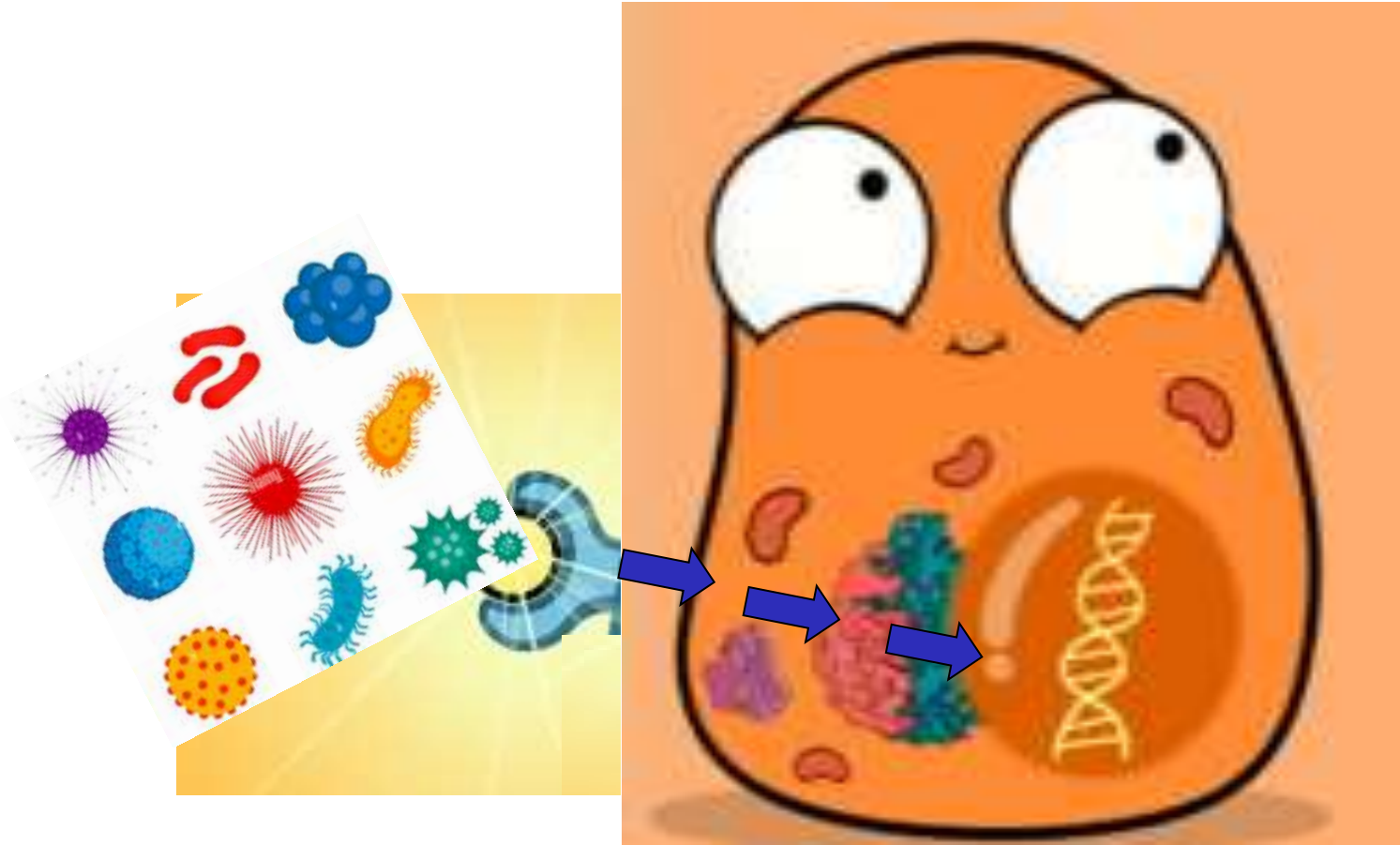


Vie di trasduzione del segnale nelle cellule del sistema immunitario



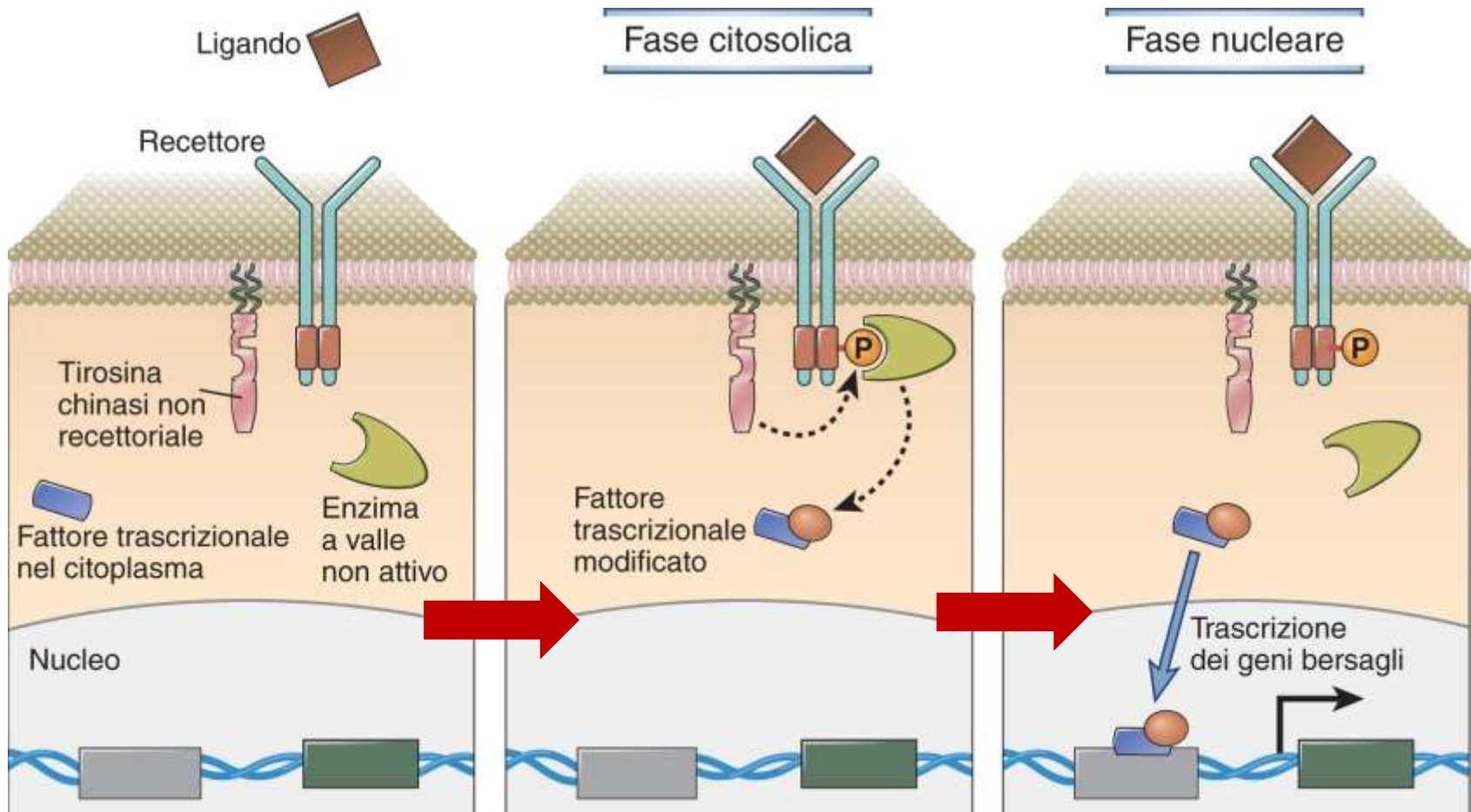
Basi della trasduzione del segnale

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

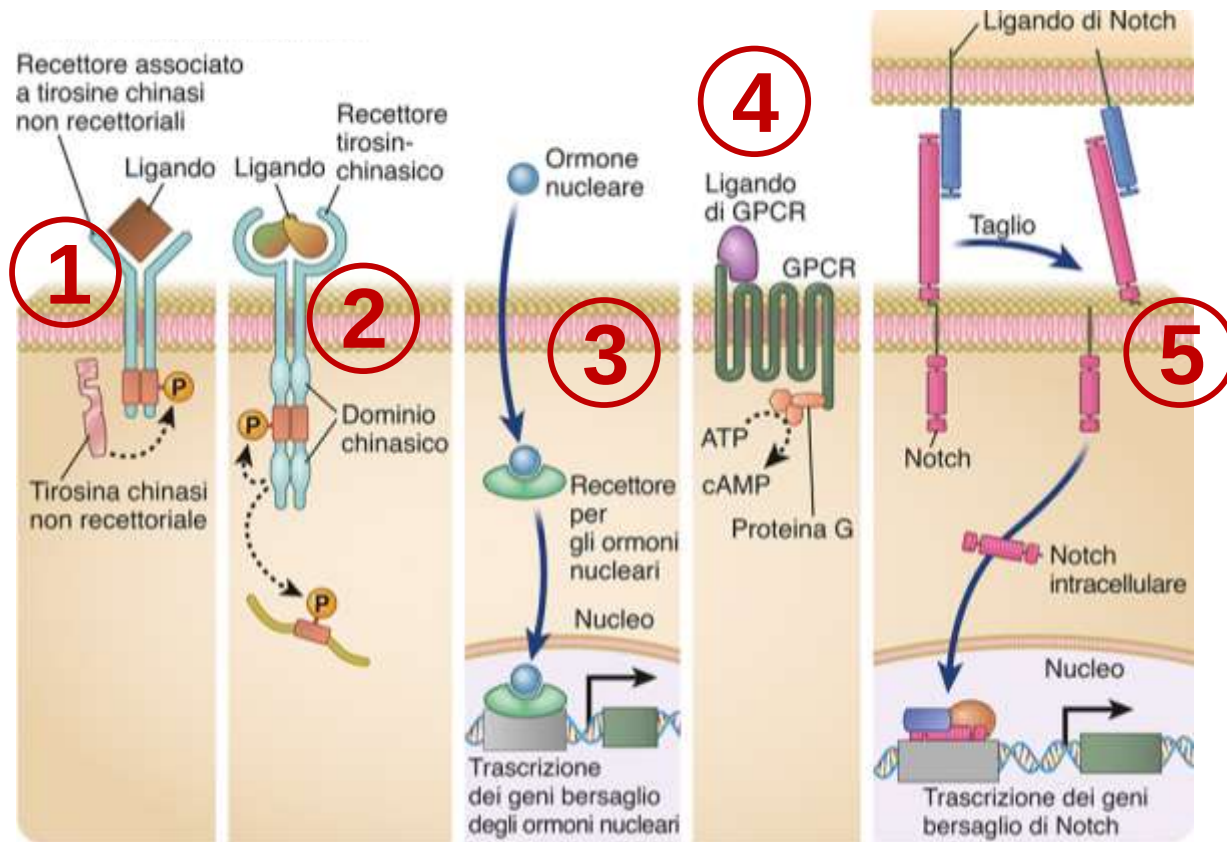
- **Fase membranaria:** interazione recettore-ligando con conseguenti modificazioni del recettore e delle proteine ad esso associate (es. fosforilazione su tirosine)
- **Fase citosolica:** reclutamento in membrana e attivazione di proteine citosoliche per indurre riorganizzazione citoscheletrica, attivazione di specifiche vie di segnalazione (es. PLC, PKC, MAPK)
- **Fase nucleare:** attivazione dei fattori di trascrizione (es. NF-AT, AP-1, NF- κ 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

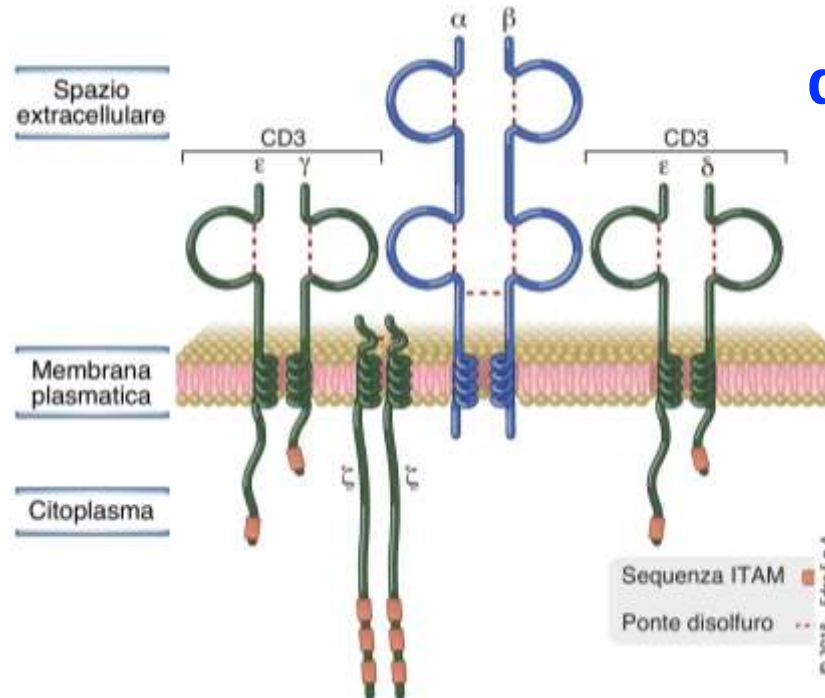
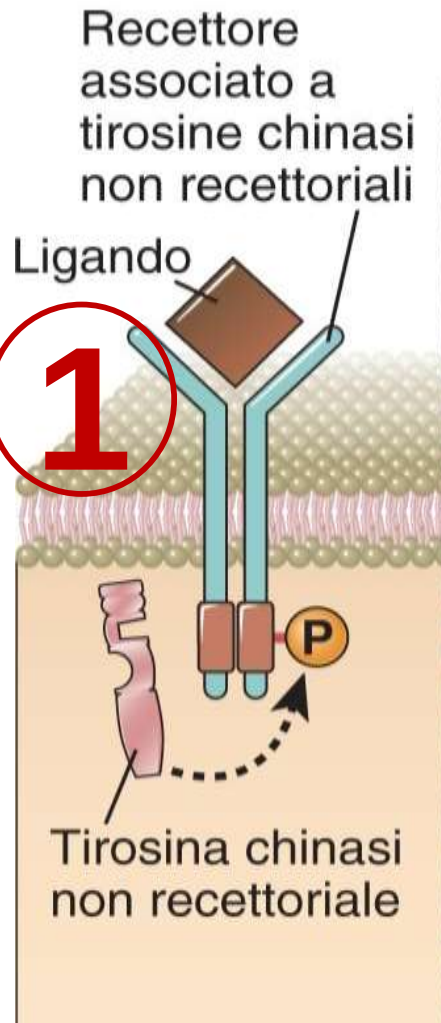


1. Recettore che utilizza una tirosin-chinasi non recettoriale
2. Recettore tirosin-chinasico
3. Recettore nucleare che in seguito a legame con ligando attiva la trascrizione genica
4. Recettori a serpentina (sette domini transmembranari) accoppiati a proteine G
5. Proteine della famiglia Notch che dopo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

