

# I RECETTORI PER LE CITOCHINE

Alessandra Cuccurullo

# IL-1

È una glicoproteina:

Responsabile dello stimolo della risposta della fase acuta nel fegato

Coinvolta nell'induzione della febbre

Causa dell'indebolimento muscolare

Stimola la crescita e l'attivazione delle cellule T nella risposta all'antigene

Induce la sintesi di recettori ad alta affinità per IL-2

Esistono due isoforme  $\alpha$  e  $\beta$ :

agiscono entrambe sullo stesso recettore

# IL-1

È prodotta da MΦ, cellule dendritiche, cellule epiteliali, linfociti T e B, cellule renali mesangiali, epitelio corneale, cellule endoteliali

Viene inizialmente sintetizzata una pro-IL-1 inattiva, citoplasmatica

Non si conosce il meccanismo di secrezione della proteina funzionalmente attiva

# IL-1 R

Appartiene alla superfamiglia dei recettori con motivi immunoglobulinici

Funge da ponte tra immunità innata ed adattativa:

Media la produzione di IL-1, IL-6, IL-12, IL-18

Presenta domini TIR sul segmento intracellulare



# Domini TIR

Composti da 3 regioni conservate (BOX 1-3)  
intercalate a regioni più variabili

BOX 1 e 2: legano molecole coinvolte nella  
trasduzione del segnale

BOX 3: coinvolto nella localizzazione del  
recettore grazie ad interazioni con citoscheletro

Anche regioni più variabili hanno sequenze  
conservate, specifiche per:

Attivazione mediata da IL-1 della sintesi di IL-2,  
IL-8

Amplificazione e abrogazione del segnale

# Famiglia dei IL-1R/TLR

Si divide in 2 gruppi:

Recettori transmembrana e solubili con domini extracellulari Ig (IL-1R)

Recettori con domini extracellulari Leu-rich

IL-1RI è presente in basso numero di copie:

Meno di 10 molecole di IL-1 attivano forte risposta nella cellula

IL-1RI lega IL-1 grazie a glicosilazione su 1 Asp

# IL-1RI

Esiste anche in forma solubile. Potrebbe avere un ruolo:

Antagonista: sequestra IL-1 al recettore in grado di trasdurre il segnale

Agonista: lega IL-1 ancorata in membrana e interagisce con IL-1RAcP

# IL-1RII

Presente su cellule linfoidi e mieloidi

Struttura:

Regione extracellulare con 3 domini Ig  
(simile a IL-1RI)

Coda intracitoplasmatica corta: non  
trasduce il segnale

Viene prodotto anche in forma solubile

# IL-1RAcP

Proteina glicosilata

Non è in grado di legare IL-1, ma si complessa a IL-1R che ha legato IL-1

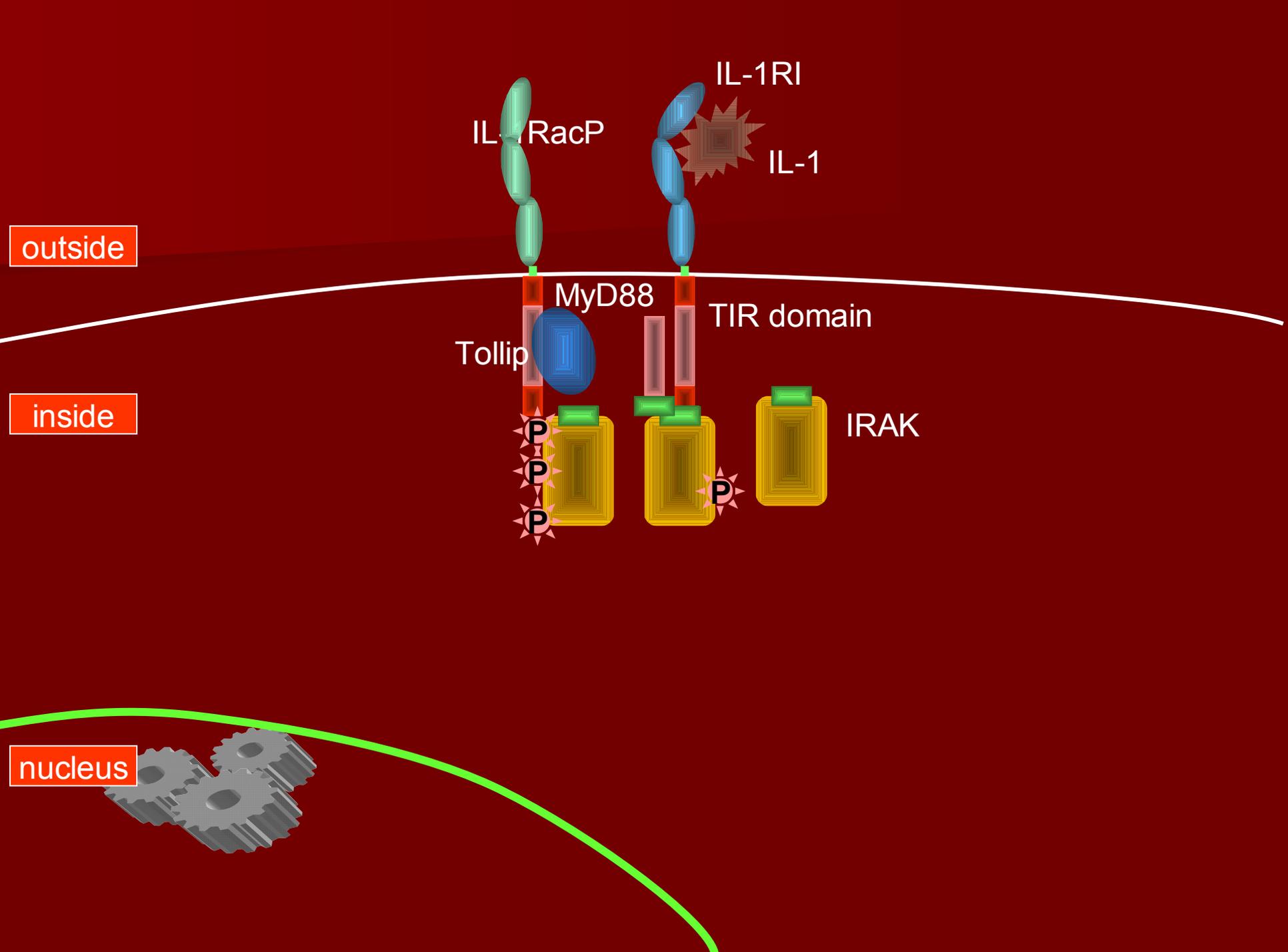
di 5 volte avidità del legame IL-1/IL-1RI

