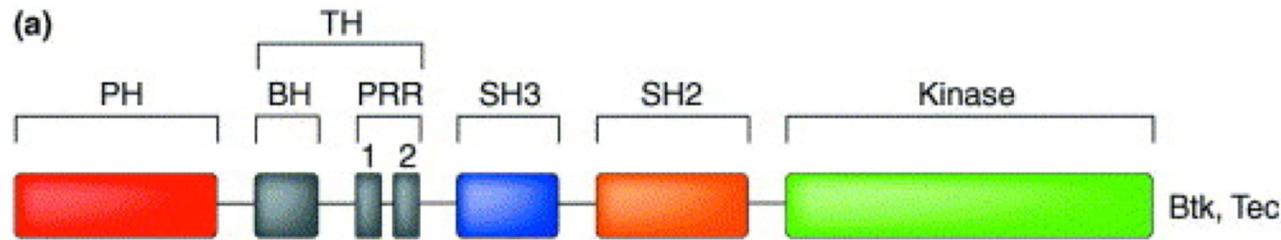
## BTK nei LINFOCITI B MACROFAGI MASTOCITI

BTK = Bruton's tyrosine kinase

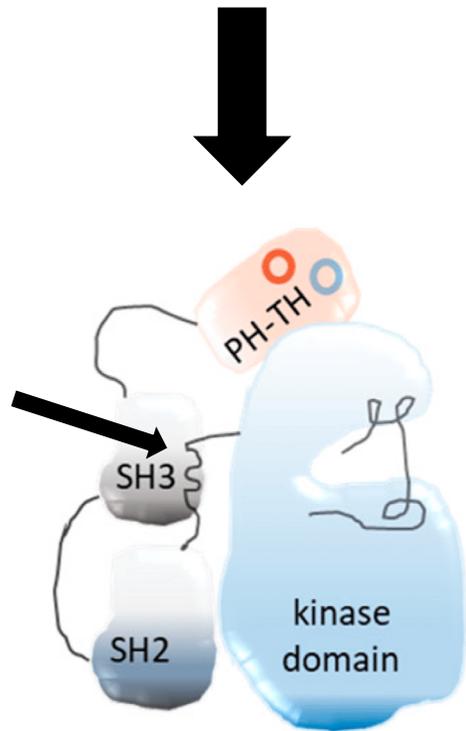
## ITK nei LINFOCITI T Cellule NK MASTOCITI