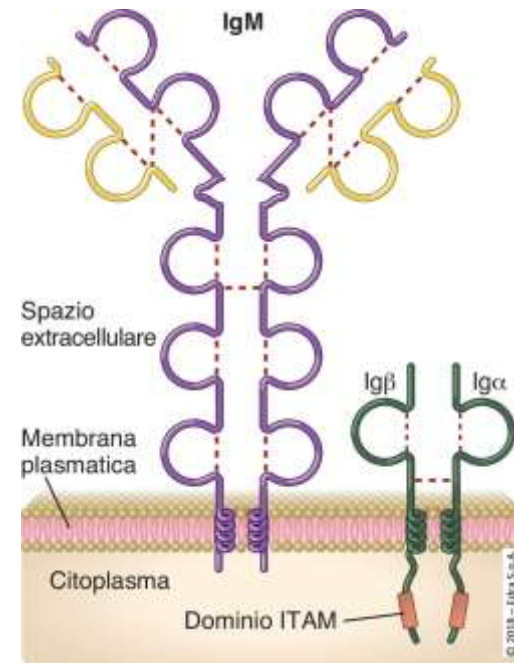
Recettori del sistema immunitario

TCR

Componenti del complesso del TCR



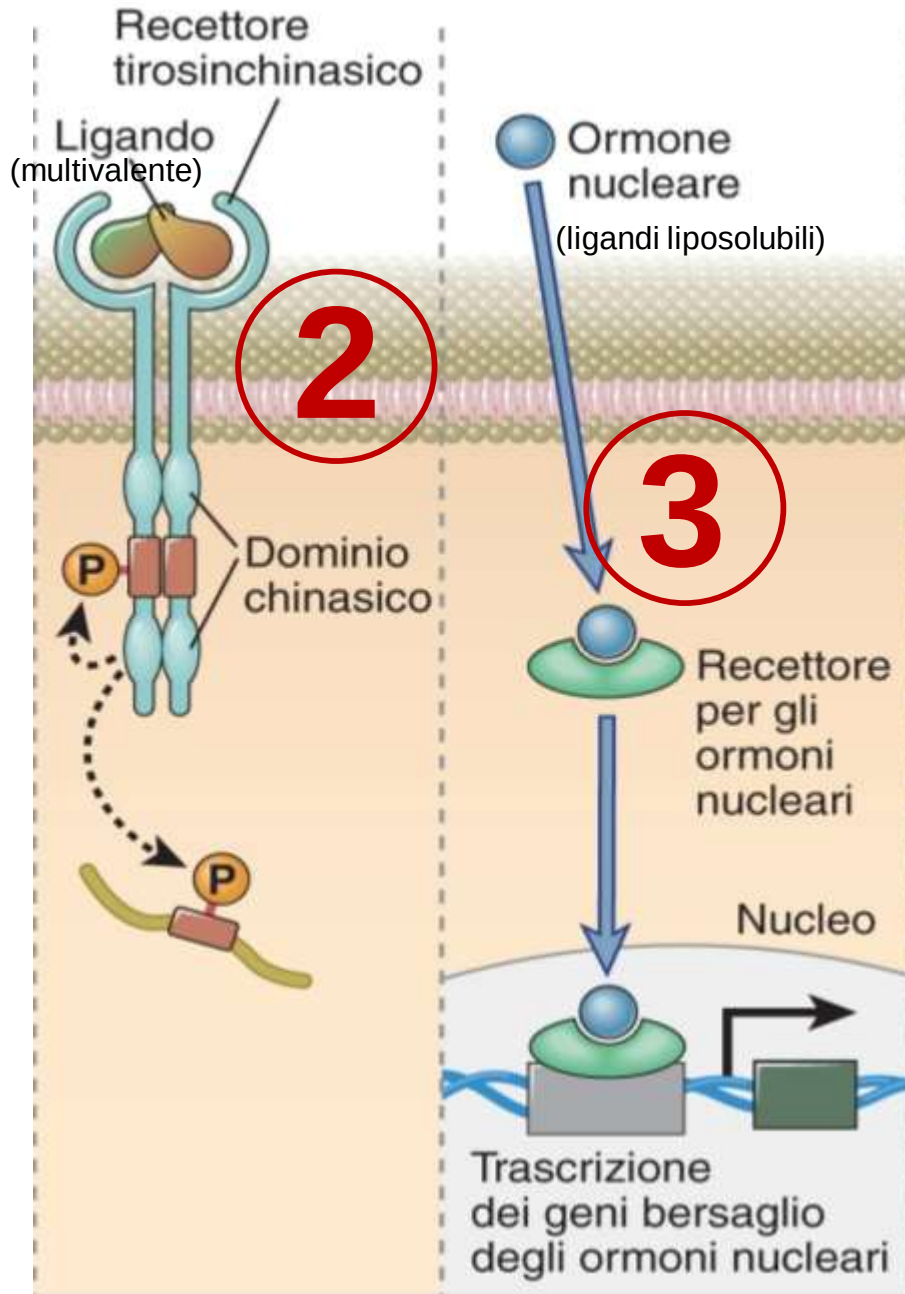
BCR o IgM di membrana



Complesso recettoriale per l'antigene dei linfociti B

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

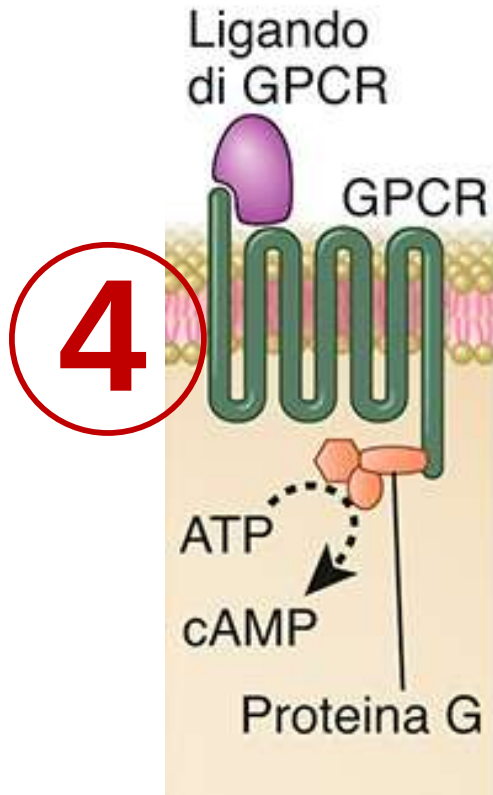
Recettori del sistema immunitario



- c-Kit
- EGF-R
- PDGF-R
- IR

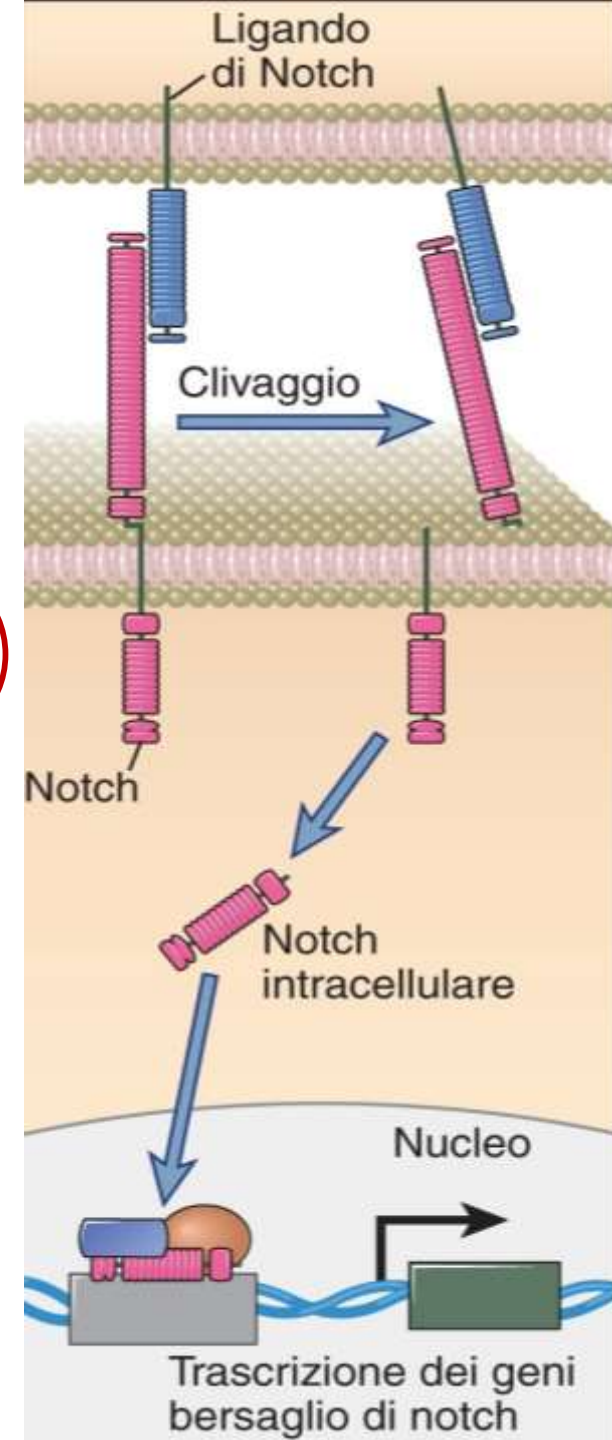
- Recettore della Vitamina D
- Recettore dei glucocorticoidi

Recettori del sistema immunitario



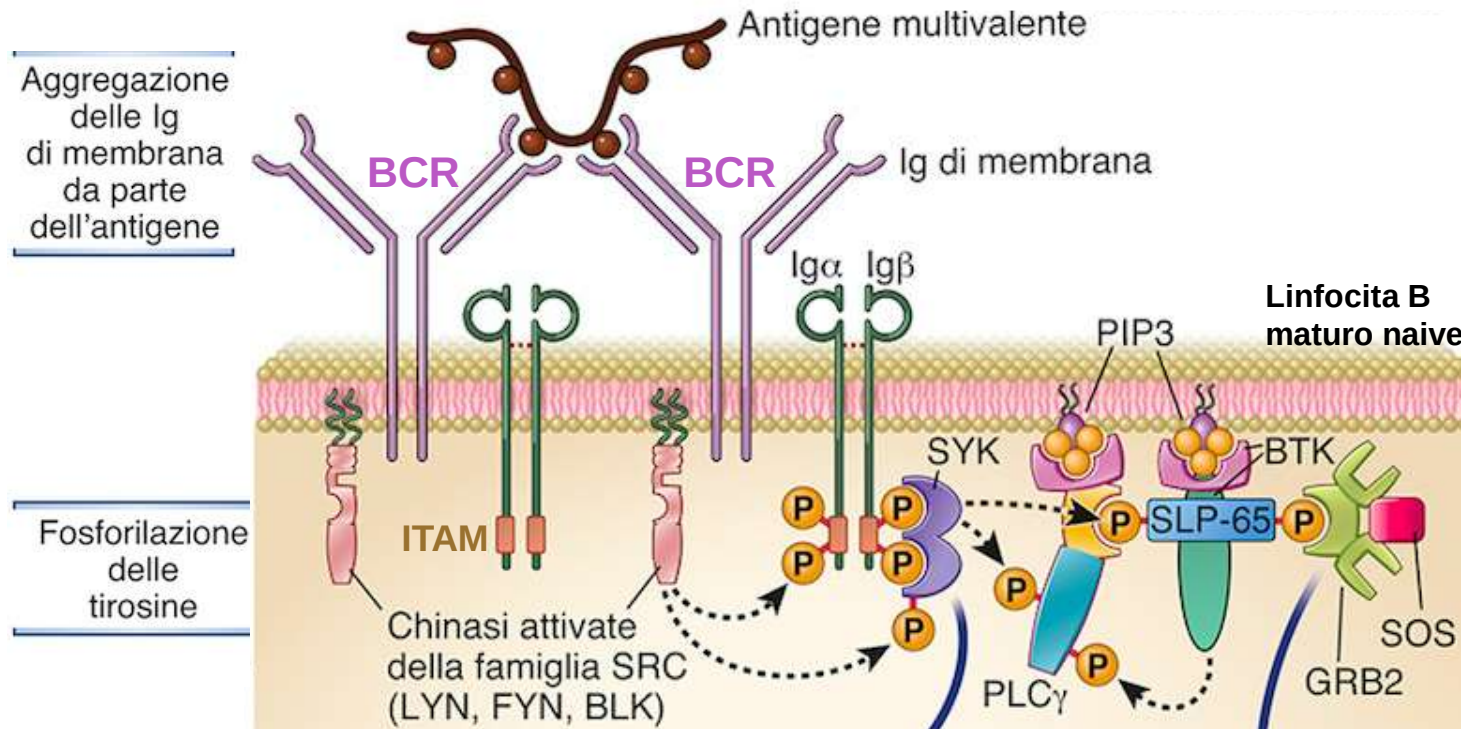
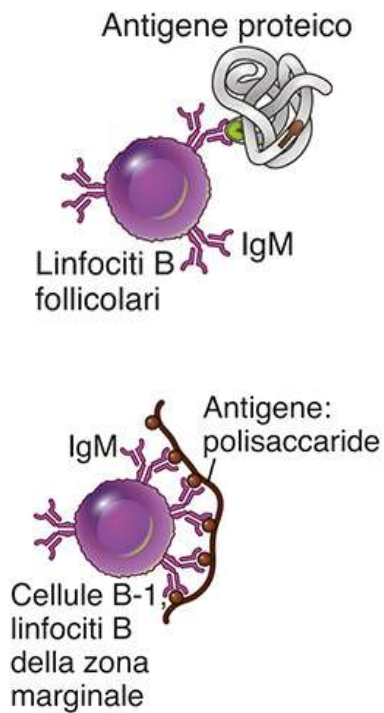
- Recettori per:
- Chemochine
 - Leucotrieni
 - Prostaglandine
 - istamina
 - C3a, C5a (frammenti del Complemento)

5



Proteine per la trasduzione del segnale e proteine adattatrici

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

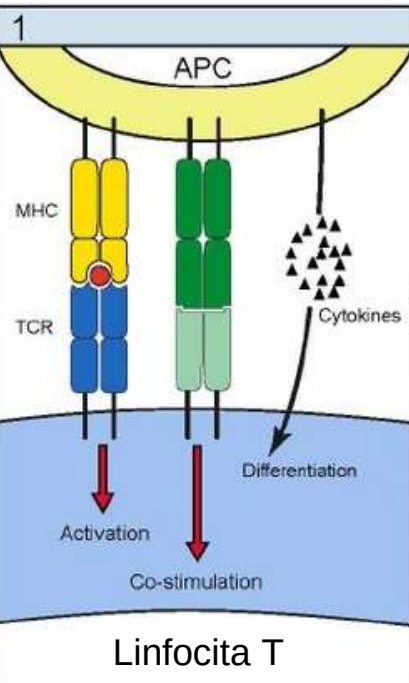


Intermedi biochimici

Enzimi attivati

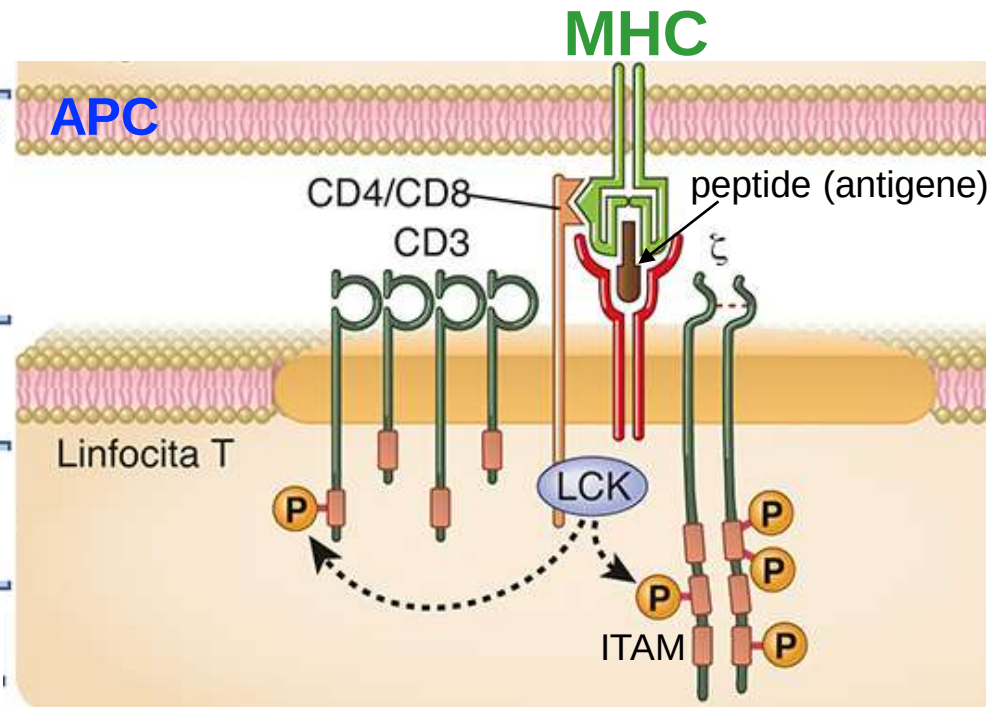
Attivazione di fattori di trascrizione

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 ζ



Fosforilazione delle tirosine



Intermedi biochimici



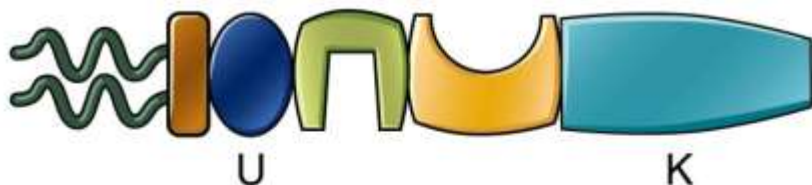
Enzimi attivati



Attivazione di fattori di trascrizione

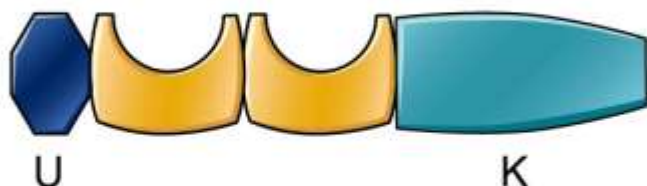
Proteine di trasduzione (TIROSIN CHINASI)

Chinasi della famiglia Src



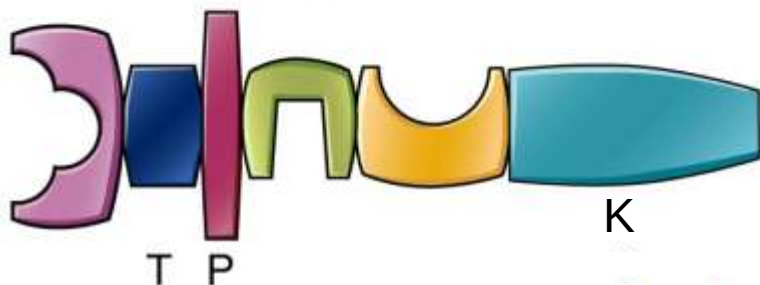
Src Family: p56 Lck; p59 Fyn; Lyn; Blk, miristilate all'N-terminale → localizzazione nei **raft lipidici**, fosforilano le **ITAM**

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 chinasicco
P: peptide ricco di residui di prolina



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



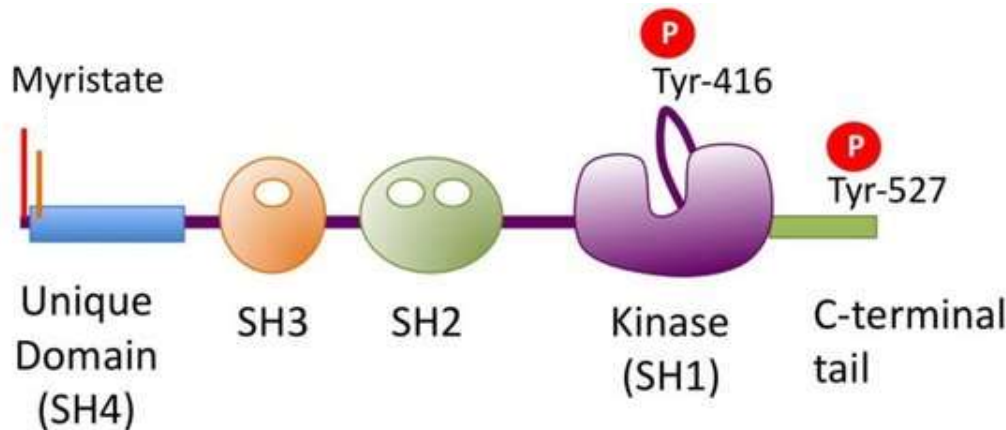
SH3: (100 aa): il dominio SH3 riconosce sequenze **ricche in prolina**



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

Src Kinase: p56Lck, p59Fyn, Lyn, Blk

A



SH2 (100 aa): riconosce sequenze con **fosfotirosine**

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

B

N-terminal unique domain

G: myristoylation **C**: palmitoylation

c-Src	MGSNKS	KP-KDASQRRRSLEPAENVH	GAGG--GAFFPASQTPSKPASADGHRG--PSA	AFA	55
c-Yes	MGC	IKSKENKSPA	IKYRPENTPEPVSTSVSHYGA	EPTTVSPCPSSSAKTAVNFSSLSMT	60
Fyn	MGC	VQCKDK	EAATKLTEERDGS	LNQSSGY-----RYGTDPTPQHYP	SFGVTSIPNYNNF
c-Fgr	MGC	VFCKKLEP	VATAKEDAGLEGDFRSYGA---	ADHYGPDPT-KARPASSFAHIPNYSNF	56
Lyn	MGC	IKSK---	GKDSLSDDGVDLKTQ-----	PVPESQLLPQ-QRFQTKDP--EEQ	43
HCK	MGC	MKSKFLQV	GGNTFSKTETSA	SPHCPVY-----VPDPTSTIKPGPN	SHNSNTPGIREA
Lck	MGC	GCSSHP--	EDDWENIDVCEN	CHYPIV-----PLDGKGTLLIR-NG	SEVRDPLVTYE
Blk	MGL	VSSKKPD-KE	KPIKEKDKGQWSPLKVS-----	AQDKDAPPLPPLVVFVFNH	LTPPPPPDE

Activation loop

		416	
c-Src	ADFG	LARLI	EDNE
c-Yes	ADFG	LARLI	EDNE
Fyn	ADFG	LARLI	EDNE
c-Fgr	ADFG	LARIK	DDEN
Lyn	ADFG	LARVI	EDNE
HCK	ADFG	LARVI	EDNE
Lck	ADFG	LARVI	EDNE
Blk	ADFG	LARI	IDS-

