

## Seminario

Serine proteasi

## SEMINARIO: SISTEMI DELLA COAGULAZIONE, DEL COMPLEMENTO E DELLE CHININE IN CUI SONO COINVOLTE DELLE SERINA PROTEASI

Seminario

### INFIAMMAZIONE & SISTEMI DI PROTEINE PLASMATICHE

- ✦ L'**infiammazione** è mediata da tre sistemi chiave di **proteine plasmatiche**: il sistema del **complemento**, il sistema della **coagulazione** e il sistema delle **chinine**.
- ✦ Ciascuno di questi sistemi consiste in una **serie di enzimi inattivi**, o **proenzimi**.
- ✦ **Quando il primo proenzima della serie è convertito in un enzima attivo, esso inizia una cascata in cui il substrato dell'enzima attivato è il componente seguente del sistema.**
- ✦ Perciò, **l'intera cascata può essere attivata mediante l'attivazione del primo componente.**
- ✦ L'attivazione di solito coinvolge il **taglio** catalizzato da un enzima del precursore inattivo (proenzima) in **due o più frammenti di dimensioni diverse**.
- ✦ **Il frammento di maggiori dimensioni è un enzima attivo il cui substrato è il componente seguente del sistema.**
- ✦ **Il frammento di minori dimensioni è spesso un potente mediatore biochimico della risposta infiammatoria.**
- ✦ La maggior parte di questi componenti hanno una durata corta, in quanto sono inattivati rapidamente da altre proteine plasmatiche.

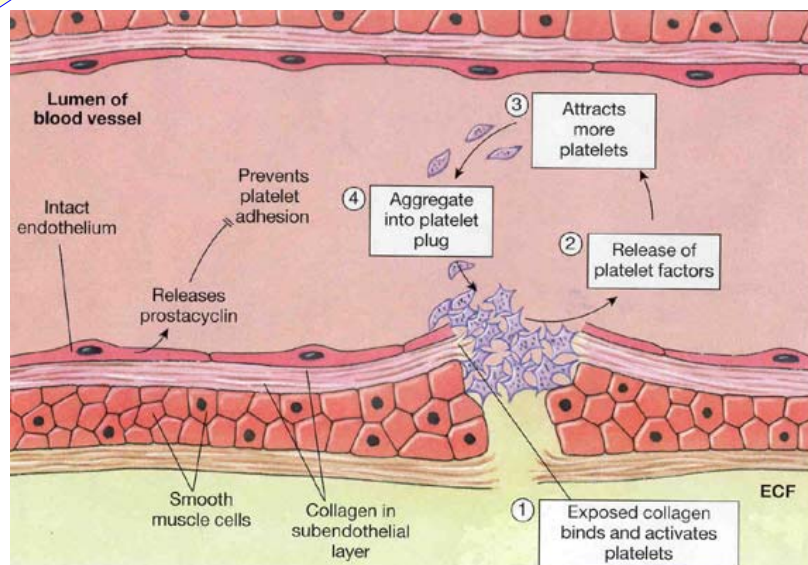
Rote & Huether: **Inflammation**» In: Understanding Pathophysiology (Huether & McCance, eds.) Mosby, 3° ed