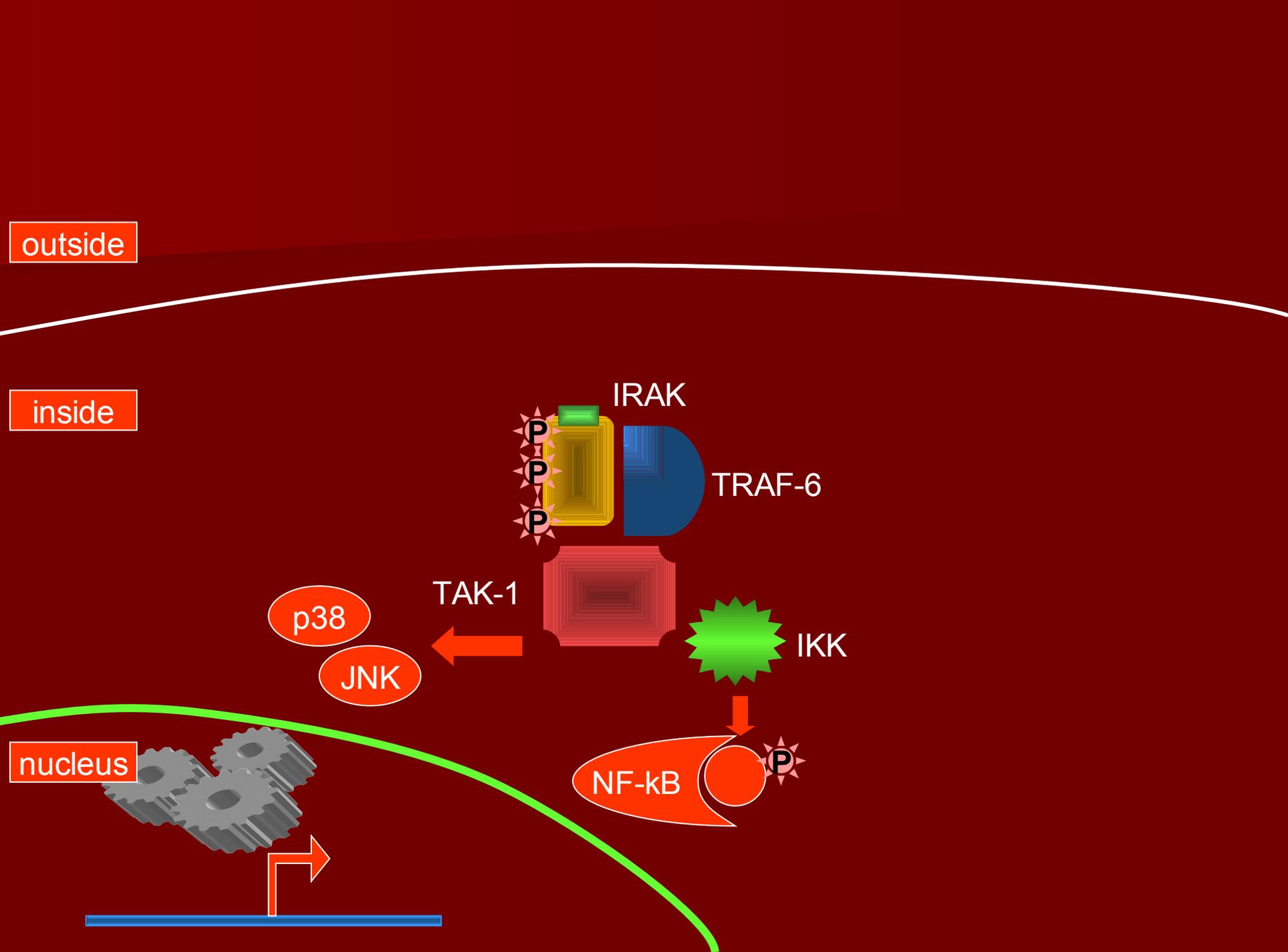
Viene prodotto anche in forma solubile:

Per attivazione di splicing alternativo

In risposta a stress o a fase acuta

Presunto ruolo di regolazione negativa del segnale





# IL-10

Sintetizzata da Th2, ma anche Th0, CD4+, CD8+, timociti, linfociti B, MΦ, cheratinociti

Svolge un'attività di controllo della funzione e dello sviluppo di vari tipi cellulari, in particolare sui linfociti B:

- vitalità delle cellule

- proliferazione

- produzione MHC II

- differenziamento e produzione di anticorpi

# IL-10

Presenta effetti anche su:

T cells → Th1

MΦ → rilascio di citochine

Cell emopoietiche → co-stimola crescita  
mastociti

Ha funzione anti-infiammatoria:

la sintesi di varie citochine

apoptosi

# IL-10: citochina anti-infiammatoria

Azione su macrofagi ( diretta):

sintesi di TNF, IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, GM-CSF

espressione di MHC classe II

Azione su linfociti T e su cellule NK ( indiretta):

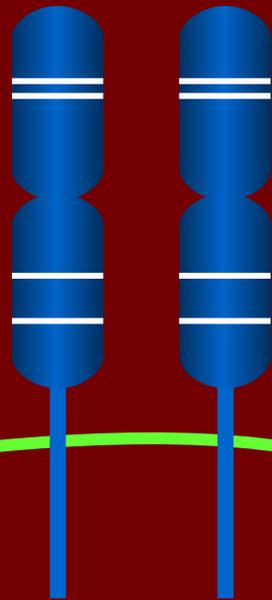
rilascio TNF e IL-12 da macrofagi  
provoca sintesi INF- $\gamma$

Azione su linfociti T e su cellule NK ( diretta):

produzione IL-2

# IL-10 R

È costituito da due subunità che appartengono entrambe alla superfamiglia dei recettori di tipo II per le citochine



2 domini extracellulari con 2  
coppie conservate di cys  
manca del dominio  
extracitoplasmatico  
WSXWS

# IL-10 R: trasduzione del segnale

Subunità  $\alpha$ :

Responsabile del legame ad alta affinità  
con IL-10

Subunità  $\beta$ :

Responsabile della trasduzione del  
segnale

Recluta JAK1 e STAT3

Lo stesso recettore è in grado di trasdurre:

Segnali di sviluppo (effetto simile a IL-6)

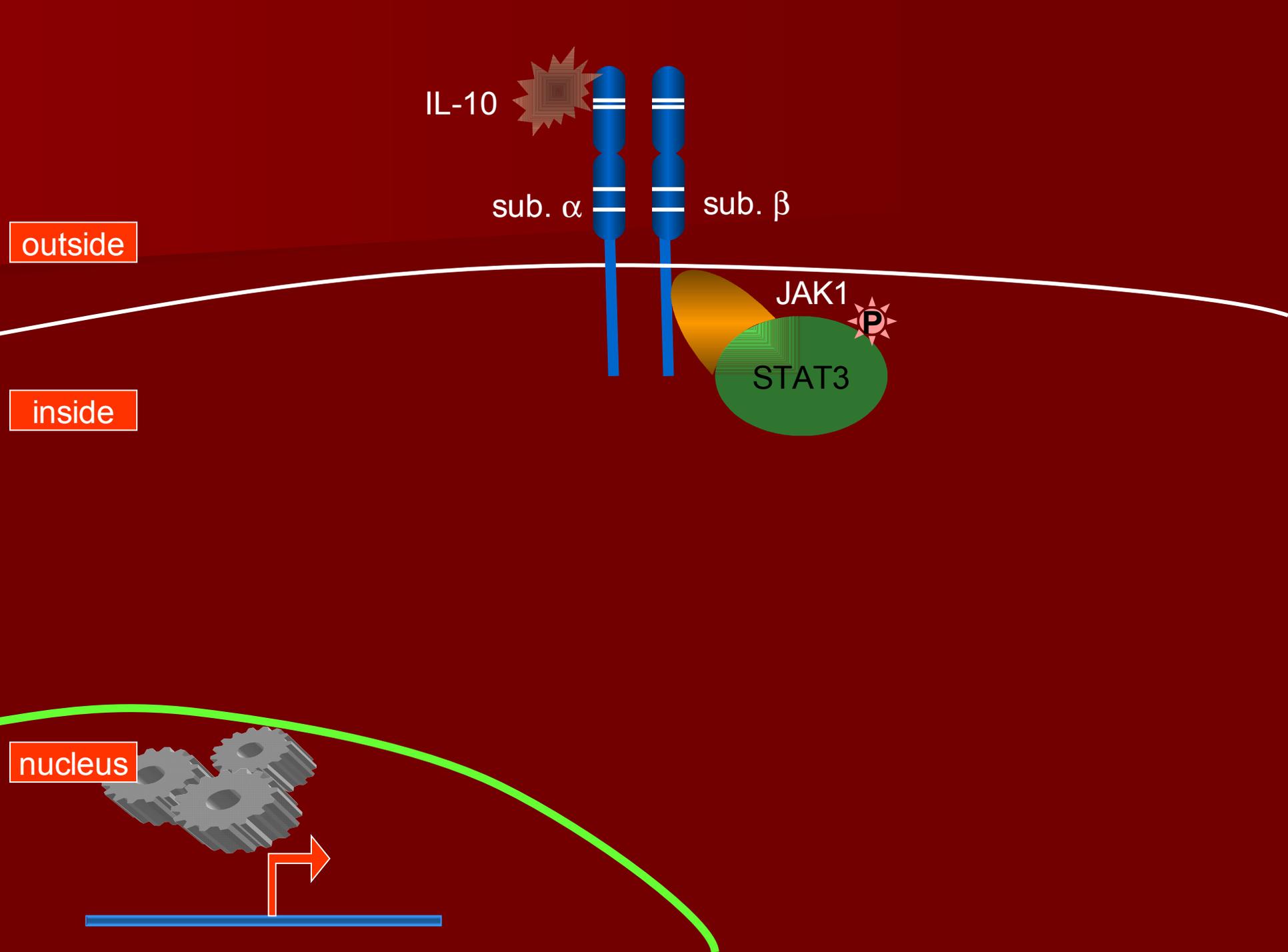
Segnali anti-infiammatori

# IL-10 R: trasduzione del segnale

Regioni differenti dello stesso recettore sono necessarie per trasdurre segnali effettori diversi:

Per l'attivazione dello stimolo di sviluppo cellulare è necessaria la presenza di un set ridondante di siti di legame per STAT3 (pos. 427-430 e 477-480)

Affinché si generi un segnale di inibizione dell'infiammazione è necessaria un'ulteriore sequenza, con una Ser conservata, nella coda C-term del recettore