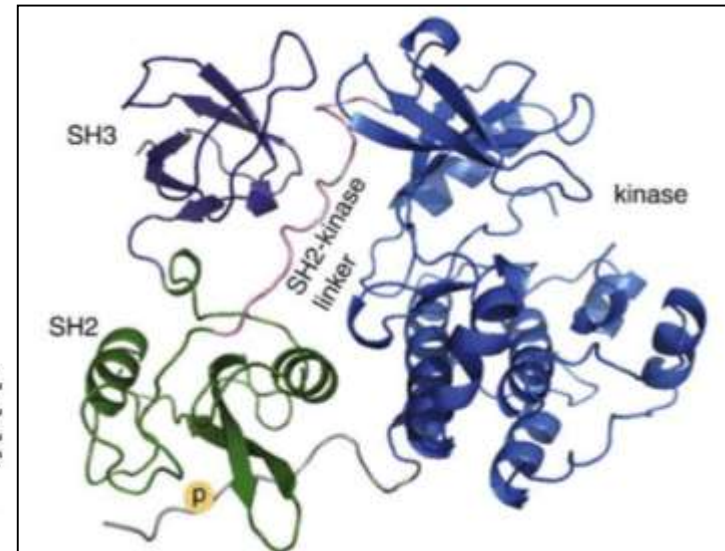
C-terminal regulatory tail

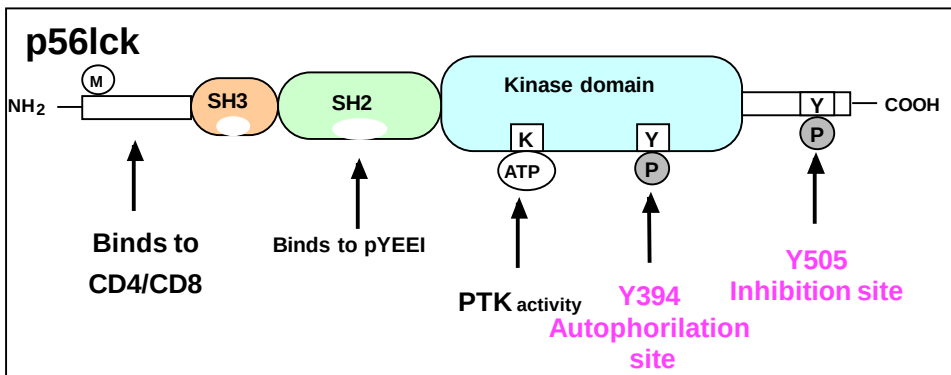
	504		527
	LMCQC	WRKEPEERPTFEYLQAF	L
	LMNL	CWK	KDP
	LMIH	CWK	KDP
	AMEQ	TWR	LDP
	IMKMC	WKE	KA
	IMMRC	WKN	RPE
	LMRL	CWK	ERP
	VIAEC	WRS	RPE

R416: autophosphorylation

G504-525: Csk recognition

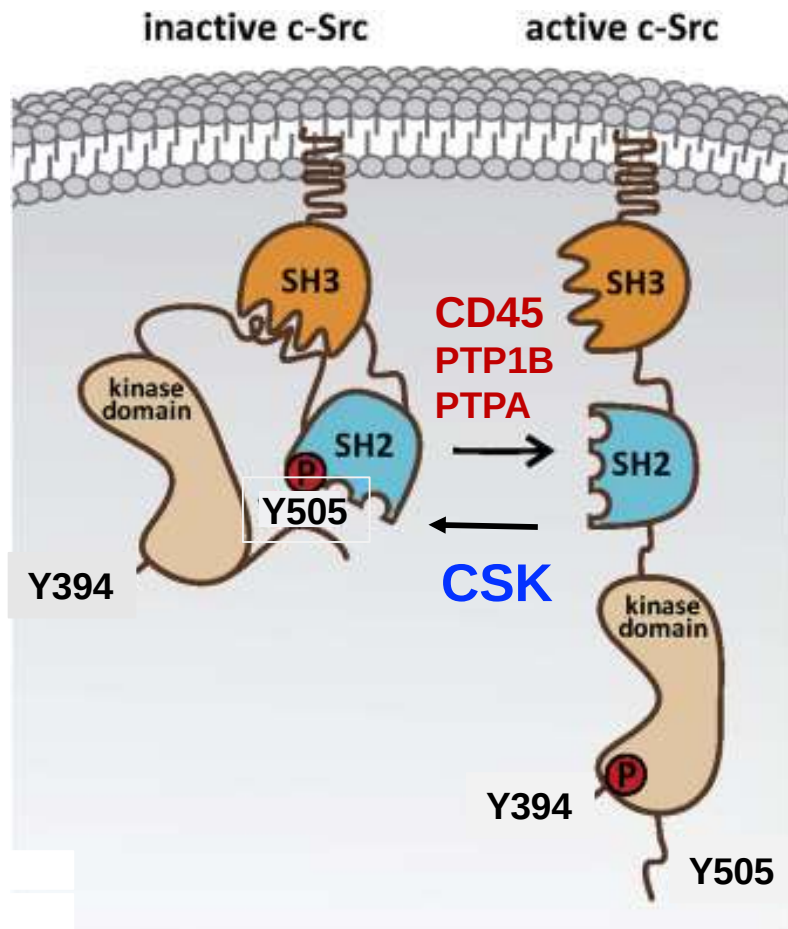
P527: Csk phosphorylation



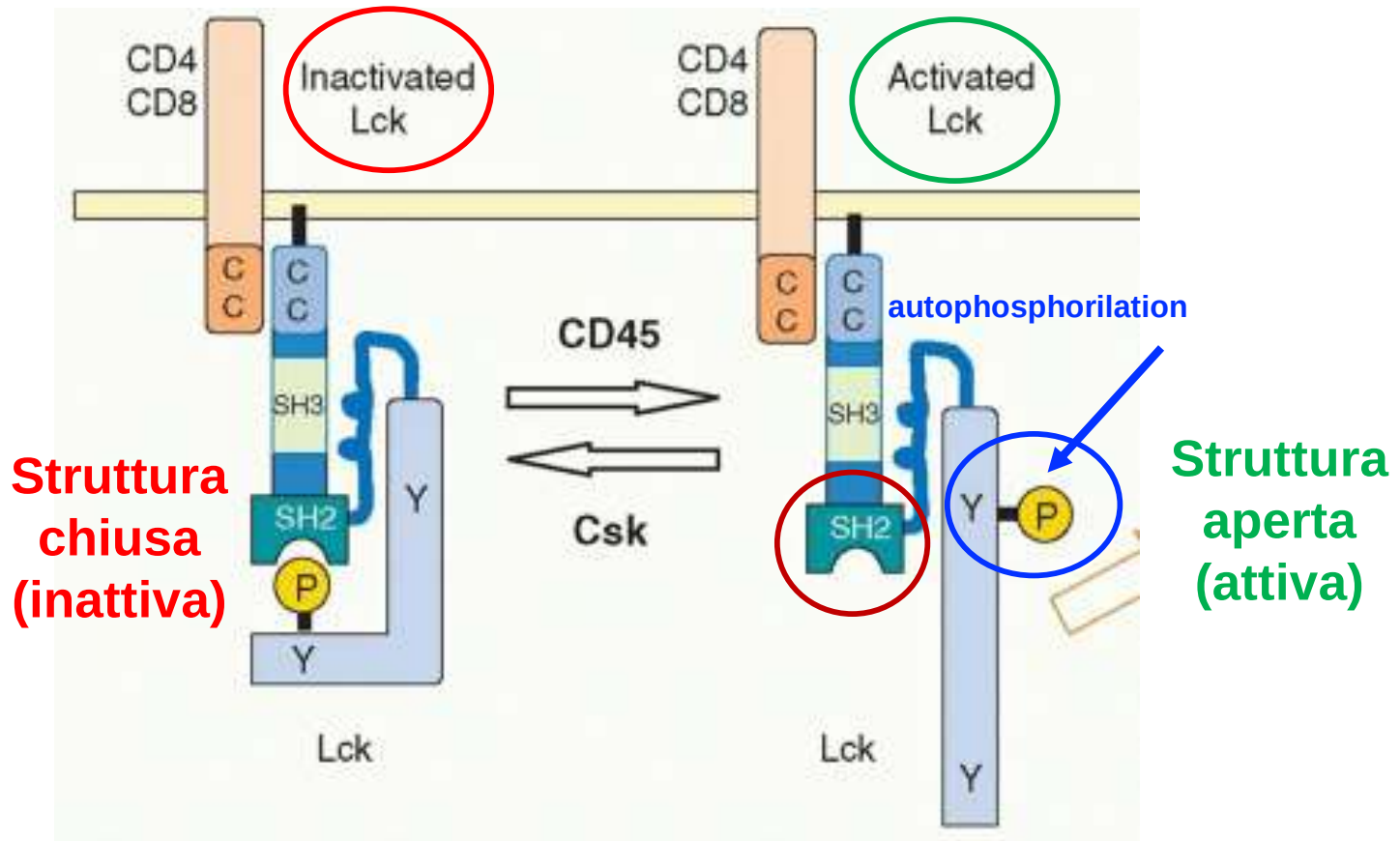


Regolazione delle Src chinasi

- **Tirosina C-terminale (regolazione negativa):** quando fosforilata mantiene la chinasi in uno stato chiuso e inattivo
- 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

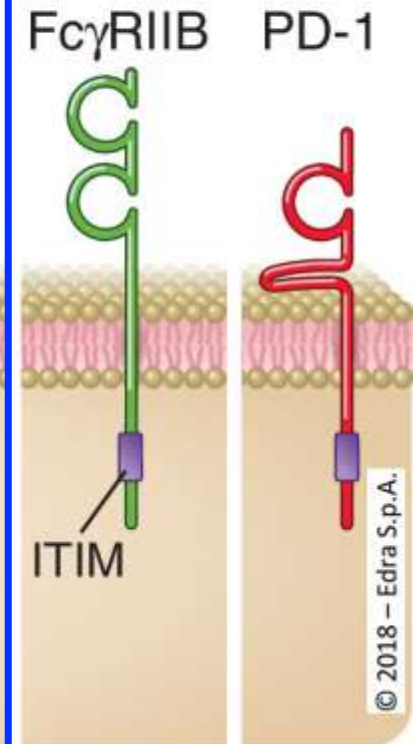
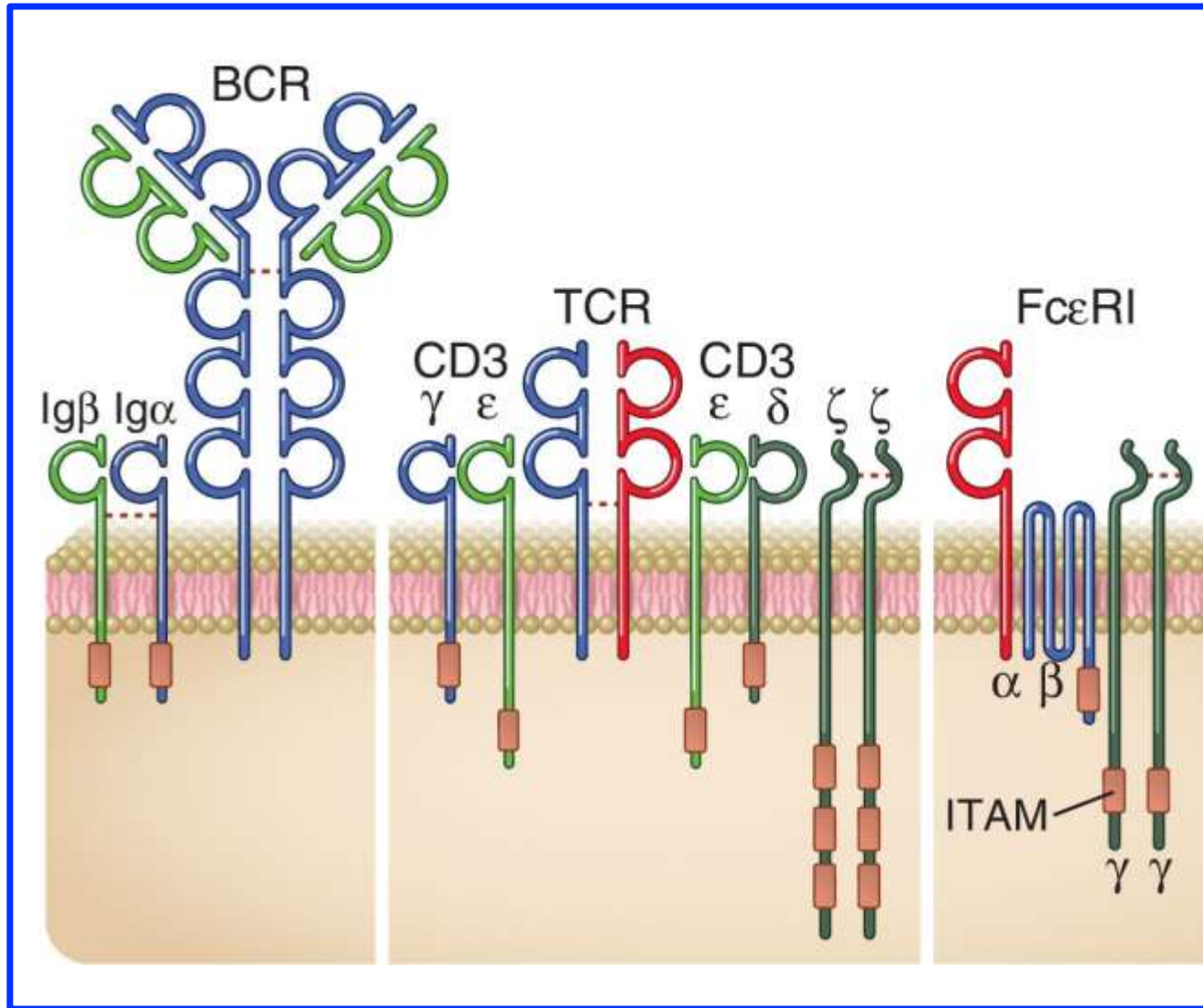


Regolazione della Src chinasi Lck



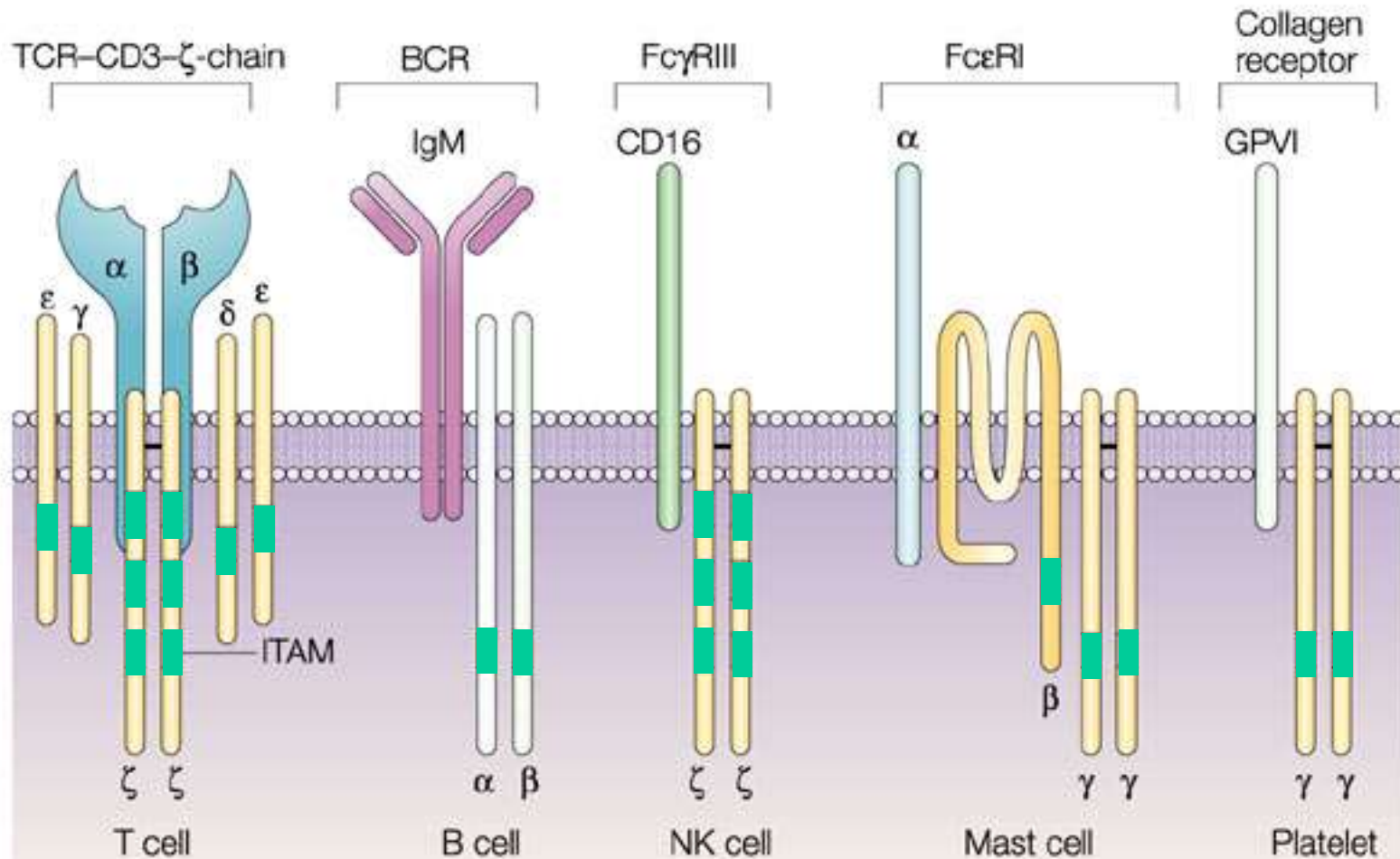
Regulation of the Src Kinase Lck activation by the **Tyrosine Kinase Csk** and the **Phosphatase CD45**. In resting T cells, Lck has a closed configuration through the intra-association between the phosphorylated tyrosine at the C terminus and the Src-homology 2 domain. C-terminus src kinase (**Csk**) 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