Seminario

## COAGULAZIONE DEL SANGUE "BLOOD CLOTTING)

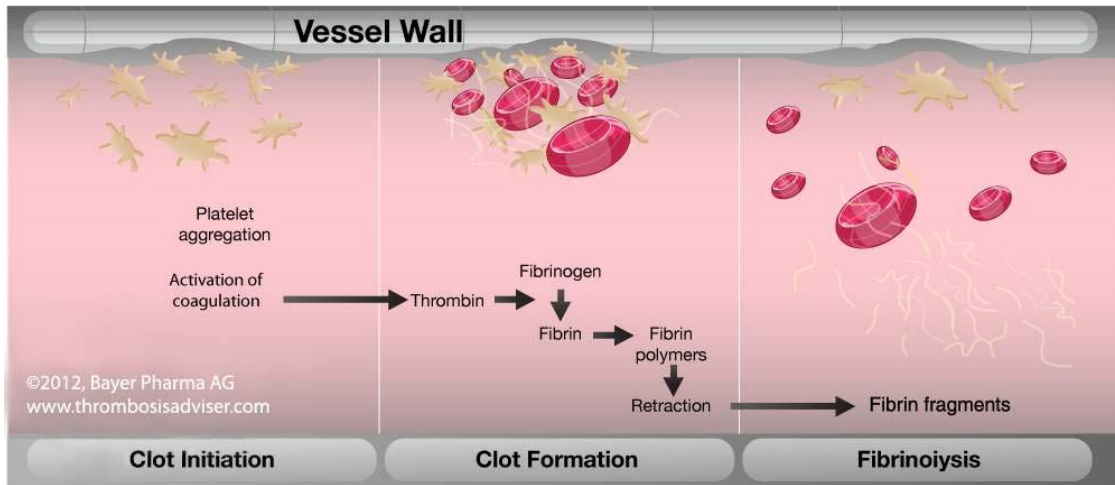
- ✚ La **coagulazione del sangue** inizia quando il tessuto è danneggiato e quando le piastrine sono esposte al collagene della lamina basale.
- ✚ Le piastrine si attivano e, degranulando, rilasciano citochine che inducono alterazioni in una serie complessa di fattori plasmatici.
- ✚ Alla fine la proteina circolante **protrombina** viene **attivata a trombina**.
- ✚ **La trombina converte il fibrinogeno inattivo in fibrina**, che forma il coagulo.

Seminario



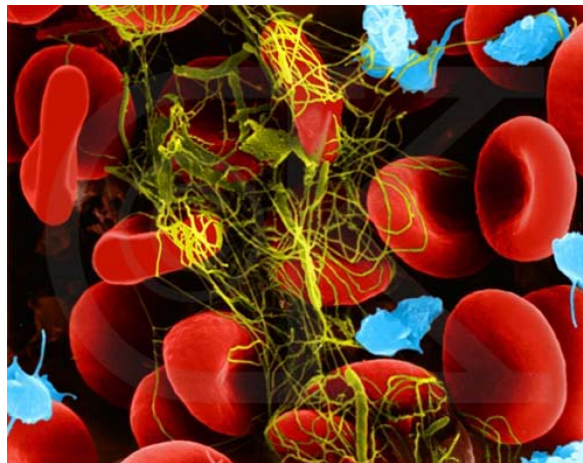
<http://fig.cox.miami.edu/~lfarmer/BIL265/BIL2001/bloodflow9.jpg>

Seminario



<http://www.thrombosisadviser.com/scripts/include/TFW/tools/download.php?f=/html/images/library/haemostasis/fibrinolysis-clot-formation-HR.jpg>

## Coagulo



<http://www2.estrellamountain.edu/faculty/farabee/BIOBK/BioBookcircSYS.html>

Seminario

## Sistema della coagulazione - 1

✚ Il **sistema della coagulazione** («clotting») è un sistema di **proteine plasmatiche** che **forma una rete fibrosa nel sito infiammato per intrappolare gli esudati, i microorganismi e i corpi estranei.**

✚ Ciò:

- Impedisce la disseminazione dell'infezione e dell'infiammazione ai tessuti vicini.
- Mantiene i microorganismi e i corpi estranei nel sito di maggiore attività fagocitica
- Forma un **coagulo** che **ferma il sanguinamento e fornisce un'impalcatura per il successivo riparo e guarigione.**

✚ La principale sostanza di questa rete è una proteina insolubile, la **fibrina**, che è il prodotto finale della cascata della coagulazione.

