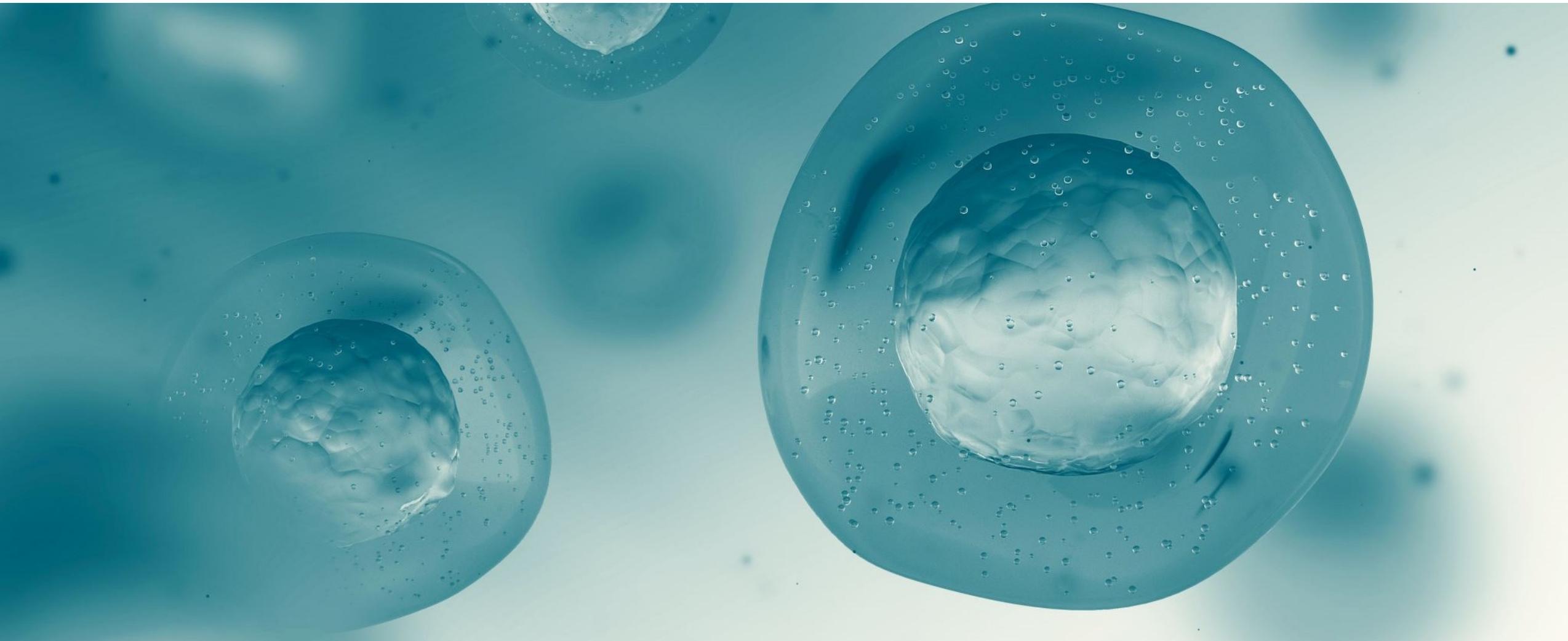
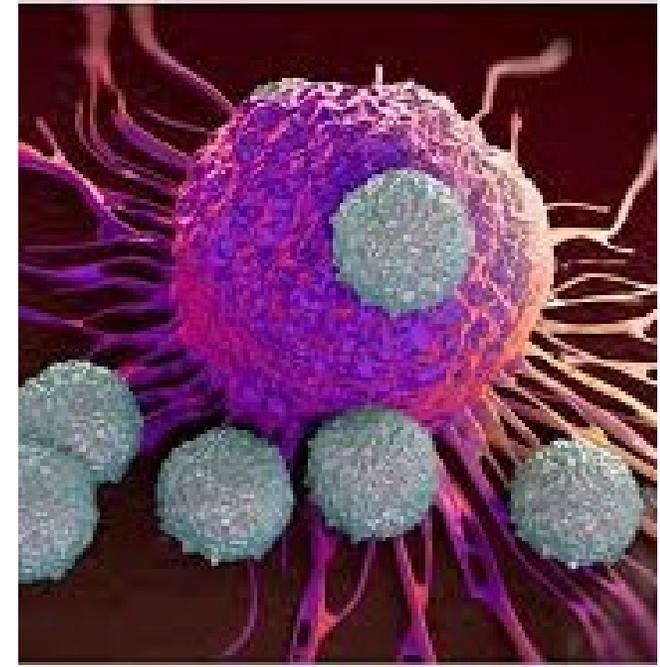
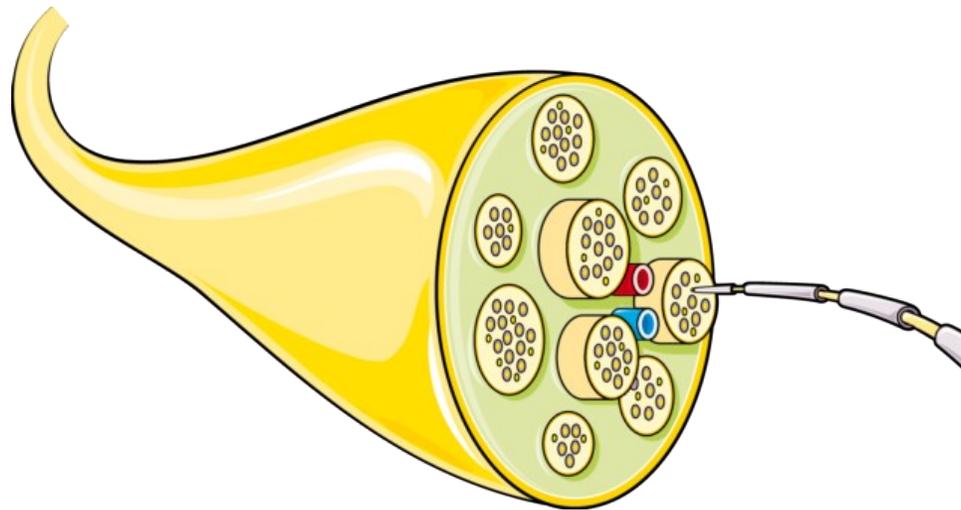
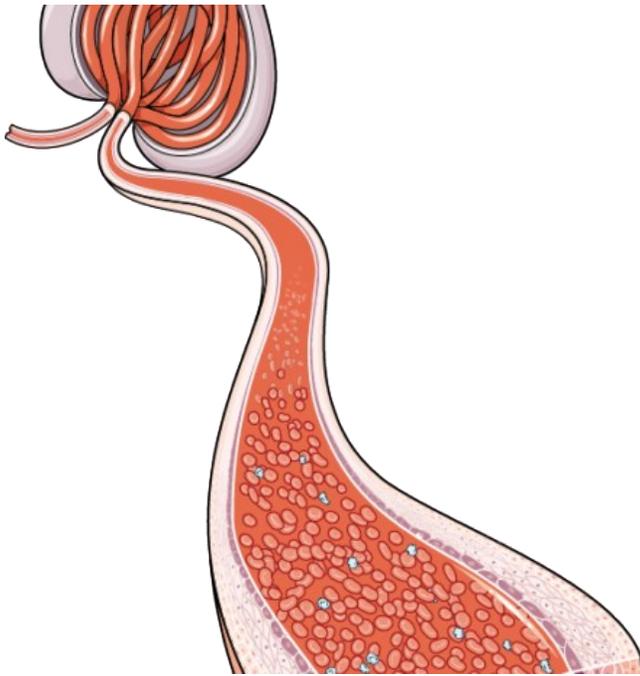


# Citochine, chemochine e recettori



# Meccanismi di comunicazione

Segnali **chimici ed elettrici** consentono la comunicazione di circa 75 mila mld di cellule che compongono il nostro organismo.



# Comunicazione intercellulare

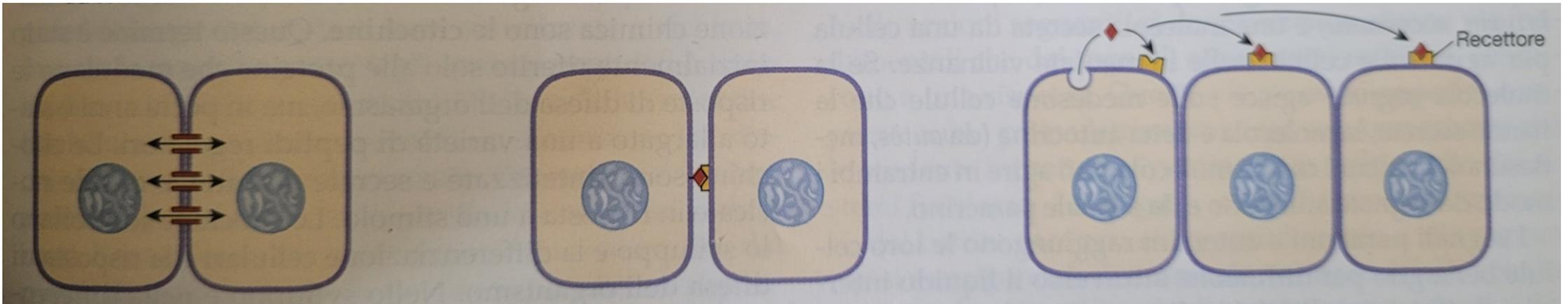
Trasferimento diretto di materiale citoplasmatico tramite le GIUNZIONI COMUNICANTI di cellule adiacenti

Segnali dipendenti dal contatto intercellulare, in seguito a contatto di molecole di superficie di una cellula con un'altra cellula

Comunicazione locale tramite segnali chimici che diffondono tra le cellule

Comunicazione a grandi distanze tramite terminazioni nervose (segnali elettrici) sangue circolante (segnali chimici)

# Comunicazione locale



**Giunzioni comunicanti**

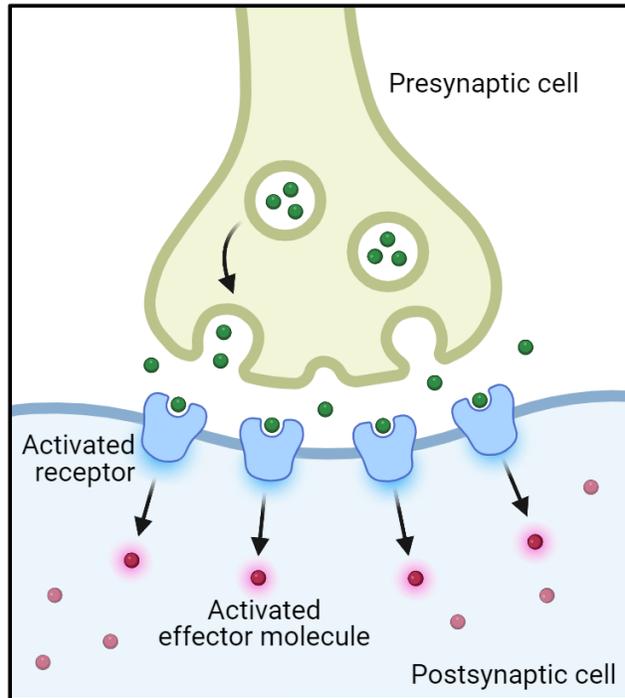
**Segnali dipendenti  
dal contatto intercellulare**

**Segnali autocrini/paracrini**

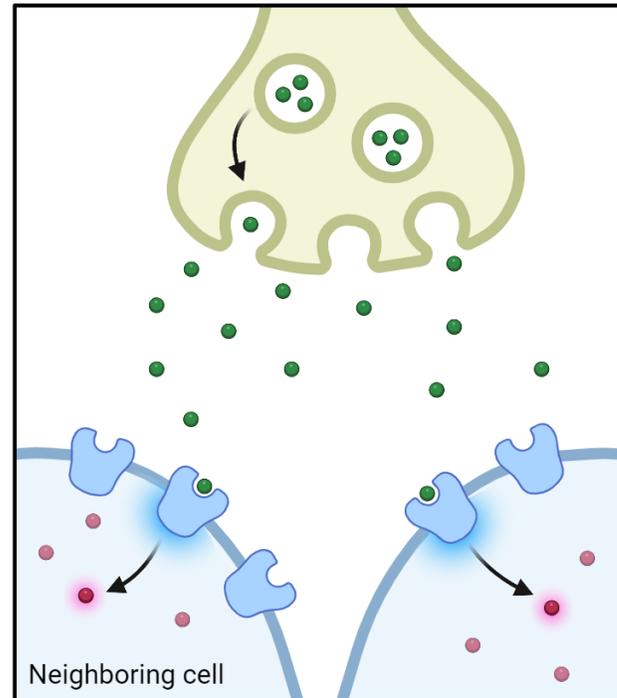
# Comunicazione a distanza

## Sistema endocrino e nervoso

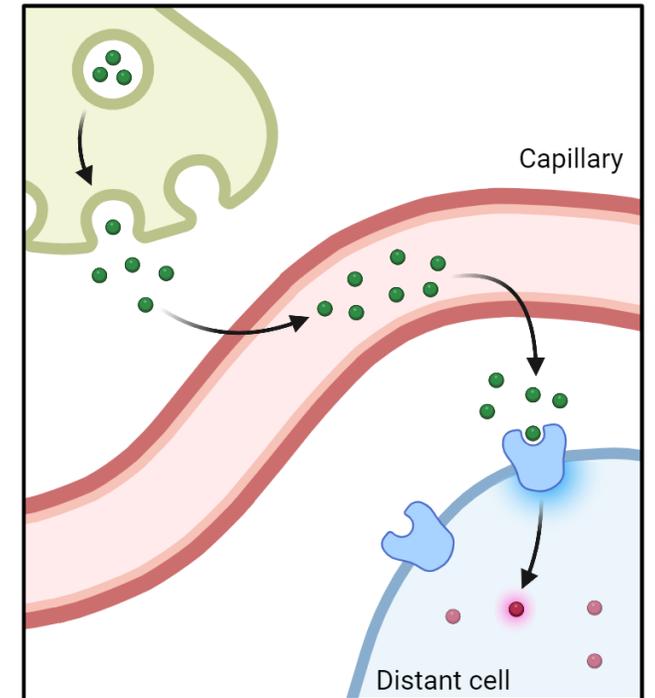
### Synaptic



### Paracrine



### Endocrine



Signaling cell

Signaling molecule

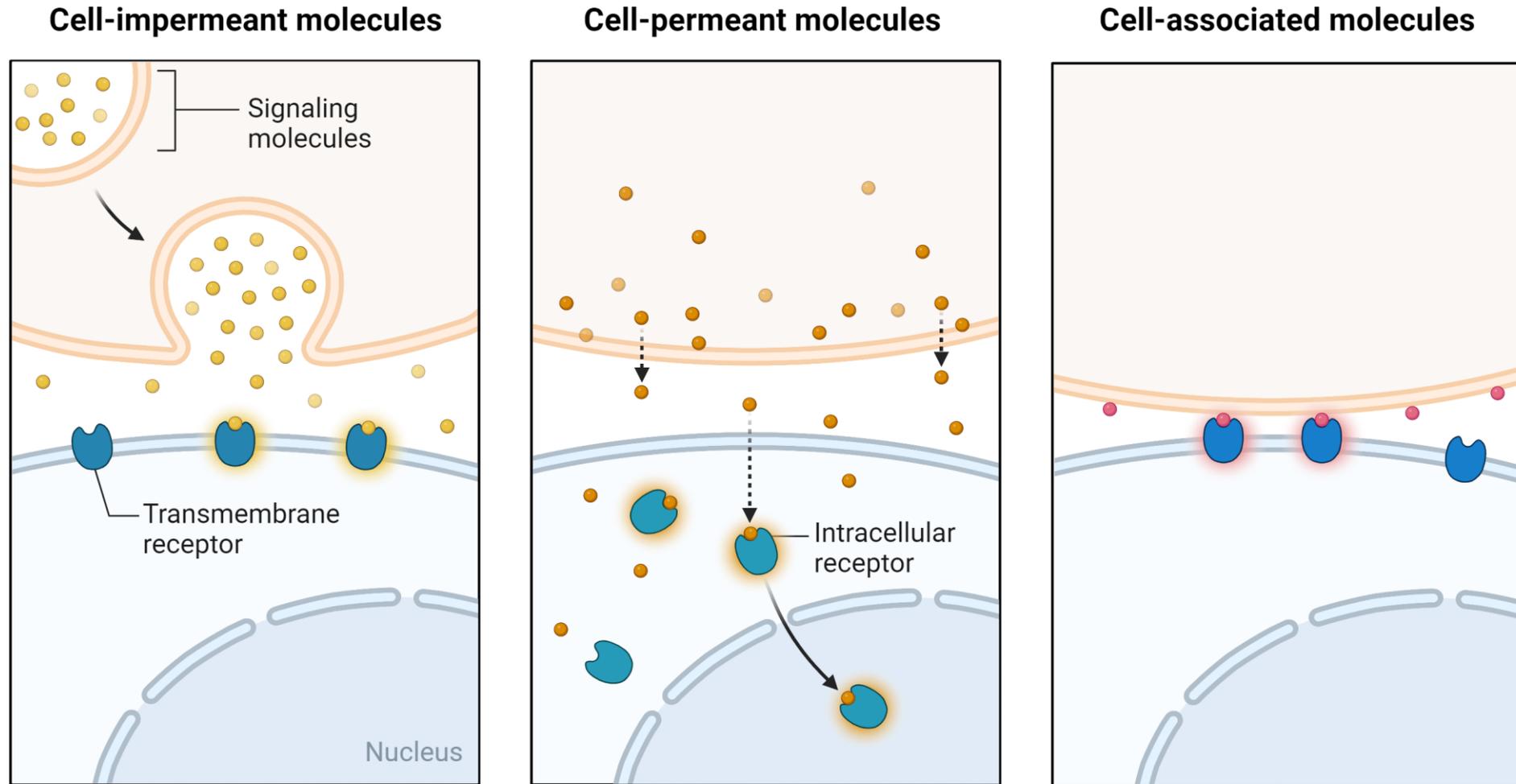
Receptor

Effector molecule

Response

Neurotrasmettitore  
Neuromodulatore  
Neurormone

# Classes of Signaling Molecules



# Le citochine

Proteine regolatorie modulanti le risposte di difesa dell'organismo

Identificate più di 200

- Interleuchine (IL)
- Fattori di Necrosi Tumorale (TNF)
- Interferoni (IFN)
- Chemochine
- Fattori stimolanti la formazione di colonie (CSF)
- Fattori di crescita (GF)

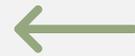
Sono sintetizzate e secrete da tutte le cellule nucleate in risposta ad uno stimolo ed agiscono in maniera paracrina o autocrina

- Sviluppo
- Differenziamento cellulare
- Risposta immunitaria
- Ematopoiesi

# Le citochine



Mediatori solubili della immunità innata e specifica



Proteine o glicoproteina a basso peso molecolare



Modulano la durata e l'intensità della risposta



Fase di attivazione crescita e differenziamento dei Linfociti e poi di cellule effettrici

# Le citochine



Prodotte da tutte cellule nucleate



Azione autocrina e paracrina



Differenze con ormoni:  
cellule target e sintesi limitata e di breve durata

# Le citochine, la classificazione

## cellula di produzione

- fagociti mononucleati (monochine)
- linfociti (linfocine)

Prodotte da entrambi i tipi di cellule → citochine

Prodotte da leucociti ed agenti su di loro → interleuchine

# Le citochine, la classificazione

## Strutturale

- Citochine a CATENA LUNGA (long chain cytokines)
- Citochine a CATENA CORTA (short chain cytokines)

# Le citochine, la classificazione

## Funzionale

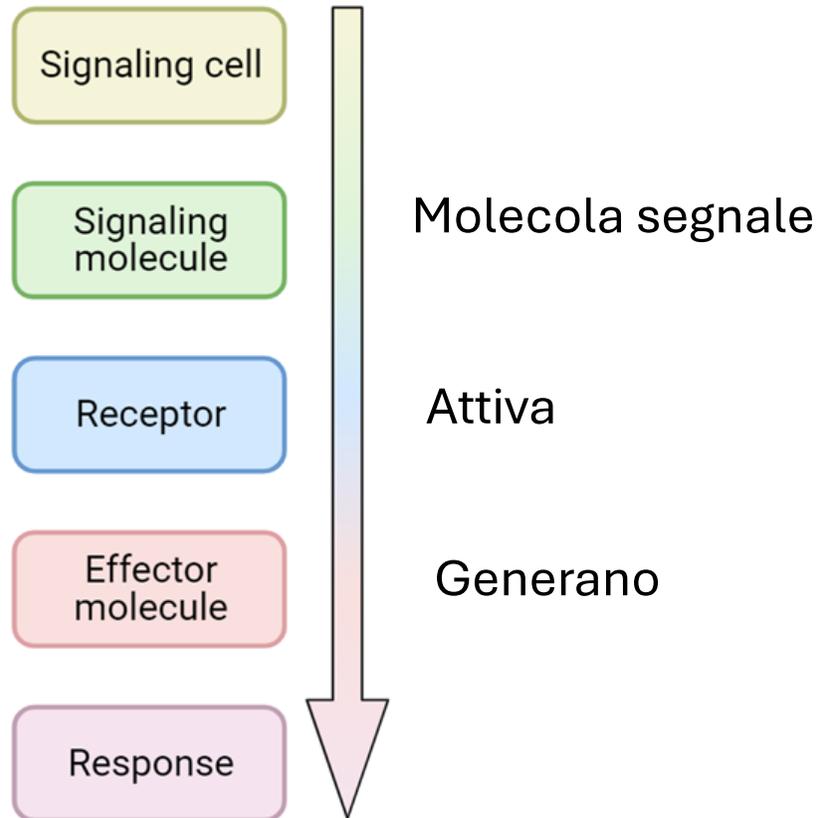
- Mediatrici dell'immunità naturale/innata (IFN di tipo I, TNF- $\alpha$ )
- Regolatrici di crescita, attivazione e differenziazione dei linfociti (IL-2, IL-4, IL-5, IL-12, IL-15)
- Attivatrici delle cellule infiammatorie in processi virali (IFN- $\gamma$ )
- Stimolatrici dell'ematopoiesi (IL-3, GM-CSF, IL-7)
- Le citochine hanno generalmente una massa molecolare inferiore ai 30 kDa; studi strutturali hanno dimostrato che le citochine caratterizzate finora appartengono a quattro gruppi: la famiglia delle **ematopoietine**, la famiglia degli **interferoni**, la famiglia delle **chemochine** e, infine, la famiglia dei **fattori di necrosi tumorale**.

# Le citochine, la classificazione

lo svolgimento delle attività biologiche delle citochine avviene mediante il legame a specifici recettori presenti sulla membrana delle cellule bersaglio.

Sono tutti composti da una o più proteine/domini transmembrane, la cui porzione extracellulare è deputata al legame con la citochina e quella citoplasmatica alla cascata dei segnali di trasduzione del segnale intracellulare.

# Le citochine



Possono agire, come gli ormoni, su cellule a distanza grazie al flusso sanguigno. Differiscono da ormoni perché:

- agiscono su più ampio spettro di cellule bersaglio;
- sono prodotte e rilasciate dopo stimolo
- emivita breve

# Le citochine, la classificazione

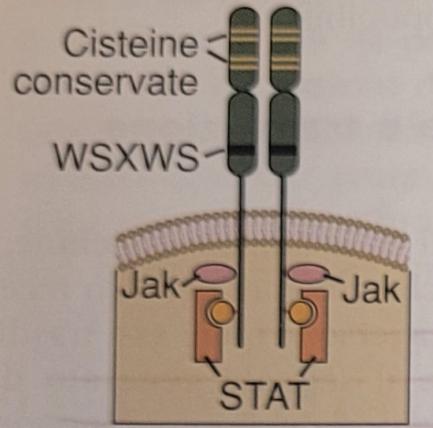
## Subunità Recettoriali Comuni

- Recettori tirosino-chinasici (CSF-1)
- Recettori citochinici di tipo I (ematopoietine)
- Recettori citochinici di tipo II (interferoni)
- Recettori serina-chinasici (TGF- $\beta$ )
- Recettori della famiglia del TNF
- Recettori IL-1/toll-like
- Recettori legati alle proteine G (chemochine)

(A)

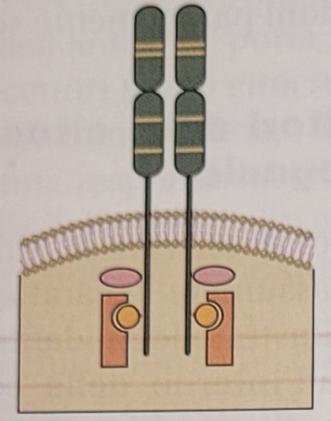
### Famiglie di recettori per le citochine

Recettori per le citochine di tipo I (o dell'emopoietina)



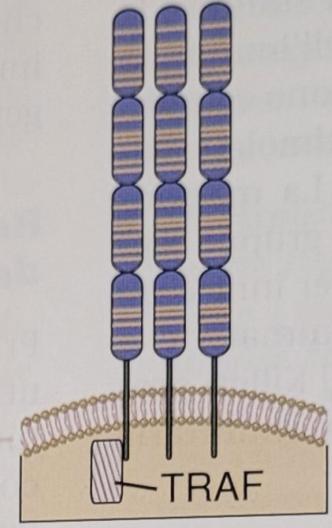
Recettori per:  
IL-2, IL-3, IL-4, IL-5,  
IL-6, IL-7, IL-9, IL-11,  
IL-12, IL-13, IL-15,  
GM-CSF, G-CSF

Recettori per le citochine di tipo II



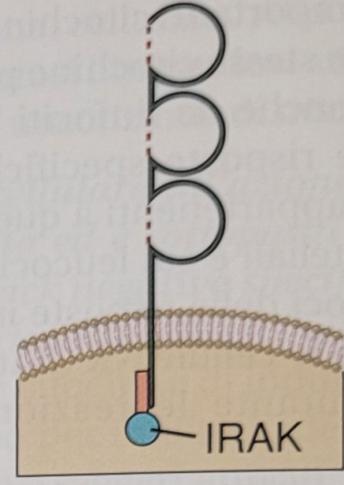
Recettori per:  
IFN- $\alpha/\beta$ , IFN- $\gamma$ ,  
IFN- $\lambda$ , IL-10, IL-20,  
IL-24, IL-26

Recettori per il TNF



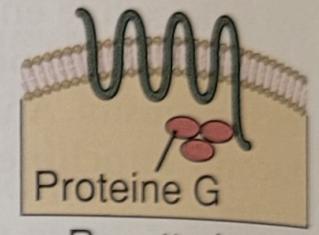
Recettori per:  
TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ , LT,  
CD40, Fas,  
OX40, GITR  
"nerve growth factor"

Recettore per IL-1



Recettori per:  
IL-1, IL-18

Recettori a sette domini transmembrana accoppiati alle proteine G



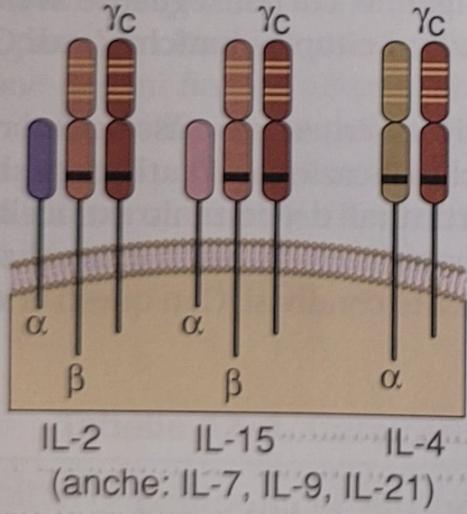
Recettori per:  
chemochine

(B)