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

Le sequenze ITAM

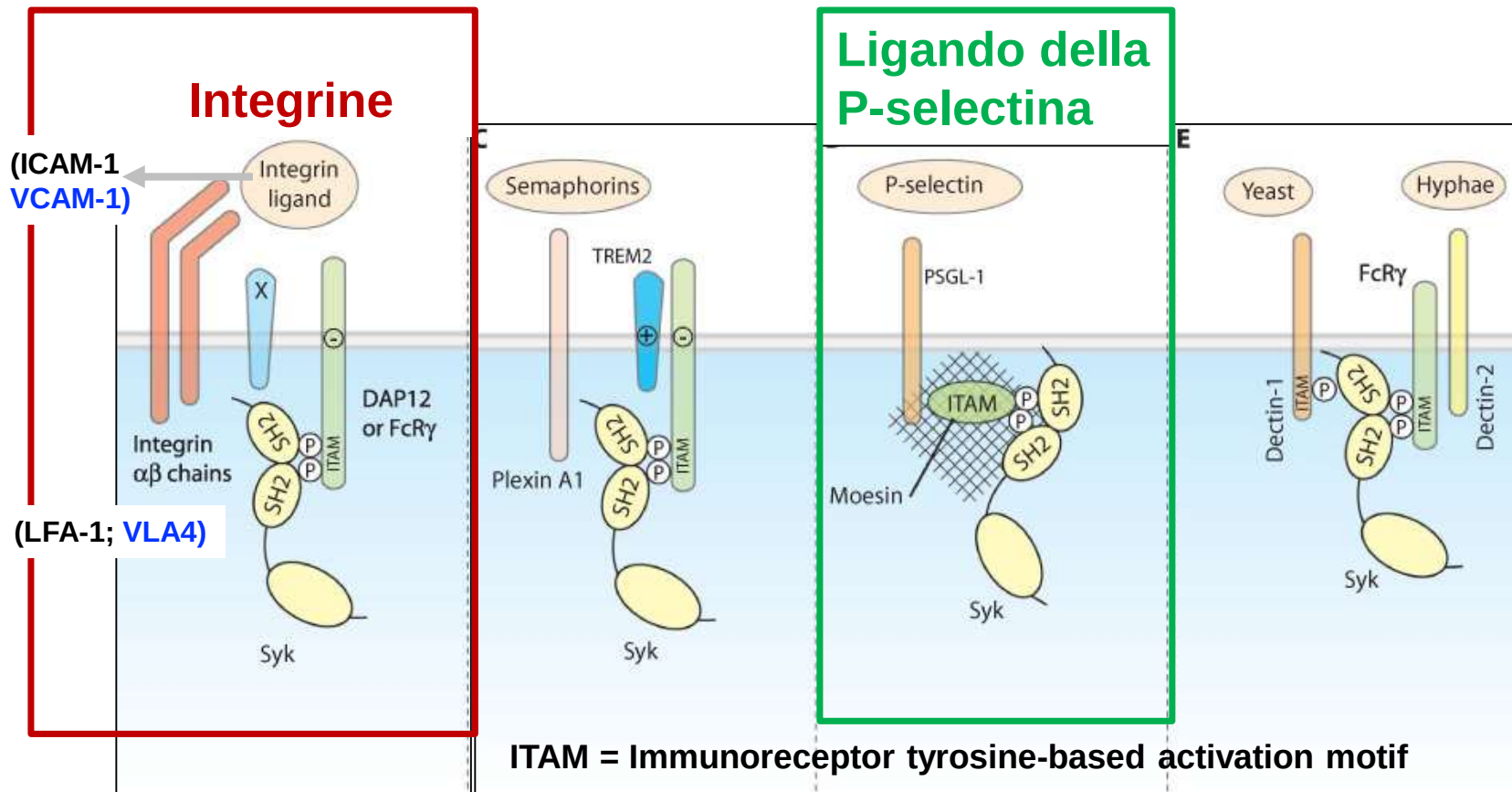


ITAM: YxxL/I (X)₆₋₈ YxxL/I

ITAM = Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif

Nature Reviews | Immunology

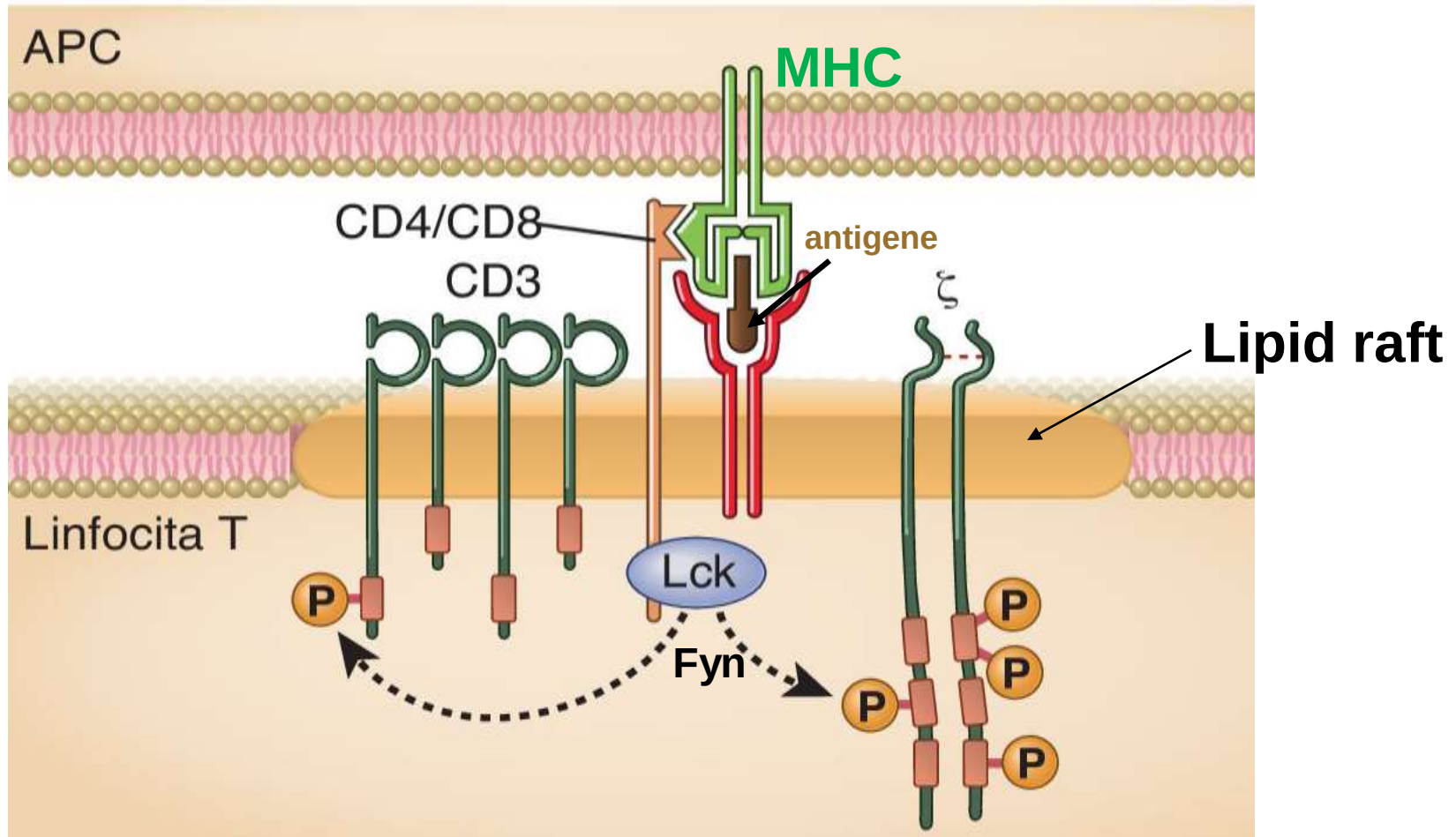
Altri recettori che utilizzano le ITAM



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**.

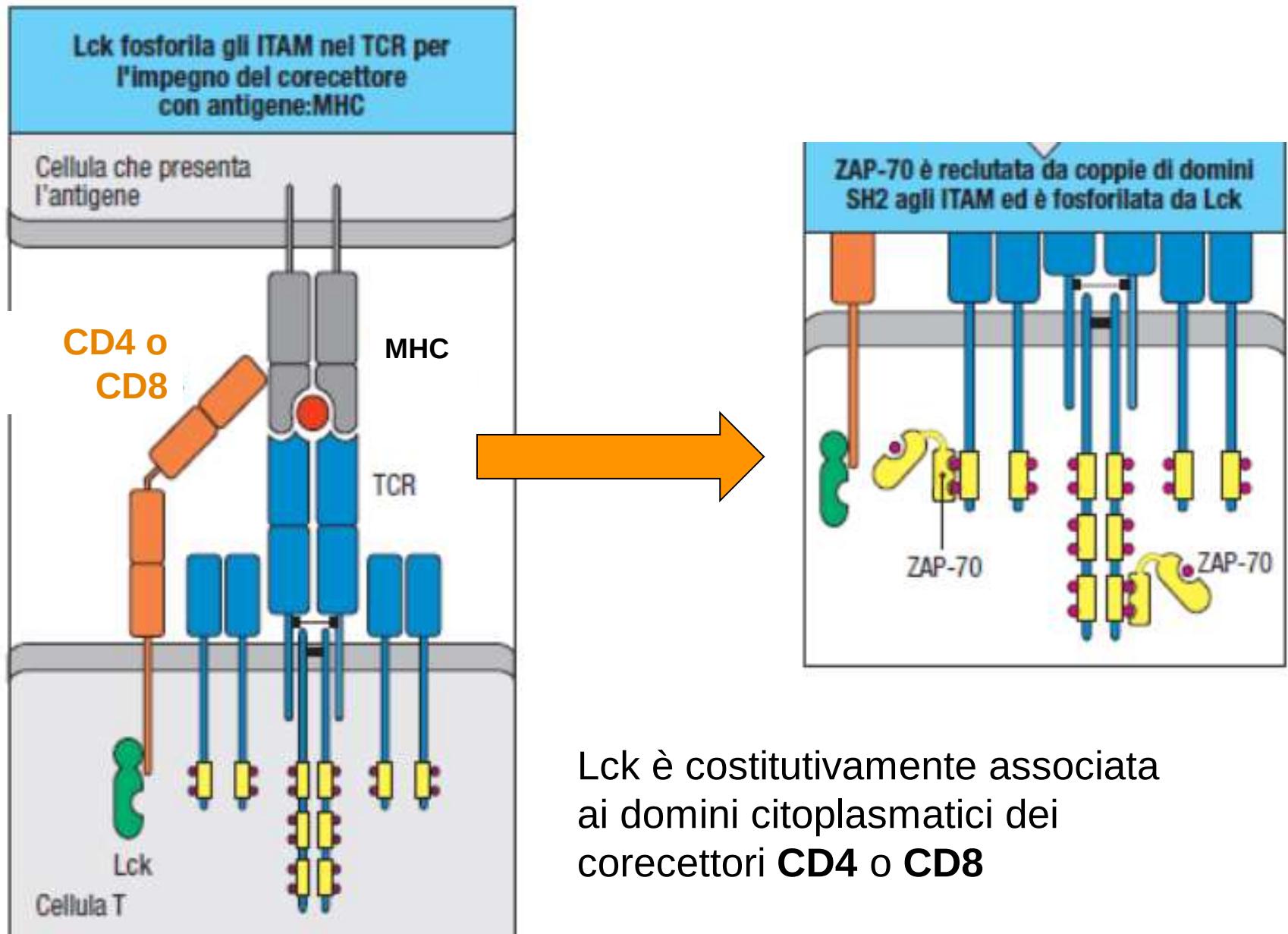
Ligando della P-selectina (PSGL1): espresso dai leucociti lega la P-selectina presenti sulle cellule endoteliali promuovendone l'adesione blanda durante il reclutamento.

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



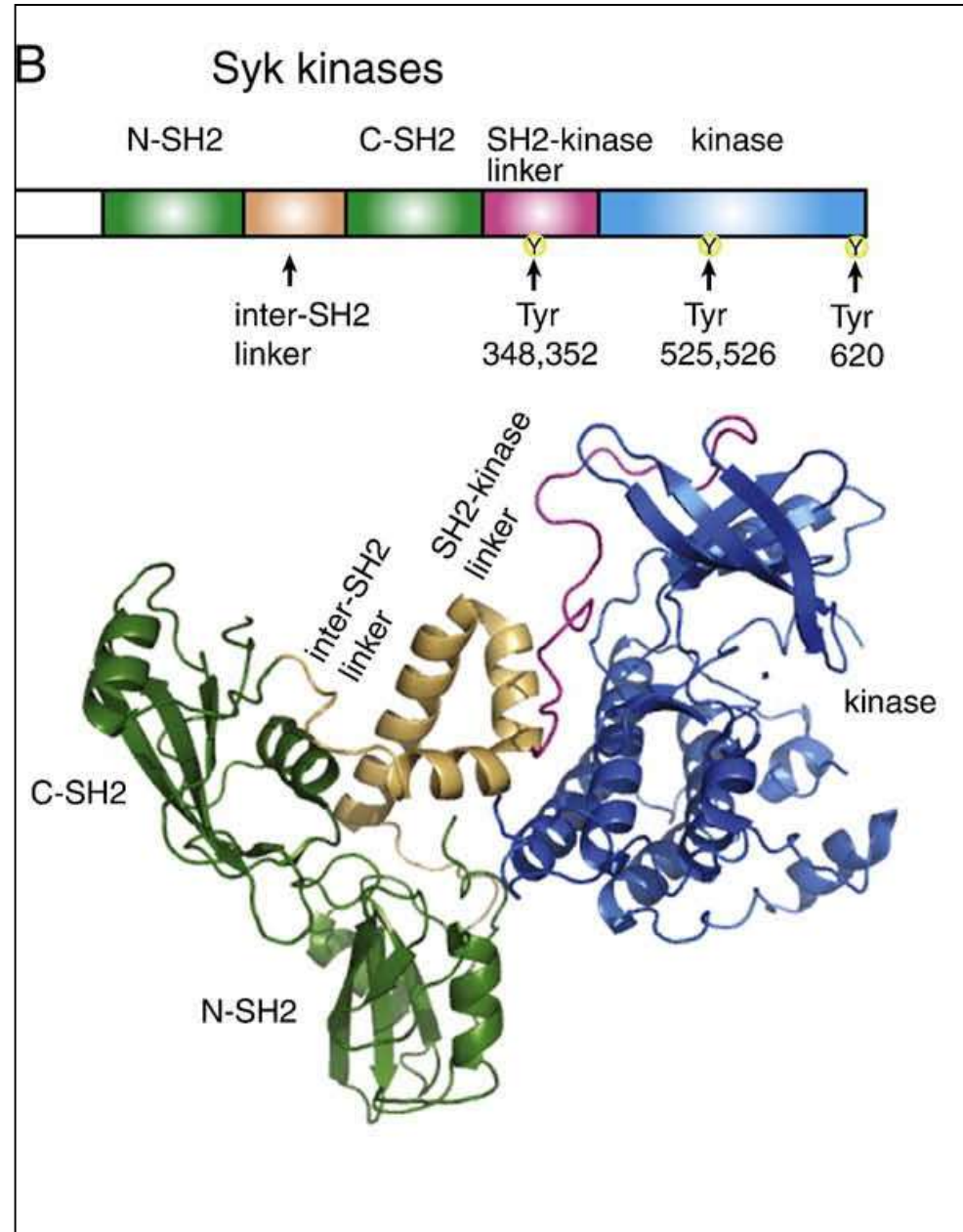
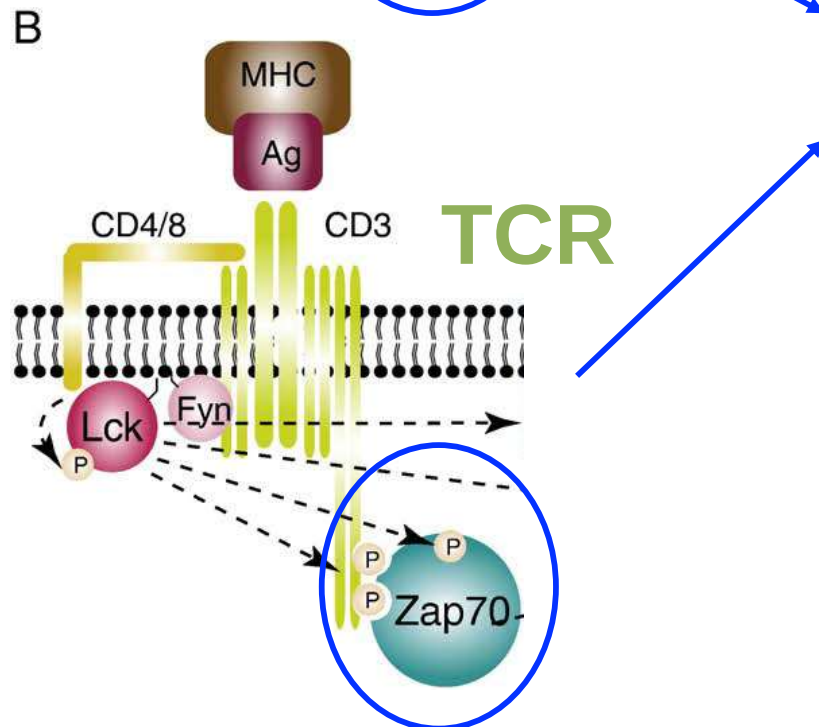
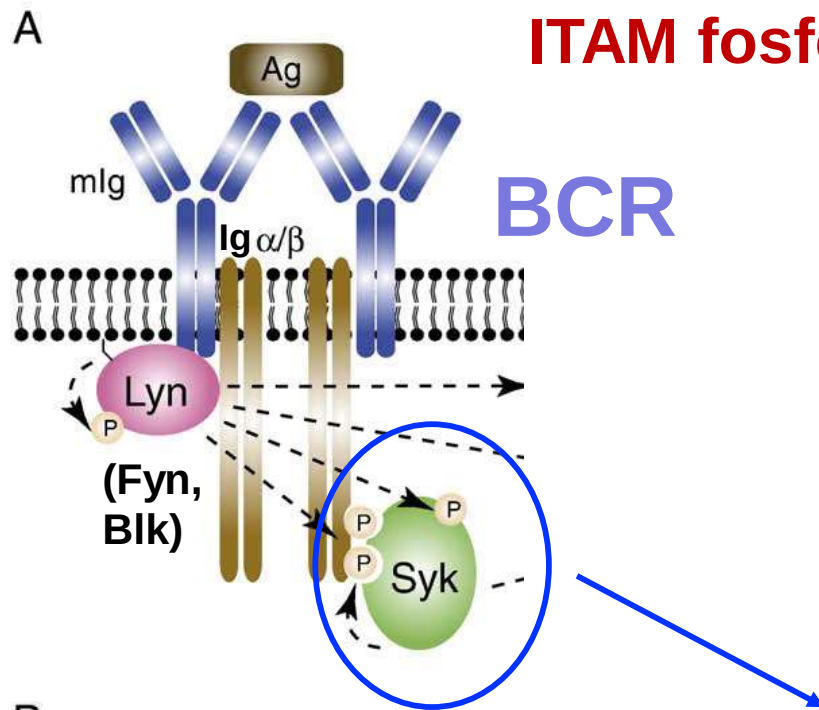
- In seguito al riconoscimento dell'antigene il TCR e il corecettore CD4/CD8 vengono raggruppanti nei raft lipidici di membrana.
- Lck (o anche Fyn) fosforila le Tyr nelle sequenze ITAM nel CD3 e delle catene zeta

Il legame dei corecettori (CD4 o CD8) al complesso MHC/antigene aiuta inizialmente la trasduzione del segnale