Rote & Huether: **Inflammation»** In: Understanding Pathophysiology (Huether & McCance, eds.) Mosby, 3° ed

Seminario

## Sistema della coagulazione - 3

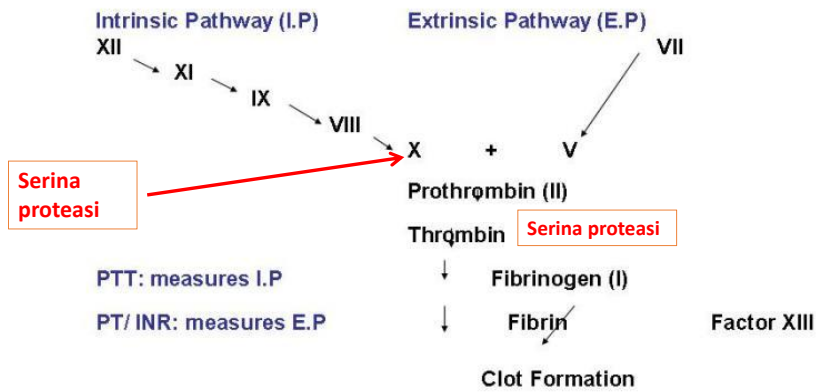
✚ Il sistema della coagulazione può essere attivato da molte sostanze rilasciate durante la distruzione tissutale e l'infezione, incluso collagene, proteasi, kallikreina, plasmina ed endotossine batteriche.

✚ Inoltre, l'attivazione della cascata produce **due fibrinopeptidi a basso peso molecolare.**

✚ Questi sono rilasciati dal fibrinogeno durante la produzione di fibrina (soprattutto il fibrinopeptide B), sono **chemotattici per i neutrofili ed aumentano la permeabilità vascolare**, aumentando gli effetti della bradichinina (formata dal sistema della chinina).

Rote & Huether: **Inflammation»** In: Understanding Pathophysiology (Huether & McCance, eds.) Mosby, 3° ed

## CASCATA DELLA COAGULAZIONE

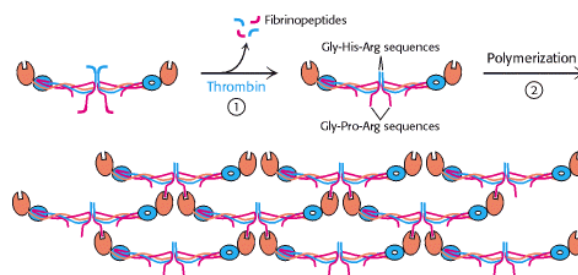


(c) 2006, Kanchan Ganda, M.D.

<http://ocw.tufts.edu/Content/29/lecturenotes/368617/368643>

Seminario

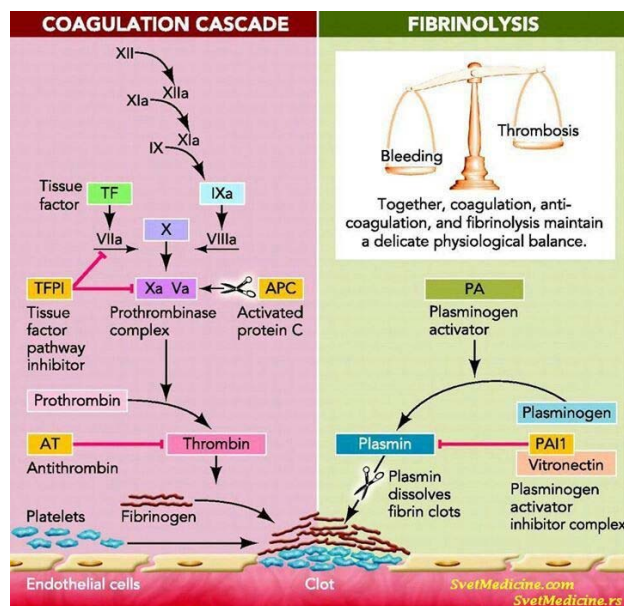
## Formazione di un coagulo di fibrina



### Formazione di un coagulo di fibrina.

- (1) La **trombina** taglia via i fibrino-peptidi A e B dalla zona globulare centrale del fibrinogeno.
- (2) I domini globulari nelle estremità carbossi-terminali delle catene  $\beta$  e  $\gamma$  interagiscono con "protuberanze" esposte nelle estremità amino-terminali delle catene  $\beta$  e  $\alpha$  formando i coaguli.