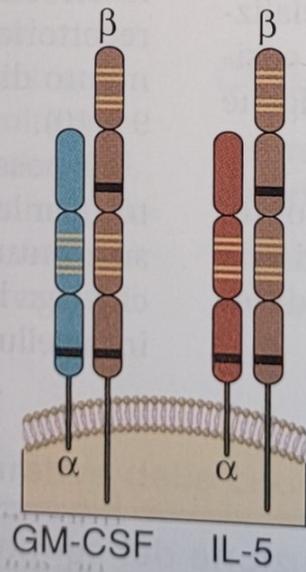
(B)

### Struttura dei recettori per le citochine

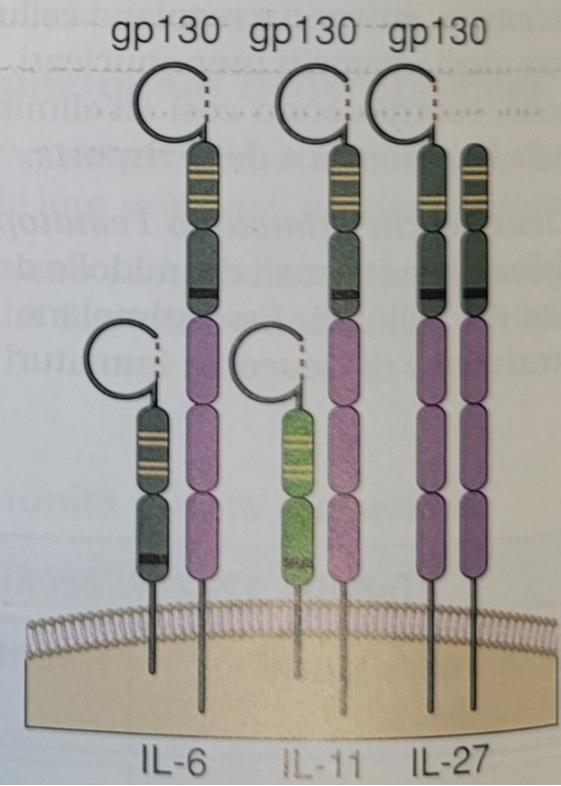
Catena  $\gamma$  comune



Famiglia del recettore per GM-CSF (catena  $\beta$  comune)



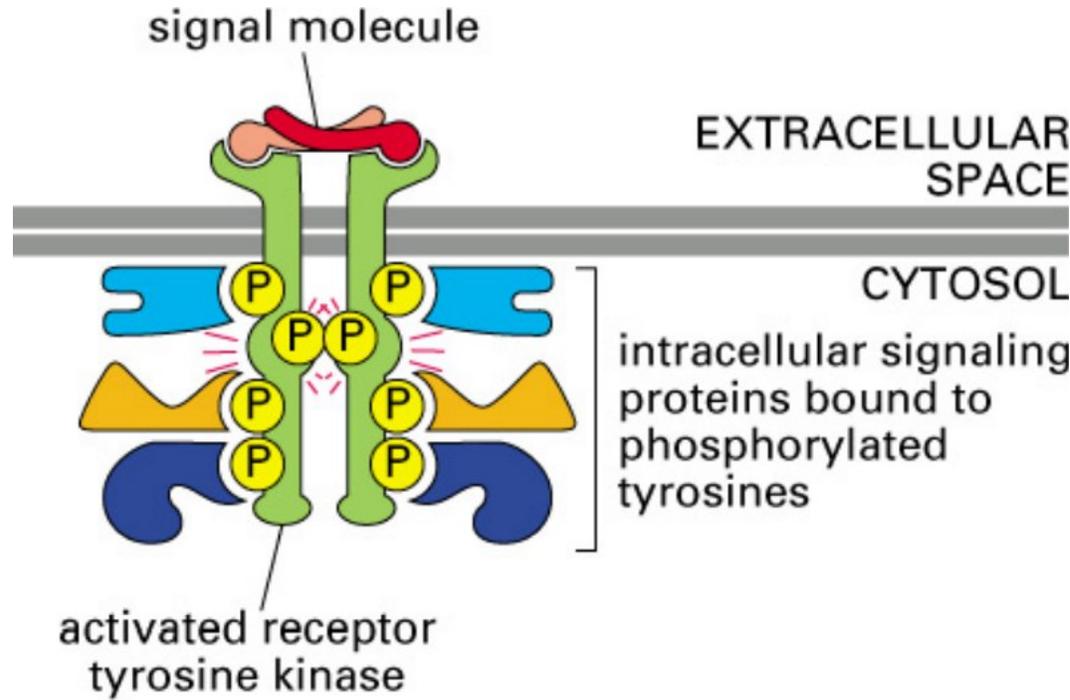
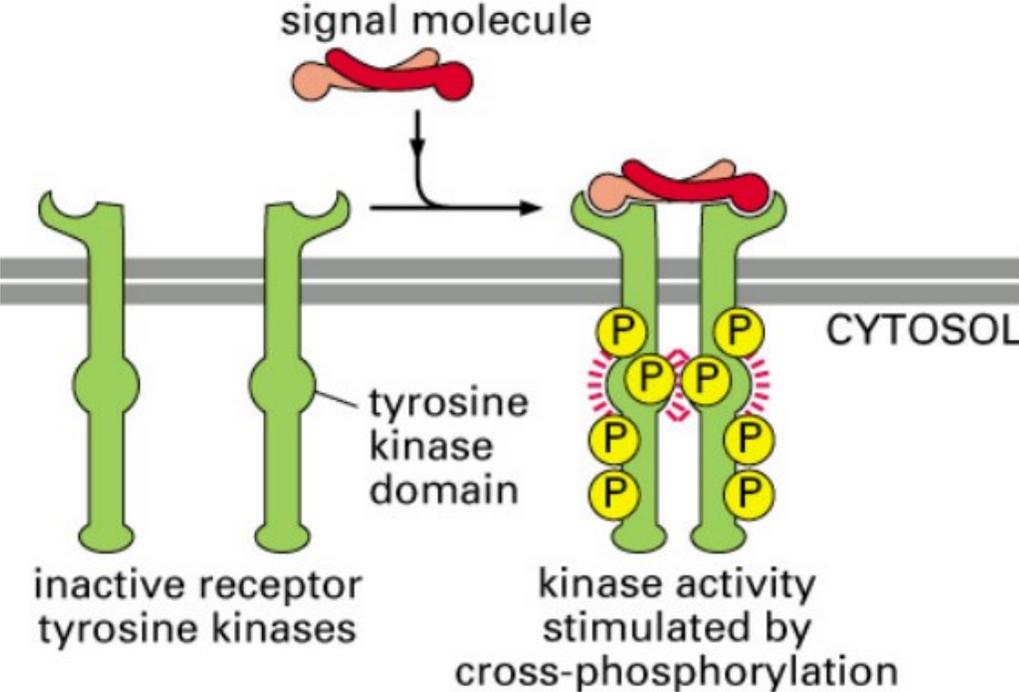
Famiglia del recettore per IL-6 (subunità gp130 comune)



# Recettori tirosino-chinasi

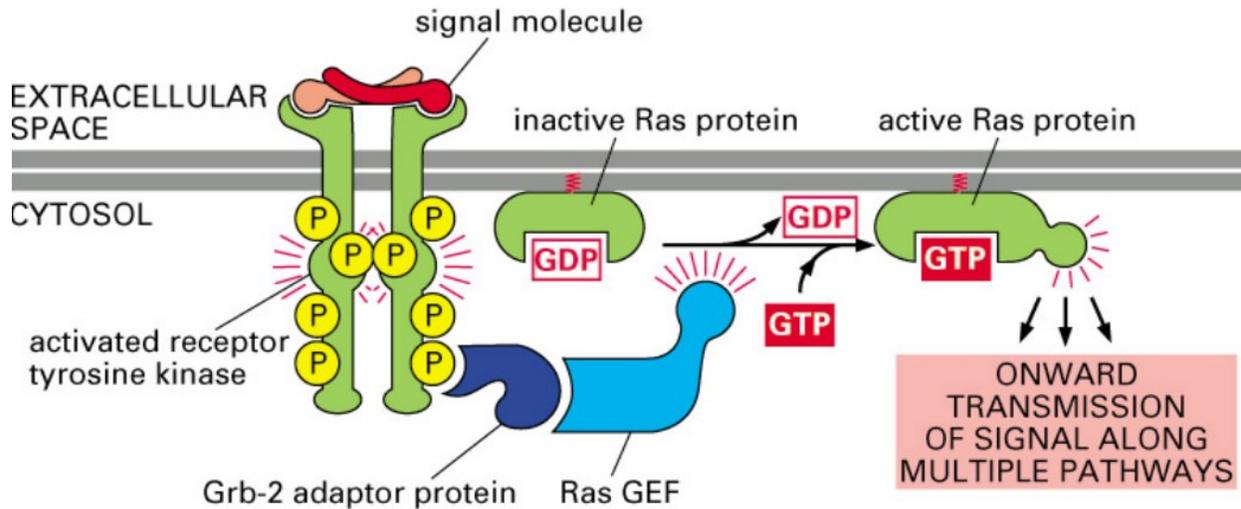
Legame ligando

Legame ligando  
intracellulari dominio SH2



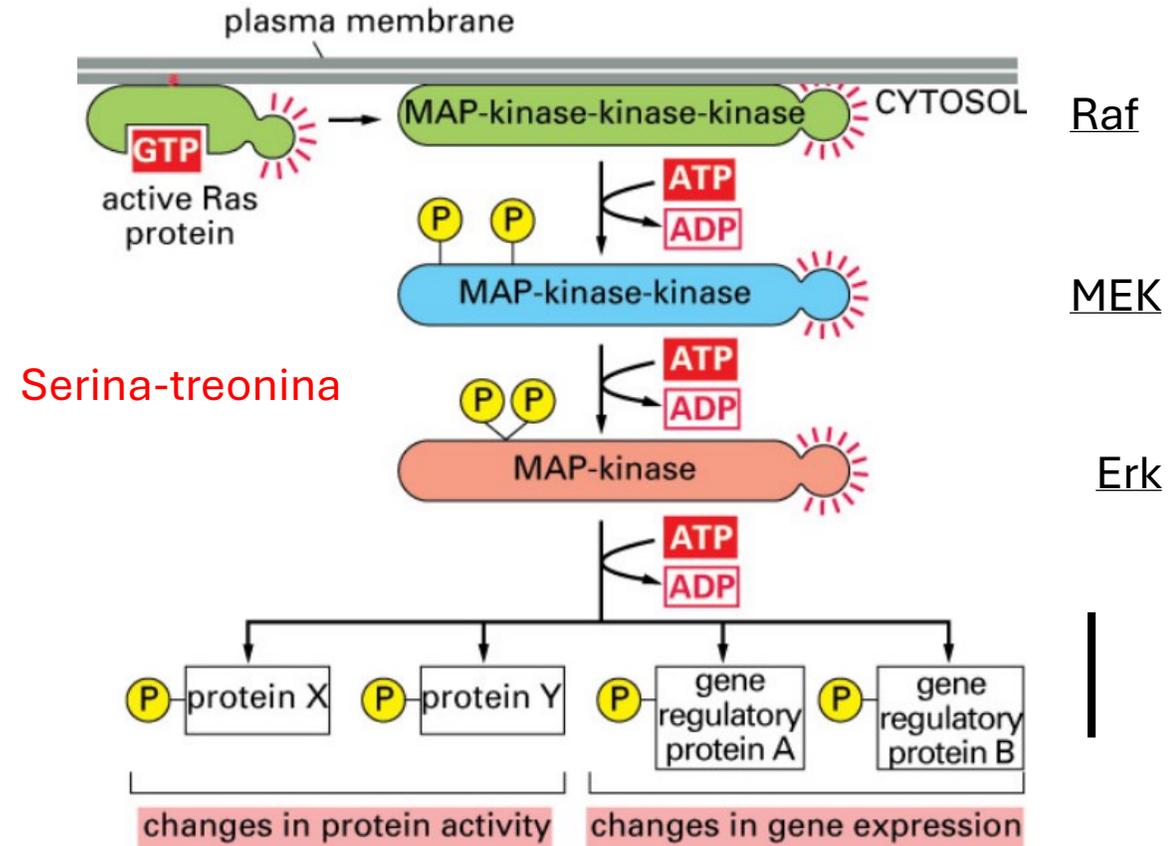
# Recettori tirosino-chinasi

Attivazione di Ras  
GTPasi monomeriche



Fattore di scambio nucleotidico (GEF)  
Proteine che attivano Gpasi (GAP)

Attivazione Mitogen Activated  
Protein-chinasi



Serina-treonina

Raf

MEK

Erk

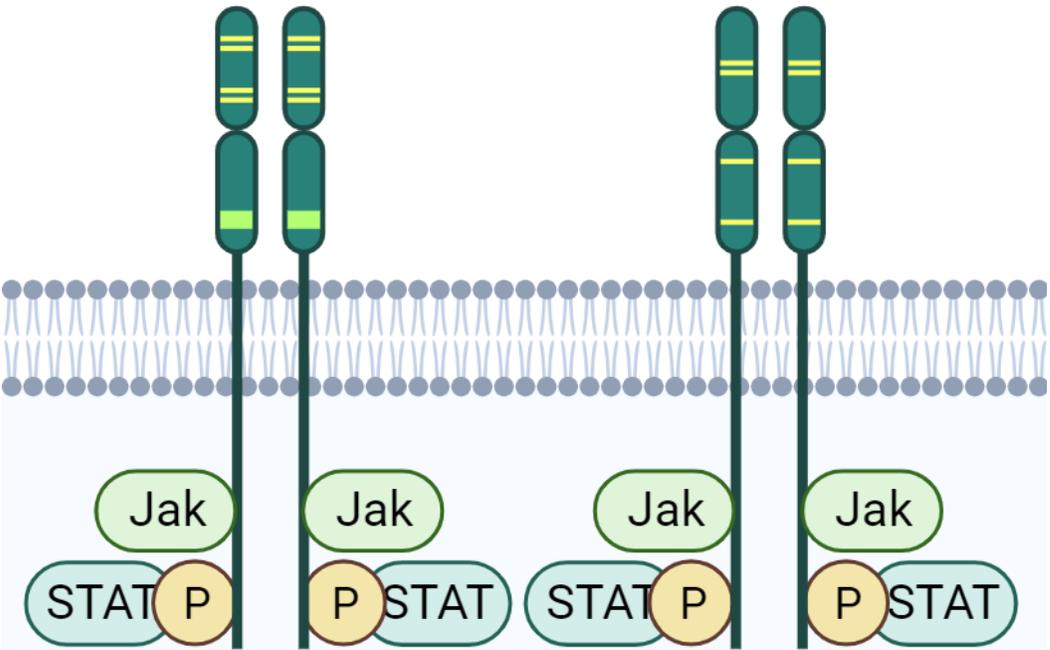
# Recettori citochinici di tipo I (ematopietine) e II (interferoni)

tipo I

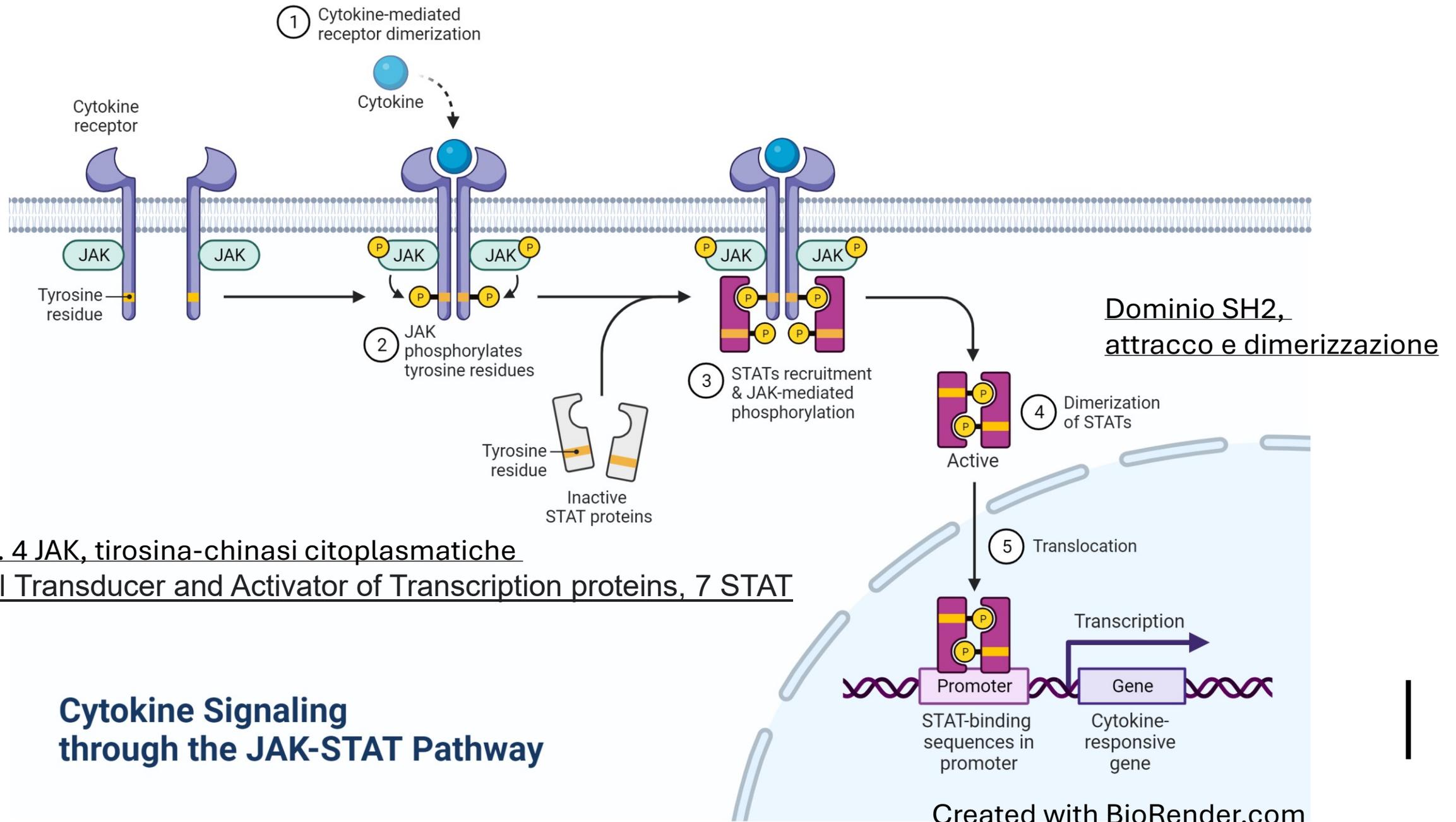
tipo II

tipo I

tipo II



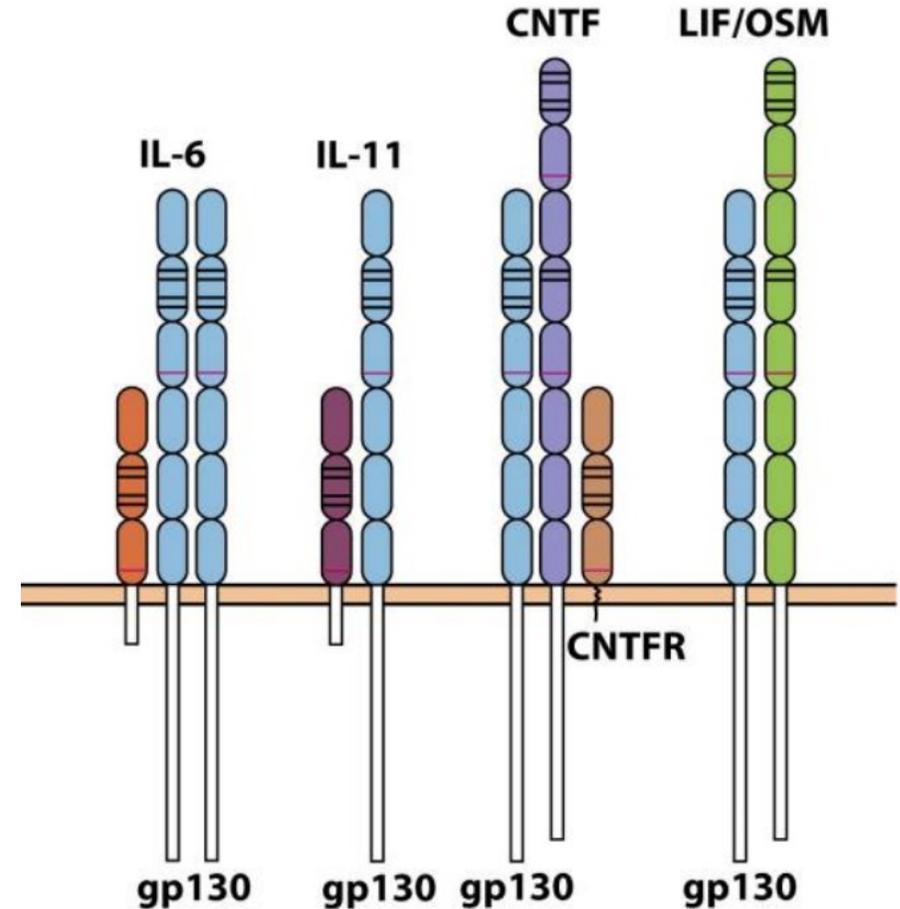
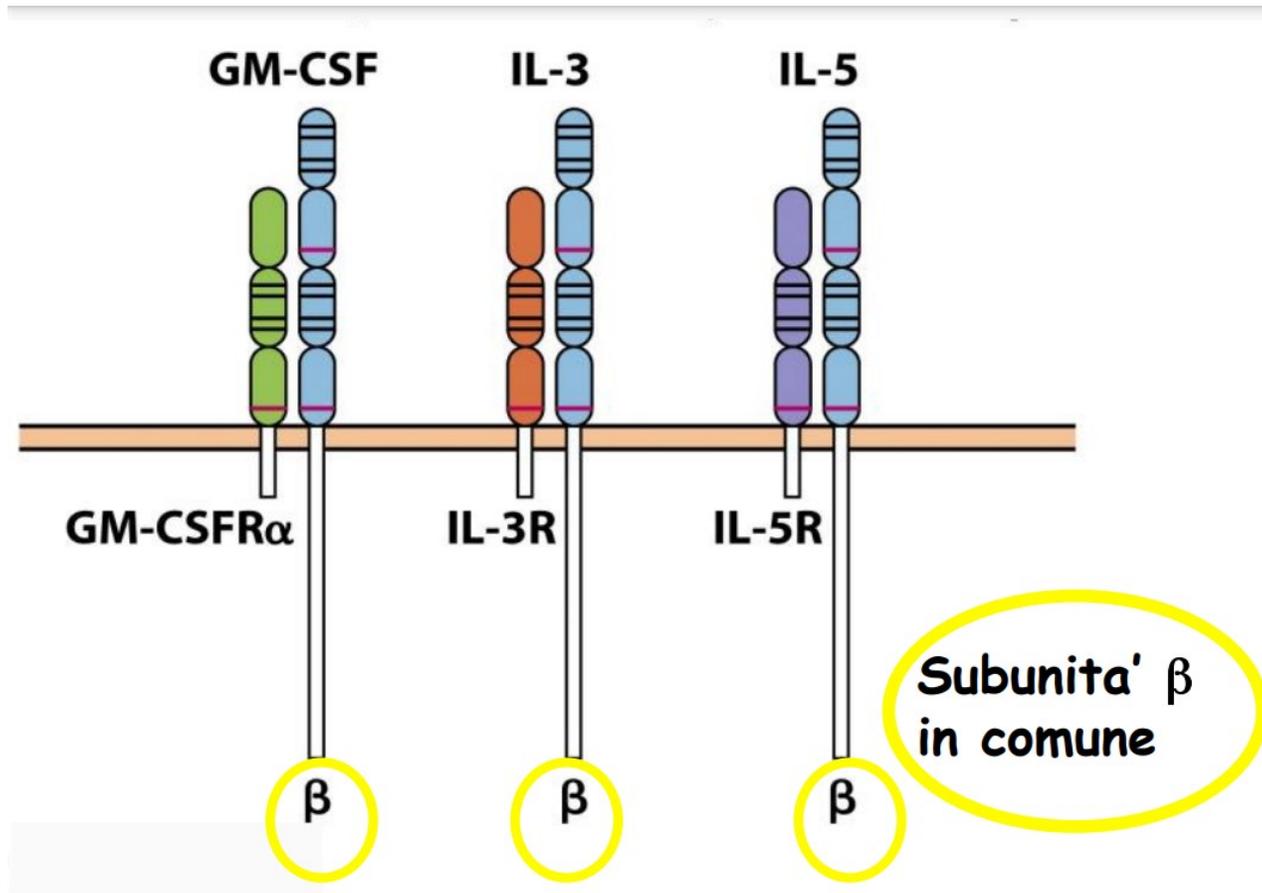
-  4Cys conservate (CCCC)
-  triptofano-serina-  
X- triptofano-serina (WSXWS)



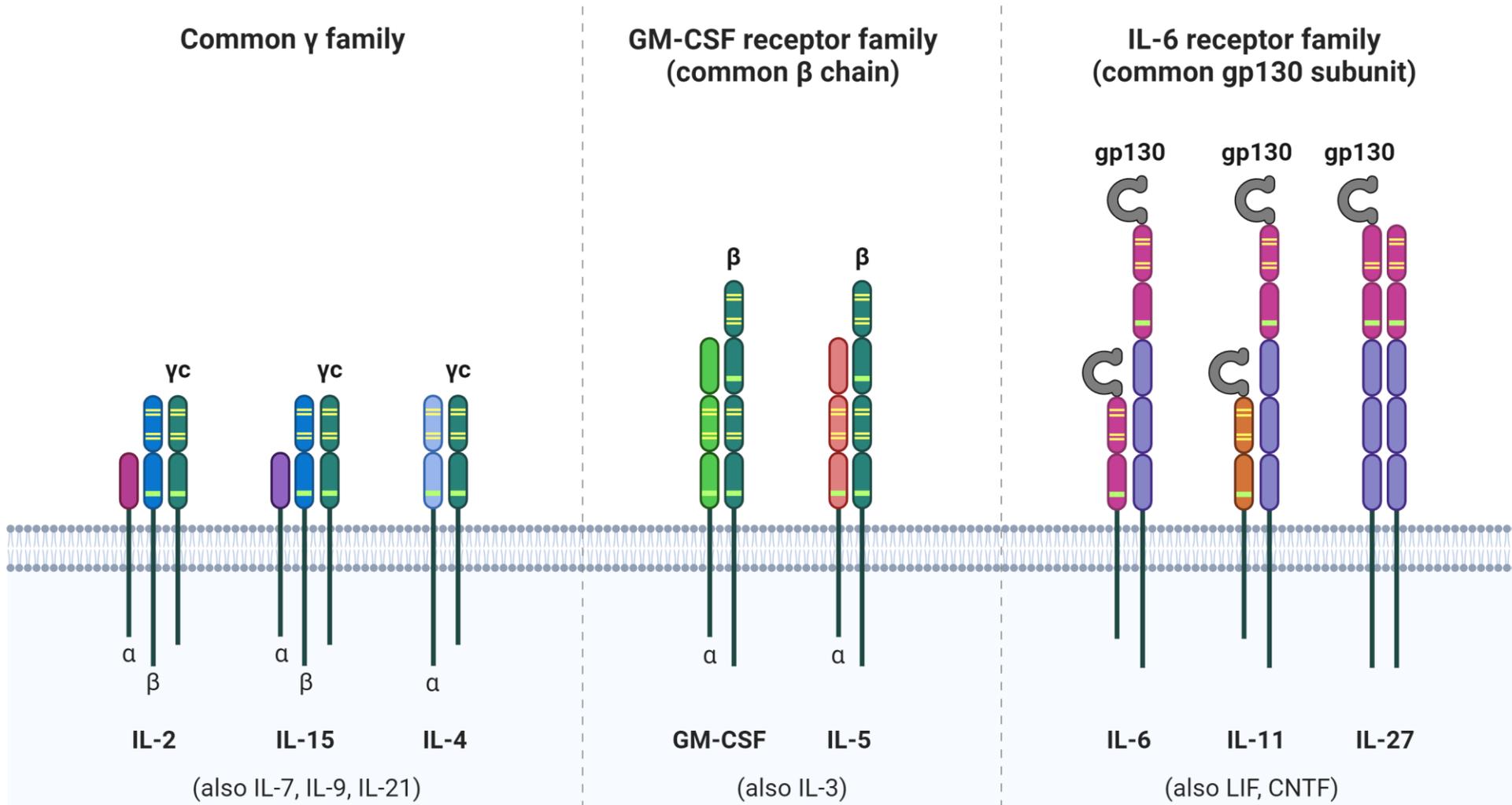
Janus. 4 JAK, tirosina-chinasi citoplasmatiche  
Signal Transducer and Activator of Transcription proteins, 7 STAT