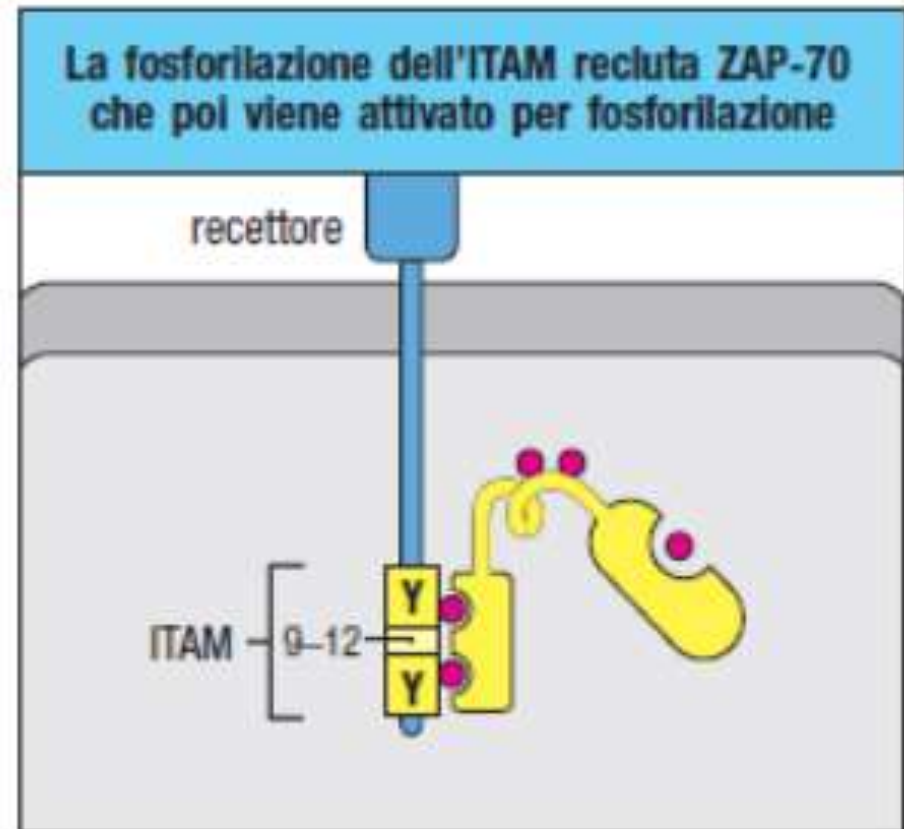
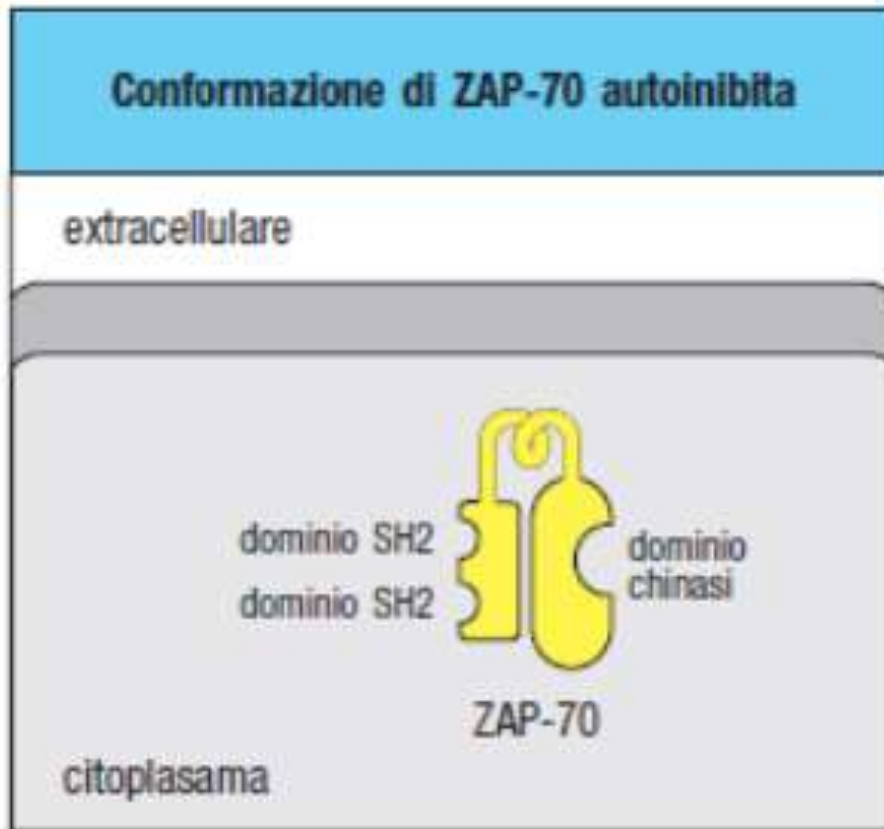


Lck è costitutivamente associata ai domini citoplasmatici dei corecettori **CD4** o **CD8**

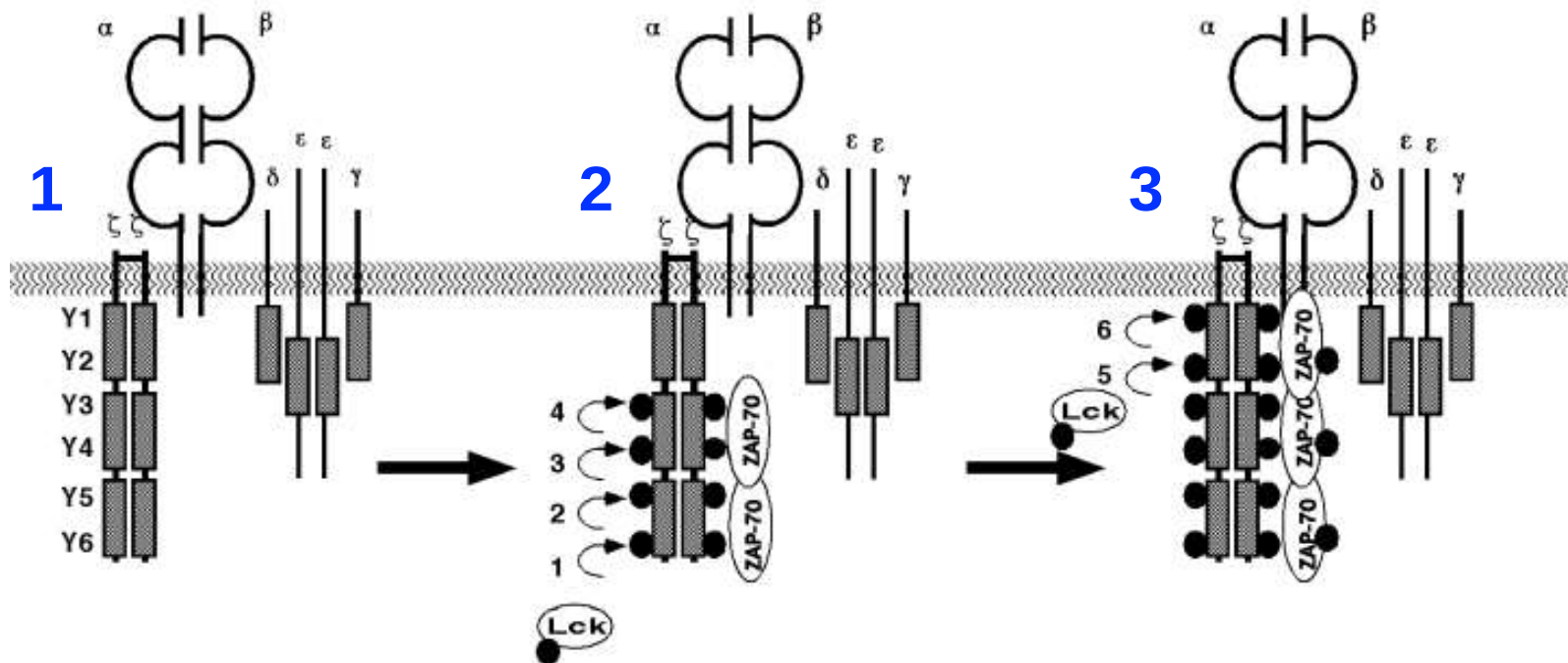
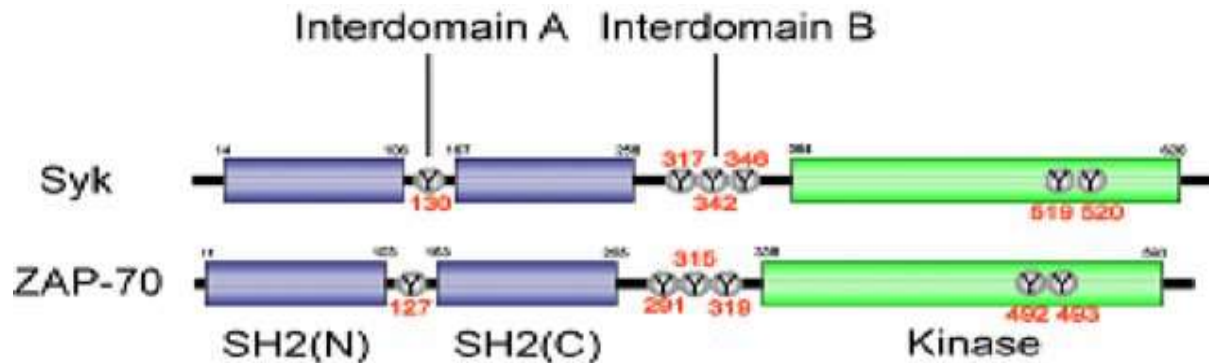
ITAM fosforilate reclutano le TYR CHINASI della famiglia SYK



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

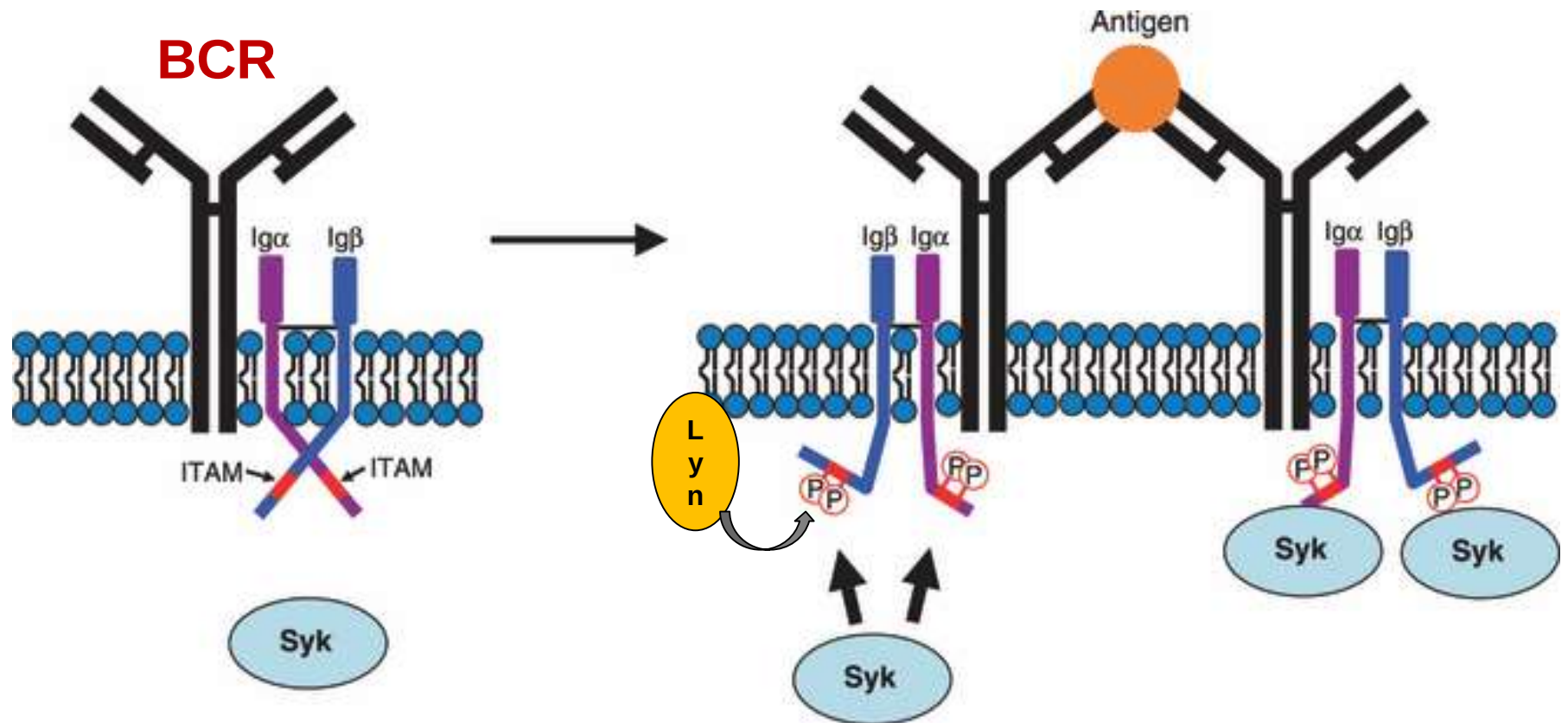


Reclutamento ed attivazione di ZAP-70 nei linfociti T



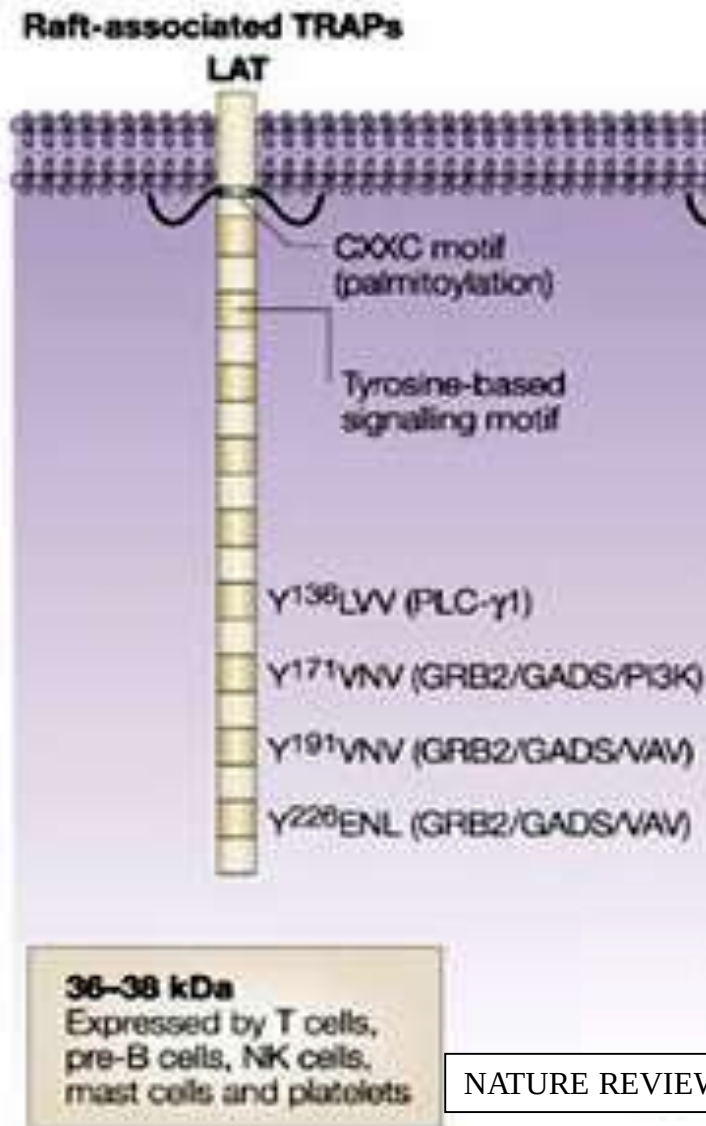
Lck (Src chinasi) fosforila le ITAM nel dominio intracitoplasmatico delle catene del CD3 e di zeta → **ZAP-70** lega le ITAM, viene **fosforilata da Lck (o si auto/transfosforila)** e si attiva.

Attivazione di SYK nei LINFOCITI B



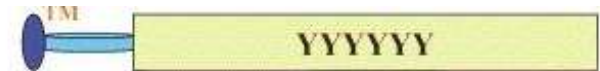
Lyn (Src chinasi) fosforila le ITAM nel dominio intracitoplasmatico di $Ig\alpha$ e $Ig\beta$ $\rightarrow$ Syk lega le ITAM e viene attivata

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



Proteine adattatrici:

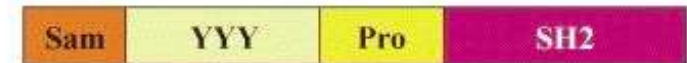
LAT



GADS



SLP-76

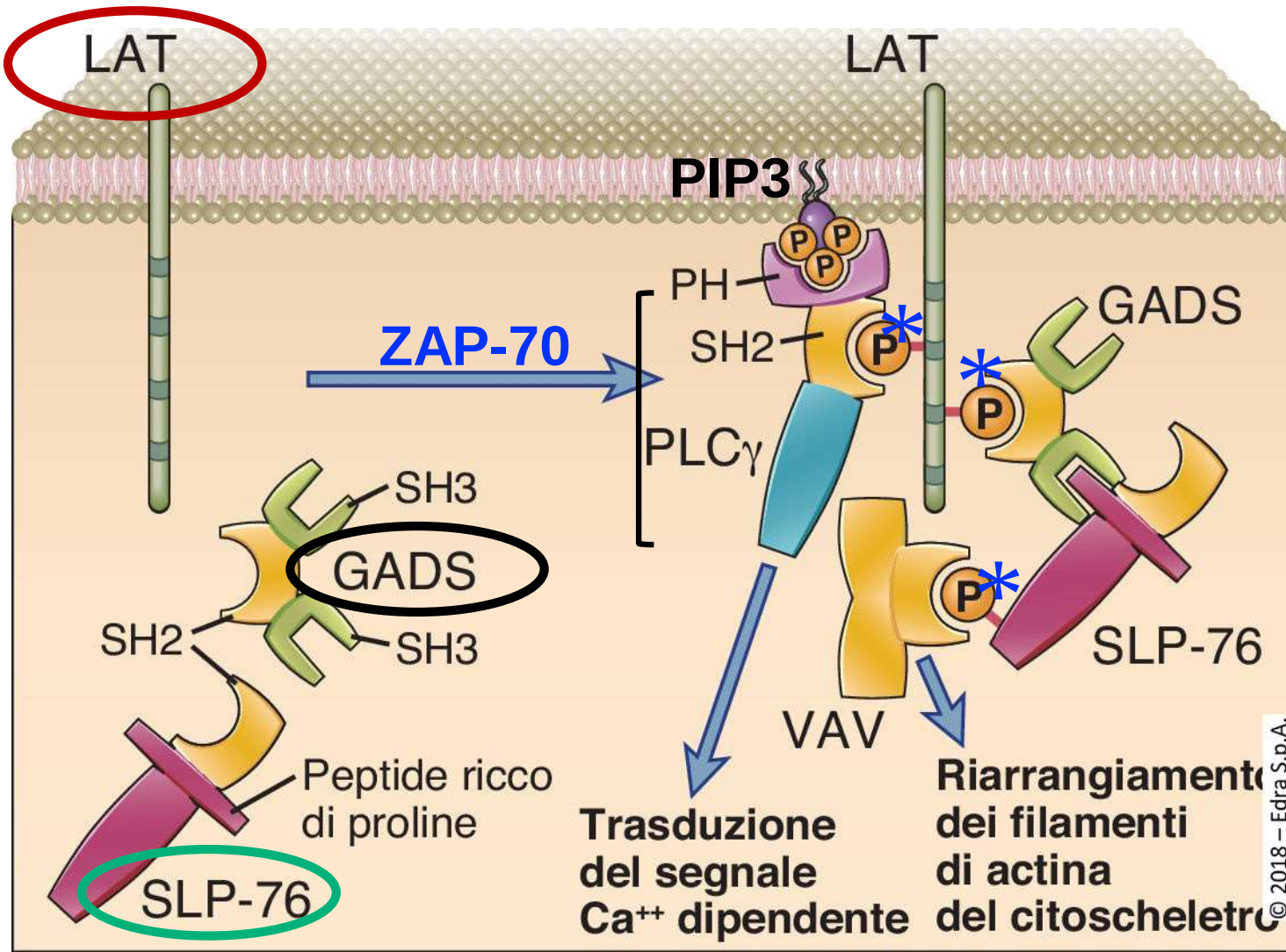


Sono siti di “docking” molecolare

NATURE REVIEWS | IMMUNOLOGY

TRAPs=transmembrane adaptor proteins
LAT=linker for activation of T cells

Proteine adattatrici coinvolte nell'attivazione linfocitaria



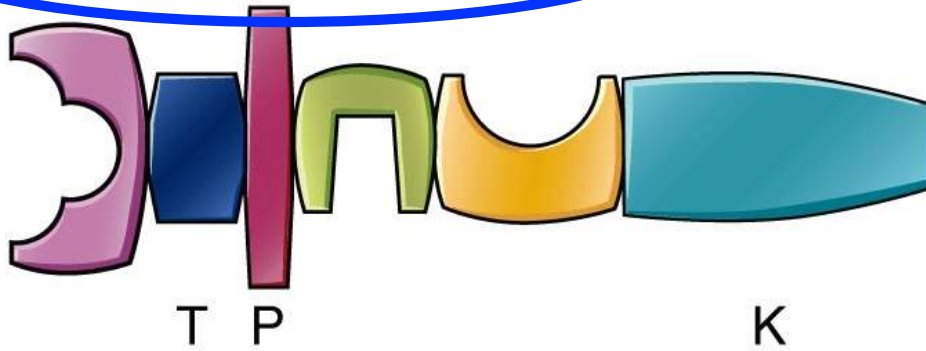
LAT e SLP-76
sono
fosforilate da
ZAP-70 *