Seminario



<http://media-cache-ak0.pinning.com/736x/73/62/7c/73627c934150bcf261dcf8c0e078f476.jpg>

## Attivatori del plasminogeno e matrice extracellulare – [1]

- ✚ Il Sistema di **Attivazione del Plasminogeno** (PA) è un meccanismo estesamente impiegato per **generare attività proteolitica** nella MEC, dove contribuisce al rimodellamento dei tessuti in un'ampia gamma di processi fisiopatologici.
- ✚ L'attivazione dello **zimogeno plasminogeno** alla **serina proteasi attiva plasmina** è un processo altamente regolato.
- ✚ Ci sono due distinti attivatori del plasminogeno (PAs):
  - tPA: «tissue-type plasminogen activator»
  - uPA: «urokinase-type plasminogen activator»
- ✚ Recettori specifici (uPAR/CD8 per uPA;  $\alpha$ -enolasi per il plasminogeno; annexina-II per tPA) contribuiscono a localizzare le attività dei PA e della plasmina nella zona pericellulare.

Suelves M, Vidal B, Ruiz V, Baeza-Raja B, Diaz-Ramos A, Cuartas I, Lluís F, Parra M, Jordi M, Lopez-Alemany R, Serrano AL, Muñoz-Canoves P. The plasminogen activation system in skeletal muscle regeneration: antagonistic roles of urokinase-type plasminogen activator (uPA) and its inhibitor (PAI-1). *Front Biosci.* 2005 Sep 1;10:2978-85.

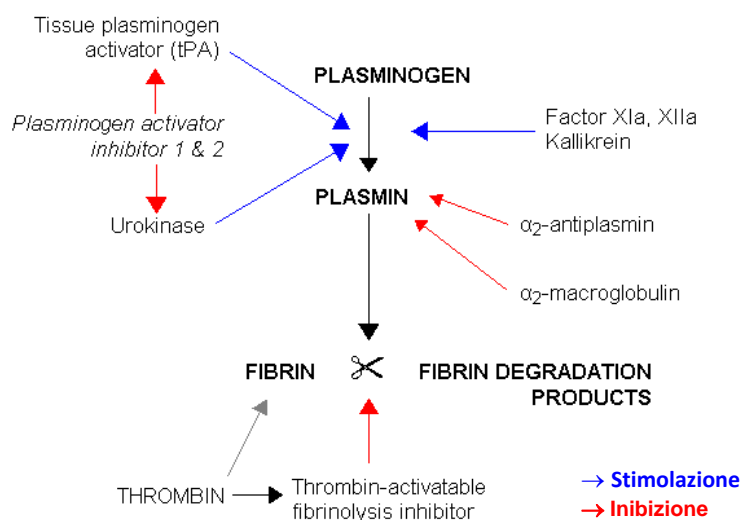
Seminario

## FIBRINOLISI - 1

- ✚ Processo fisiologico che ha come evento terminale la **dissoluzione del reticolo di fibrina** formatosi in conseguenza della coagulazione del sangue.
- ✚ La fibrinolisi ha lo scopo di **mantenere l'integrità del coagulo solo per il tempo strettamente necessario all'arresto dell'emorragia** ed anche di impedire la formazione di trombi intravascolari che si può verificare per attivazione spontanea della coagulazione.
- ✚ **La fibrinolisi inizia con la conversione del plasminogeno in plasmina ad opera degli attivatori del plasminogeno**, i più noti dei quali sono l'**urochinas** (U-PA), varie sostanze di origine tessutale e vascolare (liberate in seguito a esercizio fisico, ipoglicemia, shock ipovolemico) e una sostanza di origine batterica, la streptochinasi.
- ✚ La **plasmina** è un enzima proteolitico capace di scindere la fibrina ed il fibrinogeno (formando i cosiddetti FDP), i fattori V e VIII. La sua liberazione incontrollata avrebbe effetti disastrosi se non esistessero in circolo gli **inibitori della plasmina**, cioè sostanze in grado di neutralizzarla.