## Cytokine Signaling through the JAK-STAT Pathway

# Sottoclassi di tipo I, subunità in comune



# Subunit Compositions of Cytokine Receptors



---

**Ligando**

---

**Jak****STAT**

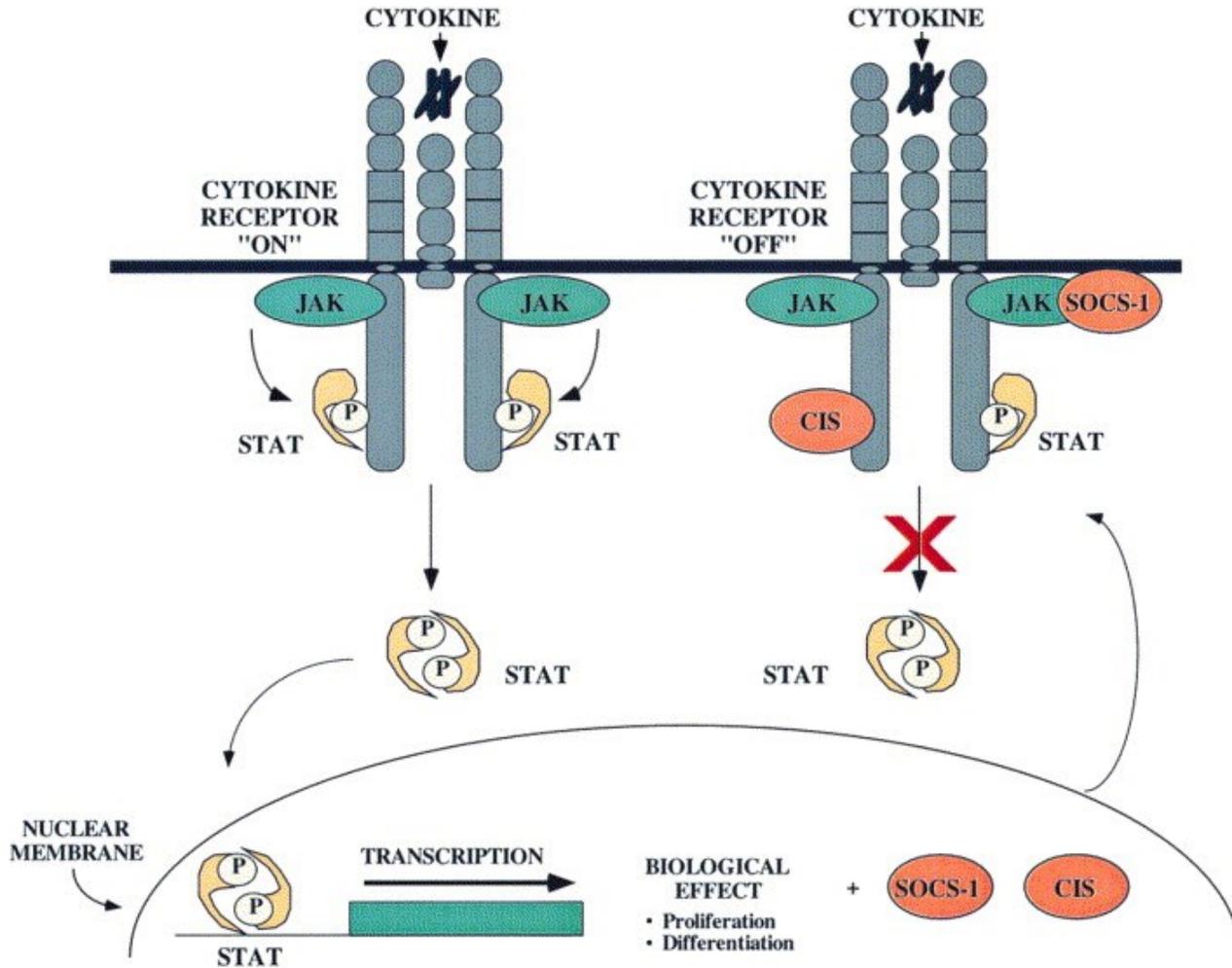
---

**γc family****IL-2****Jak1, Jak3****STAT5****IL-4****Jak1, Jak3****STAT5****IL-7****Jak1, Jak3****STAT5****gp130 family****IL-6****Jak1****STAT3****IL-11****Jak1****STAT3**

# Regolazione negativa del pathway JAK/STAT

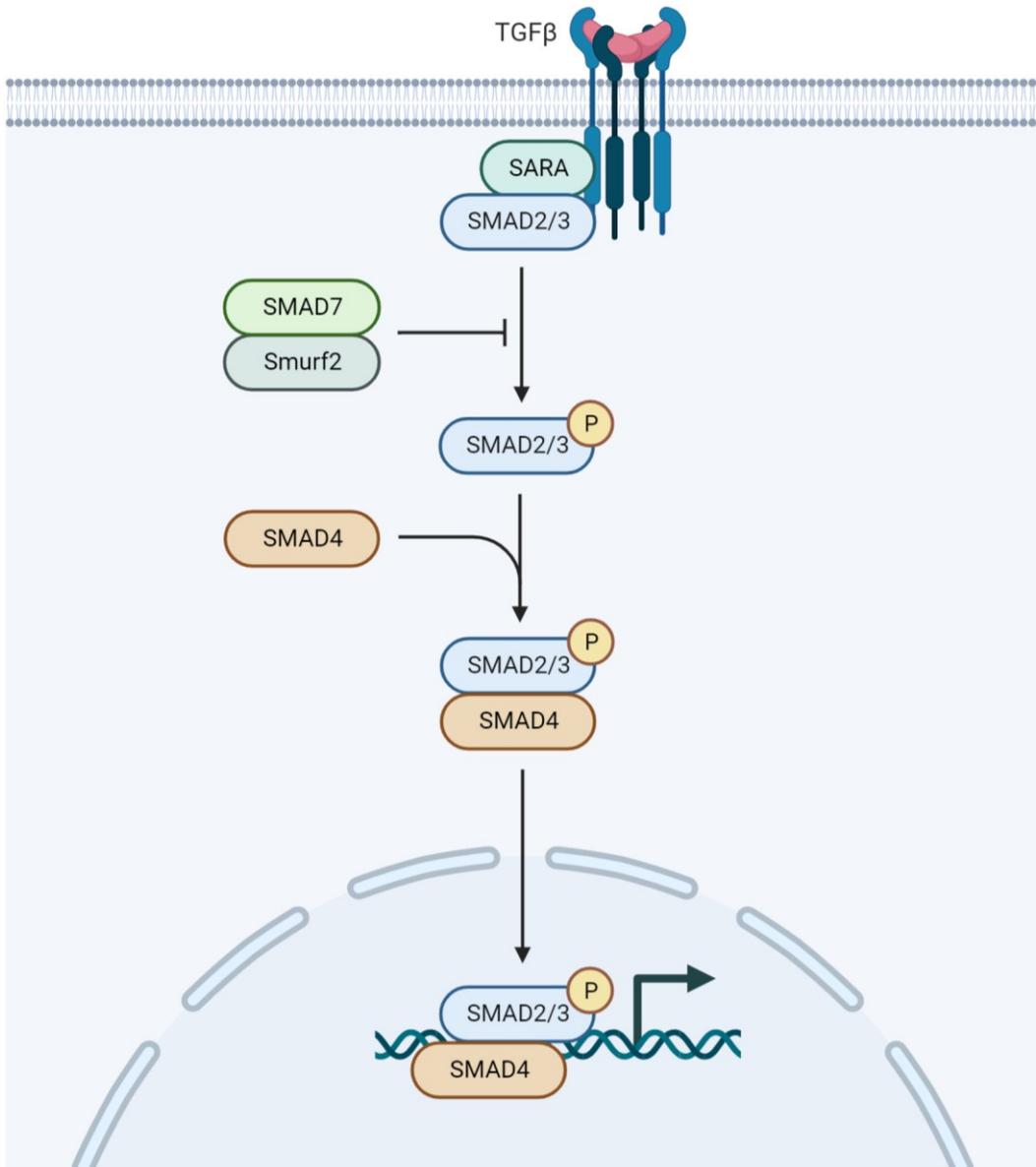
- Endocitosi e degradazione recettore-mediata
- Defosforilazione da parte di tirosino-fosfatasi (SHP-1 e SHP-2)
- Stat domini negativi come STAT1 $\beta$  e STAT3 $\beta$  che non hanno il dominio di transattivazione
- Protein inhibitor of activated Stats (PIAS)
- Suppressor of cytokine signaling (SOCS)

# Suppressor of cytokine signaling (SOCS)



- Proteine con dominio SH2 e SOCS box, 40 aa
- Interazione recettore/Jak
- Ubiquitinazione Jak
- SOCS-1 -> INF gamma, SOCS-3 ->IL-6.

# Recettori serin-chinasici (TGF- $\beta$ )



Domini extracellulari cys

Singolo domini intramembrana

Dominio intracellulare serina-treonina chinasico

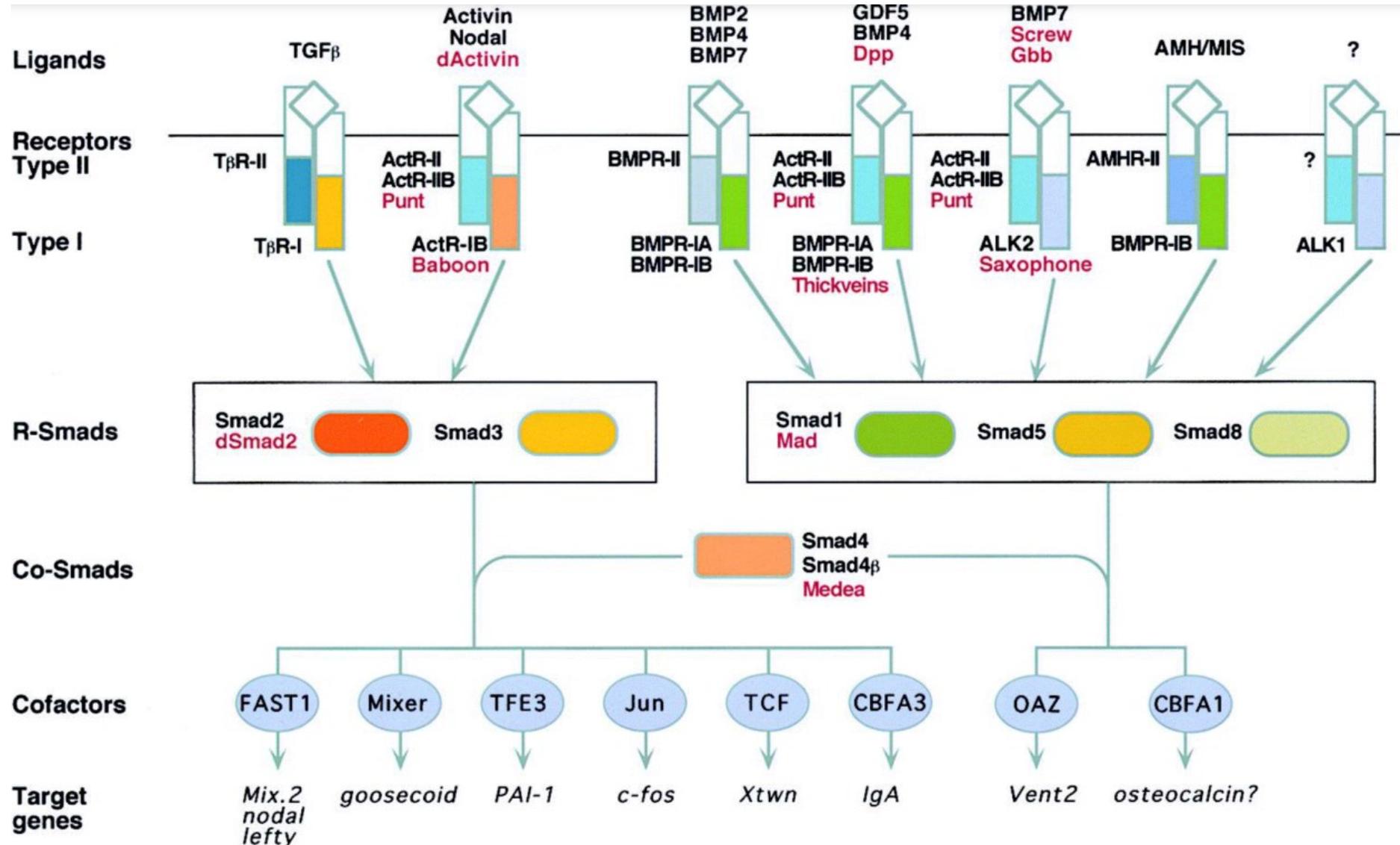
SMAD 8, tre classi;

- Receptor-associated SMAD
- co-SMAD
- Inhibitory SMAD

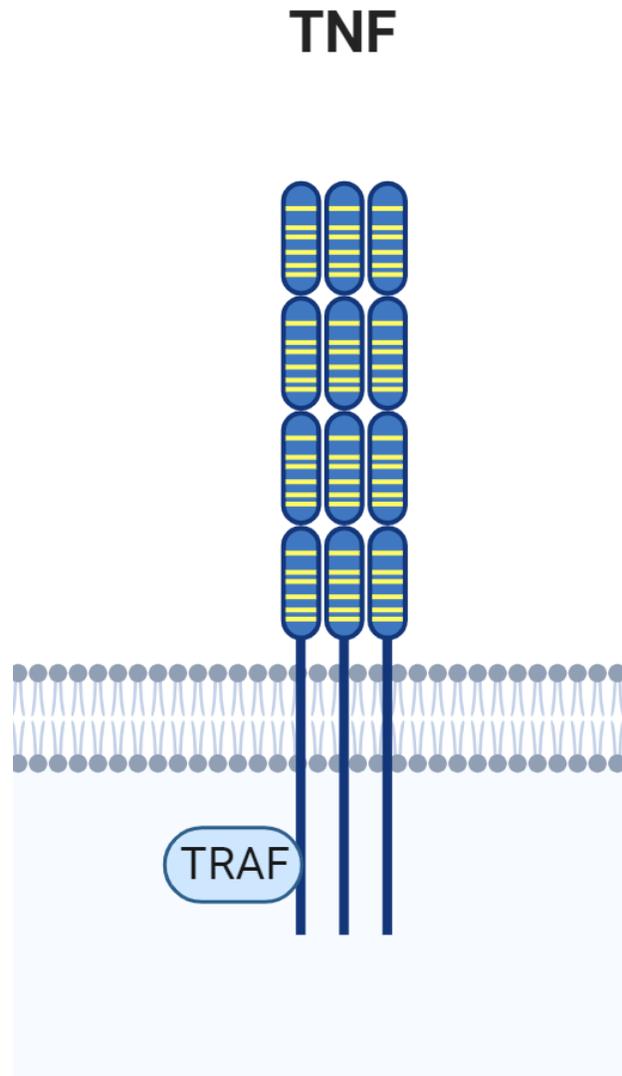
MH1 ed MH2

Created with BioRender.com

# Recettori serin-chinasici (TGF- $\beta$ )



# Recettori della famiglia del TNF



TNF

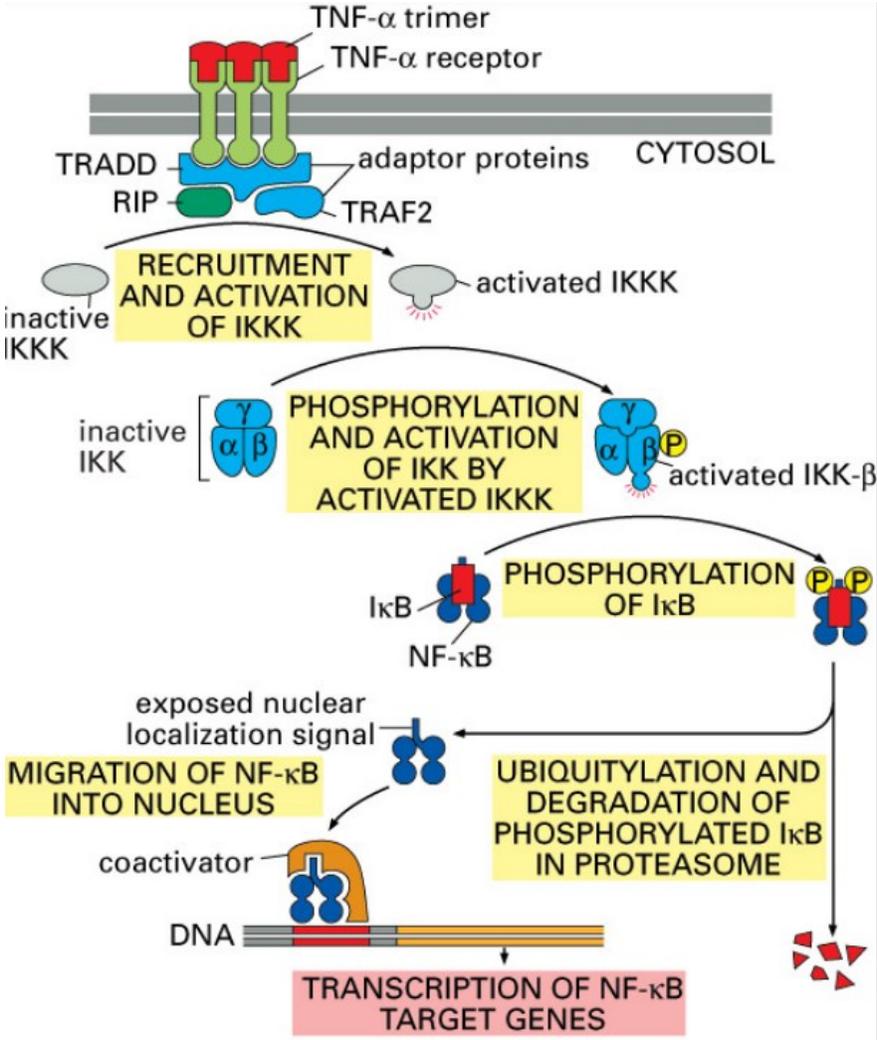
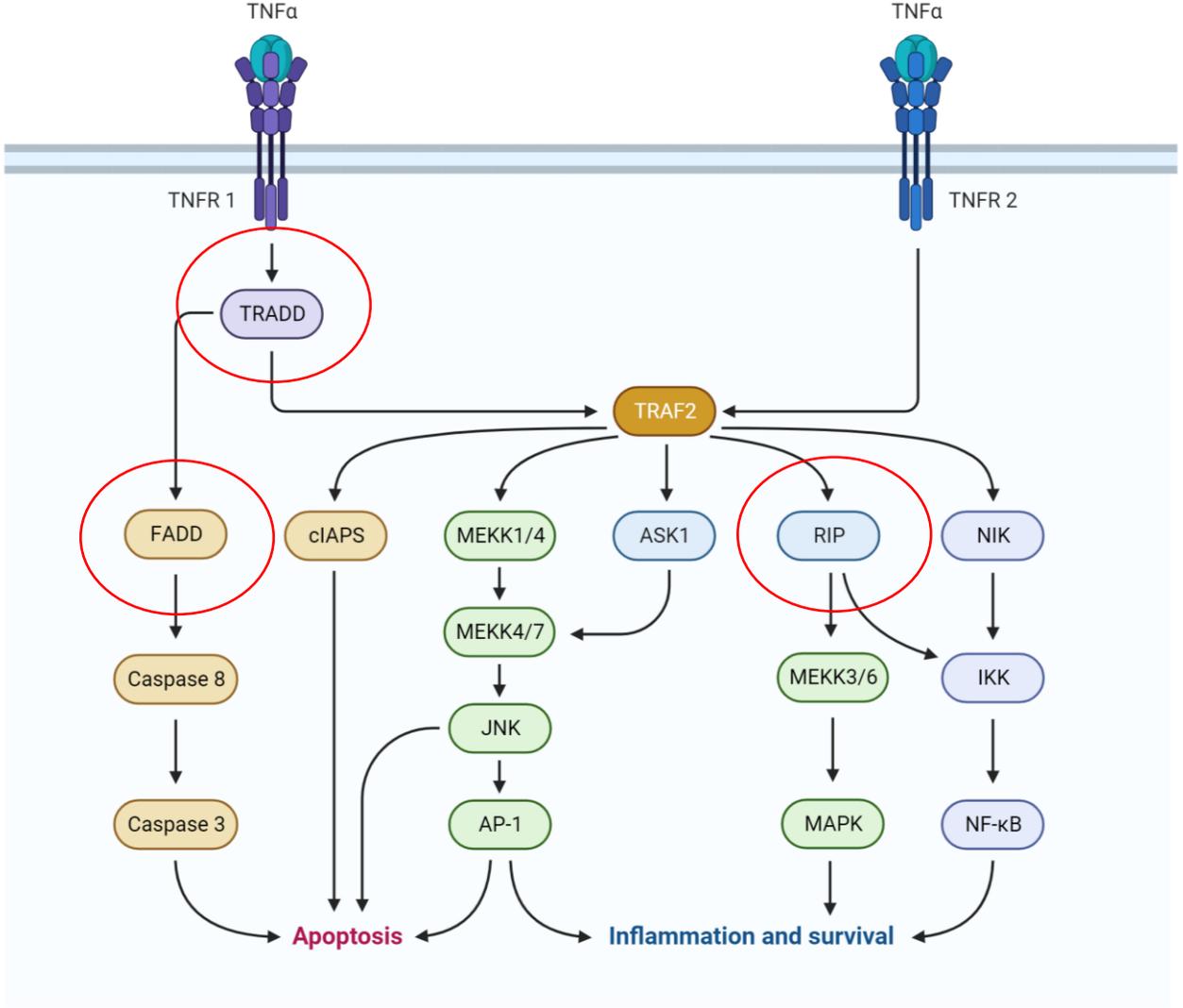
== Domini conservate ricchi in Cys

Lisi cellule bersaglio

Attivazione localizzata endotelio NO mediata

Controllo molecole di adesione e MHC I e II

# Recettori della famiglia del TNF



# Tumor Necrosis Factor- $\alpha$

Basse concentrazioni azione locale

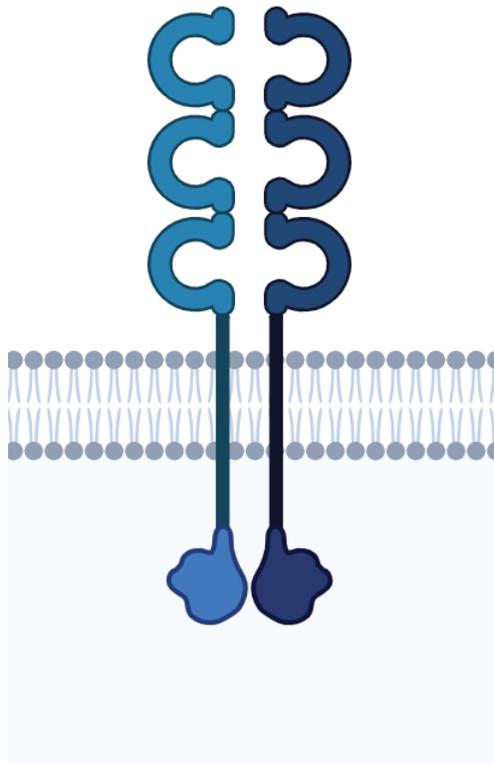
- lisi delle cellule bersaglio,
- il mediatore centrale del danno tissutale indotto da LPS
- attivazione localizzata dell'endotelio vascolare,
- il rilascio di NO con vasodilatazione aumento della permeabilità vascolare
- Incremento adesività piastrinica, favorendo la formazione del trombo e l'occlusione dei vasi
- Permeabilità mitocondri