# Bruton's tyrosine kinase (BTK)



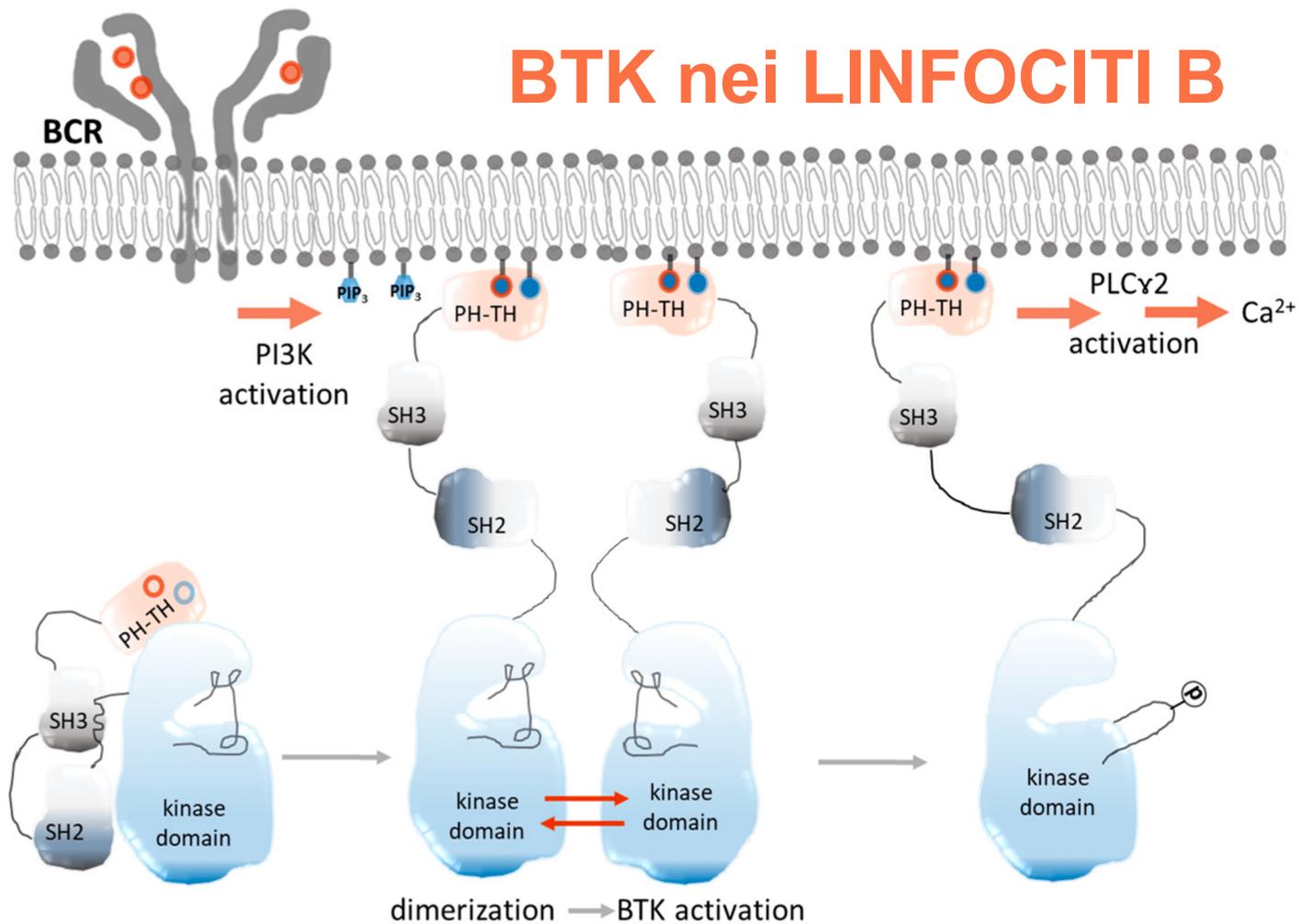
## Forma citosolica inattiva



- Nella forma citosolica Btk è chiusa su se stessa ed autoinibita dall'interazione tra il dominio SH3 e il linker SH2-dominio chinamico, stabilizzato dal modulo PH-TH → il **dominio chinamico è inattivo**
- Il **legame in membrana del modulo PH-TH con il PIP3** favorisce una apertura della molecola e dimerizzazione che culmina nell'attivazione per autotransfosforilazione

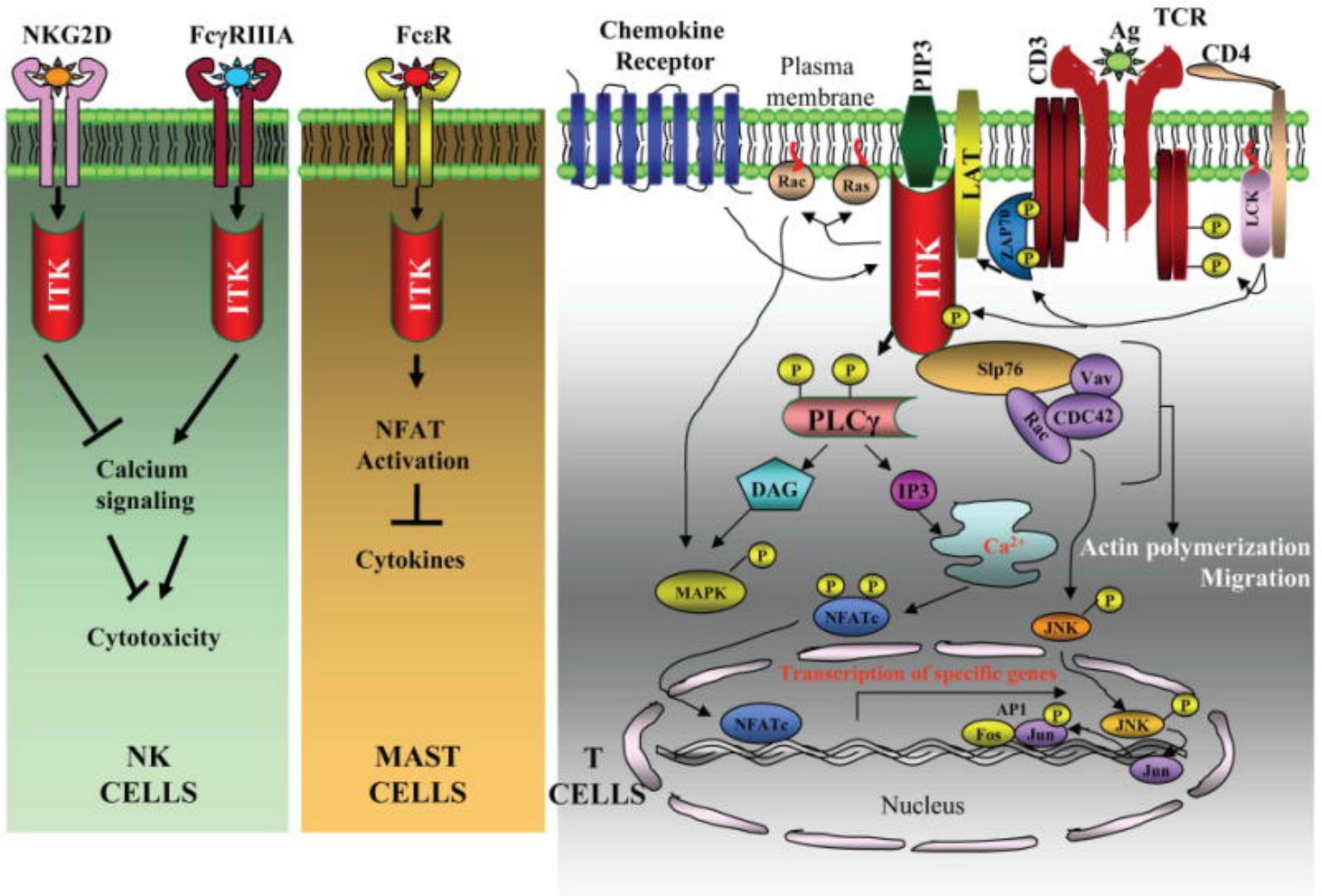
**Mutazioni o delezioni di BTK** provocano una malattia da immunodeficienza detta Agammaglobulinemia legata al cromosoma X o anche **agammaglobulinemia di Bruton**. Si verifica arresto precoce nella maturazione dei **linfociti B** con assenza di produzione di anticorpi.