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 interazione con gli inositolfosfolipidi (PIP3) e attivate

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



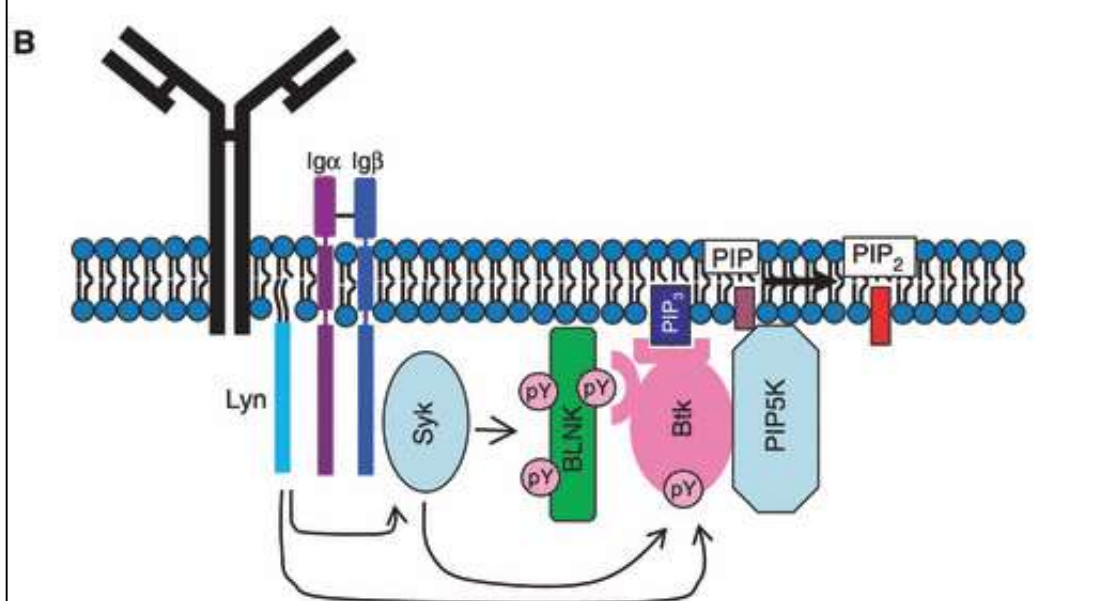
SH2: (100 aa): il dominio SH2 riconosce sequenze comprendenti **tirosine fosforilate (fosfotirosine)**



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)

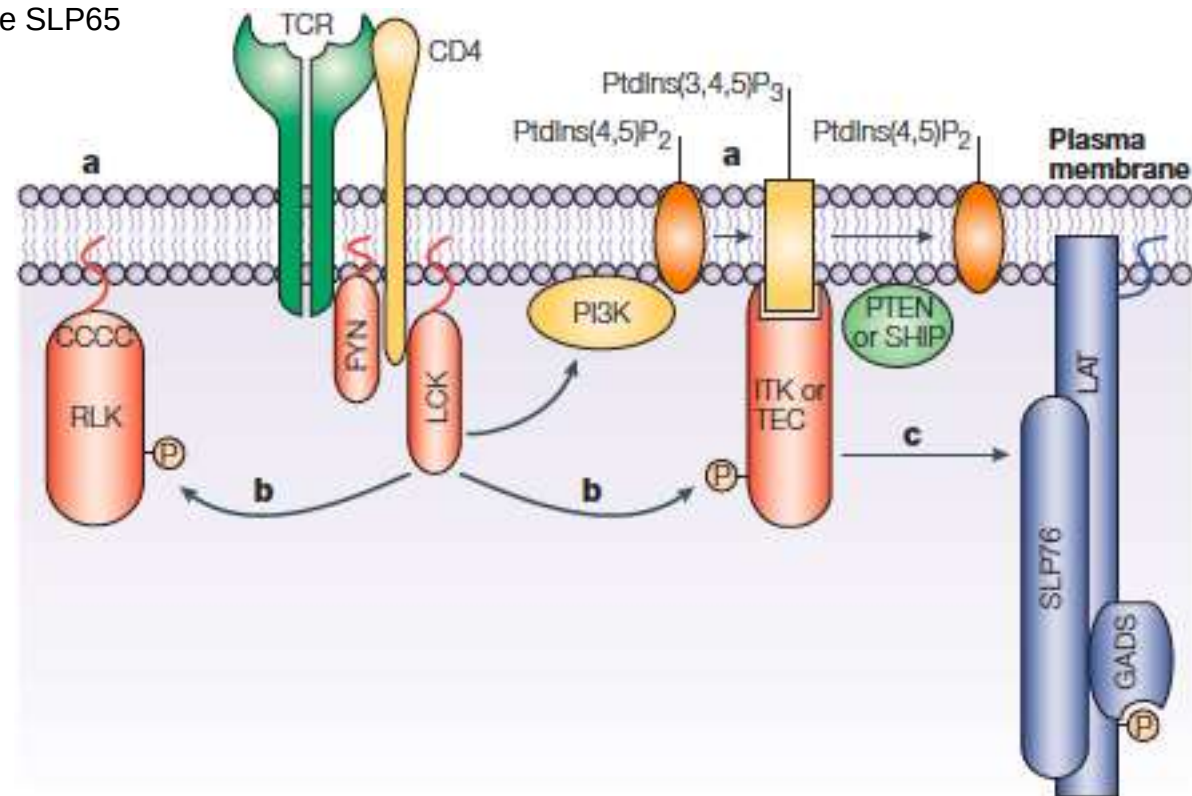


BLNK detta anche SLP65

**BTK nei
LINFOCITI B,
MACROFAGI
e MASTOCITI**

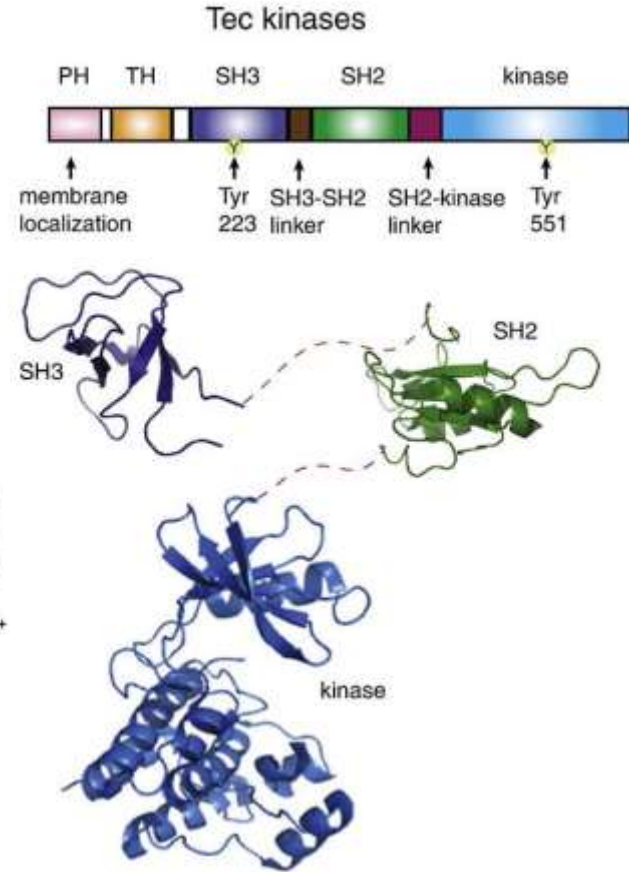
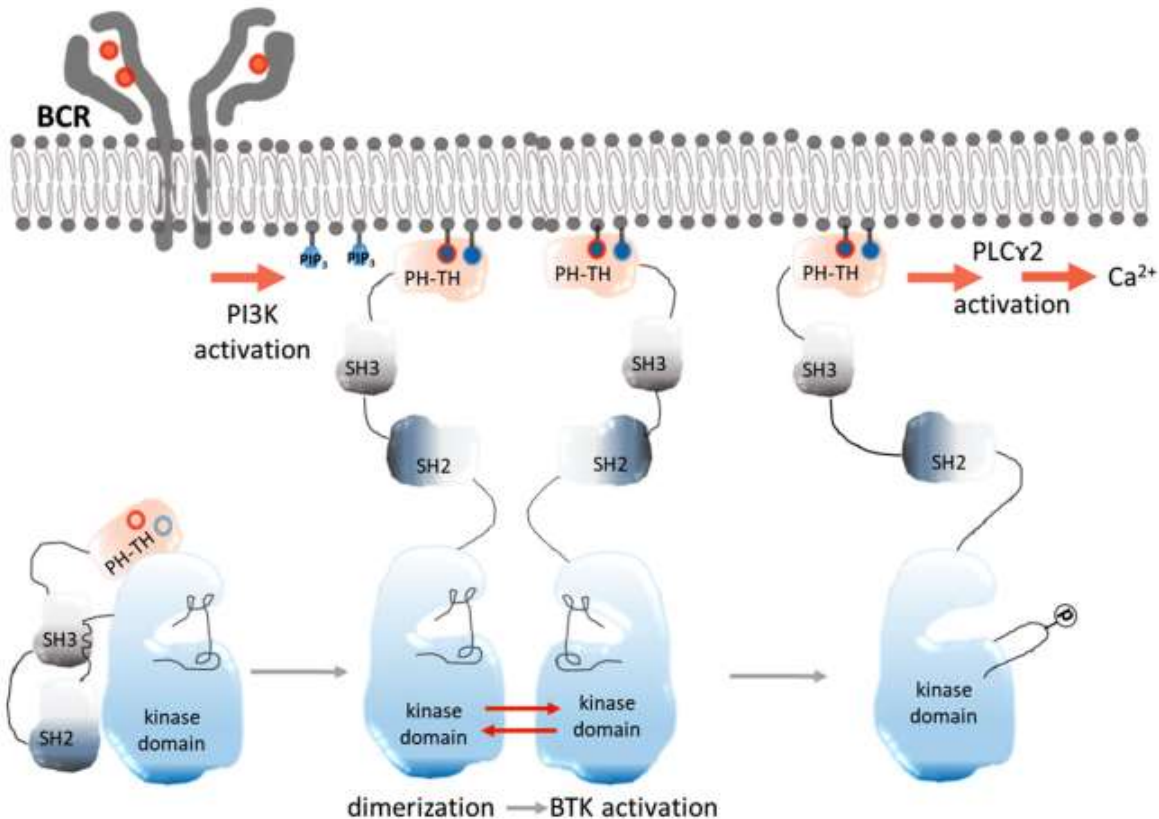
BTK = Bruton's tyrosine kinase

**ITK nei
LINFOCITI T
Cellule NK
MASTOCITI**

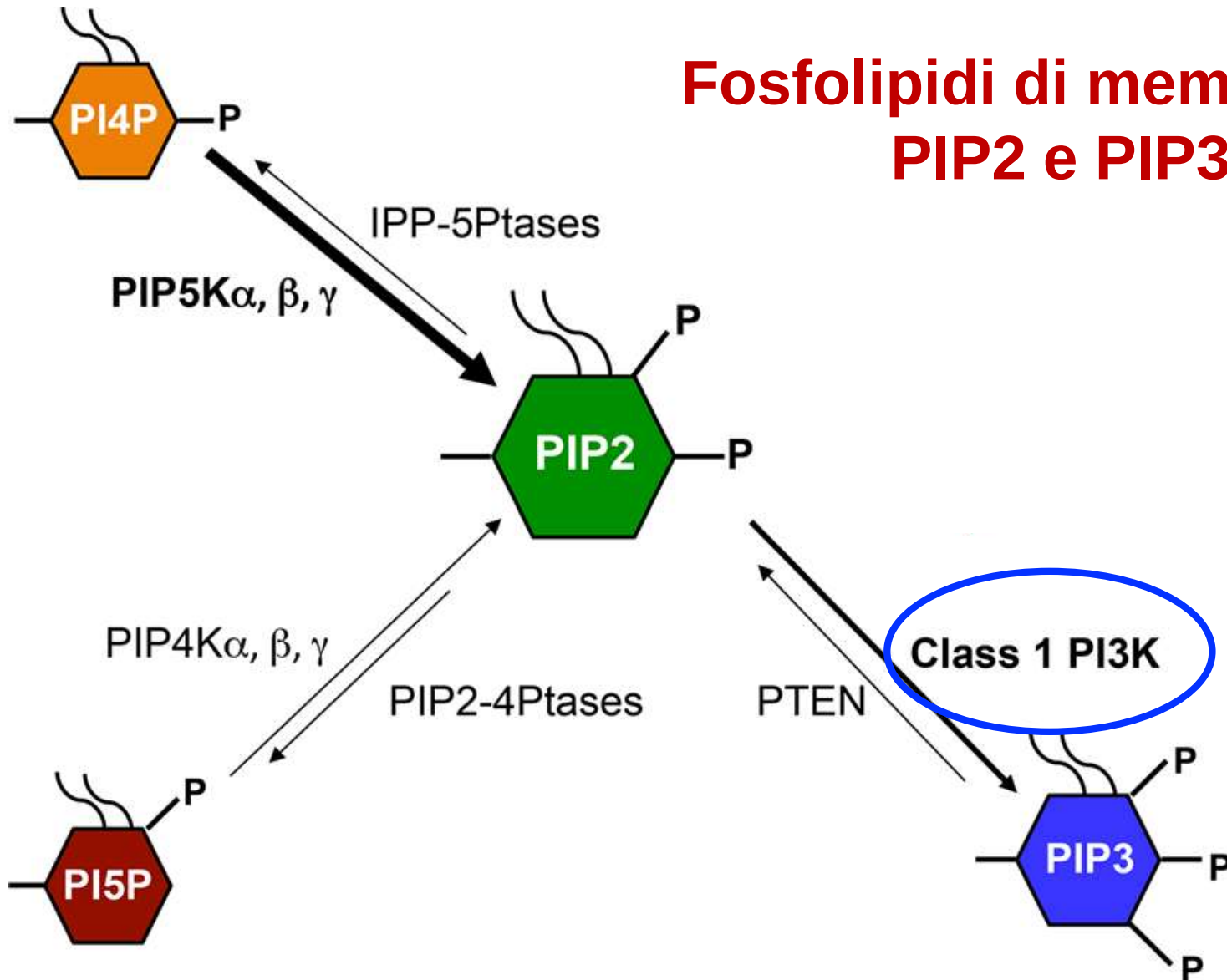


Tec CHINASI: Itk, Btk, Tec

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

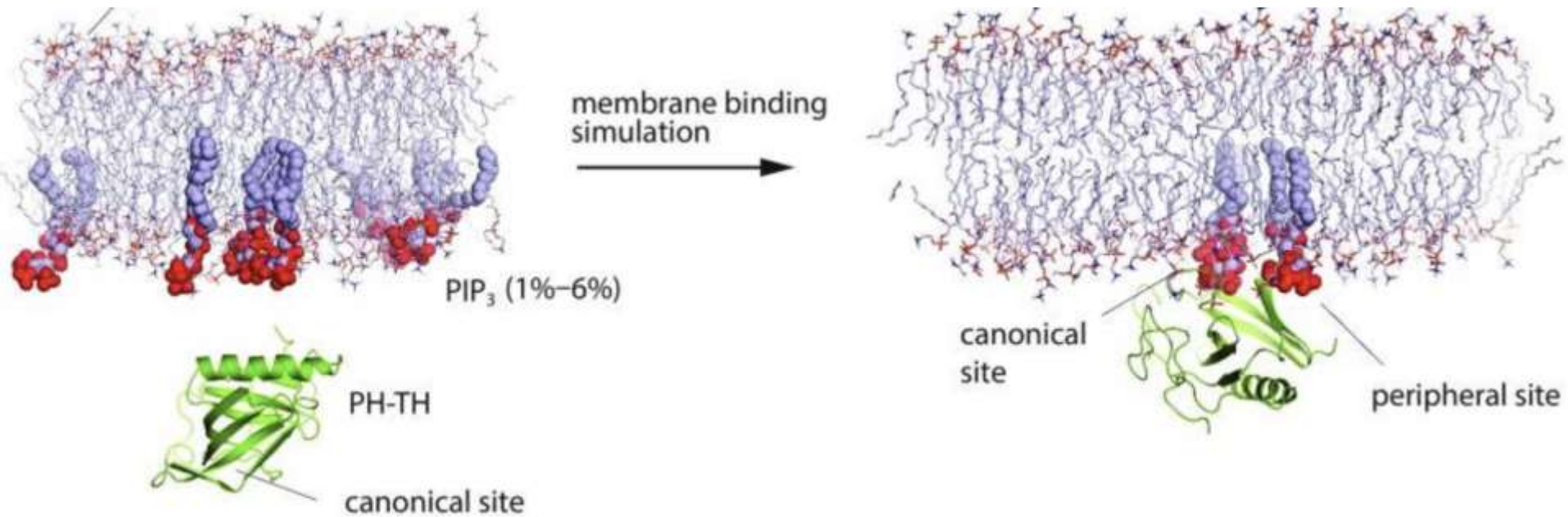


Fosfolipidi di membrana: PIP2 e PIP3



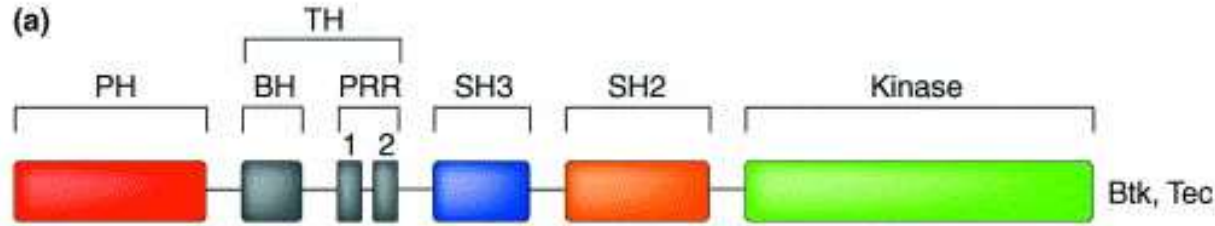
PIP2=fosfatidilinositolo 4,5-bisfosfato
PIP3=fosfatidilinositolo 3,4,5-trifosfato