Alte concentrazioni azione sistemica

- Sintesi PG e inibizione contrattilità miocardiociti

# Recettori IL-1/toll-like

IL-1

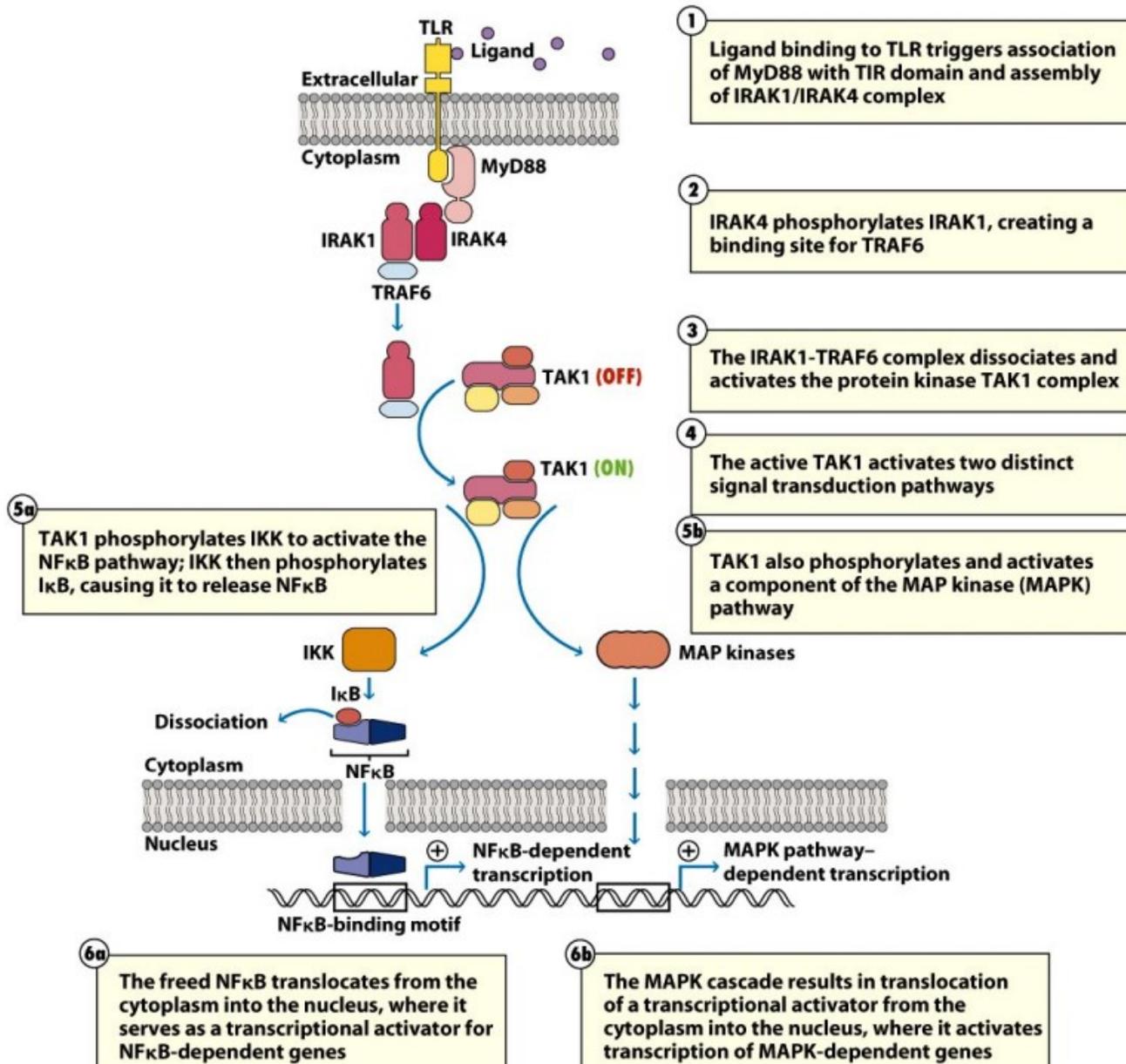


Secrezione da mononucleate fagociti, neutrofili, cellule endotelaini ed epiteliali LPS o TNF-indotta

dominio Ig extracellulare

domino TIR (Toll-like/IL1 receptor) intracitoplasmatico

# Recettori IL-1/toll-like



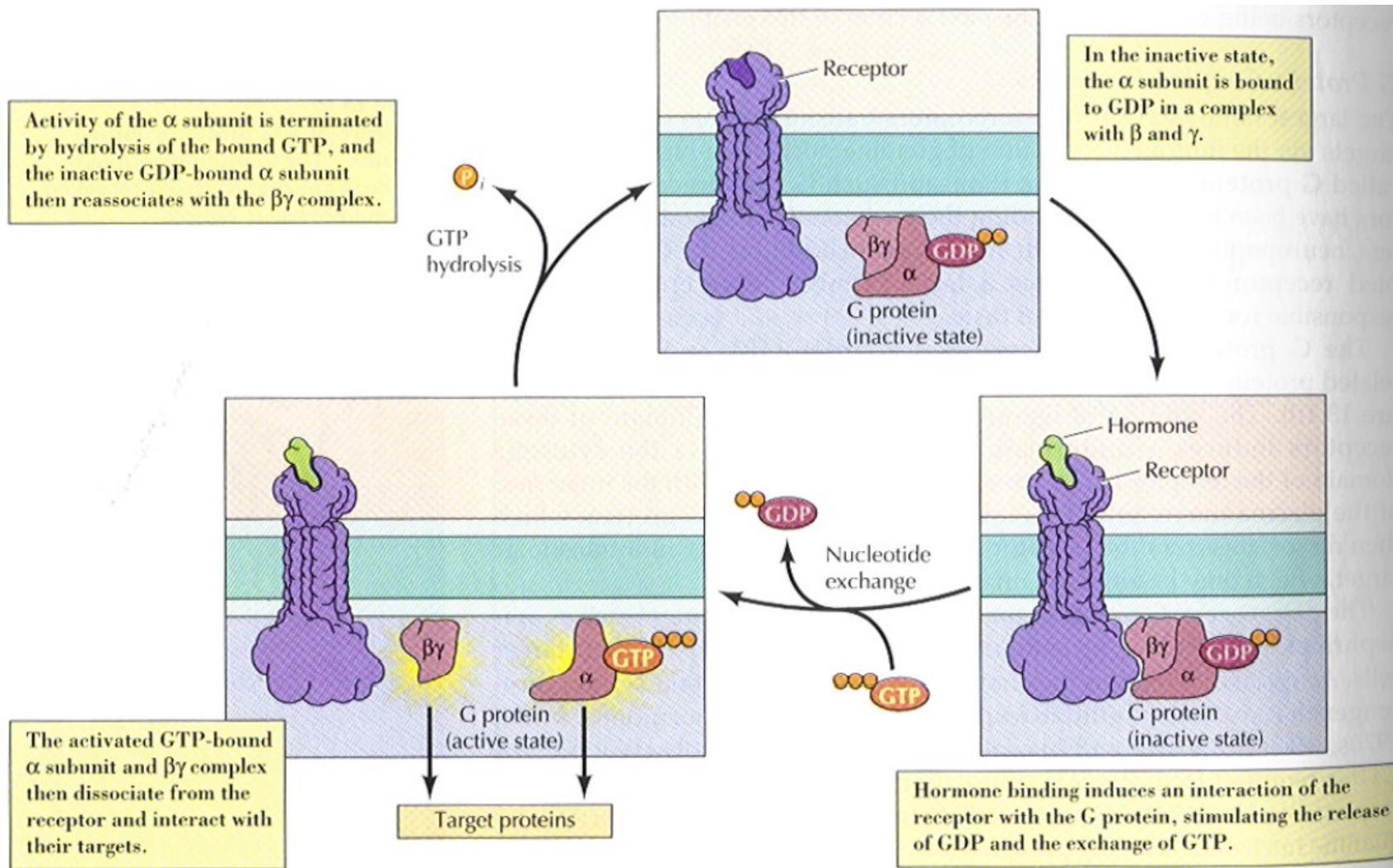
IL-1α e IL-1 β

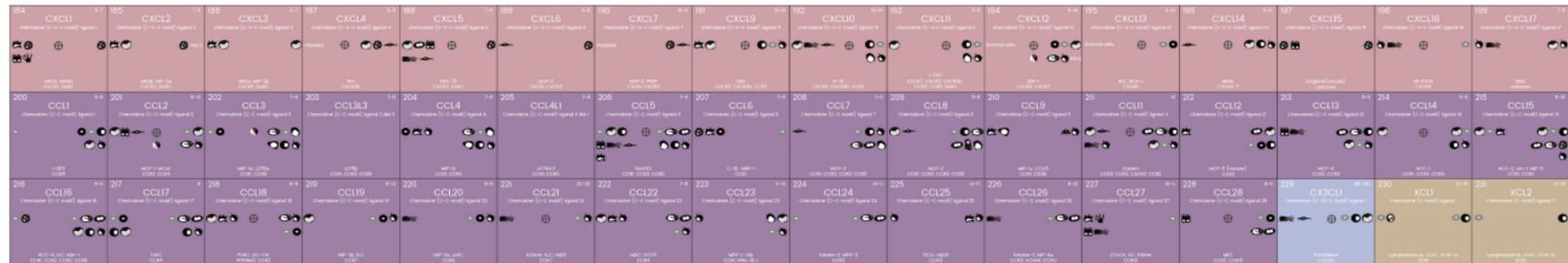
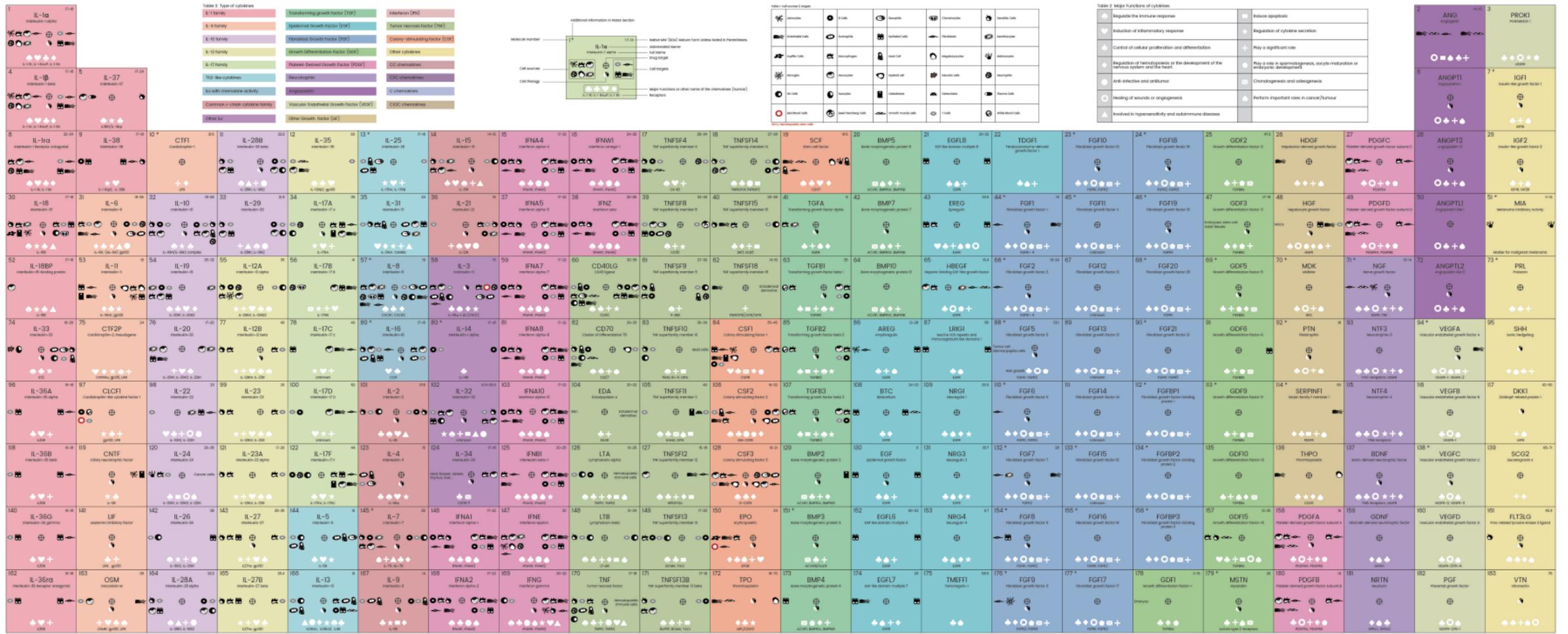
Entrambe sono sintetizzate come precursori di 33 kDa, successivamente clivate proteoliticamente per ottenere la forma matura di 17 KDa.

dominio Ig extracellulare  
domino TIR (Toll-like/IL1 receptor) intracitoplasmatico

MyD88

# Recettori legati alle proteine G (chemochine)



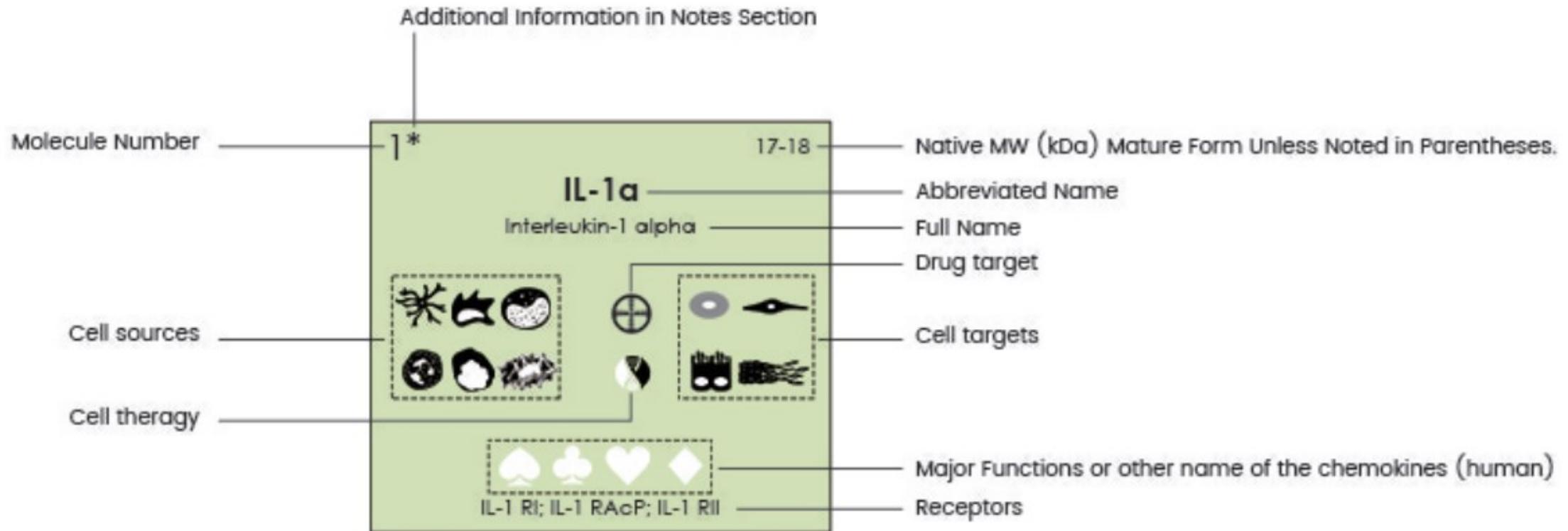


# Tipologia

Table 3: Type of cytokines

IL-1 family	Transforming growth factor (TGF)	Interferon (IFN)
IL-6 family	Epidermal Growth Factor (EGF)	Tumor necrosis factor (TNF)
IL-10 family	Fibroblast Growth Factor (FGF)	Colony-stimulating factor (CSF)
IL-12 family	Growth Differentiation Factor (GDF)	Other cytokines
IL-17 family	Platelet-Derived Growth Factor (PDGF)	CC chemokines
Th2-like cytokines	Neurotrophin	CXC chemokines
ILs with chemokine activity	Angiopoietin	C chemokines
Common $\gamma$ -chain cytokine family	Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)	CX3C chemokines
Other ILs	Other Growth factor (GF)	

# Caratteristiche



# Cellule di produzione e target

Table 1: Cell sources & targets

	Astrocytes		B Cells		Basophils		Chondrocytes		Dendritic Cells
	Endothelial Cells		Eosinophils		Epithelial Cells		Fibroblasts		Keratinocytes
	Kupffer Cells		Macrophages		Mast Cell		Megakaryocytes		Melanocytes
	Microglia		Monocytes		Myeloid cell		Necrotic cells		Neutrophils
	NK Cells		Nuocytes		Osteoblasts		Osteoclasts		Plasma Cells
	Red Blood Cells		Reed Sternberg Cells		Smooth muscle cells		T Cells		White Blood Cells

HSCs; Hematopoietic stem cells

# Funzioni

Table 2: Major Functions of cytokines

	Regulate the immune response		Induce apoptosis
	Induction of inflammatory response		Regulation of cytokine secretion
	Control of cellular proliferation and differentiation		Play a significant role
	Regulation of hematopoiesis or the development of the nervous system and the heart		Play a role in spermatogenesis, oocyte maturation or embryonic development
	Anti-infective and antitumor		Chondrogenesis and osteogenesis
	Healing of wounds or angiogenesis		Perform important roles in cancer/tumour
	Involved in hypersensitivity and autoimmune diseases		

# Caratteristiche citochine

Pleiotropismo cellulare

Ridondanza

Multifunzionalità

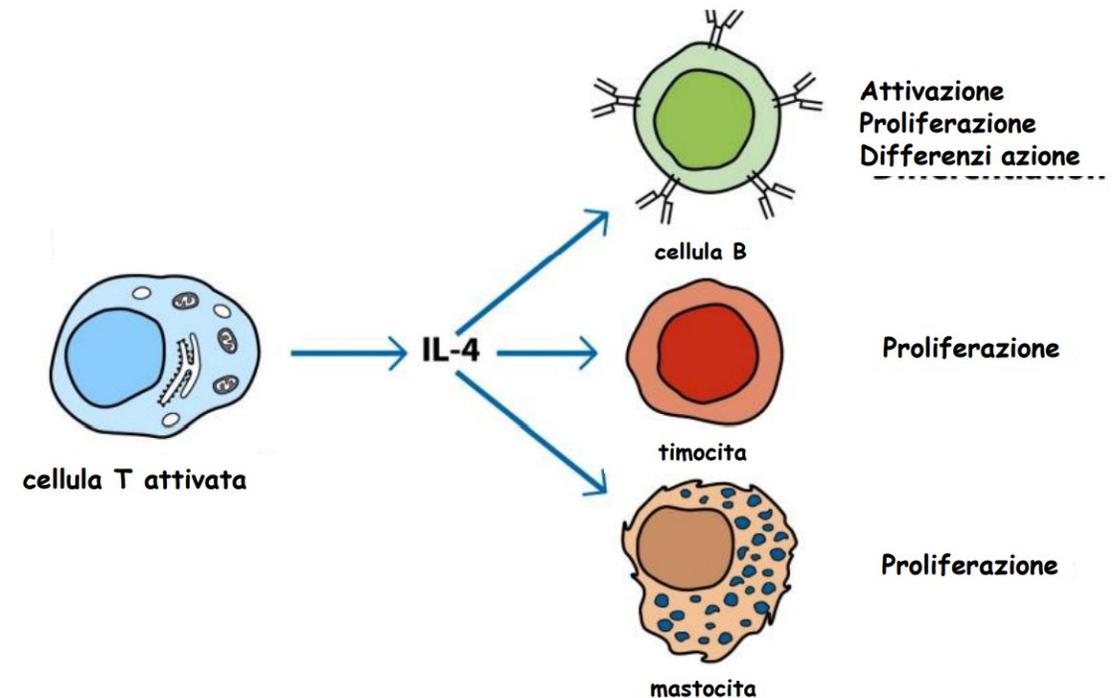
Sinergia/antagonismo

Azioni locali (autocrina o paracrina) o sistemica (endocrina)

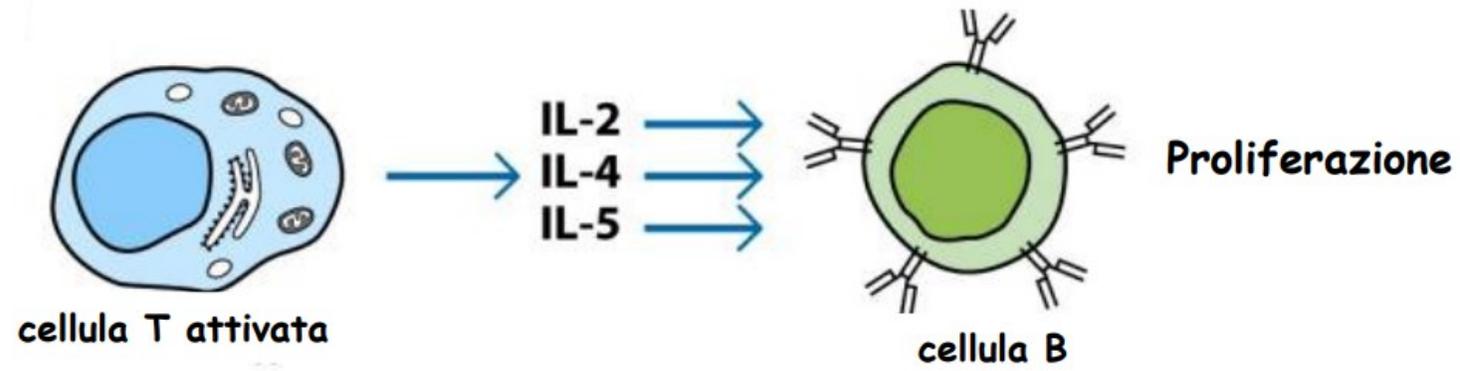
Secrezione controllata e limitata

# Pleiotropismo cellulare

una particolare citochina può agire su diversi tipi di cellule



# Ridondanza

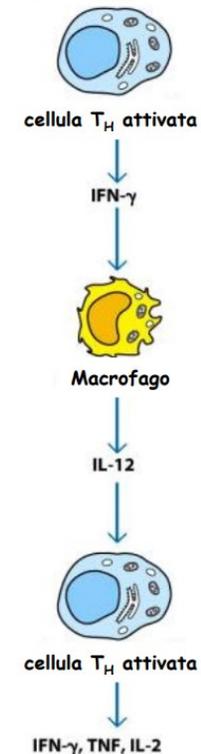


differenti citochine possono esercitare gli stessi effetti

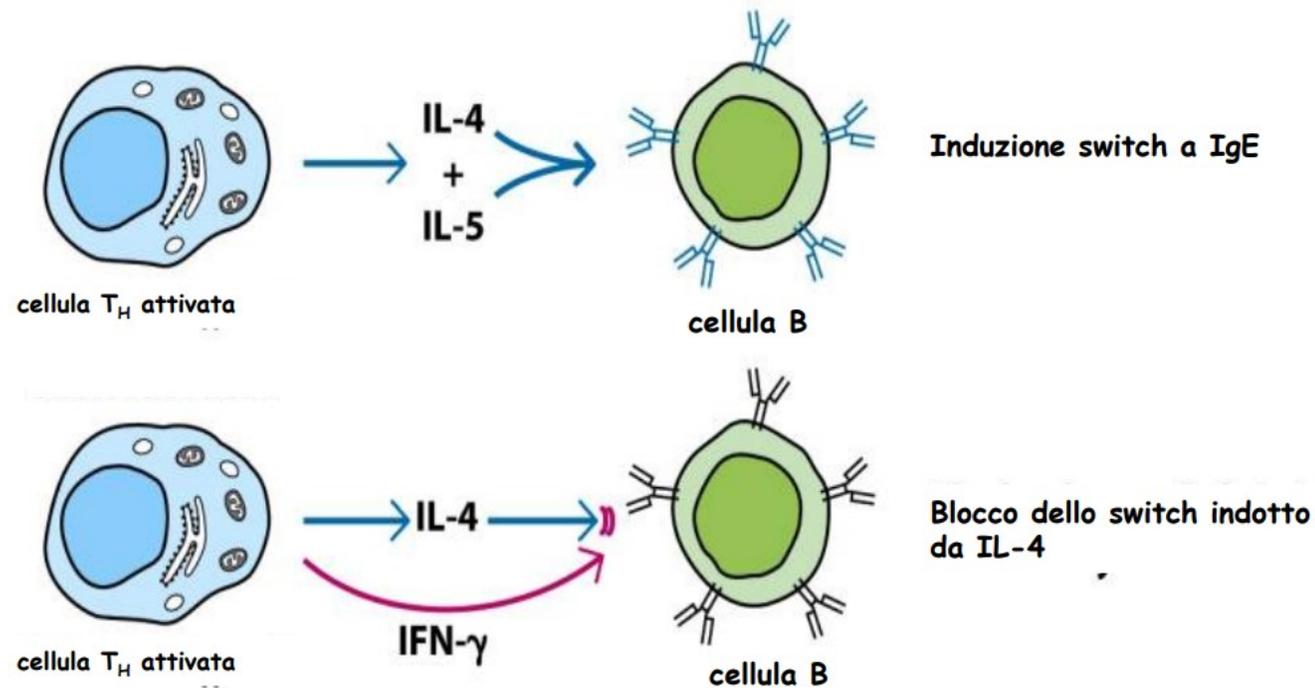
# Multifunzionalità ed Autoamplificazione del segnale

la stessa citochina regola differenti funzioni

Feedback positivo



# Azione sinergico o antagonizzante



# Chemochine

Cito**chine chemotattiche**

Piccole molecole di 8-14 kDa strutturalmente omologhe

1977 PF4

1987 Identificazione della chemochina IL-8

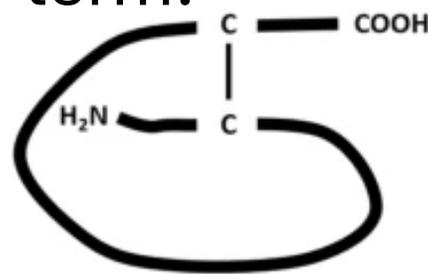
Oggi si conoscono piu 100 chemochine

# Chemochine

molecole in grado di indurre chemiotassi e quindi di richiamare cellule nel sito di infiammazione, mediante azione su recettori integrinici e citoscheletro.