Altre mutazioni che inducono up-regolazione della BTK sono legate a tumori a cellule B.

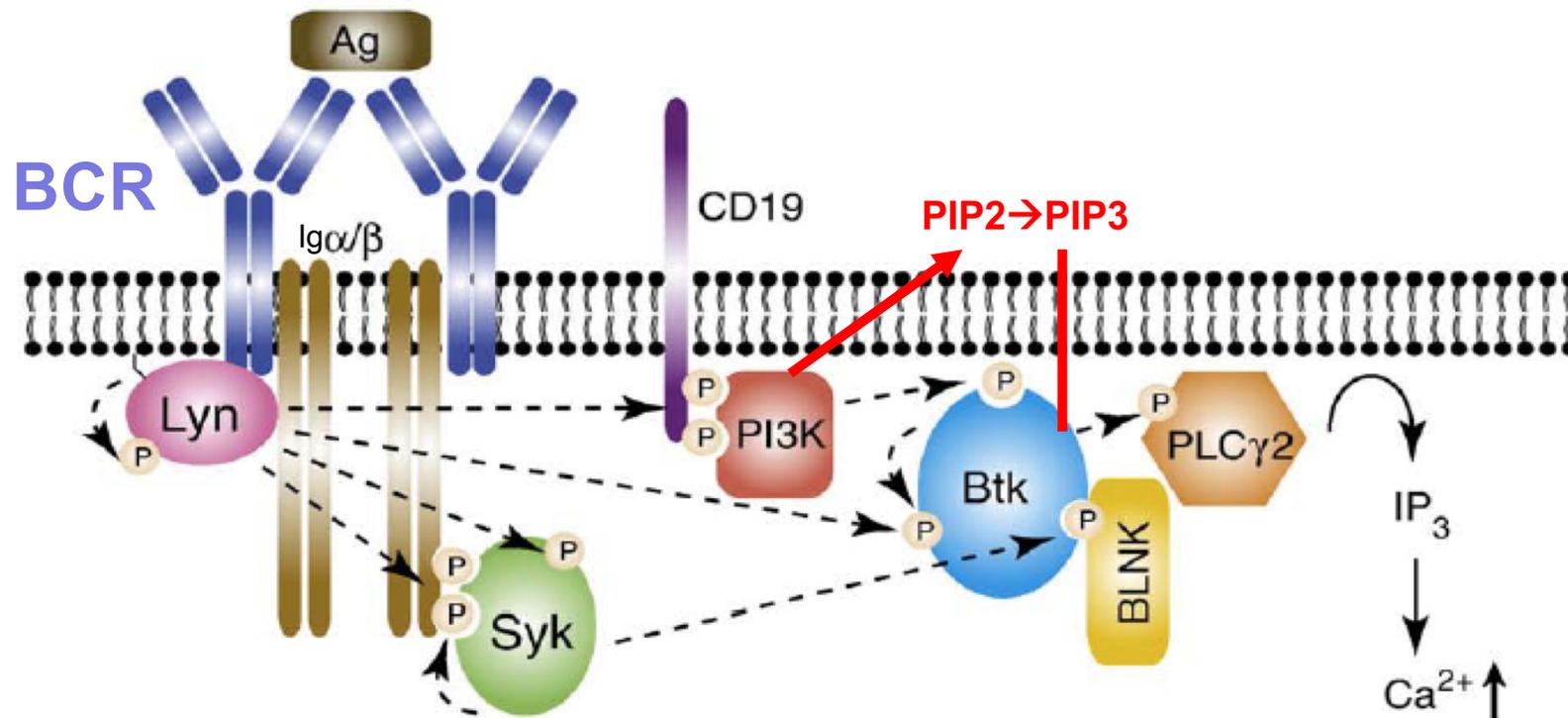


- Nelle cellule a riposo Btk è nel **citoplasma** in forma **inattiva**
- La stimolazione del BCR induce l'attivazione della **PI3K** con **aumento dei PIP3**
- il **modulo PH-TH** si lega a **due lipidi PIP3** che innescano la **dimerizzazione** del modulo BTK PH-TH sulla membrana
- Questo a sua volta **attiva BTK** mediante trans-autofosforilazione
- **BTK fosforila PLC<sub>γ</sub>2** e la attiva