# IL-13

Espressa prevalentemente da linfociti Th2 attivati, ma anche cellule epiteliali

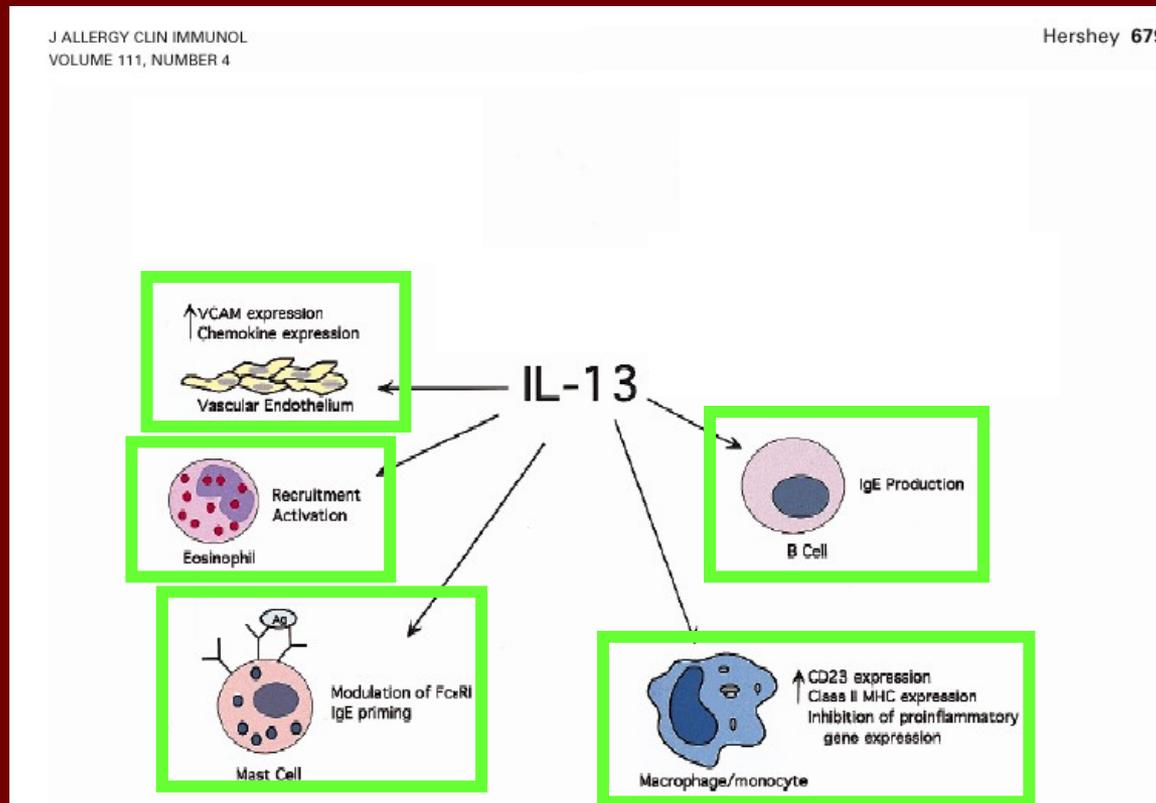
È una proteina non glicosilata

Appartiene alla superfamiglia di citochine di classe I

Presenta bassa omologia di sequenza con IL-4, ma struttura 3D simile

# Effetti di IL-13

Recettori per IL-13 sono espressi su molti tipi cellulari: ha effetti molteplici



# IL-13 R

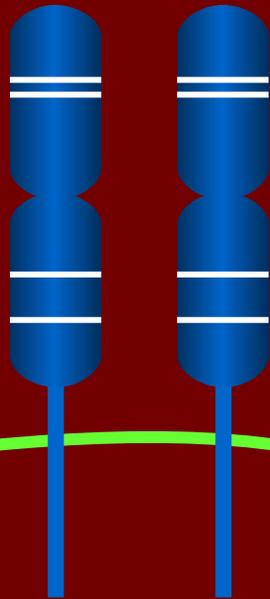
Appartiene alla superfamiglia dei recettori di tipo I per le citochine

2 domini extracellulari con 2 coppie conservate di cys

1 dominio extracitoplasmatico WSXWS

Domini Pro-rich che legano le JAK nel dominio citoplasmatico

Non ha attività chinasi intrinseca, ma ha JAK costitutivamente associate ad esso



# IL-4R $\alpha$

IL-4 e IL-13 hanno recettori con catene comuni (IL-4R $\alpha$ )

Catena IL-4R $\alpha$ :

È recettore di tipo I

Presenta regioni Pro-rich in prossimità della membrana che legano Tyr conservate su JAK1 e JAK2

È espresso in numero di copie

Si associa alla catena  $\gamma_c$  nel IL-4RII

# IL-13 R o IL-4R typell

In assenza di  $\gamma c$  IL-4 e IL-13 hanno lo stesso segnale  $\rightarrow$  serve un recettore specifico per IL-13

È eterodimero IL-4R $\alpha$  IL-13R $\alpha$ 1

Catena IL-13R $\alpha$ 1:

Appartiene a superfamiglia di recettori emopoietici I

È una glicoproteina

Lega IL-13 a affinità

Non è espressa da linf. B e linf. T, ma sui linf B si può avere l'espressione mediata da CD40-ligando e da Ig

# IL-13R $\alpha$ 2

Espressa da:

Milza, fegato, polmone, timo, cervello

IL-13R $\alpha$ 1 e IL-4R $\alpha$  sono sufficienti per segnalare a valle di IL-13

IL-13R $\alpha$ 2 non è necessaria

Lega IL-13 a affinità

Ma non è sufficiente *in vitro* per rendere cellule responsive a IL-13

Esiste in forma solubile

Potrebbe sequestrare IL-13 e bloccarne la via di segnalazione

# Via di segnalazione

La catena IL-4R $\alpha$  recluta molecole JAK (JAK1 e JAK2)

STAT6 viene fosforilato e, dopo dimerizzazione, trasloca nel nucleo e attiva la trascrizione genica

Vengono attivate anche IRS-1 e IRS-2 che promuovono attivazione delle vie di PI3K e delle MAPK

Esistono domini ITIM su IL-4R $\alpha$  che inibiscono la segnalazione

# Terminazione del segnale

Attivazione di fosfatasi citosoliche (esempio SHP1) implicate nella terminazione dell'attivazione

Induzione delle proteine SOCS1-7 che bloccano l'accesso delle STAT ai siti di legame del recettore

PIAS lega STAT1 e blocca il legame con DNA

Endocitosi del recettore e la sua degradazione

# Osteoartrite

Distruzione progressiva della cartilagine e infiammazione secondaria della membrana sinoviale

differenziamento osteoclasti

sintesi di MMP

Livelli di attività di IL-1 superiori alle condizioni fisiologiche

Difetto di produzione di IL-1ra

Meccanismo può essere controllato da citochine inibitorie (es. IL-4 IL-10 IL-13 TGF- $\beta$ )

# Ruolo di IL-13 nell'osteoartrite

Provoca del 40% nel legame di IL-1 al suo recettore

Determina sintesi di IL-1ra da parte dei fibroblasti sinoviali

Non ha effetti sulla capacità di legame di TNF- $\alpha$  al suo recettore, ma espressione del recettore stesso

# TGF- $\beta$

Sintetizzato da linfociti T attivati (Th2 e Th3), ma anche fagociti mononucleati stimolati da LPS

Esistono 3 isoforme  $\neq$ , codificate da geni  $\neq$ , ma con svariate omologie:

Sono sintetizzate come precursori, poi attivati per taglio proteolitico

Ogni molecola presenta un motivo con 6 cys  
→ si formano 3 ponti S-S

Esiste 1 cys spaiata → consente formazione omodimeri

# TGF- $\beta$ 1

Effetti su sistema immunitario:

Linf T  $\rightarrow$  crescita e differenziamento

M $\Phi$   $\rightarrow$  attivazione

Linf B  $\rightarrow$  crescita e switch IgA

Antagonismo sugli effetti delle citochine proinfiammatorie

Altri effetti:

Cell emopoietiche  $\rightarrow$  attivazione N $\Phi$

Stimola produzione ECM, MMP, integrine

$\rightarrow$  questi si ripercuotono su sviluppo embrionale e wound healing

# TGF- $\beta$ R

Esistono diverse combinazioni possibili di recettori, appartenenti alle classi di tipo I (T $\beta$ RI) e di tipo II (T $\beta$ RII)