Attivazione della BTK

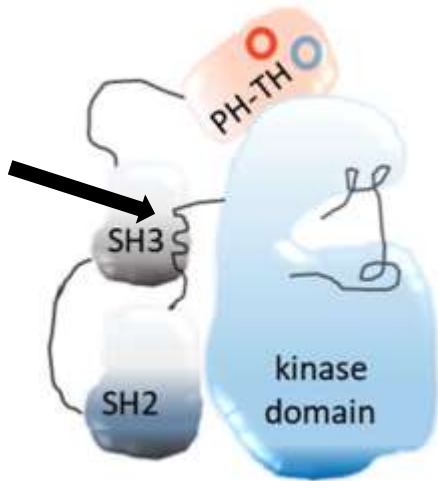
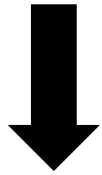


Simulazione del binding in membrana di BTK

Bruton's tyrosine kinase (BTK)



Forma citosolica inattiva

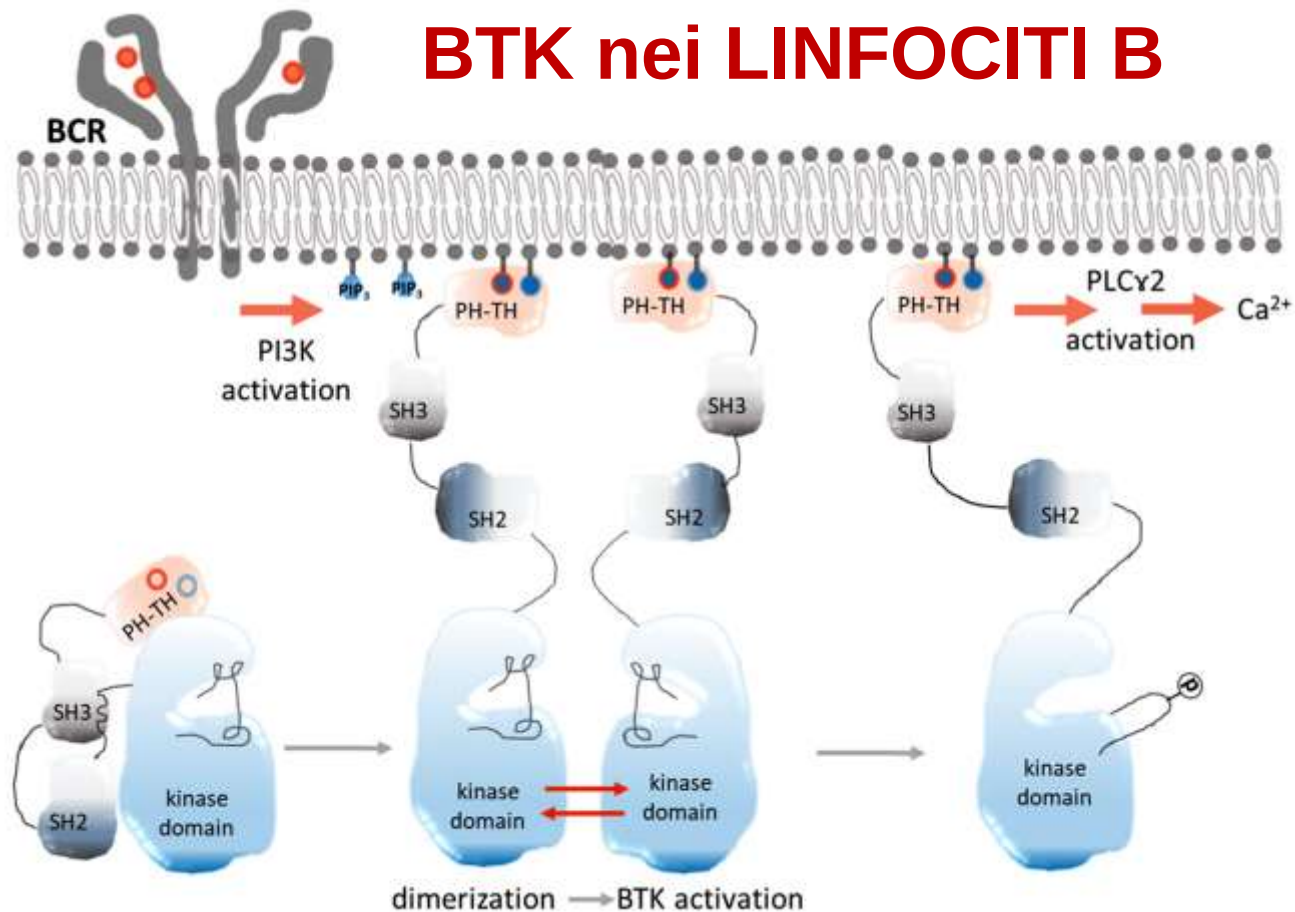


- Nella forma citosolica Btk è chiusa su se stessa ed autoinibita dall'interazione tra il dominio SH3 e il linker SH2-dominio chinasi, stabilizzato dal modulo PH-TH → il **dominio chinasi è inattivo**
- Il **legame in membrana del modulo PH-TH con il PIP3** favorisce l'apertura della molecola e la dimerizzazione 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.

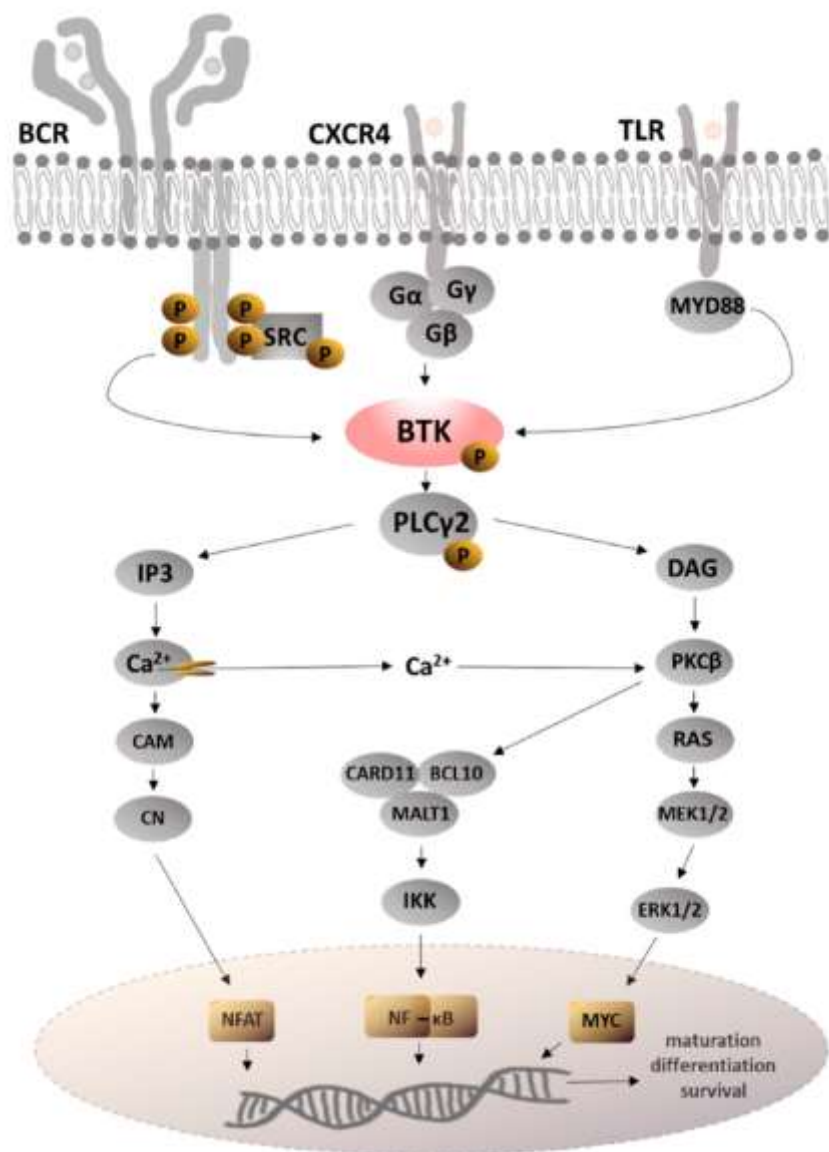
Altre mutazioni che inducono up-regolazione della BTK sono legate a tumori a cellule B o altri tumori solidi.

BTK nei LINFOCITI B



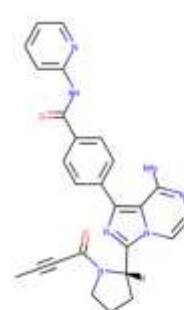
- Nelle cellule a riposo Btk è nel **citoplasma** in forma **inattiva**
- La stimolazione del BCR induce l'attivazione della **PI3K** con **aumento dei PIP₃**
- il **modulo PH-TH** si lega a **due lipidi PIP₃** che innescano la **dimerizzazione** del modulo BTK PH-TH sulla membrana
- Questo a sua volta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

Pathway di BTK



La BTK è espressa non solo nelle cellule B ma anche nei macrofagi, nelle cellule dendritiche plasmacitoidi, nei mastociti, nei basofili, nei neutrofili

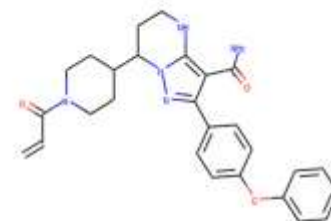
BTK inhibitors



acalabrutinib



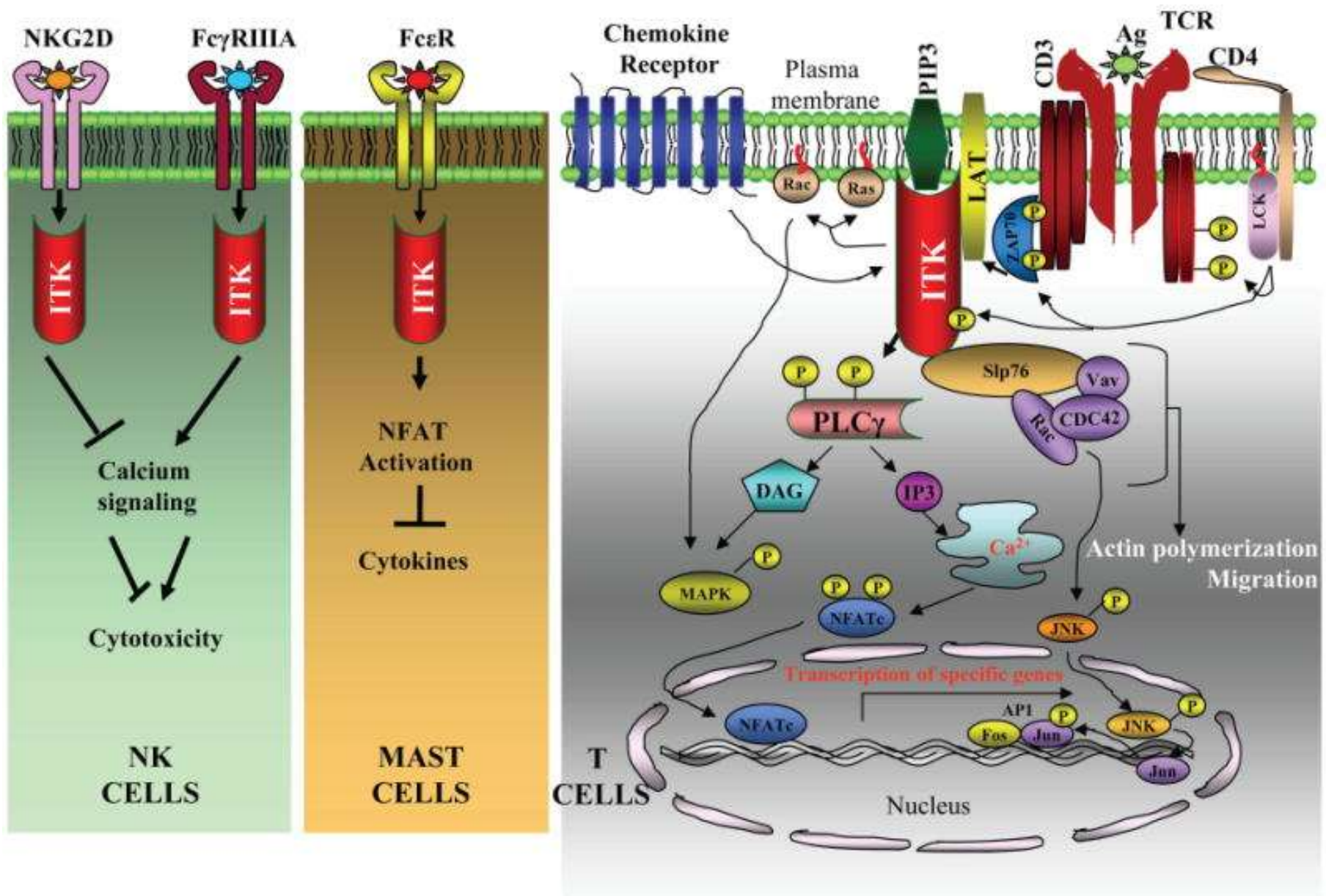
ibrutinib



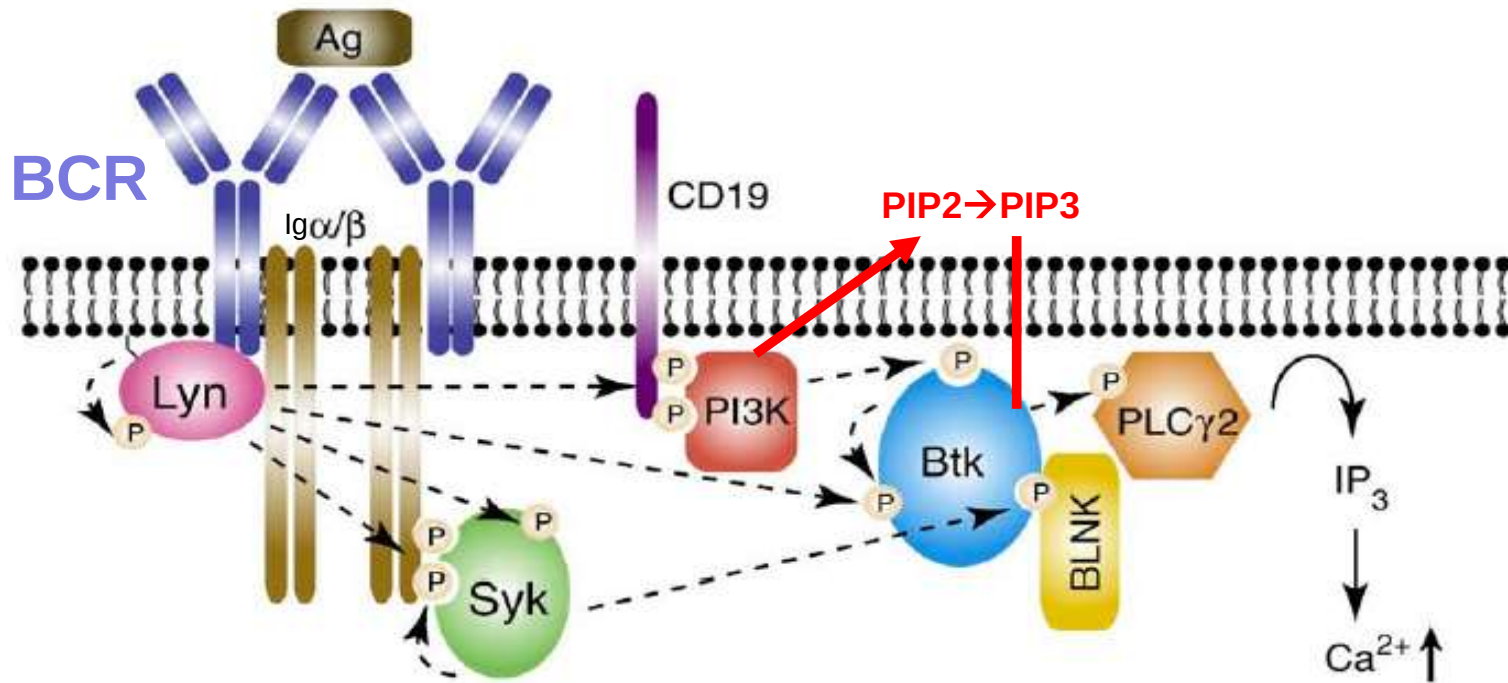
zanubrutinib

BTKIs approvati da FDA per la cura di tumori delle cellule B (Linfomi e Leucemie)