# ITK nelle cellule NK, Mastociti e linfociti T

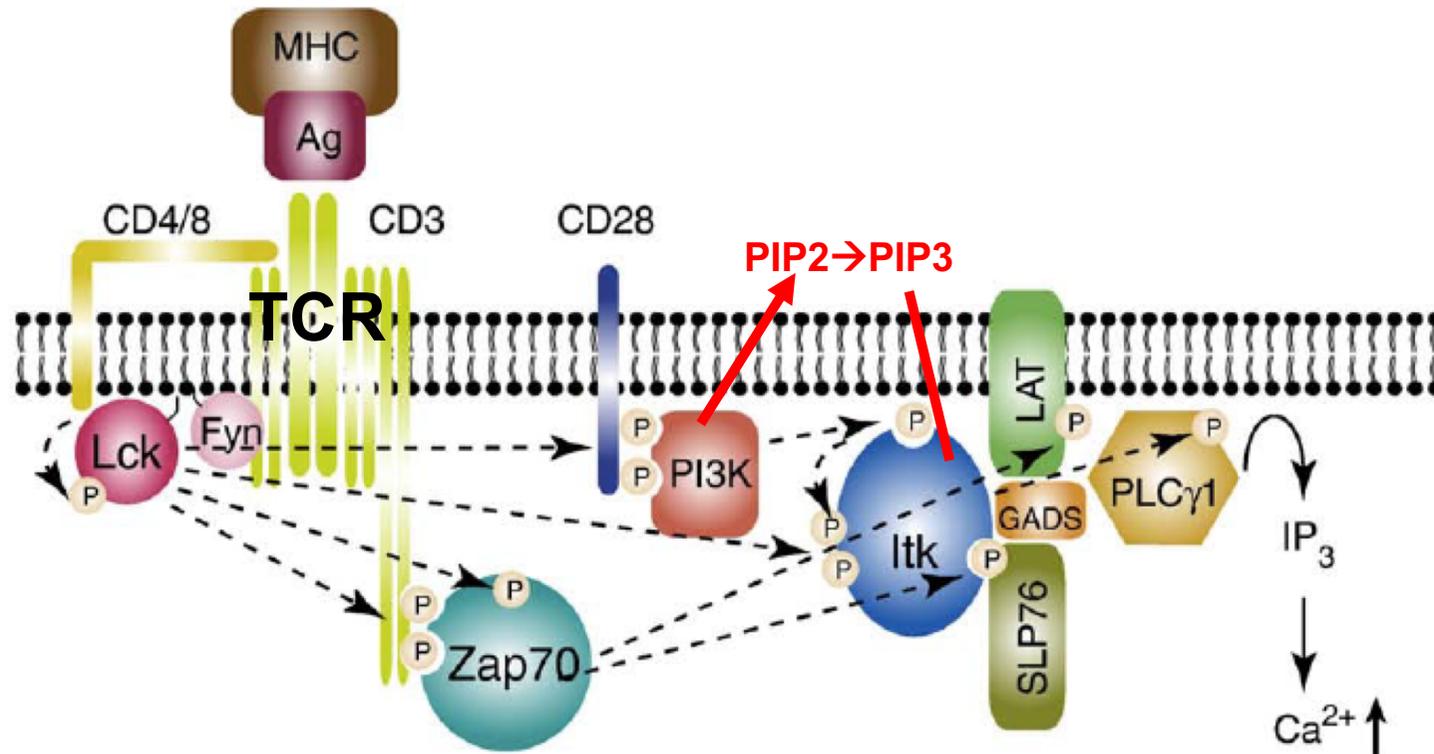


## Ruolo delle chinasi Src, Syk e Tec nei linfociti B



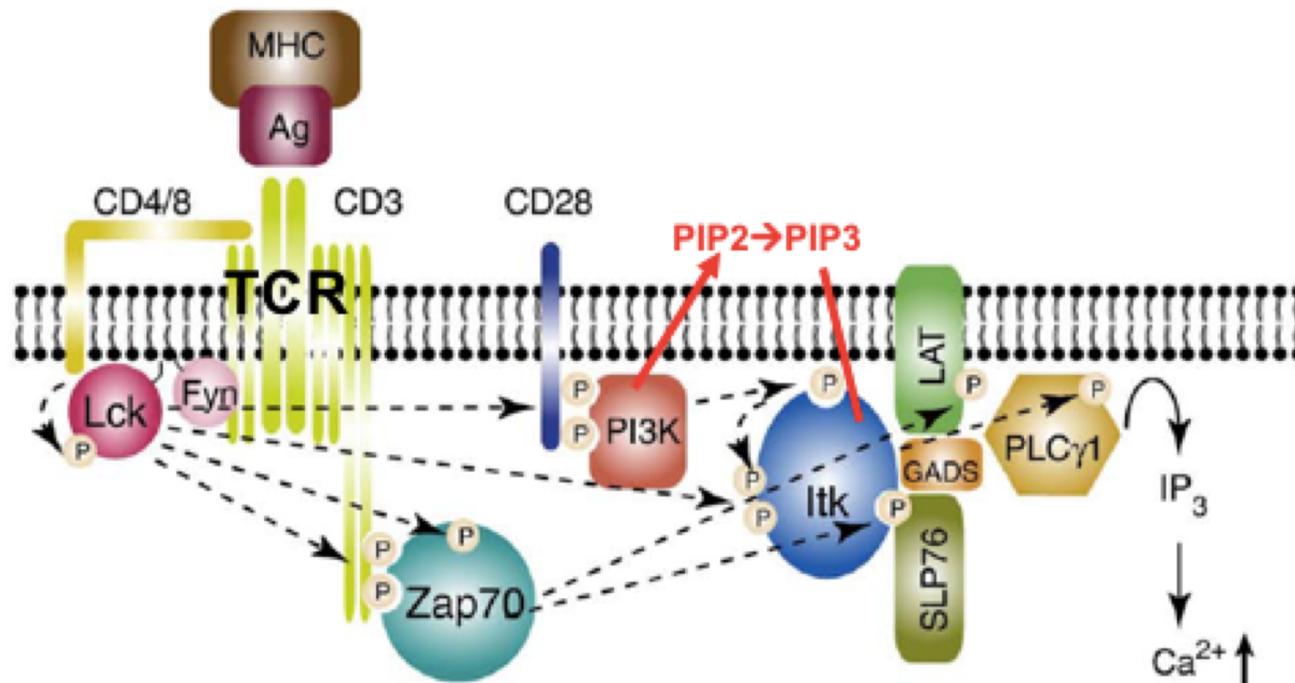
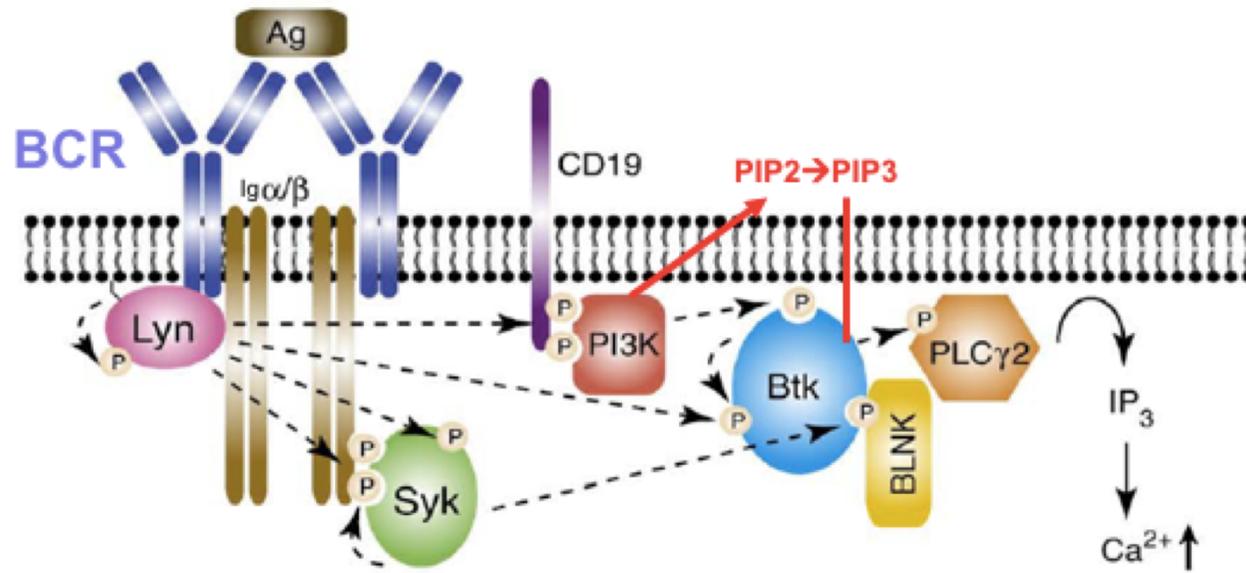
Kinase signaling downstream of the B cell receptor BCR. Binding of antigen (**Ag**) to the **BCR** increases activity of the associated Src family kinase **Lyn**. Lyn phosphorylates itself, furthering increasing its activity, and also other intracellular tyrosines including those within the ITAM motif of the BCR. The phosphorylated ITAM binds and activates Syk. Lyn also phosphorylates CD19 which induces **PI3-kinase** to synthesize phosphatidylinositol 3,4,5 triphosphate (PIP3) in the plasma membrane. PIP3 recruits the Tec kinase **Btk** to the plasma membrane via its PH-TH domain. **Btk becomes activated via both autophosphorylation and Lyn phosphorylation.** Btk is the major kinase which phosphorylates phospholipase Cγ2 (**PLCγ2**), resulting in increased inositol triphosphate (**IP3**) and eventually a spike in intracellular **calcium** concentration.