T $\beta$ RI e T $\beta$ RII hanno caratteristiche simili:

- Sono glicoproteine

- Hanno dom. extracellulare ricco in cys + singolo dom. transmembrana + dom. C-term intracitoplasmatico Ser/Thr chinasi

T $\beta$ RI ha 1 importante regione regolatoria GS a monte del dom. chinasi

# TGF- $\beta$ R

T $\beta$ RII è in grado di legare TGF- $\beta$ . In seguito a questo evento:

Recluta T $\beta$ RI e forma con esso un etero-tetramero

T $\beta$ RII fosforila il dom. GS presente su T $\beta$ RI

Questo attiva il dom. chinasi su T $\beta$ RI

Si ha fosforilazione attivativa degli effettori SMAD

# SMAD

Sono note 8 molecole appartenenti alla famiglia delle SMAD. Si dividono in 3 classi:

Receptor-associated SMAD: legano direttamente i recettori sul dominio chinamico

co-SMAD: durante la cascata, si associano alle SMAD già legate al recettore

Inhibitory SMAD: antagonizzano la segnalazione delle precedenti, in 2 modi:

Legano T $\beta$ RI, impedendo l'attracco di altre SMAD sul recettore

Legano altre SMAD, impedendo il loro legame con il recettore

# Struttura delle SMAD

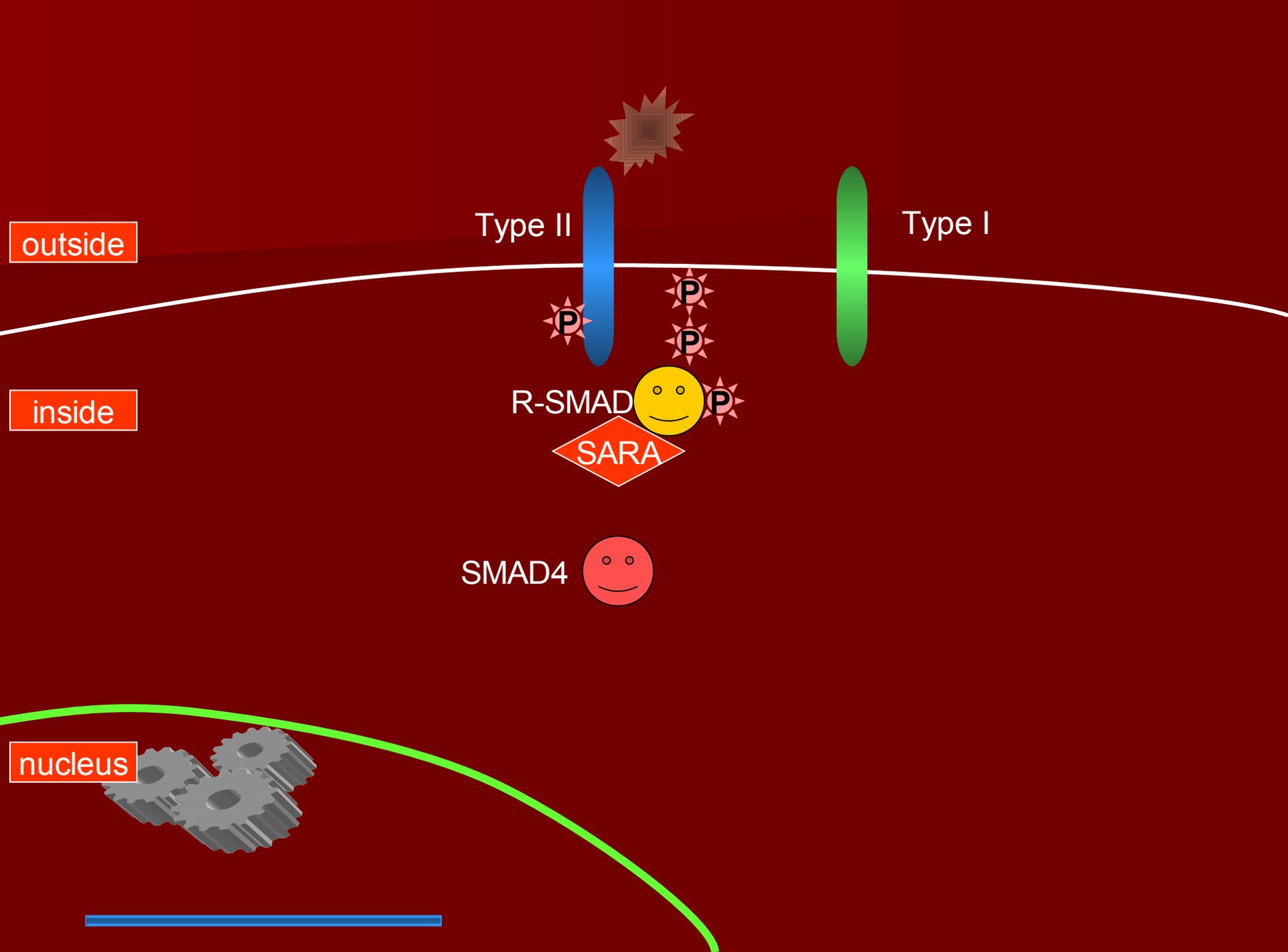
Presentano 2 dom. globulari N-term e C-term, detti MH1 e MH2