Hanno residui di Cys su N-term:

- CXC
- CXXXC
- CC
- C



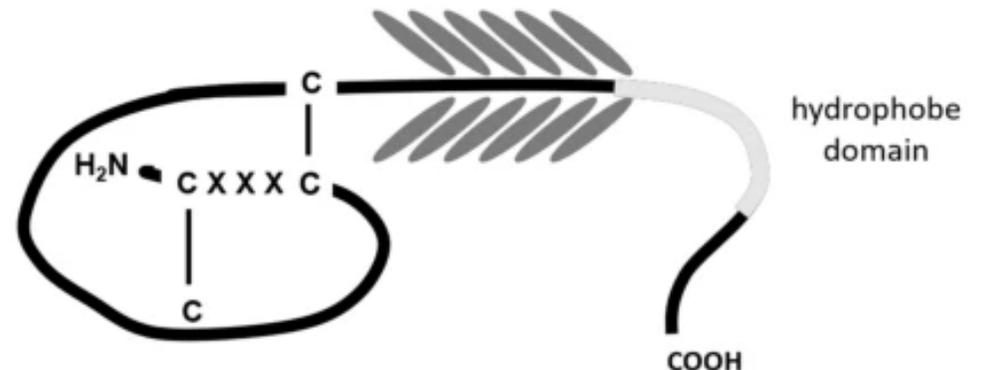
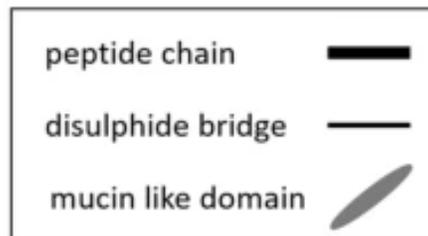
C chemokines



CC chemokines



CXC chemokines



CX3C chemokines

# Chemochine recettori

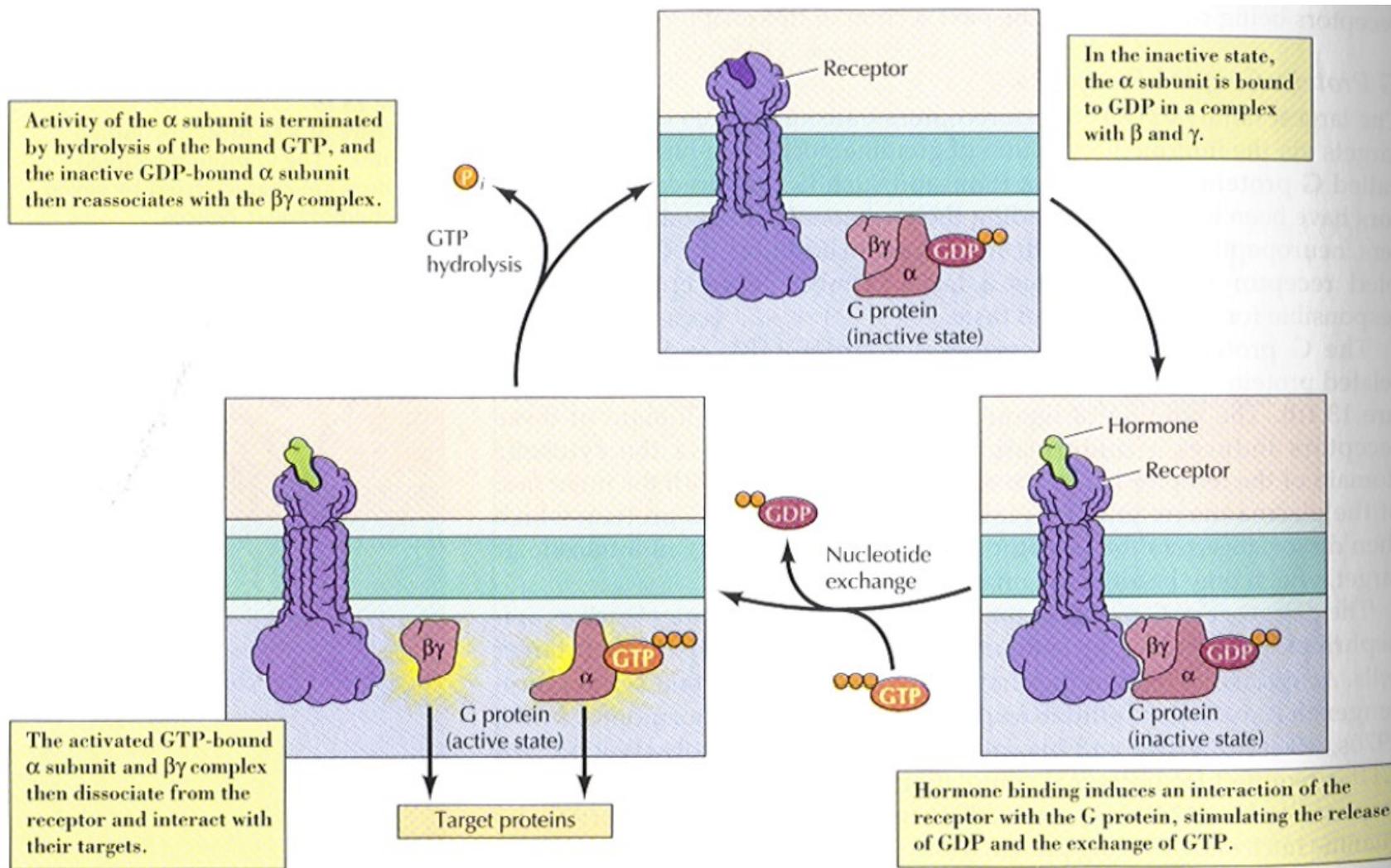
recettori per chemochine a 7 domini alpha-elica accoppiati a proteine G;  
DRYLAIV motivo conservato (D: Aspartato; R: Arginina; Y: Tirosina; L: Leucina,  
A: Alanina; I: Isoleucina; V: Valina)

$\alpha$ - (CXC)

$\beta$ - (CC)

$\gamma$ - (C)

# Recettori legati alle proteine G (chemochine)



# Chemochine effetti

Gli agenti chemiotattici si legano a recettori transmembrana accoppiati alla proteina G. Cascata di segnali ed attivazione di molecole effettrici che in ultimo danno luogo a:

- Attivazione della Fosfolipasi C
  - Rilascio di Calcio dal reticolo endoplasmatico
  - Sintesi di integrine
  - Produzione di Acido Arachidonico
  - Produzione di elementi del citoscheletro per consentire la motilità
- 
- Favoriscono il travaso delle leucociti
  - promuovono l'angiogenesi e riparo delle ferite
  - Sono coinvolte nello sviluppo di diversi organi non linfoidei

# Meccanismi di feedback negativo

- Recettori inattivi
- Molecole che bloccano interazione con chinasi accessorie
- Fosfatasi
- Molecole che bloccano interazione con fattori di trascrizione a valle

# Drug Targeting in Cytokine Receptor Pathways

**Inhibitory drugs for receptor pathway**

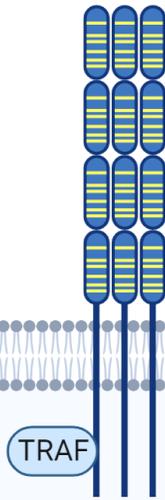
- Infliximab
- Certolizumab
- Adalimumab
- Golimumab
- Etanercept

- Tocilizumab
- Ustekinumab
- Mepolizumab
- Tofacitinib (JAK)

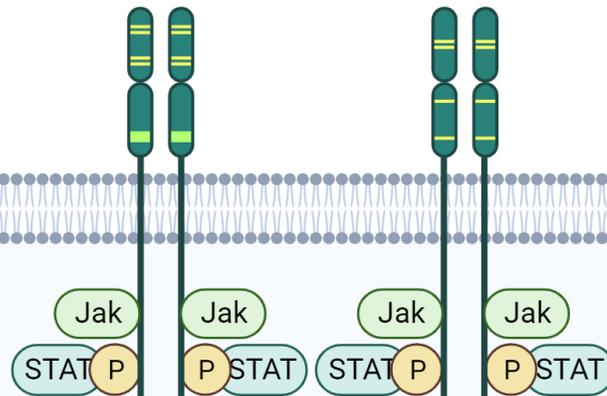
- Anakinra
- Canakinumab
- Rilonacept

- Secukinumab

TNF



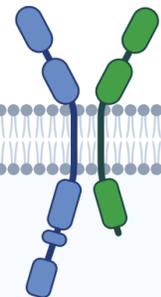
Type I and II



IL-1



IL-17





Cluster of spheres 1



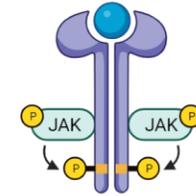
Cluster of spheres 2



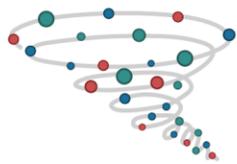
Cluster of spheres 3



Cluster of spheres 4



Activated cytokine receptor (with JAK)

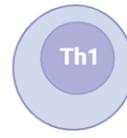


Cytokine storm



IL-10, TGF- $\beta$

Treg  
(with cytokines)



IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$

Th1  
(with cytokines)



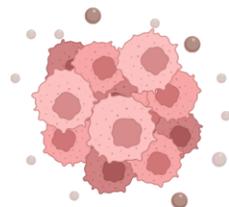
IL-4, IL-5,  
IL-9, IL-13

Th2  
(with cytokines)



IL-17, IL-22

Th17  
(with cytokines)

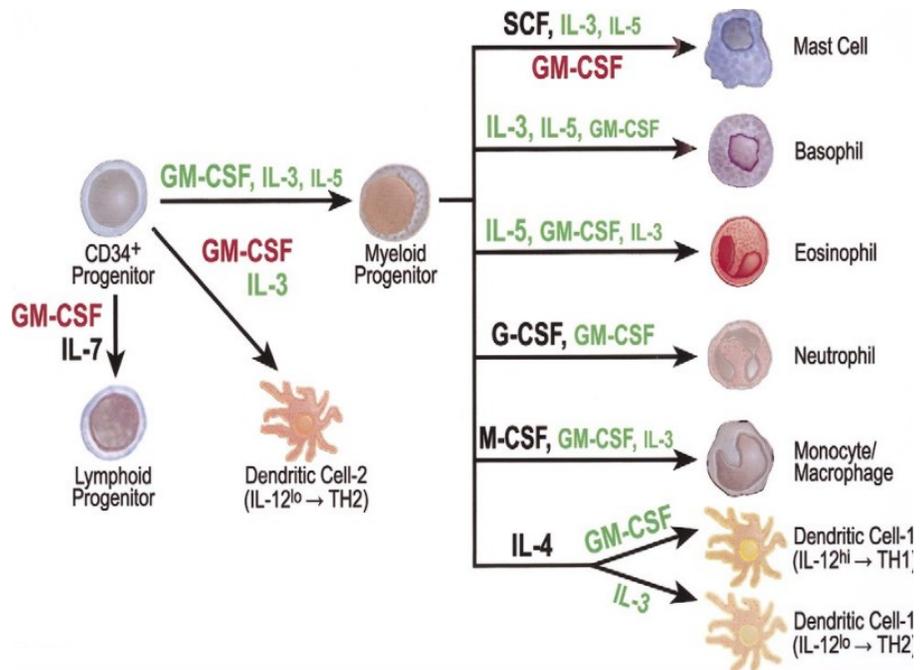


Cancer cell  
(with cytokines)

Neutrophil,  
eosinophil and mast  
cell degranulating



# Citochine ed ematopoiesi



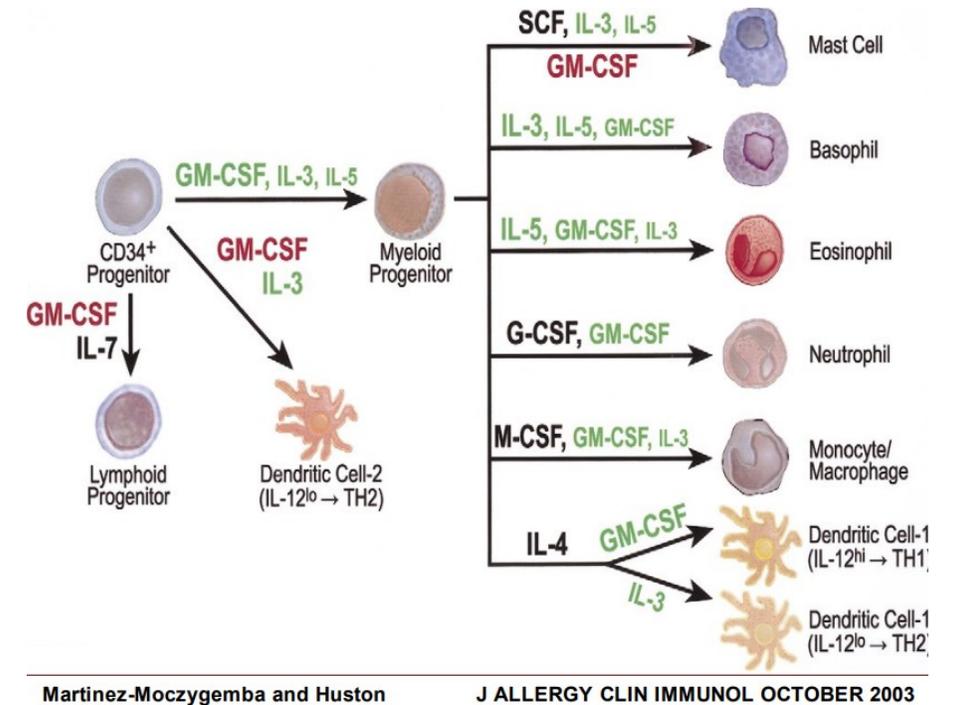
Le citochine controllano i normali processi ematopoietici a livello midollare assicurando un'omeostasi dei leucociti.

Colony Stimulating Factor, espansione e mobilitazione delle cellule progenitrici

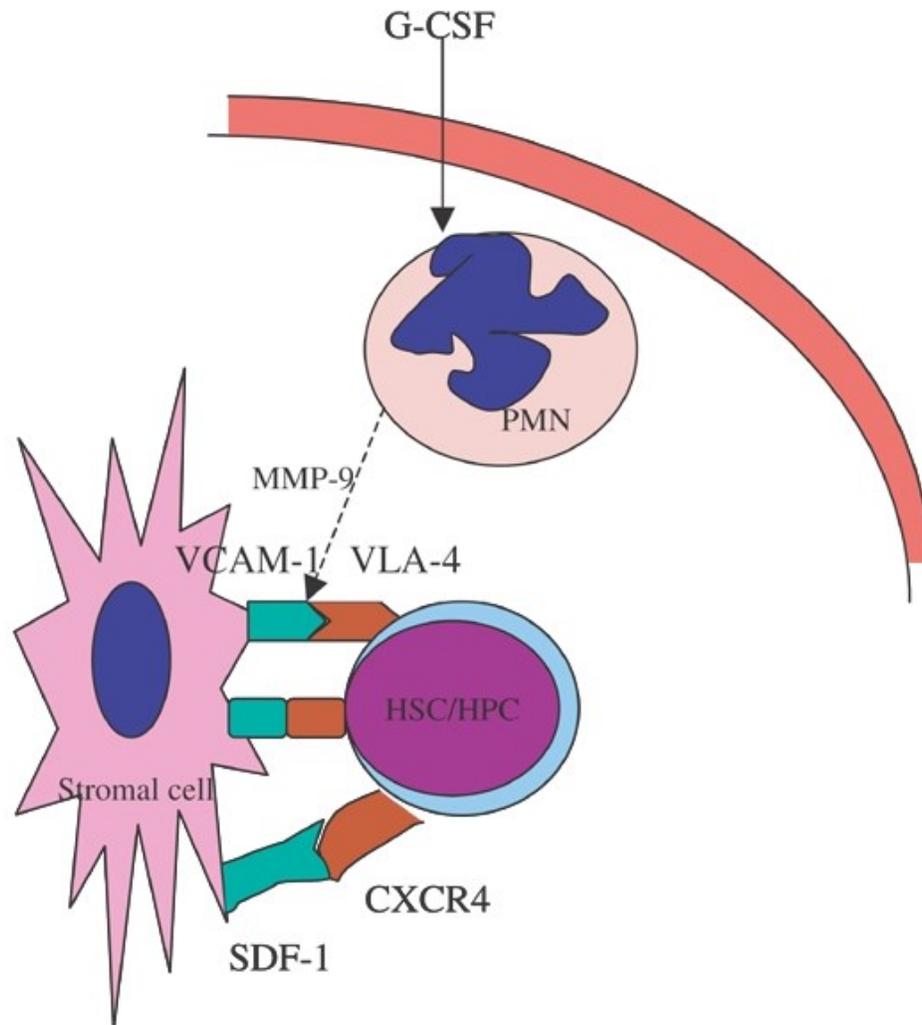
# Citochine ed ematopoiesi

## Chemochine omeostatiche:

- Mobilizzazione, cellule staminali ematopoietiche dal midollo osseo nel sangue periferico
- Homing



# Meccanismo di mobilitazione



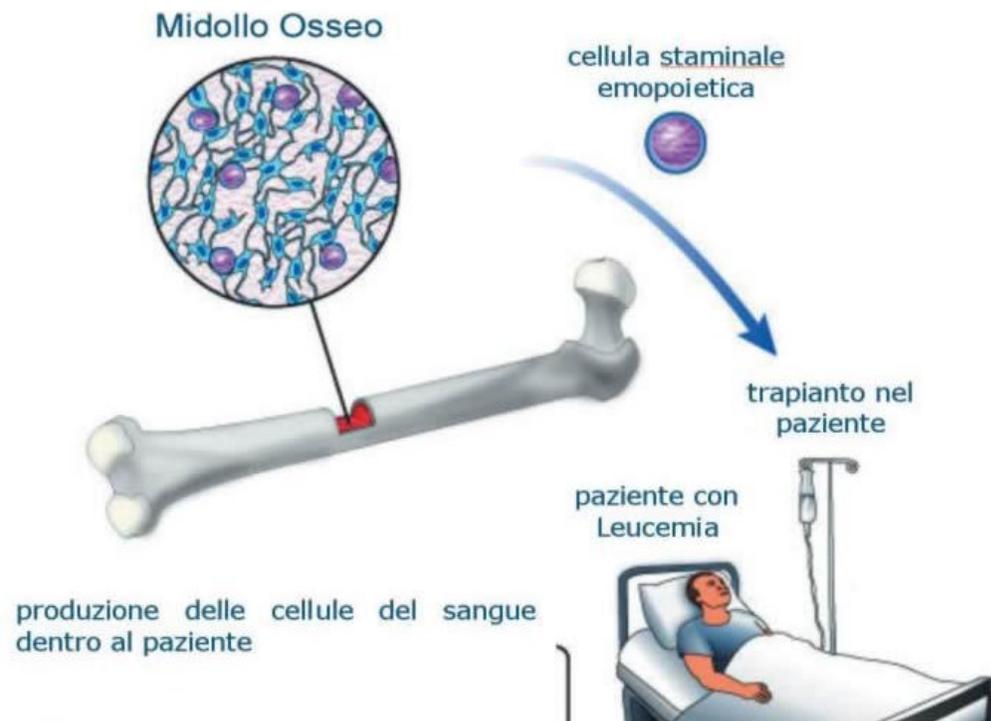
G-CSF induce il rilascio di una serie di proteasi, neutrophil elastase, che vanno a clevere diverse interazioni tra le molecole di adesione, come ad esempio tra CXCR4 e SDF-1.

# Trapianto cellule staminali ematopoietiche (HSCs)

Il trapianto di HSCs è una procedura che permette di ripristinare il sistema immunitario del paziente, che è stato distrutto dopo il trattamento chemioterapico. Esistono due tipi di trapianto : Autologo (il donatore e il ricevente sono la stessa persona) ed Allogeneico (il donatore è una persona che presenta con il paziente un'alta compatibilità del gene del complesso maggiore di istocompatibilità , gene HLA).



# Fonti HSC



- Midollo osseo
- Sangue del cordone ombelicale
- Liquido amniotico
- Sangue periferico

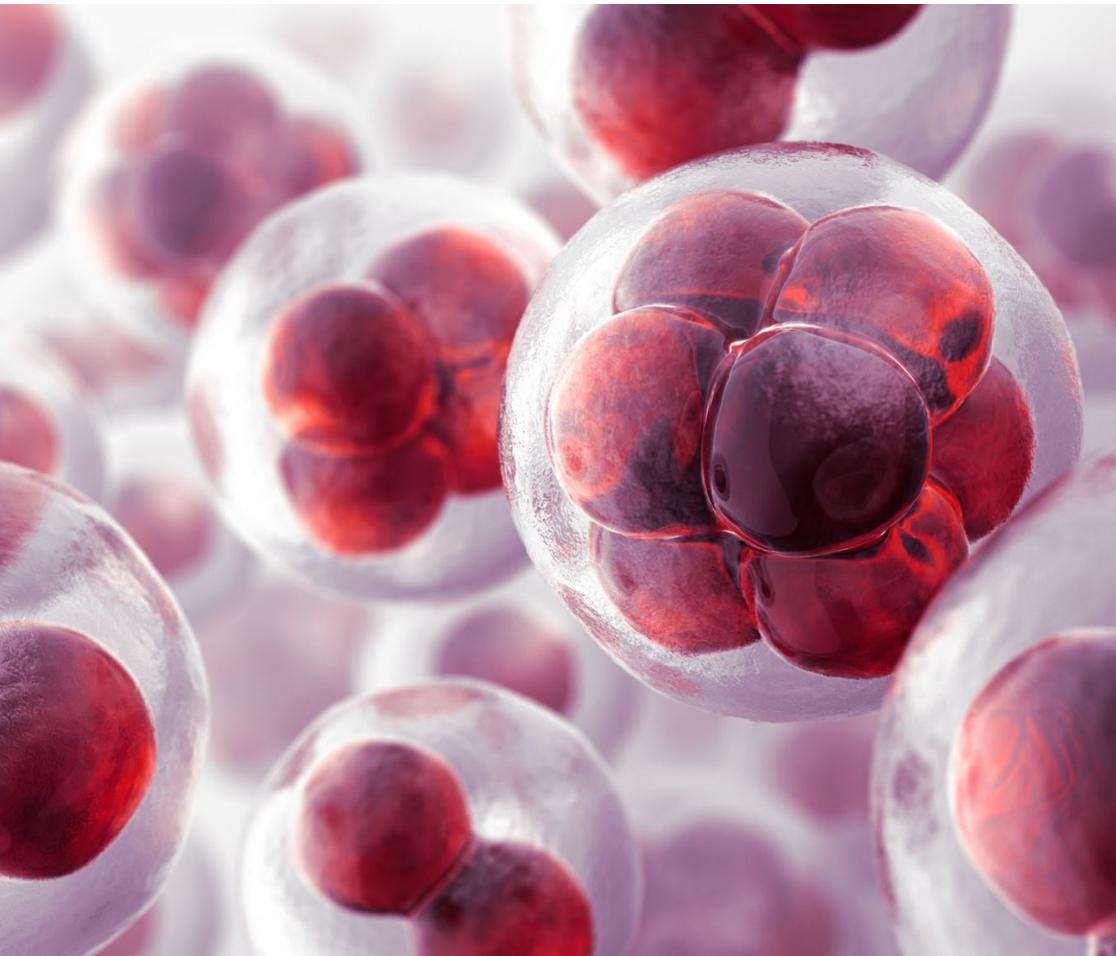
# Effetti citochine su funzione immunitaria

Caratteristiche	Immunità innata	Immunità specifica
esempi	<b>TNF, IL-1</b> , IL-12, IFN- $\gamma$	<b>IL-2</b> , IL-4, IL-5, INF- $\gamma$
cellule	Macrofagi e NK	Linfociti T
Funzioni	Su immunità innata, sistemico e locale. <b>Diapedesi neutrofili e monociti.</b>	<b>Prolifera</b> zione e <b>differenziamento</b> dei Linfociti, attivazione macrofagi, eosinofili e mastociti. Locale
Stimoli	LPS, peptide glicani batterici, RNA virale citochine dai Linfociti T (INF- $\gamma$ )	Ag proteici
Livelli	Elevati sierici	Bassi non rilevabili nel siero
Inibitori	Corticosteroidi	Ciclosporine, FK-506

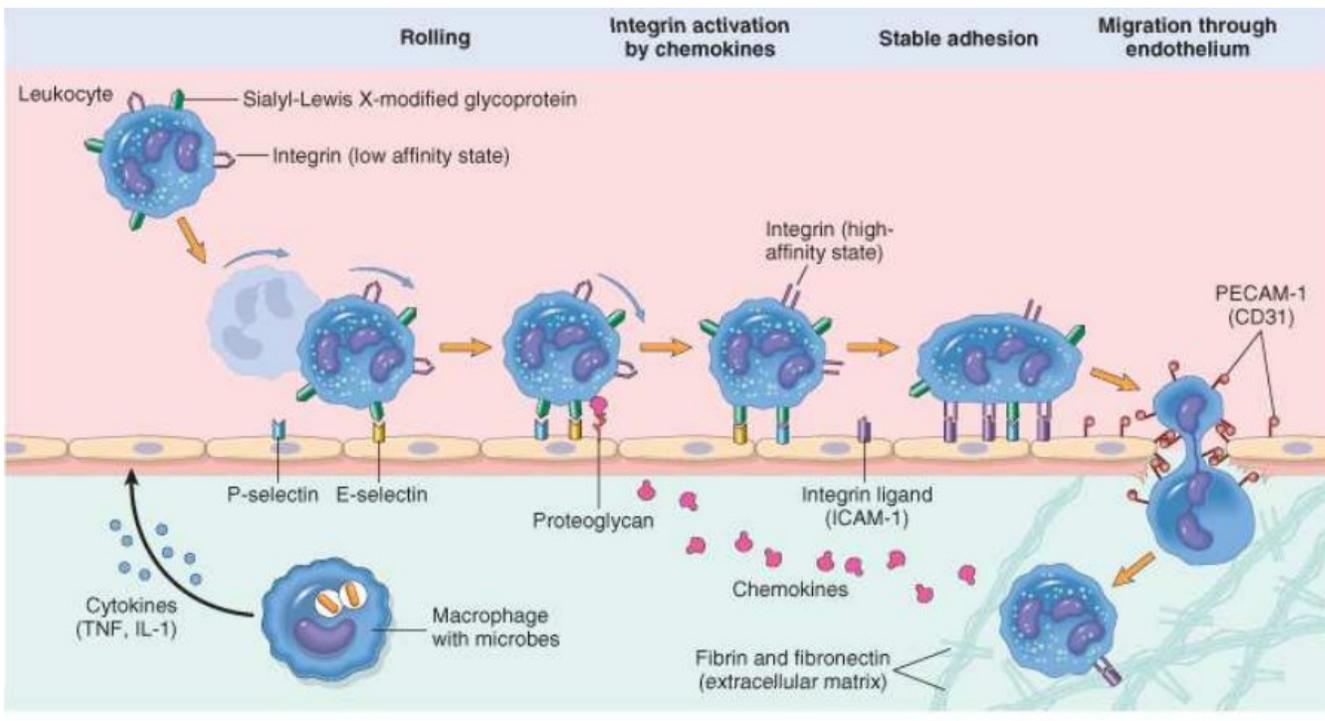
# Effetti su infiammazione acuta e cronica

- Esordio rapido (secondi o minuti) •Durata relativamente breve (da pochi minuti a diverse ore, fino ad alcuni giorni) •Formazione di un essudato composto da liquido e proteine del plasma (EDEMA) •Migrazione dei leucociti, soprattutto neutrofili
- Guarigione successiva all'infiammazione
  
- Maggiore durata (settimane, mesi) •Presenza di linfociti e macrofagi
- Infiammazione e tentativi di guarigione simultanei •Proliferazione di vasi sanguigni
- Fibrosi e necrosi tissutale

# Fase acuta



- Alterazioni del calibro vascolare
- Modificazioni strutturali nella microvascolarizzazione che consentono fuoriuscita dei leucociti dal microcircolo

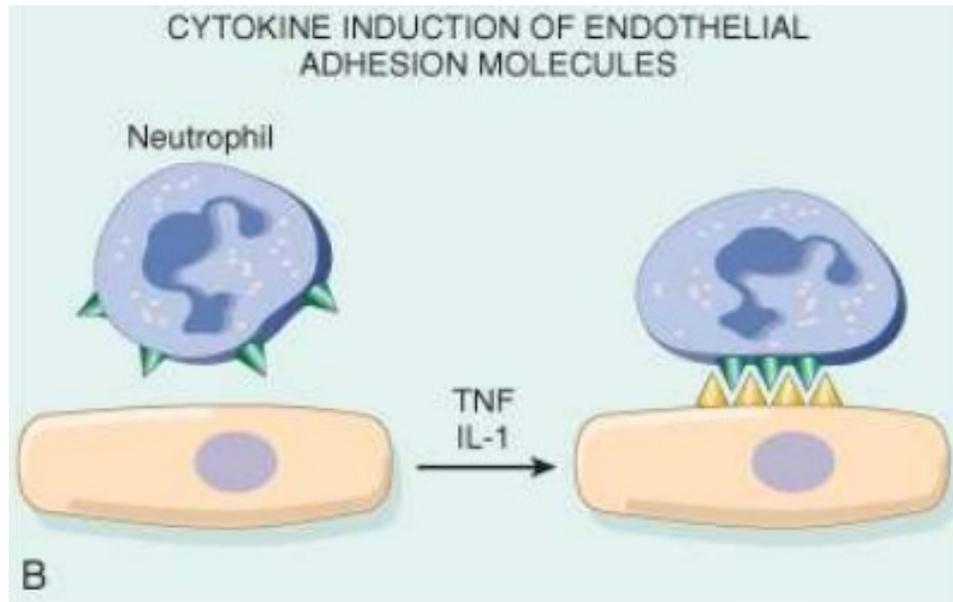


Attivazione dell'endotelio per acquisire la capacità di legare i leucociti (rolling e diapedesi)

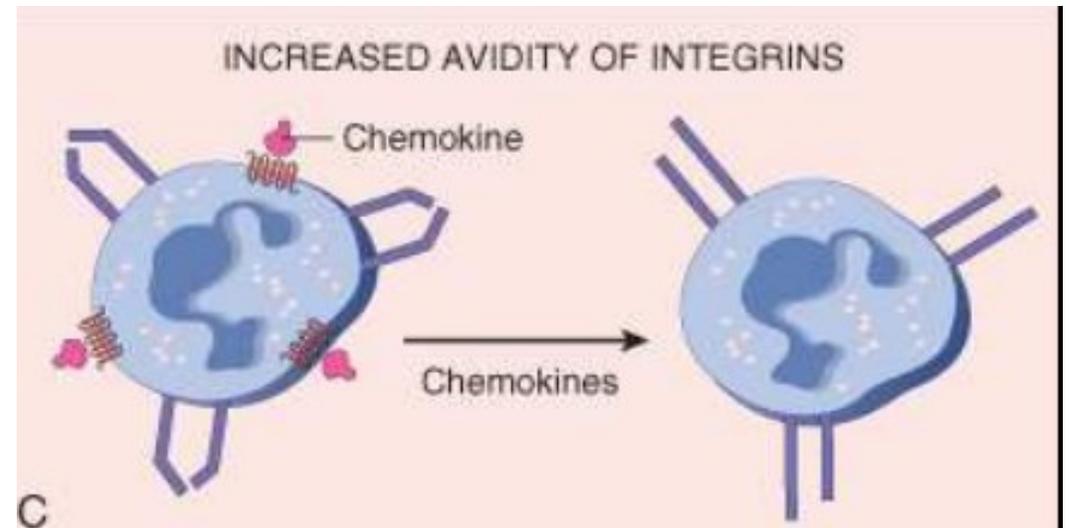
Selectine → glicoproteine

I-CAM V-CAM PECAM → integrine

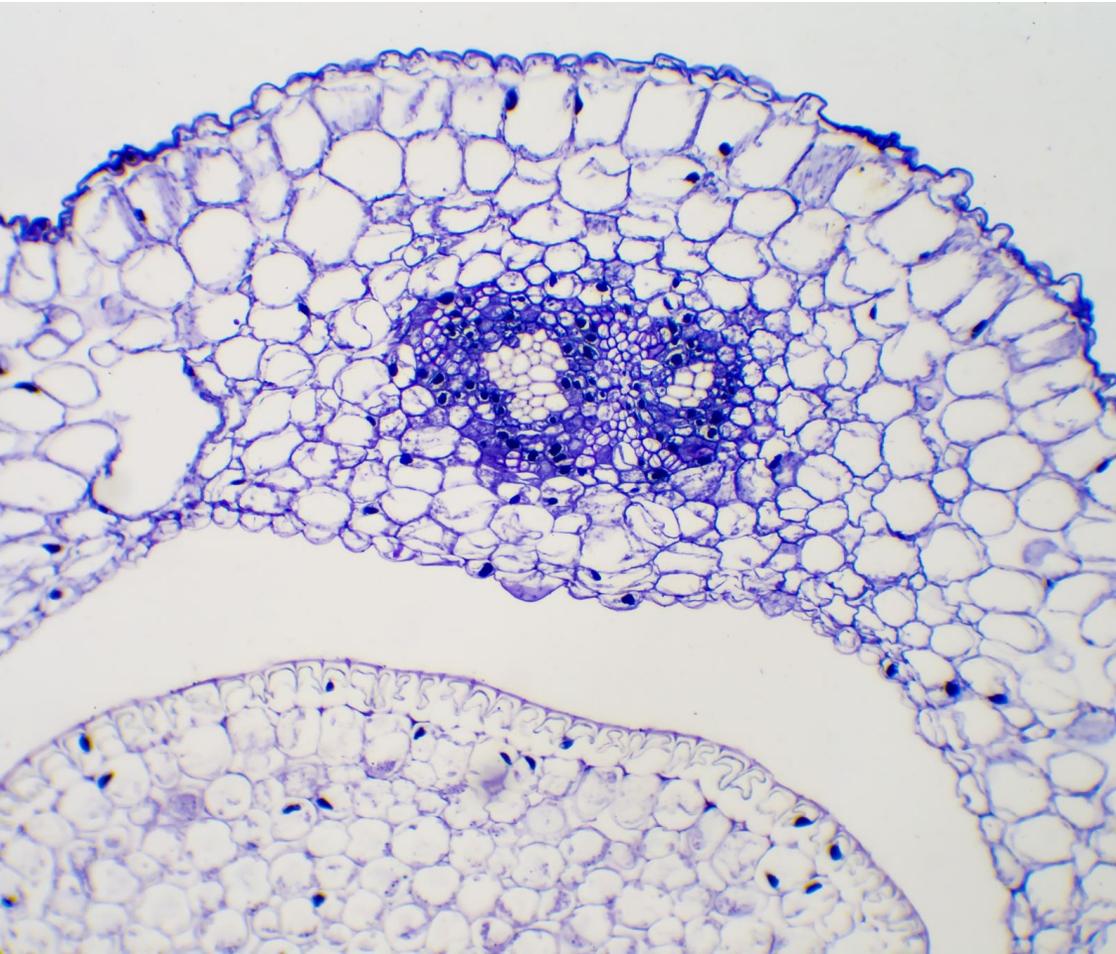
TNF, IL-1



Chemokine



# Fase acuta



- Il macrofago è il principale protagonista cellulare dell'inflammatione cronica.