## Ruolo delle chinasi Src, Syk e Tec nei linfociti T



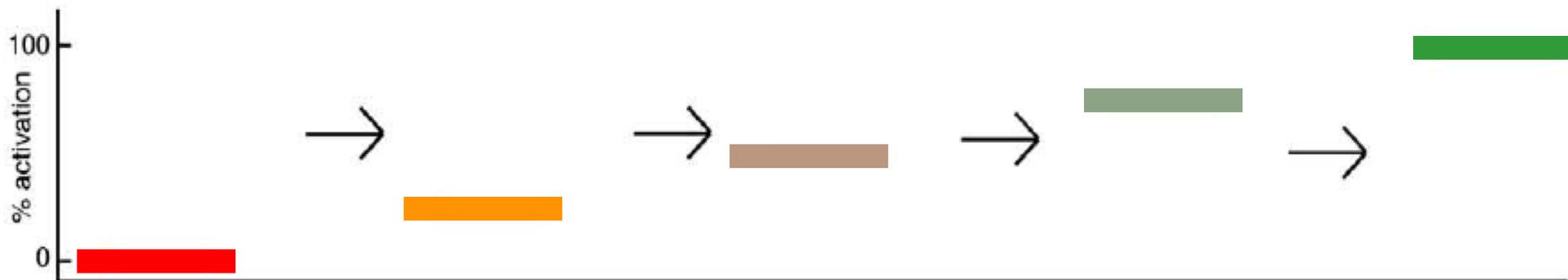
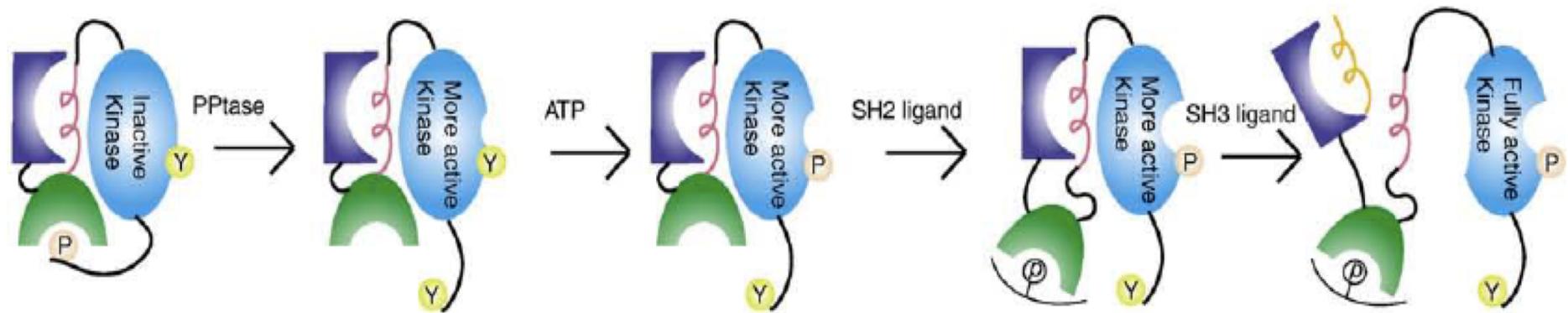
Kinase signaling downstream of the T cell receptor (TCR). Presentation of the antigen (Ag)/Major Histocompatibility Complex (MHC) to the TCR increases activity of the associated Src family kinases **Lck**, and also **Fyn**. Lck phosphorylates several nearby tyrosine residues including those within the ITAM motif of the TCR. The phosphorylated TCR-ITAM binds and activates **Zap-70**. Lck activation also leads to recruitment of the Tec family kinase **Itk** through activation of PI3-kinase. Itk binds to a signaling complex containing **LAT**, **SLP76**, and **GADS** and is involved in activation of phospholipase Cy1 (PLCγ1). **PLCγ1** activation increases the level of intracellular **IP<sub>3</sub>** and **Ca<sup>2+</sup>**, leading to further downstream signaling events.