In seguito a fosforilazione, la molecola cambia conformazione

- I 2 dom. si separano

- È possibile la continuazione della trasduzione del segnale

Nel nucleo, il DNA è contattato da MH1



outside

inside

nucleus

Type II

Type I

R-SMAD

SARA

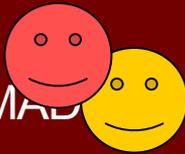
SMAD4



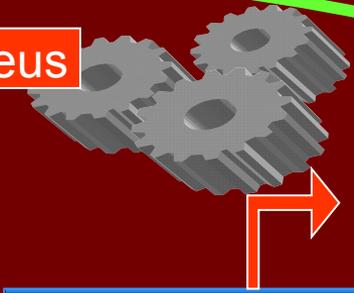
outside

inside

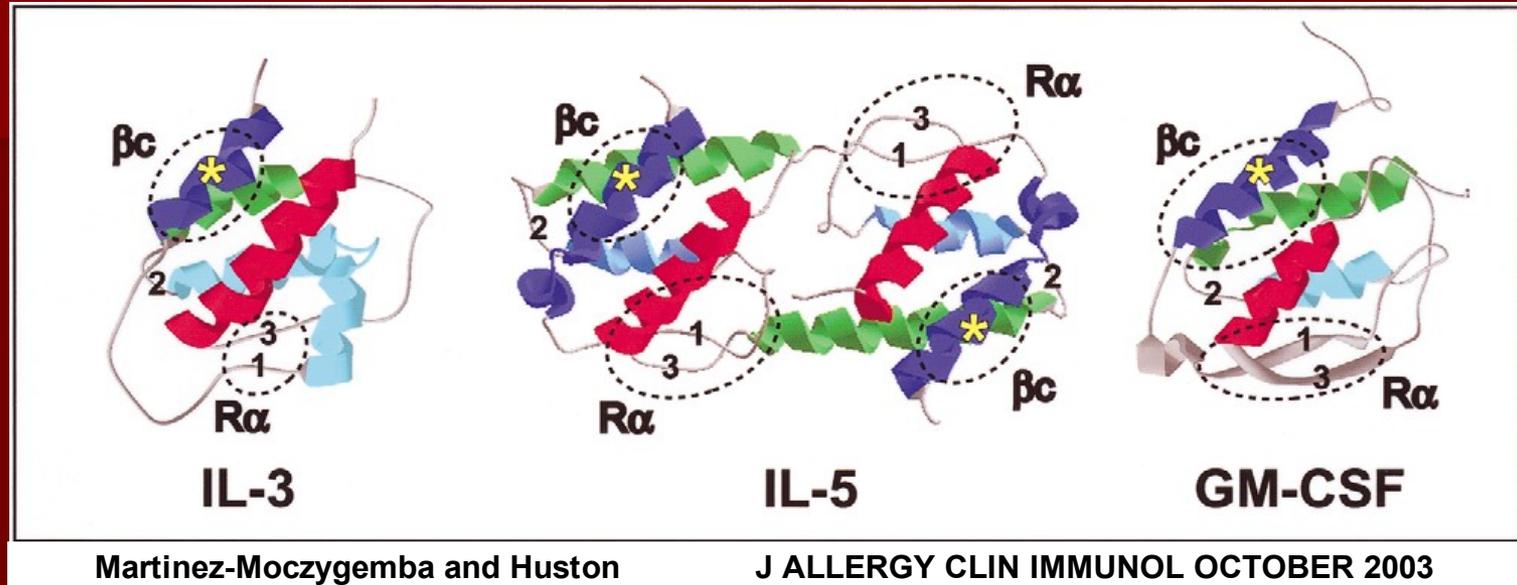
SMAD4  
R-SMAD

A diagram showing two protein subunits, SMAD4 (pink) and R-SMAD (yellow), bound together to form a dimer. Both subunits are represented as circles with two dots for eyes and a curved line for a smile.

nucleus



# IL-3 IL-5 GM-CSF



Struttura funzionale:

4  $\alpha$ -eliche in conformazione antiparallela  
up-up-down-down alternate a regioni loop

Ciascuna ha 1 recettore  $\alpha$  specifico

# IL-5

Costituita da 2 catene identiche interdigitate, che così assumono la struttura conformazionale tipica, composta da 2 fasci di 4  $\alpha$  eliche

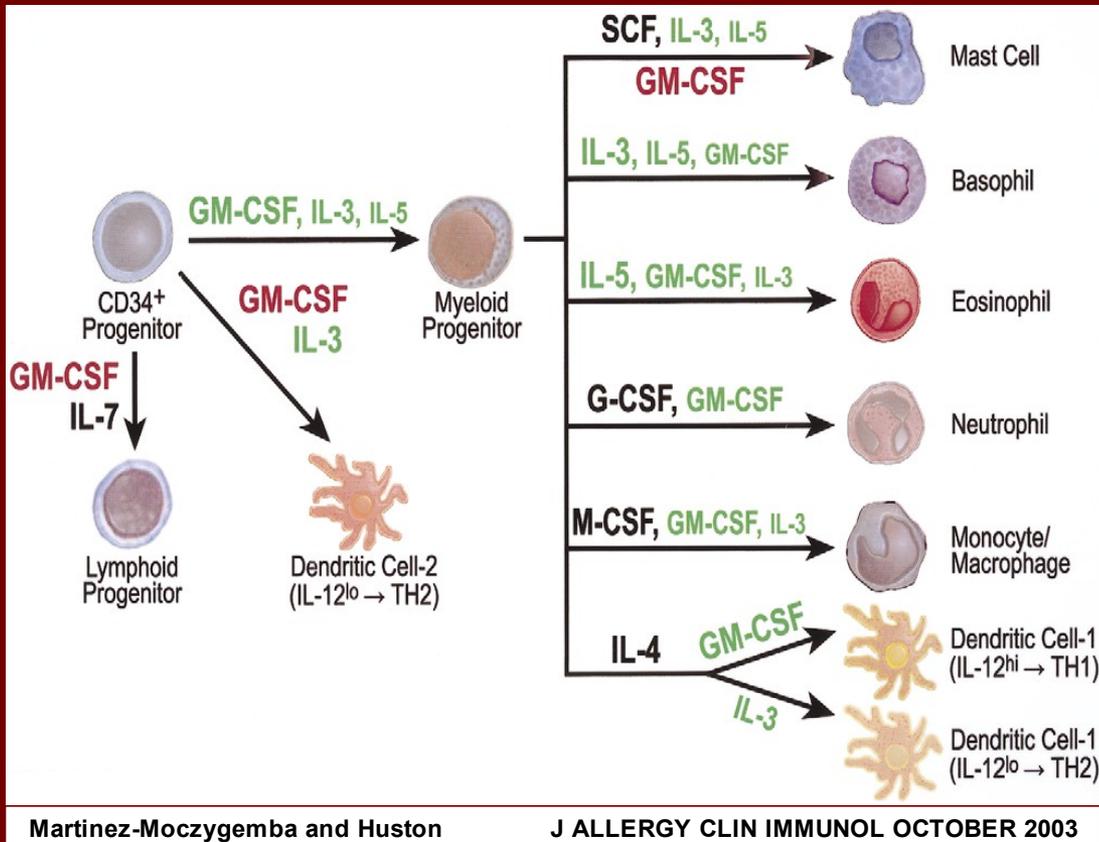
Si forma un omodimero con 4 domini funzionali:

2 legano IL-5R $\alpha$

2 legano  $\beta$ c

# Funzioni

IL-3 IL-5 GM-CSF svolgono ruolo sinergico nel controllo di differenziamento e funzione delle cellule mieloidi



Coinvolti anche in processi di infiammazione allergica e modulazione della risposta di linf Th1 e Th2

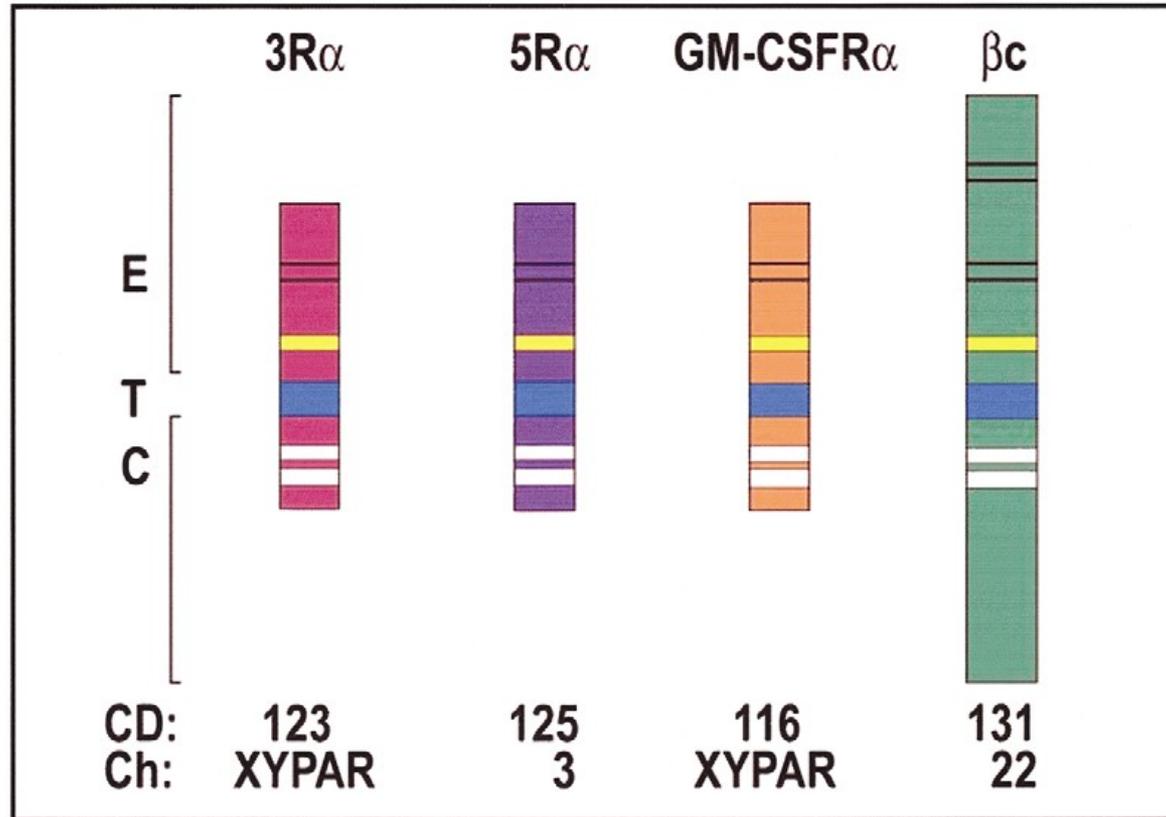
# IL-3R IL-5R GM-CSFR

IL-3 IL-5 GM-CSF legano 1 subunità  $\alpha$  specifica per ogni substrato

IL-3R $\alpha$  IL-5R $\alpha$  GM-CSFR $\alpha$  hanno 1 coda intracitoplasmatica corta: non trasducono segnale

La catena  $\beta\gamma$  si associa al complesso catena  $\alpha$ -ligando specifico e dà inizio alla segnalazione

# Struttura dei recettori



# Struttura dei recettori

Caratterizzati da:

1 modulo di 200 aa contenente 2 domini di fibronectina tipo III (catena  $\alpha$ ) o 2 paia (catena  $\beta$ c)

1 dominio conservato intracitoplasmatico  
WSXWS vicino alla membrana

Coppie di cisteine nella regione distale alla membrana

IL-5R $\alpha$  e GM-CSFR $\alpha$  esistono in forma solubile

Originati per splicing alternativo

Sequestrano il ligando  $\rightarrow$  ruolo antagonista

# Subunità $\beta c$

Omodimero costituito da 2 molecole che si interdigitano a formare un arco

Struttura differente dai recettori monomerici per citochine che dimerizzano in seguito ad interazione con il ligando

Domini citoplasmatici dell'omodimero  $\beta c$  sono troppo distanti tra loro per attivare la cascata di segnale

È necessario che ciascuno dei monomeri interagisca con una catena  $\alpha$  legata al suo substrato

# Vie di segnalazione: JAK/STAT

## JAK/STAT:

Transfosforilazione delle catene del recettore attiva JAK1 e JAK2

JAK fosforilano 6 Tyr presenti nella  $\beta c$  → può così legare dominio SH2 di STAT1 e STAT5

Le STAT vengono fosforilate, dimerizzano e vanno nel nucleo

# Vie di segnalazione: MAPK

## MAPK:

JAK2 fosforila Y577 su  $\beta c$ , che lega Shc

Shc viene fosforilata e lega Grb2

Associazione Shc/Grb2 porta alla cascata Ras, Raf-1, MEK e ERK

Gli elementi target di ERK sono i fattori di trascrizione ATF2 e TCF che possono attivare c-Jun e c-Fos

# Vie di segnalazione: PI3K

## PI3K:

Chinasi lipidica eterodimerica

Formata da una subunità regolatoria (p85) ed una subunità catalitica (p110)

Dopo stimolazione da parte delle citochine PI3K fosforila i fosfatidilinositoli di membrana

Determina formazione del secondo messaggero PIP3 → inizio cascata di segnalazione