Altre cellule sono leucociti, plasmacellule, eosinofili e mastociti

- Vengono attivati da vari stimoli (citochine, endotossine batteriche, altri mediatori chimici)

# Citochine e tumori

evasione dall'apoptosi e dei meccanismi di risposta infiammatoria

- autonomia di crescita
- insensibilità ai segnali anti-crescita

neoangiogenesi e supporto crescita

- potenziale replicativo illimitato
- invasione e metastasi

Innate immunity  
(rapid response)

Adaptive immunity  
(slow response)

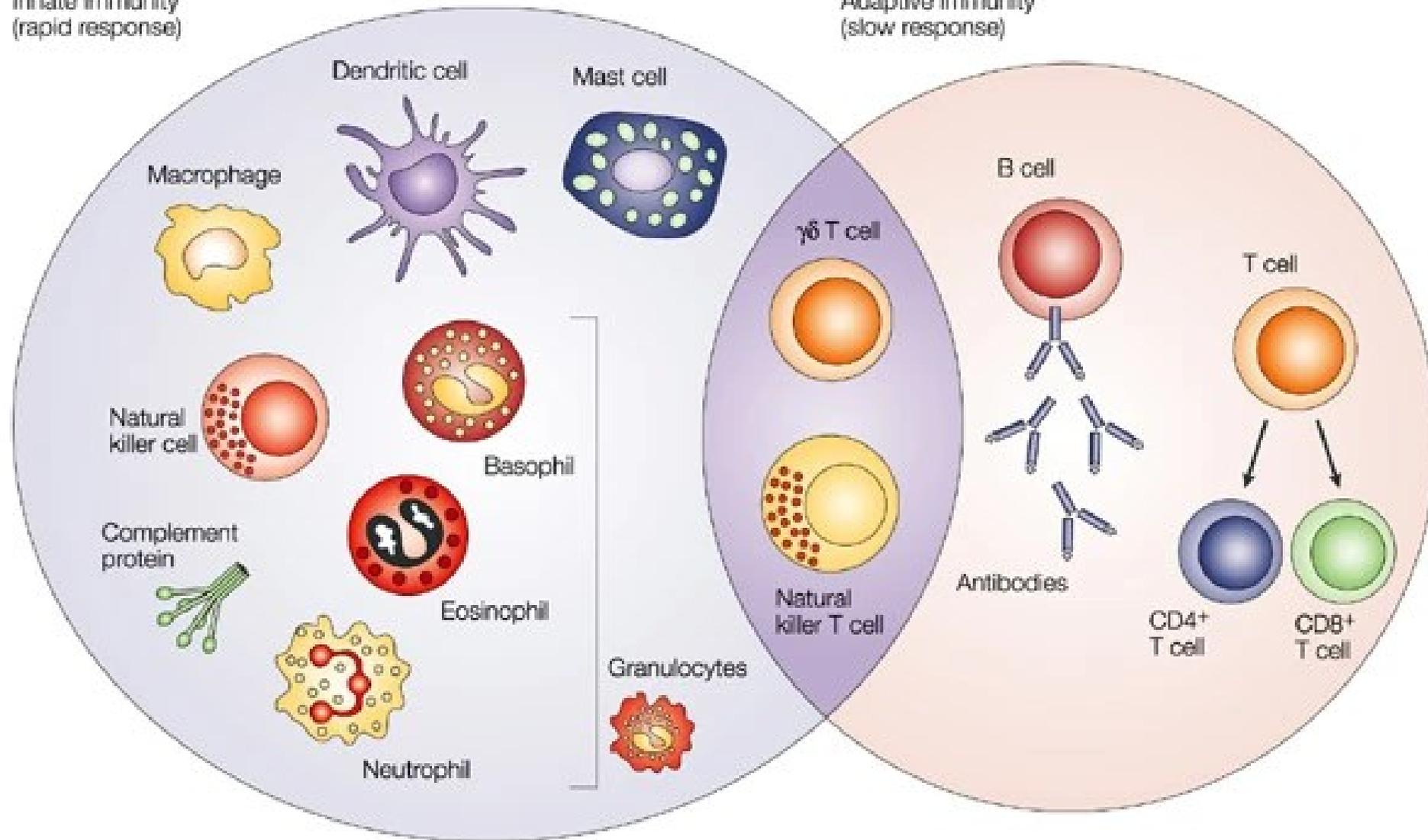


Table 1 | **Roles for endogenous cytokines in tumour pathogenesis\***

<b>Cytokine</b>	<b>Cellular sources</b>	<b>Role in tumour formation</b>	<b>References</b>
Il-1	Macrophages, dendritic cells, B cells, natural killer cells, keratinocytes	Required for tumour invasion and angiogenesis	58
Il-6	Macrophages, T cells, B cells, endothelial cells, fibroblasts	Required for chemically induced lymphomas	55,56
Il-12	Macrophages, dendritic cells, neutrophils	Inhibits chemical carcinogenesis	31
Il-15	Macrophages, dendritic cells	Promotes natural killer T cell leukaemias	52
Ifn- $\gamma$	Natural killer cells, natural killer T cells, T cells, B cells, macrophages, dendritic cells	Inhibits chemical carcinogenesis; inhibits lymphomas (especially with perforin); Stat1 and Rag2 inhibit carcinomas	27–29,32,39
M-csf	Macrophages, endothelial cells, fibroblasts, bone-marrow stroma	Promotes breast cancer invasion	57
Gm-csf	Respiratory epithelial cells, T cells, natural killer cells, natural killer T cells, macrophages, eosinophils, endothelial cells, fibroblasts	Inhibits lymphomas and carcinomas (with Ifn- $\gamma$ and Il-3)	42
Tnf- $\alpha$	Macrophages, natural killer cells, B cells, T cells, neutrophils, fibroblasts, keratinocytes	Required for chemically-induced skin cancers	54
Mif	Macrophages, T cells, eosinophils, fibroblasts, keratinocytes, pituitary	Inhibits p53 tumour-suppressor functions	53
Tgf- $\beta$	T cells, B cells, macrophages, platelets, bone-marrow stroma, eye, testis	Inhibits colon carcinomas (with Rag2)	44
Fas– Fas ligand	B cells, T cells, hepatocytes, colon, ovary, respiratory epithelial cells	Inhibits lymphomagenesis	40

\*Data from experiments in immunodeficient mice. Gm-csf, granulocyte–macrophage colony-stimulating factor; Il, interleukin; M-csf, macrophage colony-stimulating factor; Mif, macrophage-migration inhibitory factor; Tgf- $\beta$ , transforming growth factor- $\beta$ ; Tnf, tumour-necrosis factor.

Table 2 | **Cytokines as cancer therapy**

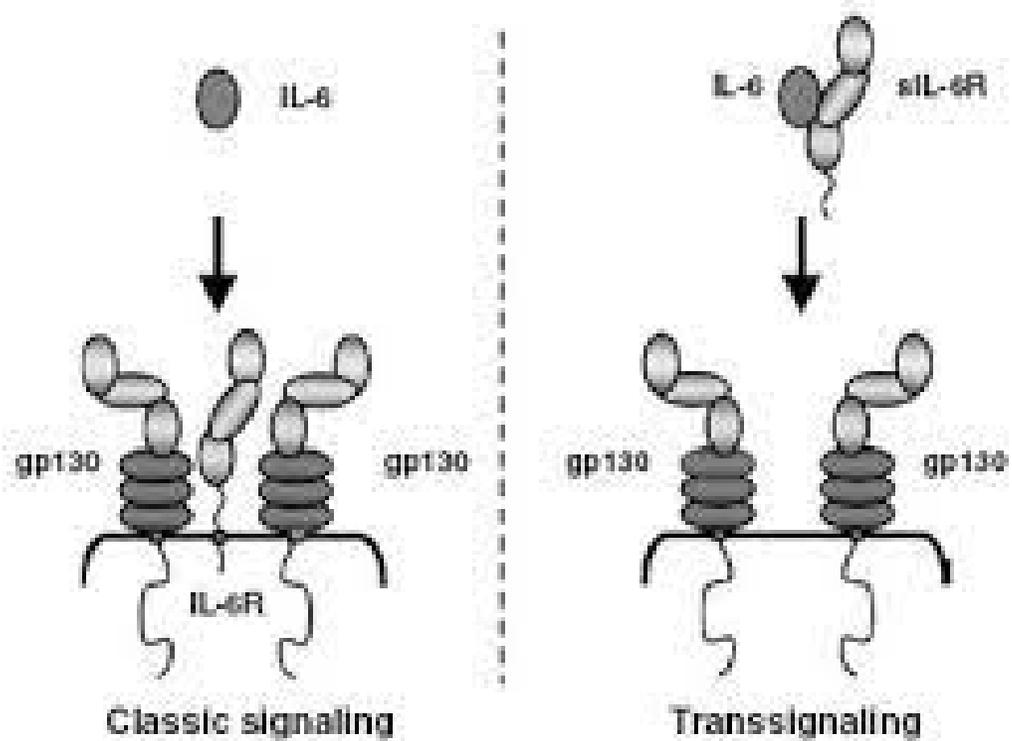
<b>Cytokine</b>	<b>Therapeutic actions</b>	<b>Clinical administration</b>	<b>Phase of clinical trials</b>	<b>References*</b>
IL-2	Enhances NK cell and CD8 <sup>+</sup> T-cell function; increases vascular permeability	Systemic, local	III	67,68,118,119
IL-3	Enhances tumour antigen presentation	Systemic	II	120
IL-4	Enhances eosinophil function and T-cell activation	Systemic, local	I	121,122
IL-6	Enhances T-cell and B-cell function; inhibition of IL-6 reduces lymphoproliferation	Systemic, local	I	123
IL-7	Enhances T-cell function	Local	I	124
IL-10	Inhibits tumour antigen presentation	Pending		125
IL-12	Enhances T <sub>H</sub> 1 immunity and cytotoxicity; inhibits angiogenesis	Systemic, local	I-II	126
IL-13	Inhibits cytotoxicity against viral neoplasms	Pending	-	127
IL-15	Enhances cytotoxicity	Pending	-	128
IL-18	Enhances T <sub>H</sub> 1 immunity and cytotoxicity; inhibits angiogenesis	Pending	-	129
M-CSF	Enhances macrophage function	Systemic	I-II	130
GM-CSF	Enhances tumour antigen presentation	Systemic, local	II-III	79
IFN- $\alpha$	Enhances tumour antigen presentation and cytotoxicity	Systemic	III	131
IFN- $\gamma$	Enhances tumour antigen presentation and cytotoxicity	Systemic, local	III	30
TNF- $\alpha$	Induces tumour-cell apoptosis; activates endothelium and granulocytes	Systemic	III	132
TRAIL	Induces tumour-cell apoptosis	Pending	-	133
FLT3 ligand	Stimulates dendritic-cell and NK-cell function	Systemic	I-II	134
Lymphotoxin	Enhances T-cell recruitment	Local	I	135
TGF- $\beta$	Inhibits T-cell effector function	Pending	-	136

\*Please note that space limitations preclude a detailed listing of all relevant references. GM-CSF, granulocyte-macrophage colony stimulating factor; IFN, interferon; IL, interleukin; M-CSF, macrophage CSF; TGF- $\beta$ , transforming growth factor- $\beta$ ; TNF, tumour-necrosis factor; NK, natural killer; T<sub>H</sub>1, T helper type-1; TRAIL, TNF-related apoptosis-inducing ligand.

# Citochine e tumori

IL-2 and IFN- $\alpha$ , demonstrated mild clinical benefit and consequently received The Food and Drug Administration (FDA) approval for the treatment of several malignant diseases. IL-2 was approved for the treatment of advanced renal cell carcinoma (RCC)<sup>3</sup> and metastatic melanoma,<sup>4</sup> whereas IFN- $\alpha$  was approved for the treatment of hairy cell leukaemia,<sup>5</sup> follicular non-Hodgkin lymphoma,<sup>6</sup> melanoma<sup>7</sup> and AIDS-related Kaposi's sarcoma.

# IL-6



è una citochina prodotta da monociti/macrofagi, cellule endoteliali e fibroblasti

reattività immunitaria, nella risposta di fase acuta, nell'oncogenesi e nella ematopoiesi.

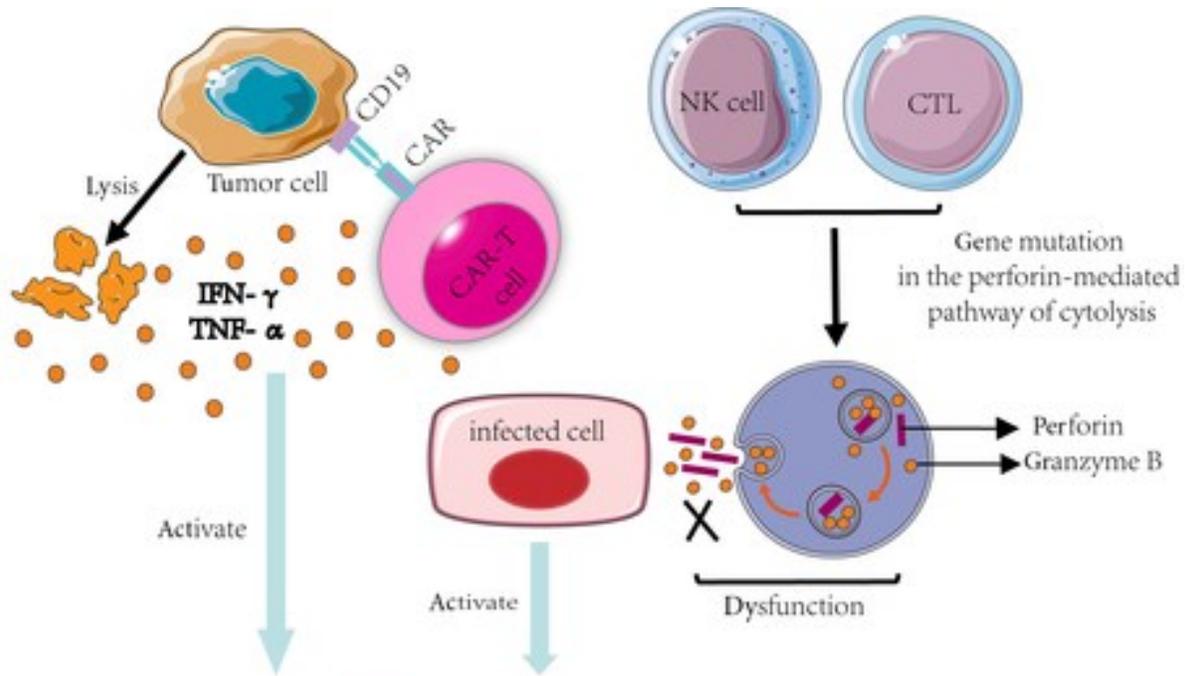
Il rilascio di questa citochina è stimolato da TNF- $\alpha$  e IL-1

Risposta intracellulare chinasi legata ad associazione complesso IL-6/IL-6R con glicoproteine gp130

# TNF-alpha

Nelle prime fasi della risposta infiammatoria, citochine quali IL-1, IL-6 e TNF- $\alpha$  stimolano rilascio delle proteine note come “proteine di fase acuta”.

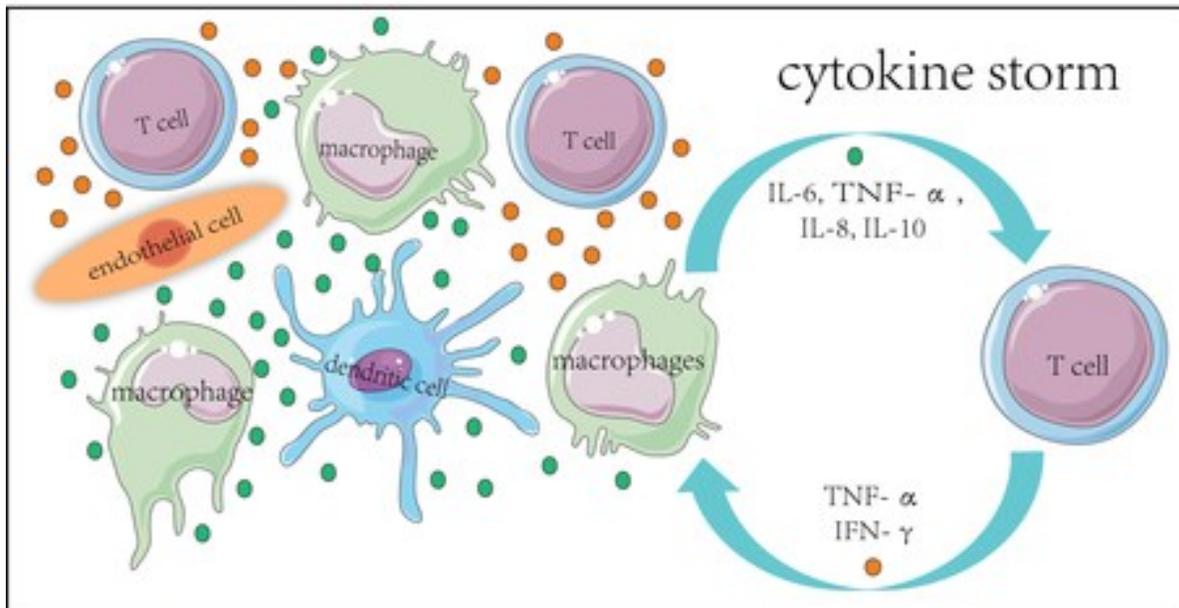
Il TNF- $\alpha$  e la interleuchina 6 (IL-6) sono anche le principali citochine rilasciate durante l'infiammazione cronica, sono note per stimolare la proliferazione delle cellule tumorali, la loro sopravvivenza e la loro disseminazione.



# Cytokine storm

eccessiva attivazione delle cellule T (sia Th che CD8+)

elevati livelli sierici/plasmatici di citochine pro-infiammatorie e chemochine (IL-2, IL-6, IL-7, IL-10, granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF), IP-10, MCP-1, MIP-1 and TNF- $\alpha$ )



Tocilizumab  
(RoActemra®  
concentrato per  
soluzione per infusione  
20 mg/ml) è un  
anticorpo monoclonale  
umanizzato in grado di  
legarsi in modo  
aspecifico ai recettori  
dell'IL-6 sia solubile  
(sIL-6R) che di  
membrana  
(mIL-6R), dimostrando  
di inibire i segnali da  
essi mediati.



*Tocilizumab nella terapia dei pazienti adulti con COVID-19*  
CTS, 09 giugno 2021

Si forniscono di seguito elementi utili ad orientare la prescrizione e a definire un rapporto fra i benefici e i rischi del medicinale sul singolo paziente.	
<i>Per quali pazienti è raccomandabile?</i>	<p>Alla luce delle attuali conoscenze l'utilizzo di tocilizumab può essere rimborsato dal SSN per il trattamento di soggetti adulti ospedalizzati con COVID-19 grave e/o con livelli elevati degli indici di infiammazione sistemica.</p> <p>In particolare, si considerano candidabili al trattamento con tocilizumab i pazienti ospedalizzati con condizioni cliniche rapidamente ingravescenti:</p> <ul style="list-style-type: none"><li>• Pazienti recentemente ospedalizzati ricoverati in terapia intensiva da meno di 24/48 ore che ricevono ventilazione meccanica o ossigeno ad alti flussi; oppure pazienti recentemente ospedalizzati con fabbisogno di ossigeno in rapido aumento che richiedono ventilazione meccanica non invasiva o ossigeno ad alti flussi in presenza di elevati livelli di indici di flogosi (CRP≥75</li></ul>