ITK nelle cellule NK, Mastociti e linfociti T

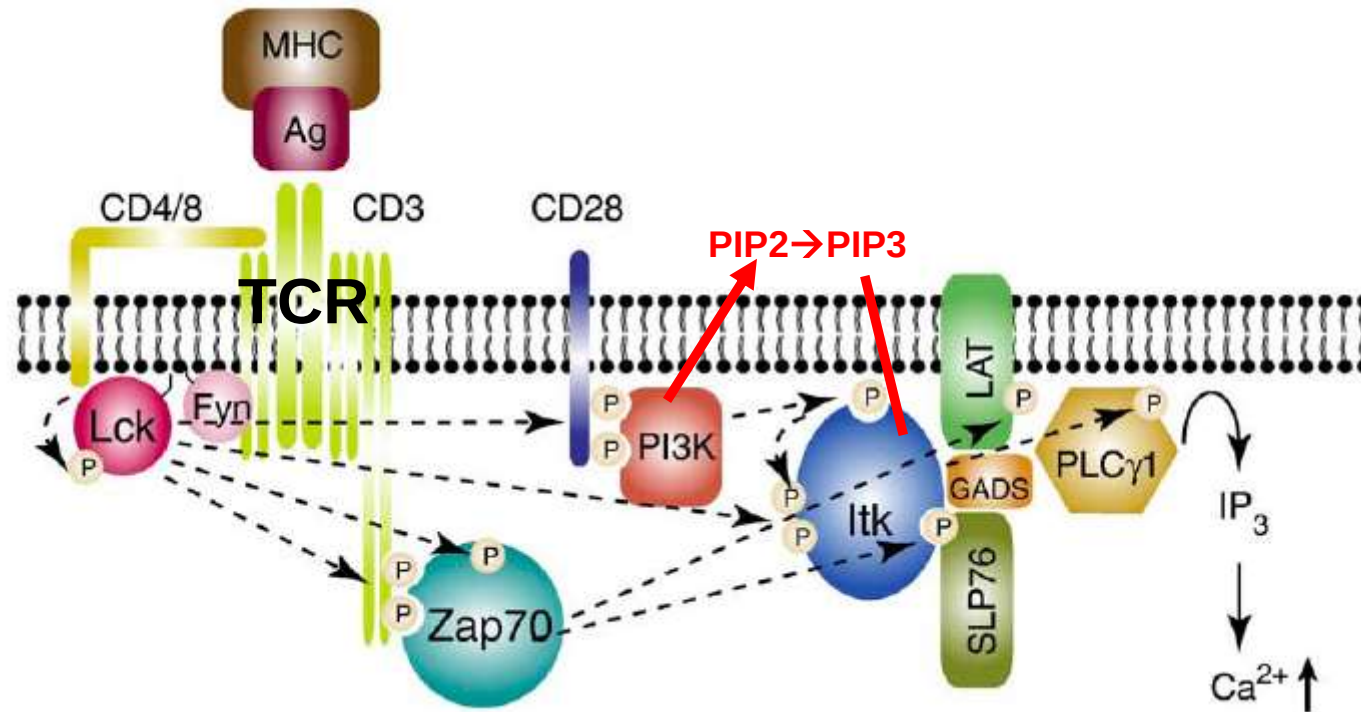


Ruolo delle chinasi Src, Syk e Tec nei linfociti B



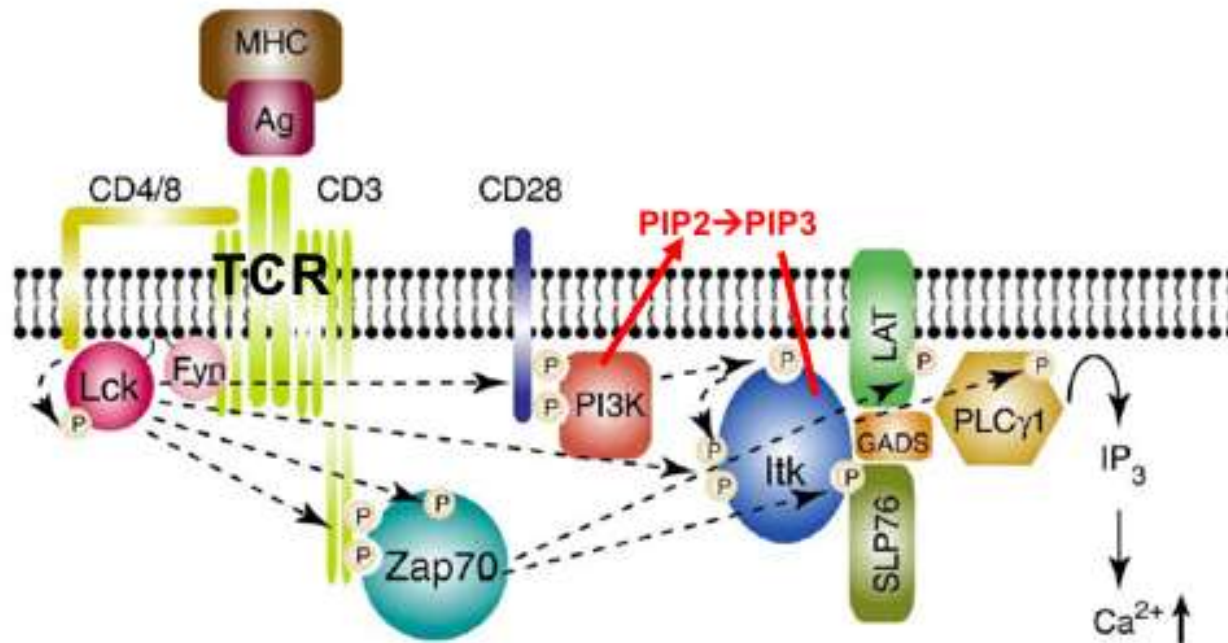
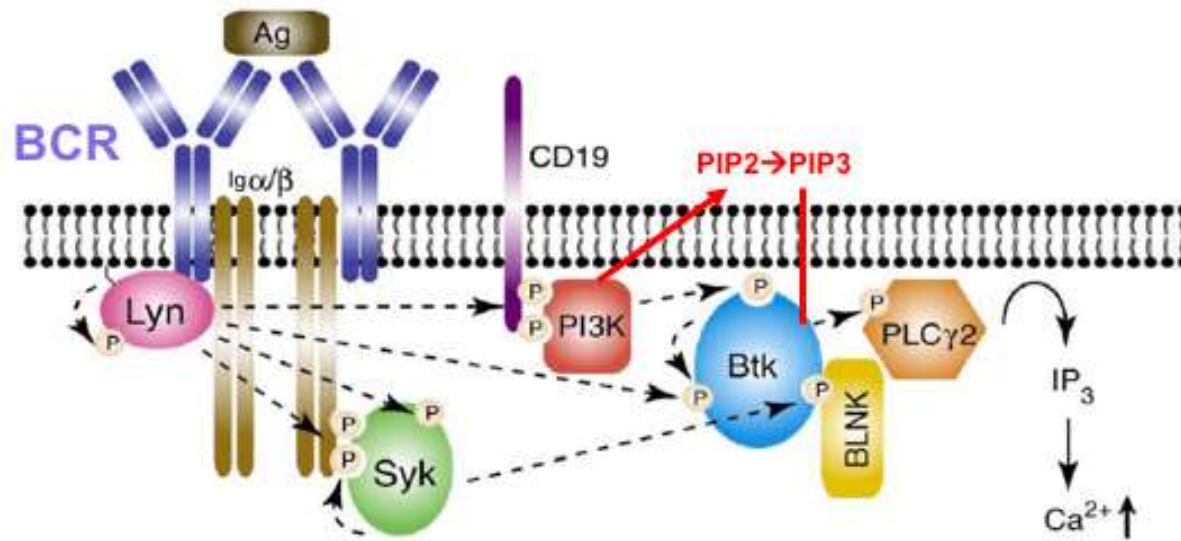
Kinase signaling downstream of the B cell receptor BCR. Binding of antigen (**Ag**) to the **BCR** increases activity of the associated Src family kinase **Lyn**. Lyn phosphorylates itself, furthering increasing its activity, and also other intracellular tyrosines including those within the ITAM motif 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 Cy2 (**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



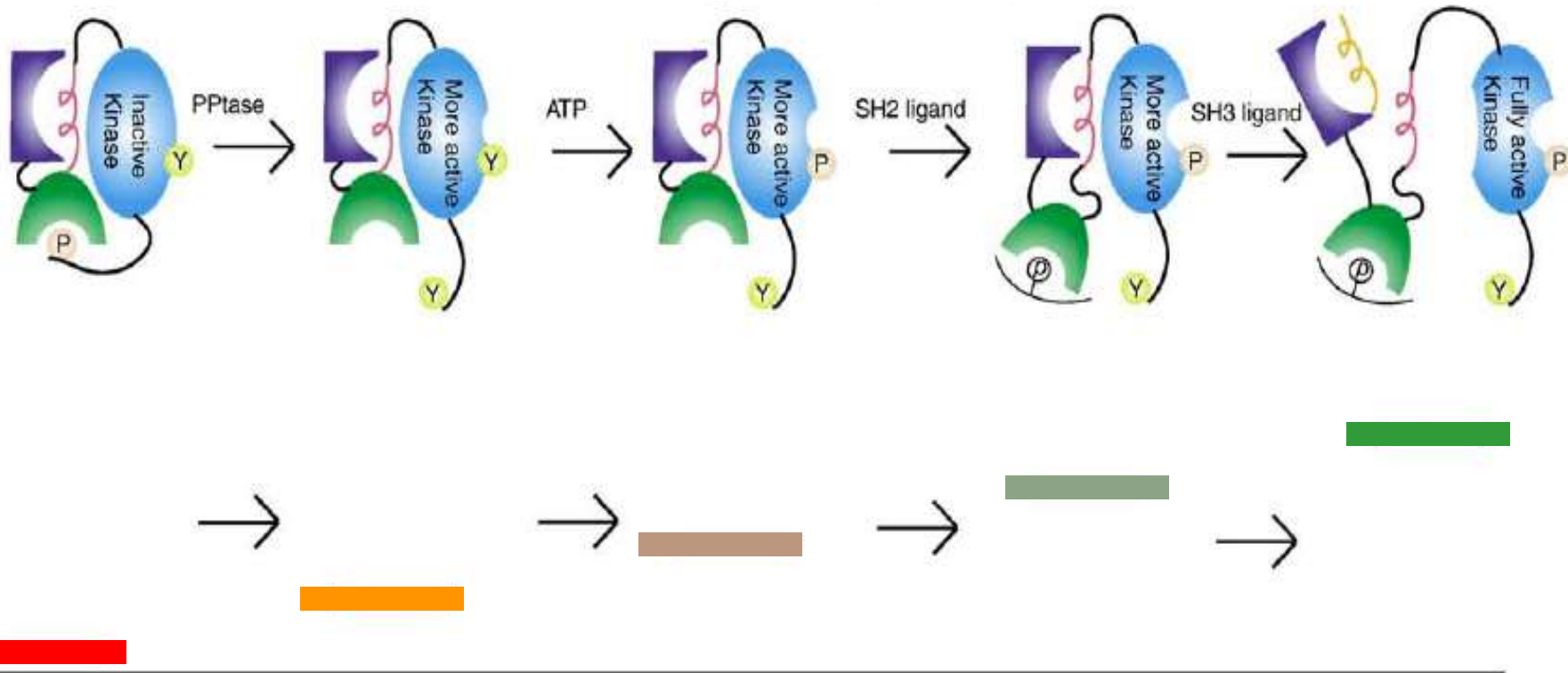
Kinase signaling downstream of the T cell receptor (TCR). Presentation of the antigen (Ag)/Major Histocompatibility Complex (MHC) to the TCR increases activity of the associated Src family kinases Lck, and also Fyn. Lck phosphorylates several nearby tyrosine residues including those within the ITAM motif 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 IP₃ and Ca²⁺, 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

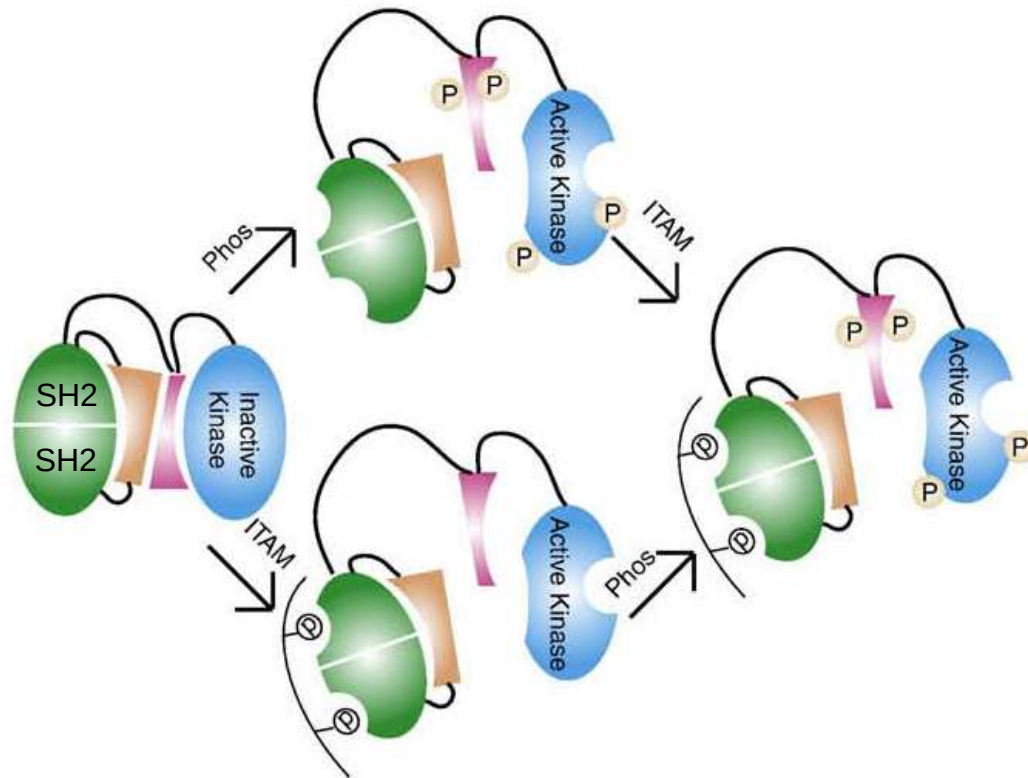


L'attivazione delle Src chinasi avviene in modo graduale (“interruttori graduati”) ed è infatti incrementata da diversi eventi: la defosforilazione della coda C-terminale (Tyr C-terminale regolatoria); la fosforilazione del dominio catalitico, il legame di un ligando al dominio SH2 e al dominio SH3.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

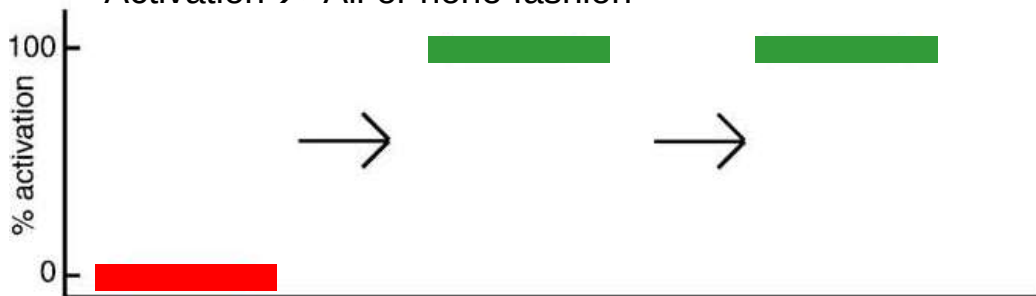
Attivazione delle SYK CHINASI: legame alle ITAM e/o fosforilazione

B

Syk kinases: OR-gate switches



Activation → All or none fashion



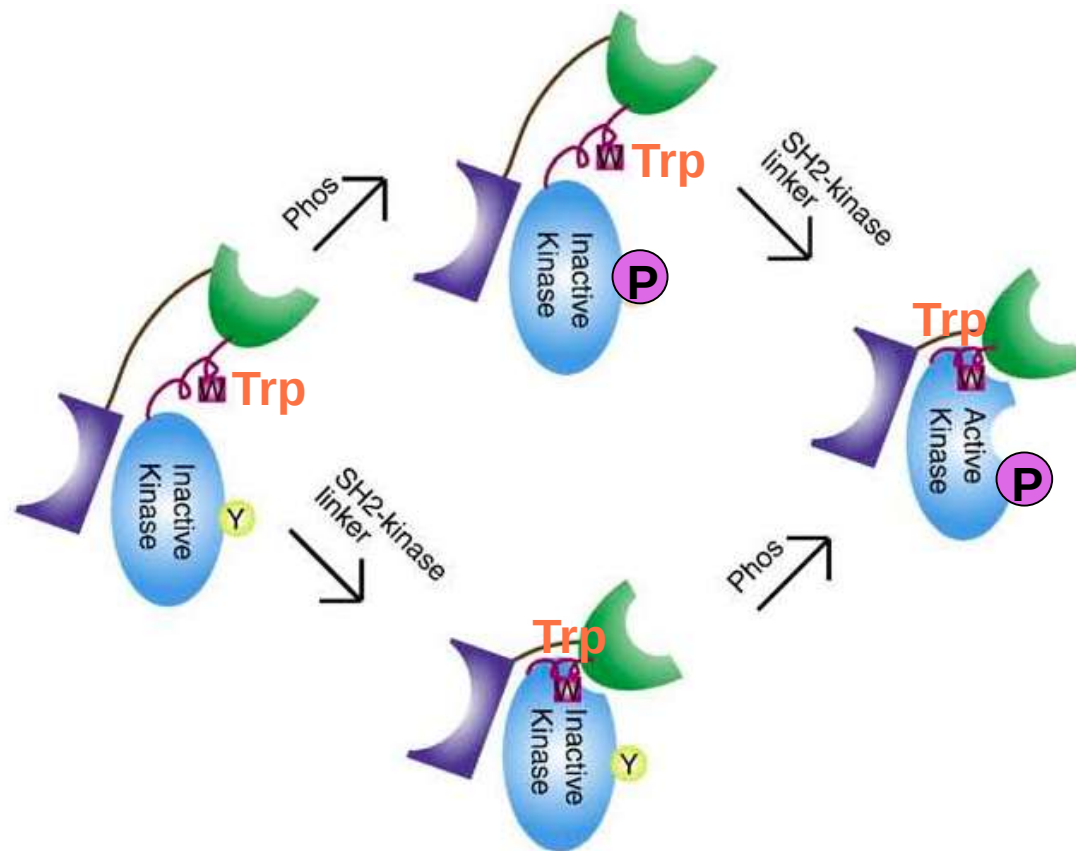
Zap70: nei linfociti T e NK

Syk: nei linfociti B, mastociti e macrofagi

Interazioni tra la regione di collegamento dei 2 SH2 (**inter SH2 linker**) e quella tra SH2 e dominio chinasi (**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 chinasi e SH2 e poi nel dominio chinasi inducono **l'attivazione della chinasi**

Tec Kinases: AND-gate switches

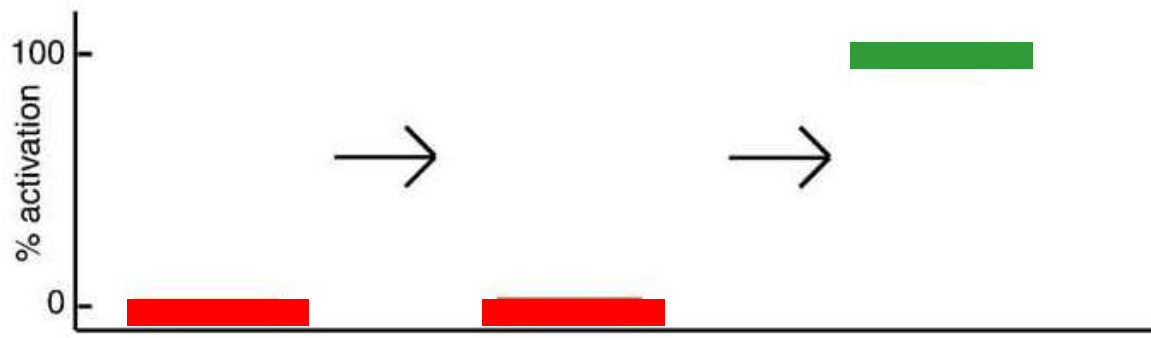


La massima attività delle Tec chinasi è raggiunta con due eventi:

1. Fosforilazione del dominio chinasico

e (**AND**)

2. Posizionamento del Trp del linker tra SH2 e 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