# Ruolo delle chinasi Src, Syk e Tec nei linfociti B e T



# Src kinases: “graded” switches

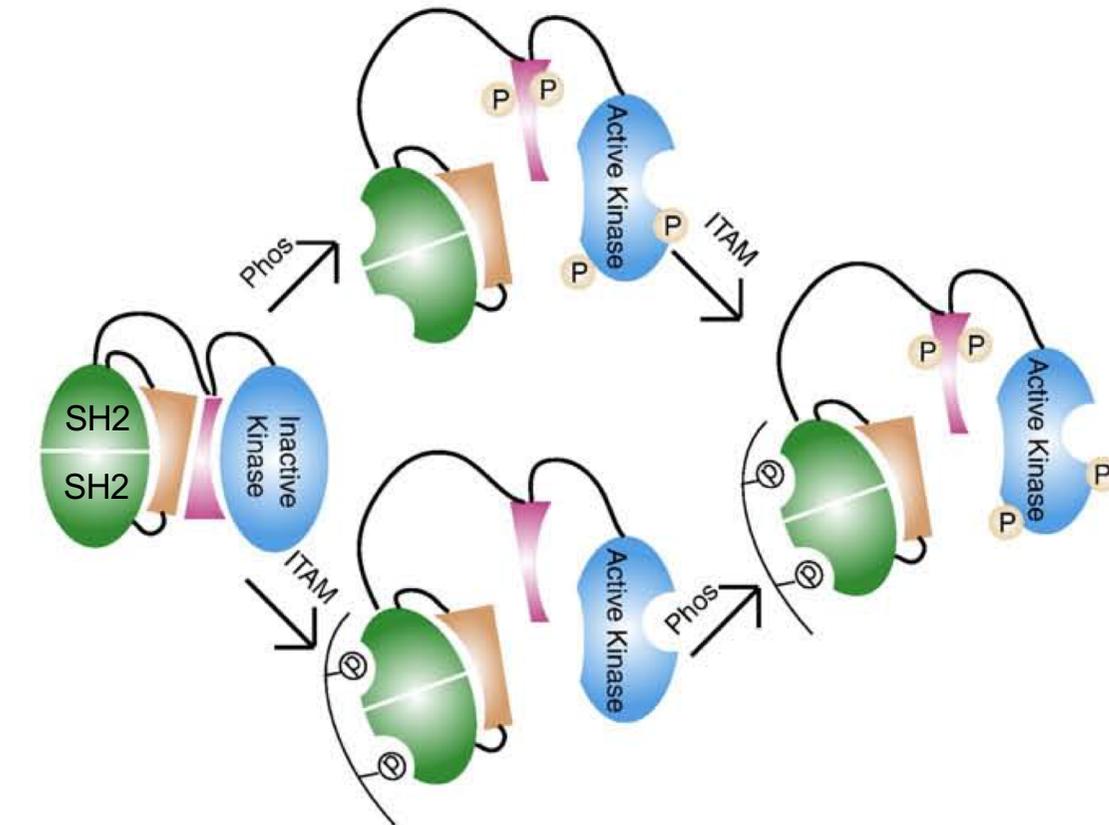
Lck; Fyn; Lyn; Blk



L'attivazione delle Src chinasi avviene in modo graduale (“interruttori graduati”) ed è infatti incrementata da diversi eventi: la defosforilazione della coda C-terminale (Tyr C-terminale regolatoria); la fosforilazione del dominio catalitico, il legame di un ligando al dominio SH2 e al dominio SH3. È stato riportato che ogni evento aggiuntivo determina un livello più elevato di attività della chinasi.