# Metodi di dosaggio delle citochine

## Diretti

Immunodosaggi

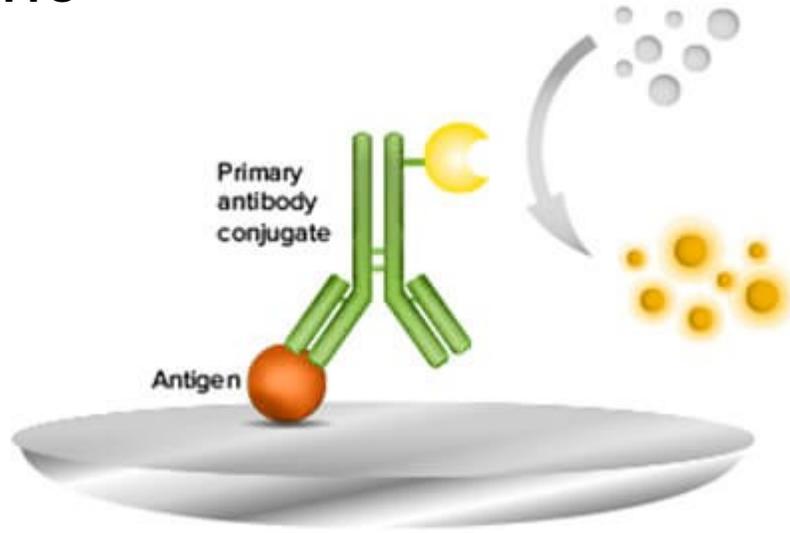
Citofluorimetria

## Indiretti

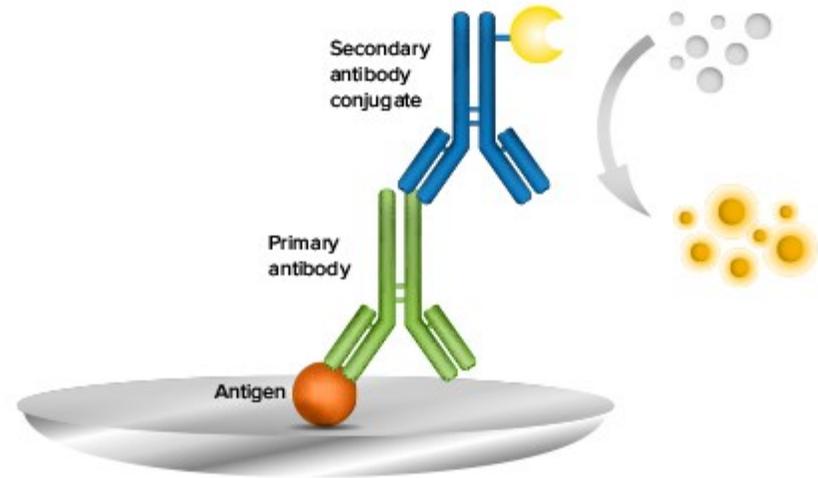
Proliferazione

migrazione

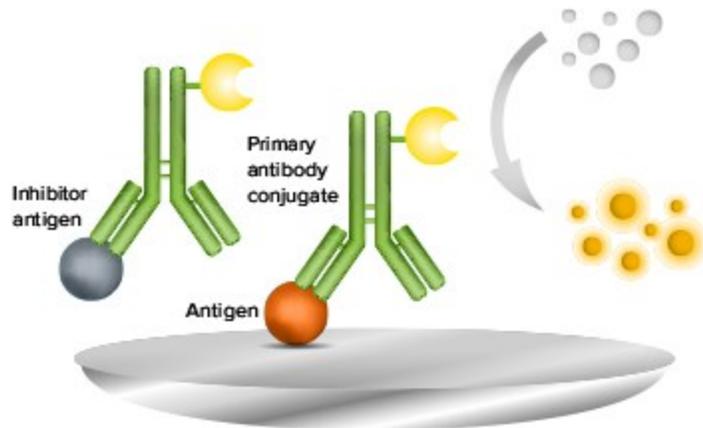
## DIRETTO



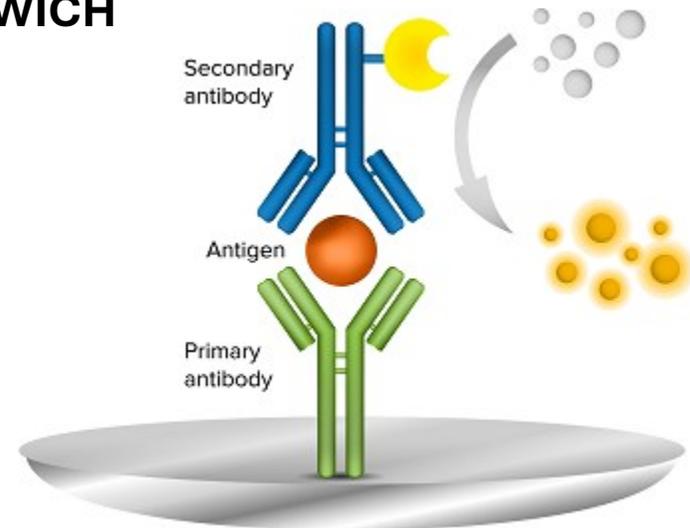
## INDIRETTO



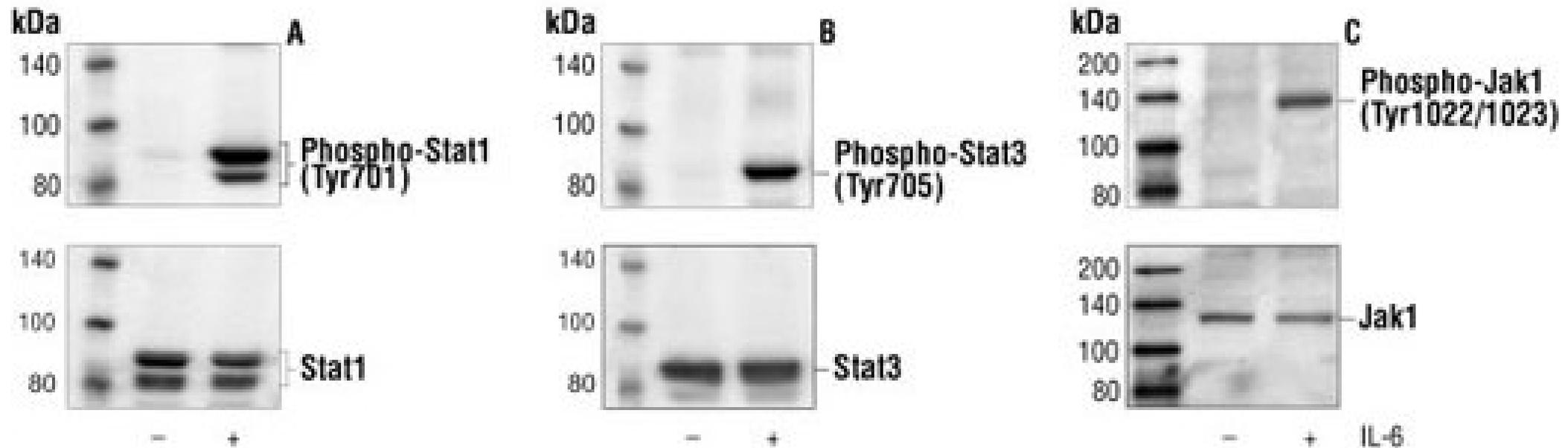
## COMPETITIVO



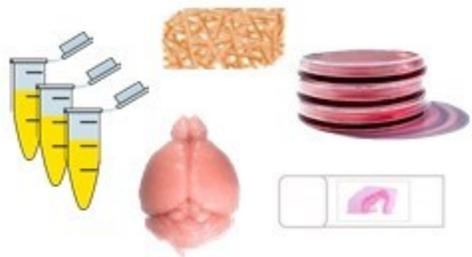
## SANDWICH



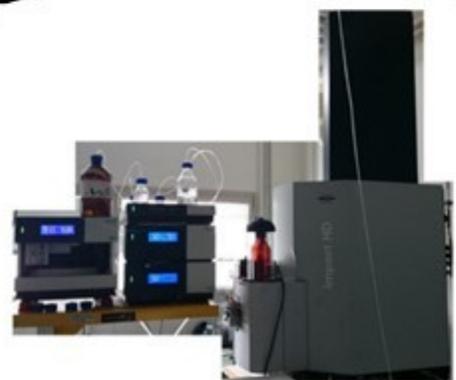
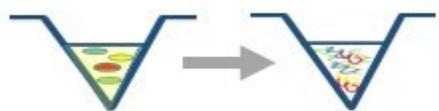
# Metodi di dosaggio delle citochine



# Biological Samples



# Sample Prep

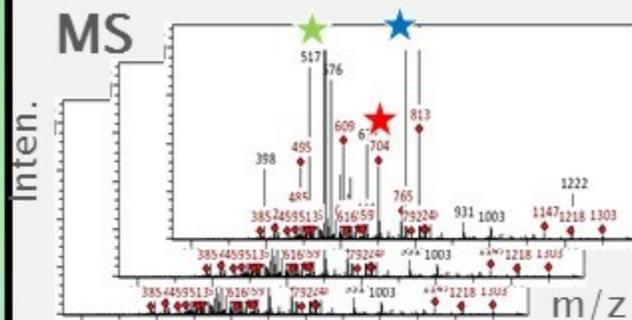


# LC-ESI-MS/MS

WHAT?

HOW MUCH?

## PROTEIN/PEPTIDE IDENTIFICATION



MS/MS

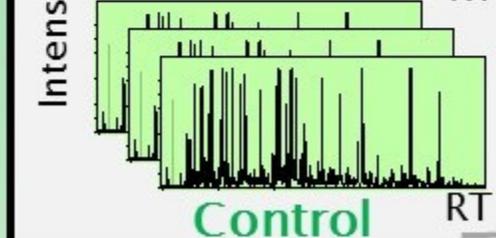
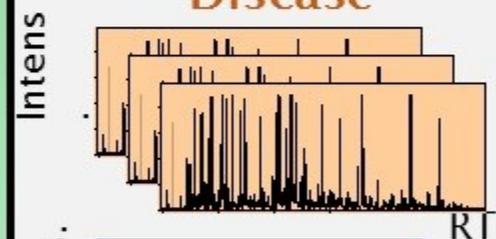
### Protein ID List

ADT1	CMTD1	DLG4	IMF1	MOM	NDU51	NMD21	PPA	SH3A7	TBCC	VSL1
AT1A3	CNTN1	DPYL2	IGEC1	MBP	NDU52	NRX1A	QCR1	SPTA2	TBB3	VPP1
ATPA	COXA	DYN1	IGEC2	MPOF	NDU57	NBF	QCR2	SPTB2	TBB5	
ATPB	CTNA2	ERC2	KCC2A	MTGH1	NDU57	ODD1	RAB35	SRON1	TENR	
BAIP2	CTRO	FLOT2	KCC2B	MYH10	NDU58	ODP2	RMS1	STX1A	TOM40	
BAIP1	DLG2	GDOL1	KCC2D	MYO5A	NDU51	ODP8	RL8	STX1B	TOM70	
BEGIN	DLG3	GDAP1	KCC2G	MYPR	NDU52	OPF1	RPG4	STX1E	VAD1	
BSN	DLG4	GLPK	KCC16	NDU47	NDUM	PH8	SEPT8	SYN2	VAPA	
CI12	DLG1	GRN2	KF2A	NDU48	NFL	PHB2	SFND	SYNP	VATB2	
CL1	DLG2	HSP7C	LPA2	NDU49	NFM	PKN	SHAN2	SYT1	VDAC1	
CMC1	DLG5	HOK1	LINC7	NDU4C	NMDE2	PLEC	SHAN3	TBA1B	VDAC2	

### Peptide sequence

HNIVK	PGSTPTVTVQANLK	MSA_HUMAN
MYVSLVYAN	DFGDDVYVTER	CA_TE_HUMAN
LESDI	DSCEVSDVYVDFPSSSK	EBF_HUMAN
IQRFQVYV	DSQDQVYVSEELK	GBB_HUMAN
VLLDGA	HDFAPQDEDFR	GD_HUMAN
VLLLEDFAPQ	SEPKS	PTA_VDQVYVDFR
QVTLAV	AVDQDQVYVDFR	SLD3_HUMAN
SLKPD	QVYVDFR	SLD3_HUMAN
LDQVYV	AVDQDQVYVDFR	PTT_HUMAN
LDQVYV	AVDQDQVYVDFR	SLD3_HUMAN

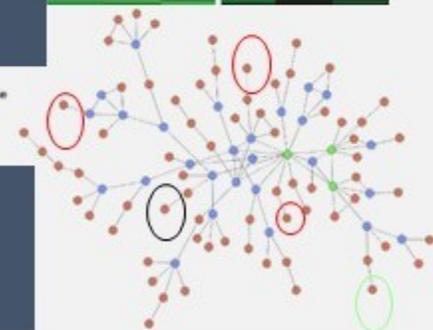
## Disease



Relative Abundance (Fold change)

Decrease No change Increase

Absolute Abundance [ug/u]



MS based Proteomics: qualitative and quantitative aspects

# Metodi di dosaggio delle citochine

La citofluorimetria consente l'analisi veloce ed automatica di popolazioni cellulari in sospensione misurandone le caratteristiche fisiche e/o biochimiche (volume, granulosità, antigenicità).

- Sistema fluido per il trasporto del campione
- Sistema di eccitazione, una o più sorgenti luminose, solitamente laser
- Sistema ottico-elettronico che raccoglie segnale luminoso e converte in segnale elettrico
- Computer di analisi dati

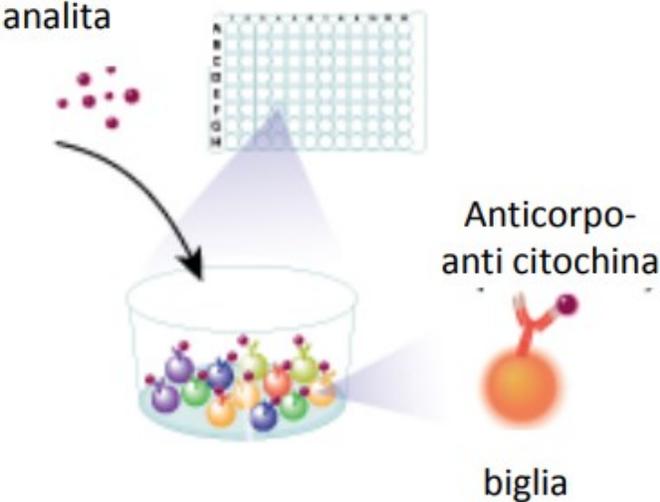
# Bead based multiplex assays

consentono il rilevamento e la quantificazione simultanea di più citochine e chemochine. Questa tecnologia ad alto rendimento produce risultati paragonabili all' ELISA ma con maggiore efficienza, sensibilità, velocità e gamma dinamica.

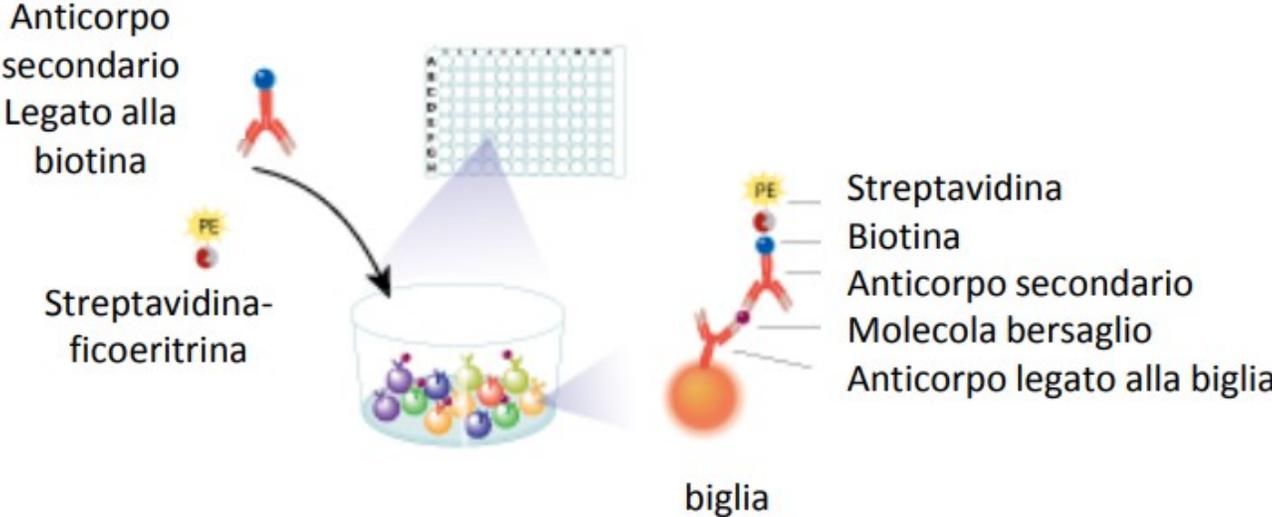
Dosaggio basato su [microsfere magnetiche](#) di diametro 5.6µm sulla cui superficie è legato un [anticorpo specifico per la citochina](#) che vogliamo quantificare

# Saggio: procedura

## Fase 1

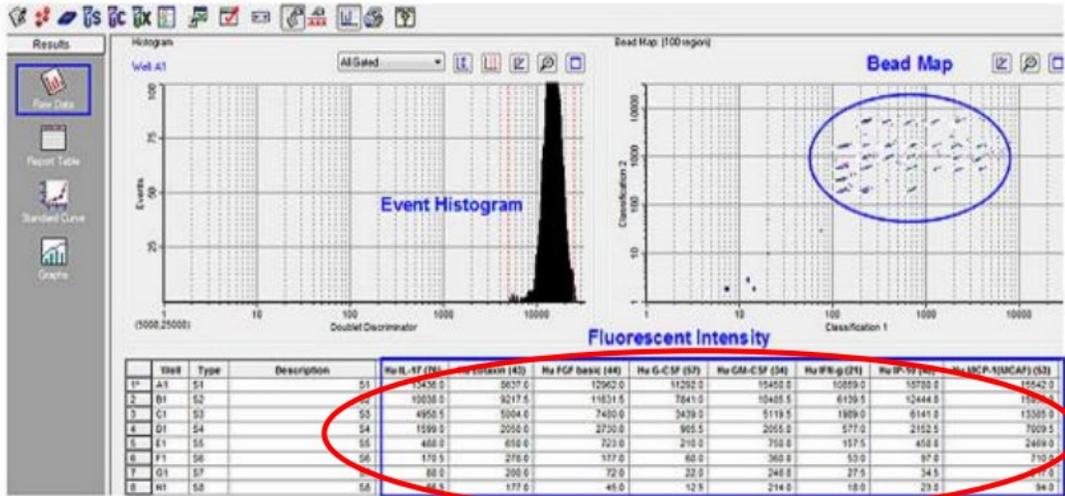


## Fase 2



Doppio laser;  
biglia ed eccitazione fluoroforo





## Analisi del dato

Re IL-17a (21)	Obs Conc	Exp Conc	(Obs/Exp) * 100
	25244.19	34015.00	74
	9221.96	8503.75	108
	2039.84	2125.94	96
	559.64	531.48	104
	136.04	132.87	102
	32.64	33.22	96
	7.75	8.30	93
	2.29	2.08	

← Recovery percentage

Per ogni campione

## Esempio

	IL18	IL1RA	IL2	IL4	IL5	IL6	IL7	IL8	IL9	IL10	IL13	IL15	IL17	EOTAXIN	FGF	GCSF	IFNG	IP10	MCP1	MIP1A	MIP1B	PDGFB	RANTES	TNFA	VEGF
campione 1	0,83	50,37	14,53	1,43	11,12	0,71	10,9	152,58	53,12	12,22	2,64	138,56	1,22	5,42	98,18	169,97	0	11,86	9,24	4	21,58	0	347,76	21,86	196,33
campione 2	0,2	20,31	0	0	0,51	0,63	0	49,58	0	0,61	0	0	0	0	0	4,77	0	0	11,85	5,94	0	0	4,28	5,16	0
campione 3	0,83	16,23	0	0	1,73	0	0	71,37	5,57	0,95	0	0	0	0,03	0	4,77	0	0	0	0,68	6,1	0	123,77	5,16	0
campione 4	1,95	28,18	0,84	0,15	1,73	0,11	0	135,16	19,16	0,84	0	0	0	0,5	0	0	0	2,35	3,96	0,49	21,35	1,33	503,63	11,28	70,58
campione 5	0,2	28,18	0	0	0,51	0,55	0	42,67	0	0,61	0	0	0	0	0	11,03	0	0	7,94	4,58	0	0	1,62	3,3	0
campione 6	0,48	20,31	0	0	0,51	0	0	55,14	2,55	0,61	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,49	2,95	0	86,43	1,3	61,3
campione 7	3,96	20,31	0,34	0,15	3,42	0	0	291,2	24,17	0,84	0	46,18	0	0,47	20,5	15,31	0	7,24	9,24	0,73	25,58	13,35	860,26	20,28	141,94
campione 8	0,11	12,01	0	0	0	0	0	0	0,38	0	0	0	0	0	0	0,73	0	0	0	0	0	0	*0,37	0	41,01
campione 9	0,2	20,31	796,9	0	1,73	0,11	0	325,91	16,04	1,06	1,58	0	0	0,33	0	45,36	0	0	23,58	13,02	20,63	0	518,08	47,55	149,06
campione 10	0,25	28,18	380,37	0	2,87	0,38	0	255,4	14,18	1,06	0,18	0	0	0,29	20,5	25,25	0	0	24,63	11,29	18,23	0	534,84	31,16	15,81
campione 11	0,79	28,18	11,25	0	2,87	0,11	0	231,34	24,17	1,06	0,51	38,88	0	0,43	0	27,7	0	0	4,24	6,8	21,86	0	699	17,07	193,08
campione 12	1,78	28,18	17,77	0,15	4,5	0,11	0	391,71	24,17	0,84	1,15	69,83	0	0,64	20,5	34,97	0	2,35	20,48	7,48	27,45	7,22	1370,67	23,44	228,01
campione 13	0,66	50,37	23,75	1,21	9,63	0,63	10,9	101,73	50,87	11	3,25	113,57	1,74	5,21	98,18	162,83	0	8,94	4,79	7,43	26,81	0	677,95	26,55	196,33
campione 14	0,16	28,18	398,22	0	2,31	0	0	42,67	9,85	0,38	0	0	0	0	0	6,61	0	0	1,24	10,92	0	0	264,57	23,44	125,47
campione 15	0,2	20,31	166,94	0	1,14	0,11	0	96,61	11,7	0,13	0	0	0	0,13	0	12,75	0	0	16,88	6,58	13,3	0	295,23	17,07	0
campione 16	0,83	28,18	2,71	0	1,44	0,11	0	108,35	19,78	0,38	0	0	0	0,29	0	7,51	0	2,35	1,62	1,39	18,23	0	456,69	15,44	56,48
campione 17	1,7	20,31	4,04	0,15	3,42	0	0	154,86	25,11	0,61	0	58,82	0	0,5	0	13,61	0	5,22	4,66	0,99	22,91	10,81	1045,29	13,79	240,32
campione 18	0,39	43,15	5,14	1,33	9,13	0,63	8,57	53,75	38,08	10,79	2,32	97,63	0,96	5,07	89,61	131,2	0	8,94	0	1,07	14,99	0	299,22	13,79	169,82
campione 19	0,11	12,01	197,19	0	1,14	0	0	29,1	9,85	0,84	0	0	0	0,13	0	13,61	0	0	1,95	11,6	0	0	272,37	18,68	166,42
campione 20	0,39	28,18	680,29	0,15	2,31	0,38	0	62,16	15,42	0,61	0	0	0	0,43	20,5	11,9	0	0	7,72	6,22	16,22	0	366,04	40,19	0
campione 30	0,11	20,31	307,12	0	2,31	0,11	0	76,37	8,01	0,49	0	0	0	0,13	0	11,9	0	0	6,2	4,75	10,52	0	350,6	20,28	38,24
campione 31	0,75	20,31	25,33	0,15	1,14	0	0	126,16	21,03	0,61	0	0	0	0,43	20,5	16,99	0	2,35	2,72	2,38	21,27	0	567,18	13,79	58,91
campione 32	1,87	12,01	10,84	0,15	2,31	0	0	248,15	23,23	0,61	0	42,64	0	0,5	20,5	23,62	0	5,22	11,46	3,03	23,64	6,2	876,8	17,07	166,42

# Metodi di dosaggio delle citochine

- Piccolo volume di campione necessario per l'analisi (in genere 50µl)
- Ampi intervalli quantitativi di analisi
- Permette lo studio di molecole presenti in molte tipologie diverse di fluidi biologici dai surnatanti di colture cellulari, al plasma, il siero , il fluido follicolare, la saliva, il liquido sinoviale, le lacrime etc

# Metodi di dosaggio delle citochine

Received: 25 May 2021

Revised: 19 October 2021

Accepted: 22 October 2021

DOI: 10.1002/jcb.30172

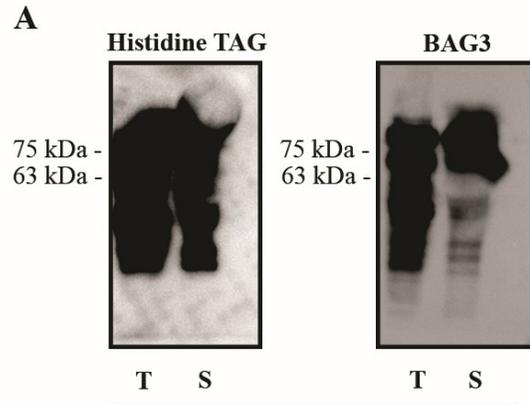
**RESEARCH ARTICLE**

Journal of **Cellular Biochemistry**

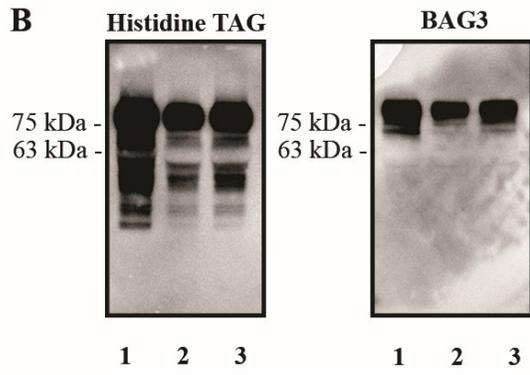
WILEY

## **BAG3 induces fibroblasts to release key cytokines involved in pancreatic cell migration**

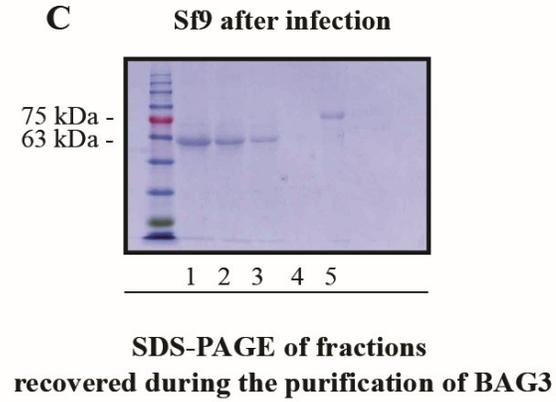
**Beatrice Dufrusine<sup>1,2</sup> | Verena Damiani<sup>1,2</sup> | Emily Capone<sup>1,2</sup> |  
Damiana Pieragostino<sup>1,2</sup> | Enrico Dainese<sup>3</sup> | Margot De Marco<sup>4,5</sup> |  
Francesca Reppucci<sup>4</sup> | Maria C. Turco<sup>4,5</sup>  | Alessandra Rosati<sup>1,4,5</sup>  |  
Liberato Marzullo<sup>4,5</sup> | Gianluca Sala<sup>1,2</sup> | Michele Sallese<sup>1,2</sup>  |  
Vincenzo De Laurenzi<sup>1,2</sup>**



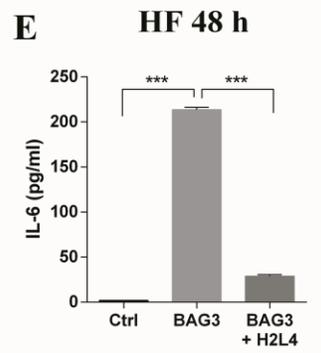
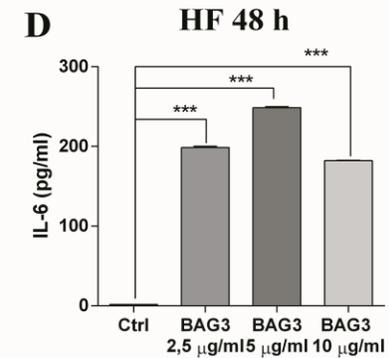
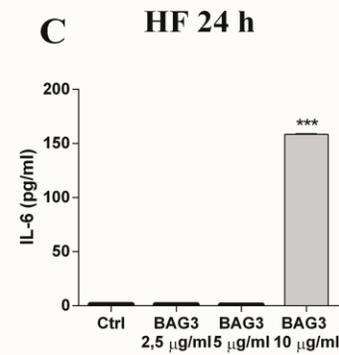
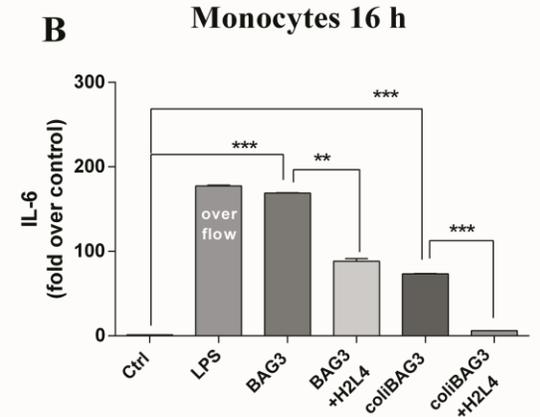
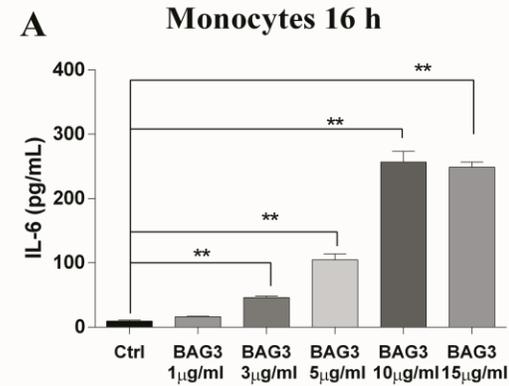
Sf9 high titer