# Terminazione del segnale

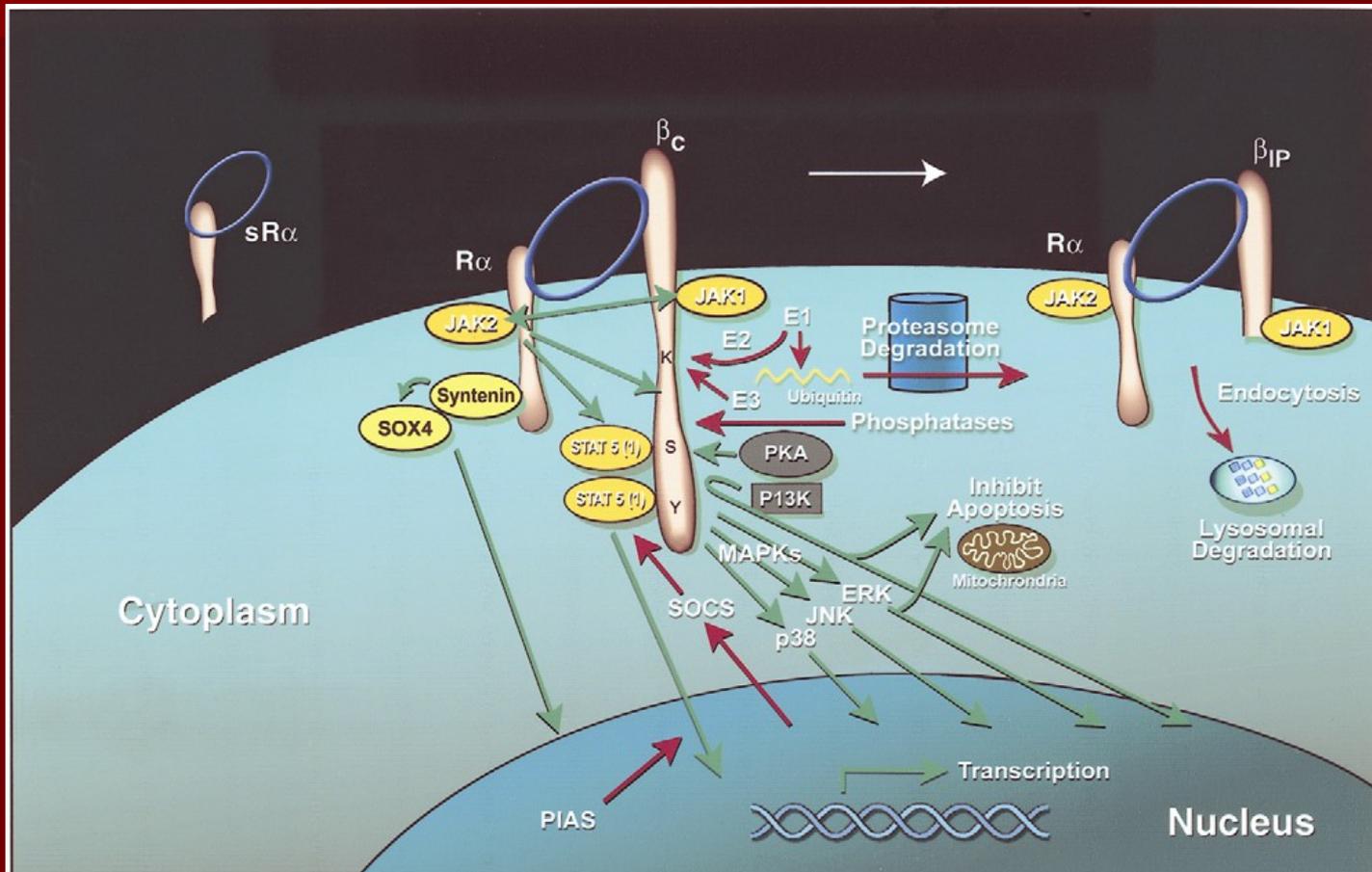
Attivazione di fosfatasi citosoliche (esempio SHP1) implicate nella terminazione dell'attivazione della catena  $\beta c$

Induzione delle proteine SOCS1-7 che bloccano l'accesso delle STAT ai siti di legame del recettore

PIAS lega STAT1 e blocca il legame con DNA

Endocitosi del recettore e la sua degradazione

# Vie di segnalazione



# BIBLIOGRAFIA

- Huising M et al, *The molecular evolution of interleukine-1 family of cytokines; IL-18 in teleost fish*, Dev. Comp. Immun. 28: 395-413, 2004
- Subramaniam S et al, *The interleukine 1 receptor family*, Dev. Comp. Immun. 28: 415-428, 2004
- Scapigliati G et al, *Modelling of interleukine-1 and its receptor*, Dev. Comp. Immun. 28: 429-441, 2004
- Khurana G et al, *IL-13 receptors and signaling pathways: an evolving web*, J. Allergy Clin. Immun. 111: 677-690, 2003
- Yasunaga S et al, *The negative-feedback regulation of the IL-13 signal by the IL-13 receptor  $\alpha 2$  chain in bronchial epithelial cells*, Cytokine 24: 293-303, 2003
- Jovanovic D et al, *Effect of IL-13 on cytokines, cytokine receptors and inhibitors on human osteoarthritis synovium and synovial fibroblasts*, Osteoarthritis and Cartilage 6: 40-49, 1998
- Schiller M et al, *TGF- $\beta$ -induced SMAD signaling and gene regulation: consequences for extracellular matrix remodeling and wound healing*, J Dermatol Science 35: 83-92, 2004
- Herpin A et al, *Transforming growth factor- $\beta$ -related proteins: an ancestral and widespread superfasmily of cytokines in metazoans*, Dev. Comp. Immun. 28: 461-485, 2004
- Rosenkranz S et al, *TGF- $\beta 1$  and angiotensin networking in cardiac remodeling*, Cardiovascular Research 63: 423-432, 2004
- Weber-Nordt R et al, *Lipopolysaccharide-dependent induction of IL-10 receptor expression on murine fibroblasts*, J Immunology 153: 3734-3744, 1994
- Riley J et al, *Interleukin-10 receptor signaling through the JAK-STAT pathway*, J. Biological chemistry 274: 16513-16521, 1999
- Martinez-Moczyquemba M, Huston D, *Biology of common beta receptor-signaling cytokines: IL-3, IL-5, and GM-CSF*, J Allergy Clin Immunol 112: 653-665, 2003
- Guthridge M et al, *Mechanism of activation of the GM-CSF, IL-3, and IL-5 family of receptors*, Stem Cells 16: 301-313, 1998
- Adachi T, Alam R, *The mechanism of IL-5 signal transduction*, Am J Physiol 275: 623-633, 1998
- Lyne P et al, *Molecular modeling of the GM-CSF and IL-3 receptor complexes*, Protein Science 4: 2223-2233, 1995