# Attivazione delle SYK CHINASI: legame alle ITAM e/o fosforilazione

B Syk kinases: OR-gate switches



**Zap70:** linfociti T e NK

**Syk:** linfociti B, mastociti e macrofagi

Interazioni tra la regione di collegamento dei 2 SH2 (**inter SH2 linker**) e quella tra SH2 e dominio chinamico (**SH2-kinase linker**) inducono nella chinasi una **conformazione chiusa inattiva**

L'interazione con le ITAM e/o la fosforilazione dei residui di Tyr nella regione di collegamento tra dominio chinamico e SH2 e poi nel dominio chinamico inducono **l'attivazione della chinasi**

Activation → All or none fashion



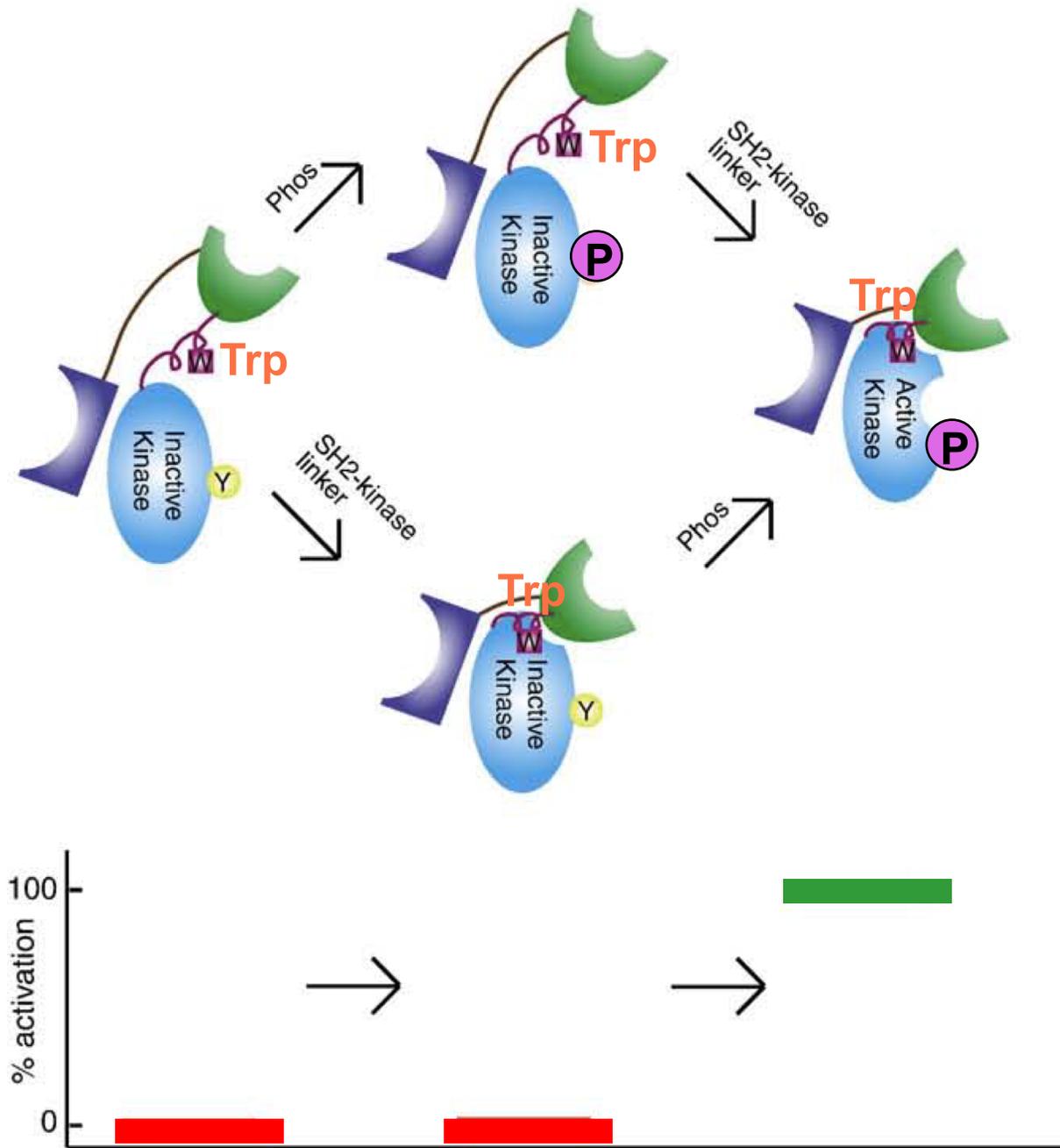
# Tec Kinases: AND-gate switches

La massima attività delle Tec chinasi è raggiunta con due eventi:

1. Fosforilazione del dominio chinasico

e (**AND**)

2. Posizionamento del Trp del linker SH2-dominio chinasico (Trp 355 in ITK) in una pocket del dominio chinasico stesso.



# Attivazione dei linfociti T : la via di Ras e delle MAP chinasi