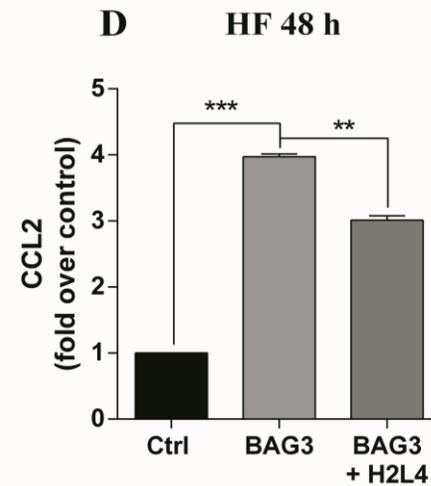
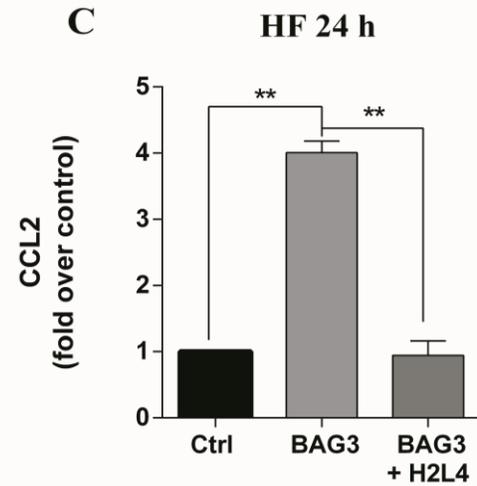
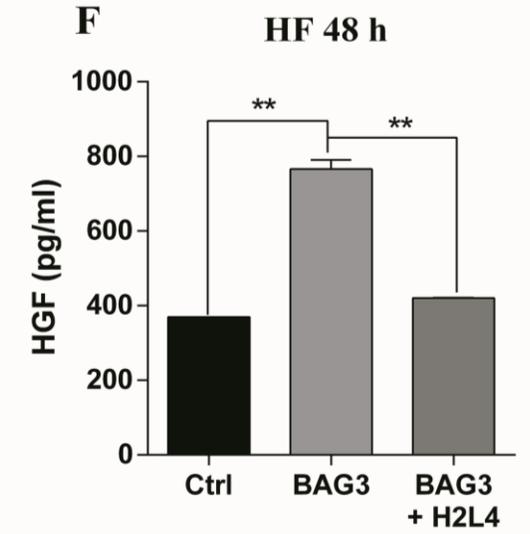
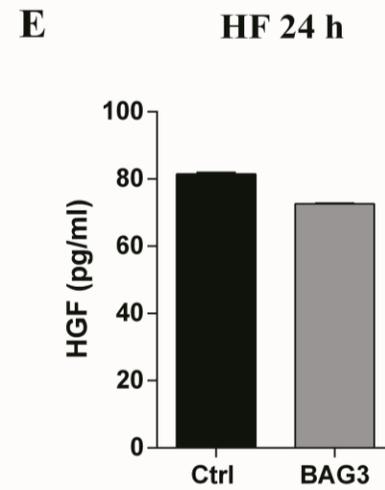
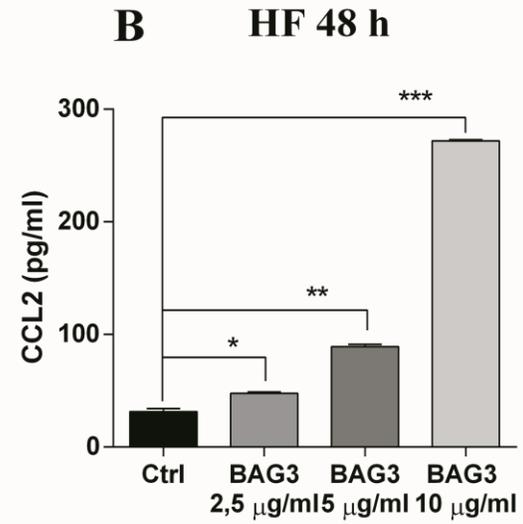
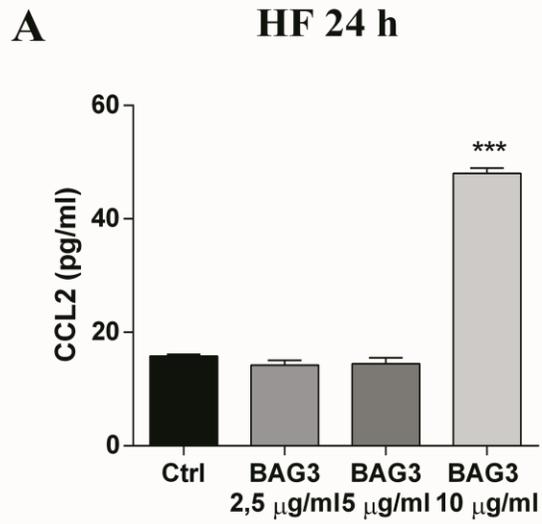


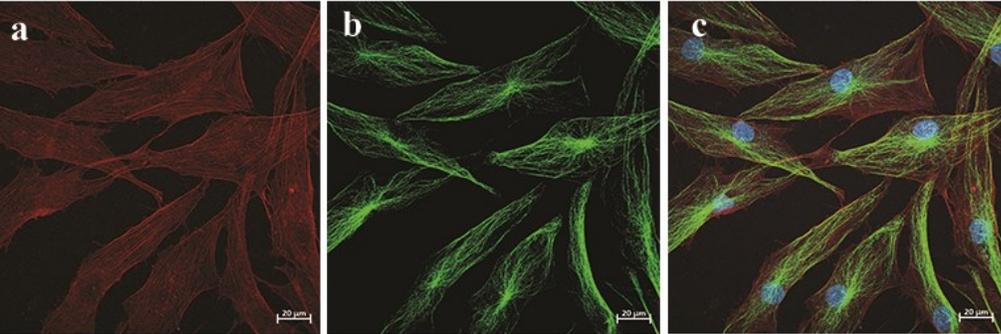
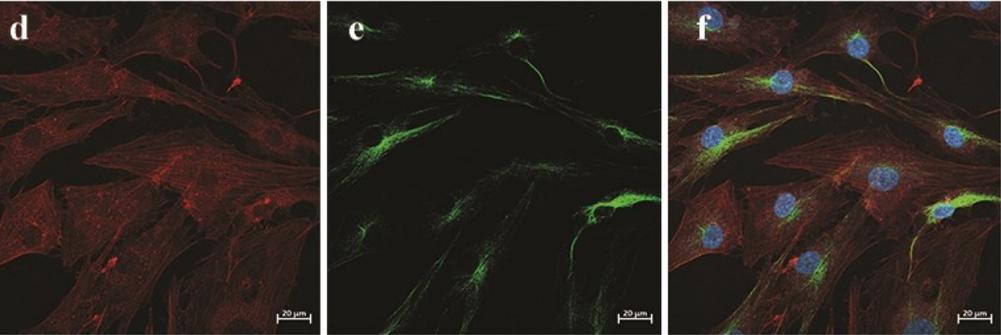
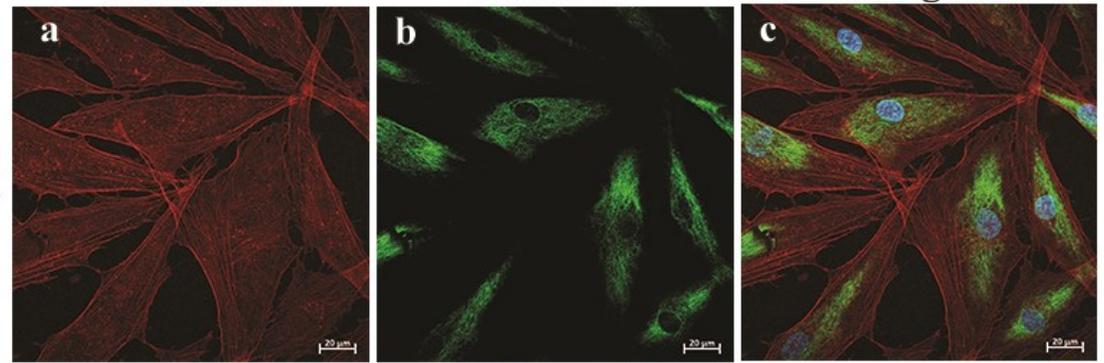
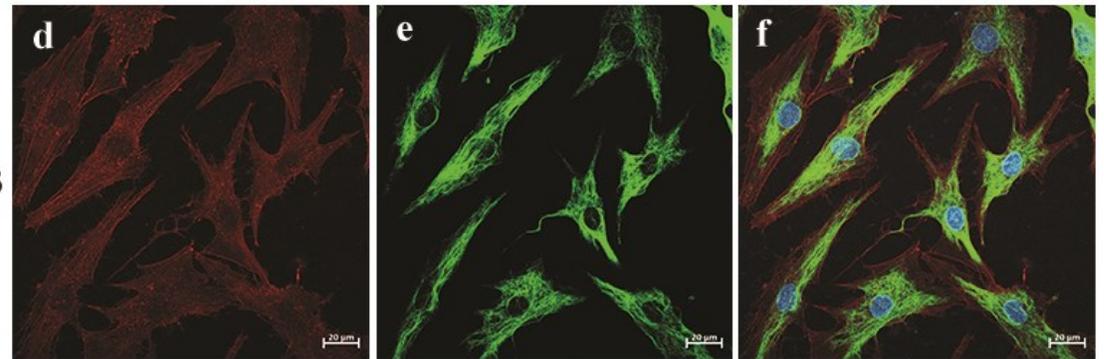
Sf9 after infection



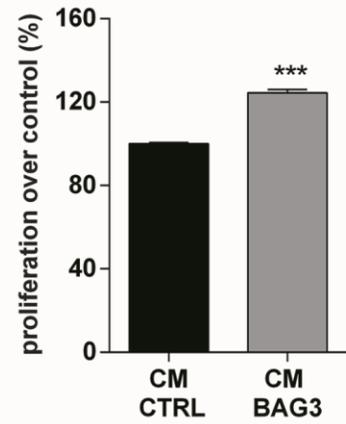
**Figure 1. BAG3 expression and purification using the baculovirus-insect cell expression system.** (A) Immunoblot using anti-histidine tag and anti-BAG3 antibodies of cellular (T) and secreted BAG3 (S) expressed in Sf9 infected with recombinant BAG3 baculovirus. (B) Immunoblot using anti-histidine tag and anti-BAG3 antibodies of three purification batches (lane 1, 2 and 3). (C) SDS-PAGE analysis of recombinant BAG3 produced in sf9 cells, purified by affinity and stained with Coomassie blue. Protein molecular weight standards, lane 1: total extract, lane 2: unbound fraction, lane 3-4: wash fractions and lane 5: elution fraction are shown.



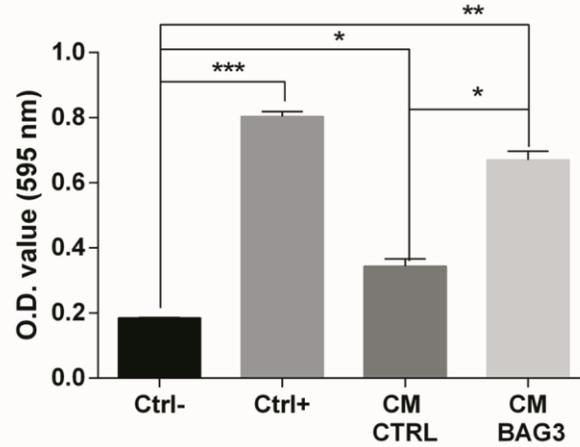


**B****Phalloidin****Tubulin****merge****Ctrl****BAG3****A****Phalloidin****Vimentin****merge****Ctrl****BAG3**

**A** MIA PaCa-2 48 h

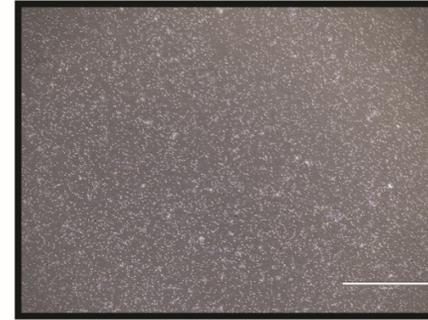


**B** MIA PaCa-2 24 h

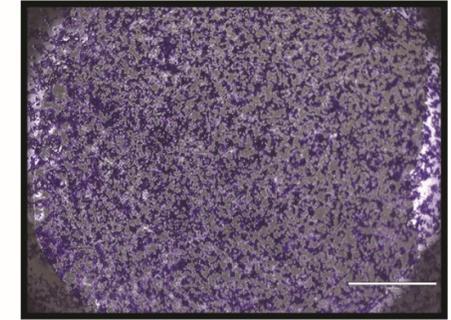


**C**

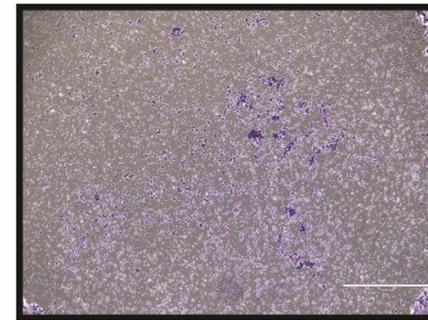
**Ctrl -**



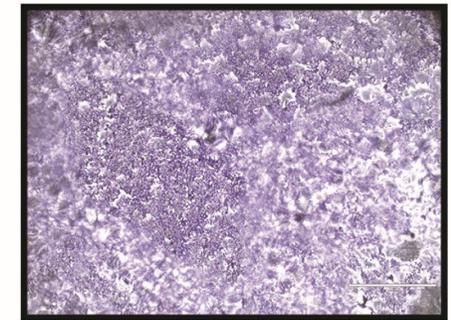
**Ctrl +  
FBS**

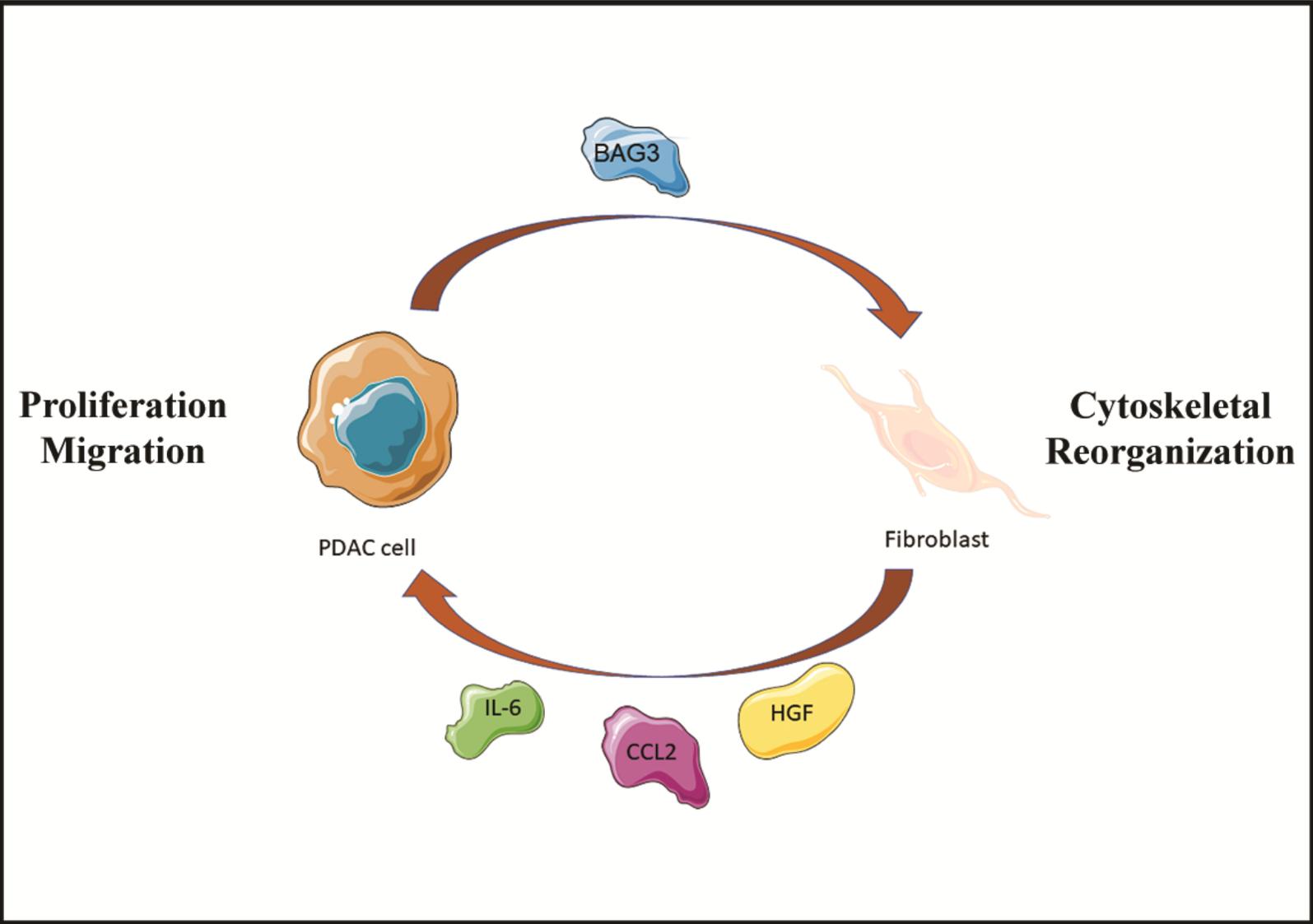


**CM CTRL**



**CM BAG3**







*Article*

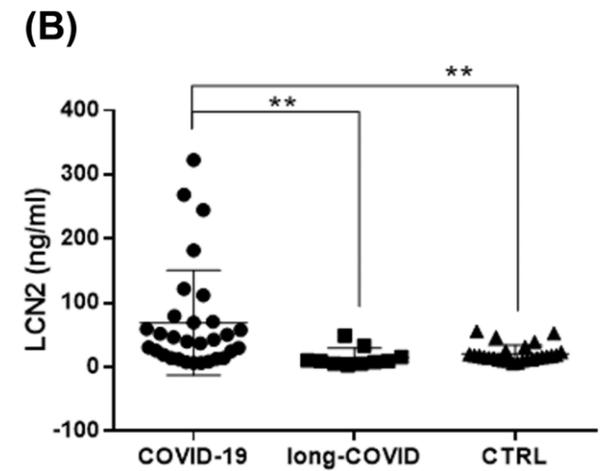
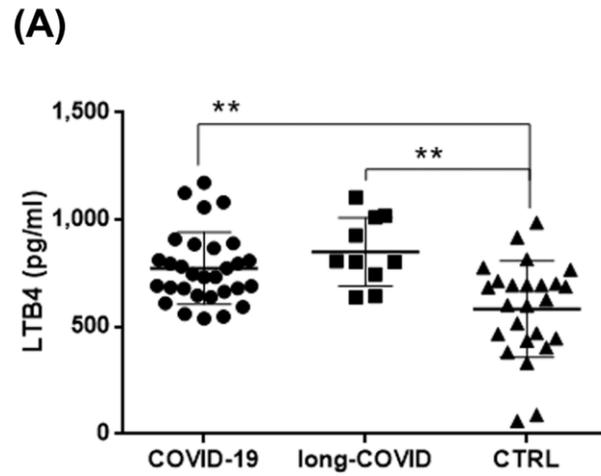
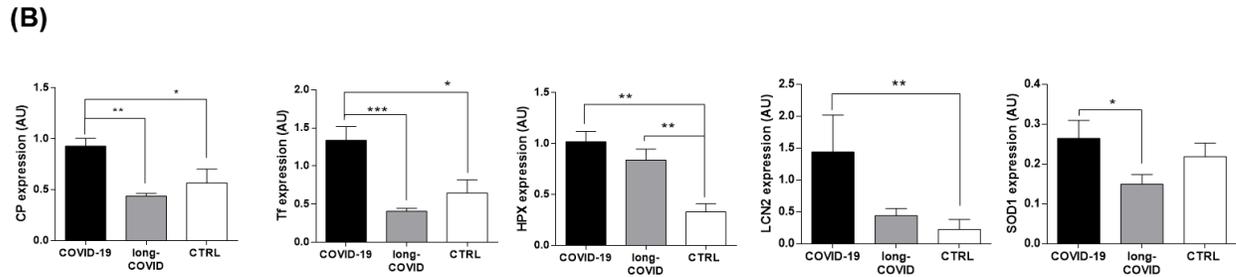
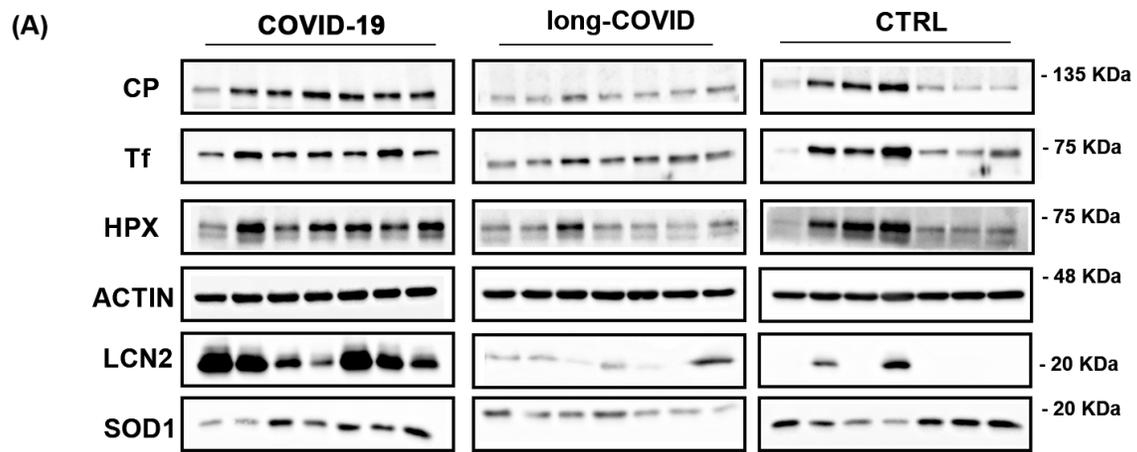
# Iron Dyshomeostasis in COVID-19: Biomarkers Reveal a Functional Link to 5-Lipoxygenase Activation

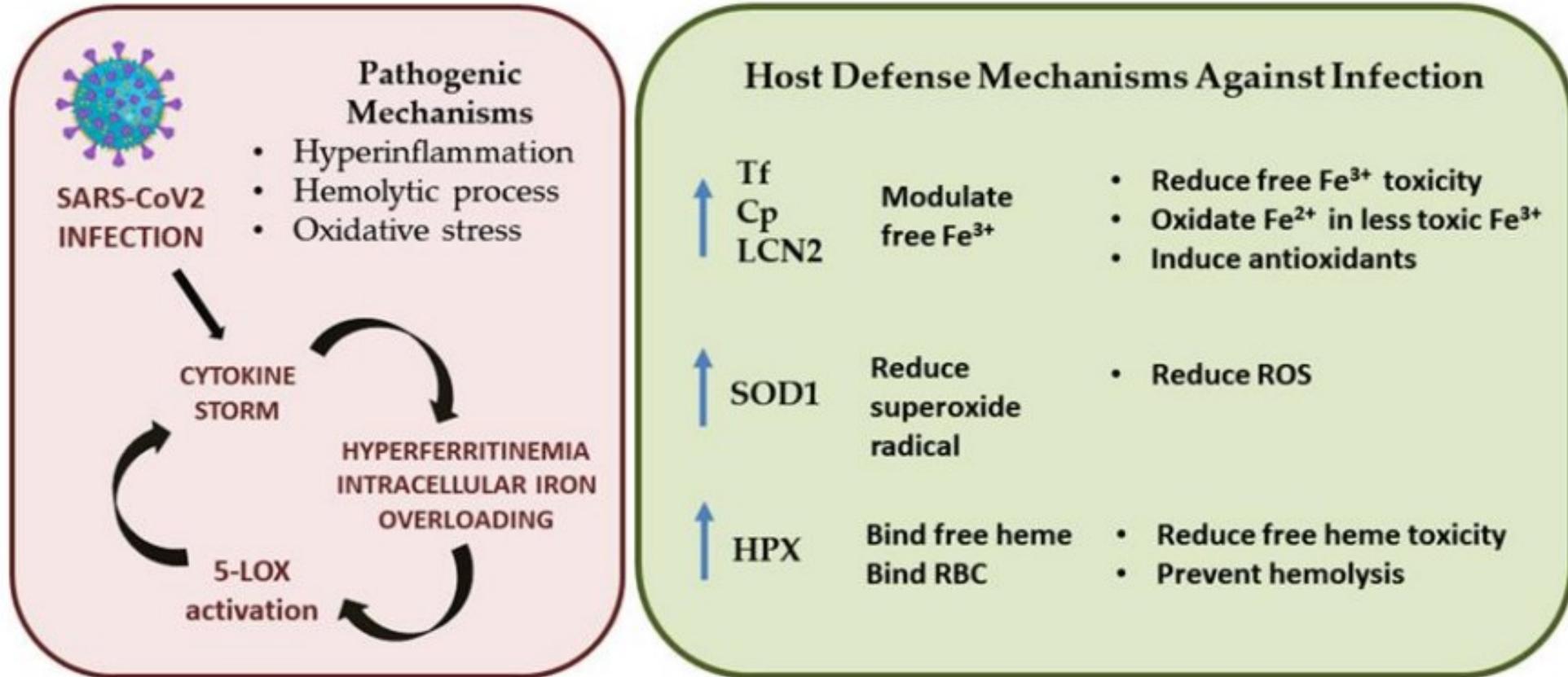
Beatrice Dufrusine <sup>1,2,3</sup> , Silvia Valentinuzzi <sup>3,4</sup>, Sandra Bibbò <sup>2,3</sup> , Verena Damiani <sup>2,3</sup> , Paola Lanuti <sup>3,5</sup> ,  
Damiana Pieragostino <sup>2,3</sup> , Piero Del Boccio <sup>3,4</sup> , Ersilia D'Alessandro <sup>3</sup>, Alberto Rabottini <sup>3</sup>,  
Alessandro Berghella <sup>1</sup> , Nerino Allocati <sup>2</sup> , Katia Falasca <sup>5,6</sup> , Claudio Ucciferri <sup>6</sup>, Francesco Mucedola <sup>6</sup>,  
Marco Di Perna <sup>7</sup>, Laura Martino <sup>7</sup>, Jacopo Vecchiet <sup>5,6</sup>, Vincenzo De Laurenzi <sup>2,3,\*</sup> and Enrico Dainese <sup>1,\*</sup> 

**Table 1.** COVID-19 (n = 30) and long-COVID (n = 10) patient characteristics.

Variable	Value in COVID-19 (n = 30)	Value in Long-COVID (n = 10)	<i>p</i> -Value
<b>Gender (Female), n (%)</b>	14 (46.7%)	5 (50%)	n.s.
<b>Age, mean ± SD</b>	67.5 ± 14.8	62.7 ± 13.2	n.s.
<b>Symptoms, n (%)</b>			
Fever	20 (66.7%)	3 (30%)	n.s.
Cough	8 (26.7%)	3 (30%)	n.s.
Dyspnea	13 (43.3%)	10 (100%)	0.002 **
Diarrhea	2 (6.7%)	-	n.a.
Asthenia	4 (13.3%)	-	n.a.
<b>Comorbid Conditions, n (%)</b>			
Any	-	3 (30%)	n.a.
Hypertension	15 (50%)	3 (30%)	n.s.
Diabetes Mellitus II	5 (16.7%)	2 (20%)	n.s.
Hypothyroidism	1 (3.3%)	1 (10%)	n.s.
Cancer	5 (16.7%)	-	n.a.
Chronic kidney disease	3 (10%)	-	n.a.
Obesity	2 (6.7%)	-	n.a.
<b>IL-6 (pg/mL)</b>			
Median value (min.–max.)	128.6 (3.6–278.9)	64.8 (11.1–194)	n.a.
Cut-off < 6.4 pg/mL			
<b>Ferritin (ng/mL)</b>			
Median value (min.–max.)	991.8 (37.2–4265)	1608.5 (205–4638)	n.a.
Cut-off 22–274 ng/mL			

Demographic and clinical characteristics of COVID-19 and long-COVID patients included in the study. Results were obtained using the Mann–Whitney test for non-parametrical distribution and the chi-squared test for categorical parameters. Values are expressed as mean ± SD or median (min-max). Cut-off values are given for an appropriate laboratory. \*\* *p* < 0.01; n.a.—not available; n.s.—not significant.





**Figure 5.** Schematic representation of pathogenesis of SARS-CoV-2 infection and possible defense mechanisms.