Seminario

## Fibrinolisi



<http://en.wikipedia.org/wiki/File:Fibrinolysis.png>

Seminario

## FIBRINOLISI - 2

- ✚ Esistono condizioni patologiche caratterizzate da un **aumento della fibrinolisi**: coagulazione intravascolare disseminata (CID), carcinoma della prostata, della mammella e del pancreas, leucemie acute, interventi chirurgici sul cuore in circolazione extracorporea.
- ✚ Gli **attivatori del plasminogeno** (soprattutto l'**urochinasi**) sono molto usati in terapia come **agenti trombolitici** nell'infarto miocardico, nell'embolia polmonare, nella trombosi venosa.

Seminario

## Sistema del complemento - a

- ✚ E' il principale mediatore della difesa immunitaria innata.
- ✚ La sua funzione è quella di **riconoscere, e in seguito opsonizzare o lisare materiali particolati, incluso batteri, funghi e altri microorganismi.**
- ✚ Il riconoscimento ha luogo mediante **legame delle proteine del complemento a insiemi di saccharidi o di cariche elettriche.**
- ✚ Dopo il riconoscimento, viene **attivata una serie di serina proteasi** culminando con l'assemblamento di proteasi complesse e instabili, dette **C3/C5 convertasi.**
- ✚ Queste attivano la proteina C3 del complemento, che funge da **opsonina.**
- ✚ Le serina proteasi del sistema del complemento includono le proteine strettamente correlate C1r, C1s, MASPs 1-3 (80-90 kDa), C2 e fattore B (100 kDa), Fattore D (25 kDa) e il Fattore 1 (85 kDa)
- ✚ Ciascuno di questi ha una **specificità insolitamente ristretta** e bassa attività enzimatica.

Sim RB, Laich A. Serine proteases of the complement system. Biochem Soc Trans. 2000 Oct;28(5):545-50.



## Complement component 1, s subcomponent

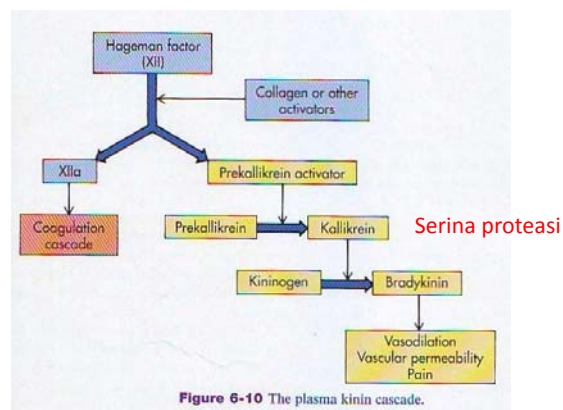
Seminario

Gene Ontology	
<b>Molecular function</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• serine-type endopeptidase activity <sup>[12]</sup></li> <li>• calcium ion binding <sup>[13]</sup></li> <li>• protein binding <sup>[14]</sup></li> <li>• identical protein binding <sup>[15]</sup></li> </ul>
<b>Cellular component</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• extracellular region <sup>[16]</sup></li> </ul>
<b>Biological process</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• proteolysis <sup>[17]</sup></li> <li>• complement activation <sup>[18]</sup></li> <li>• complement activation, classical pathway <sup>[19]</sup></li> <li>• glial cell differentiation <sup>[20]</sup></li> <li>• innate immune response <sup>[21]</sup></li> <li>• response to cAMP <sup>[22]</sup></li> </ul>

<http://en.wikipedia.org/wiki/C15>

Seminario

## Sistema delle chinine - 1



Rote & Huether: Inflammation» In: Understanding Pathophysiology (Huether & McCance,eds.) Mosby, 3<sup>e</sup> ed

Seminario

## Sistema delle chinine - 2

- ✚ La principale chinina, la **bradichinina**, che a basse dosi provoca la vasodilatazione, agisce con le prostaglandine per indurre **dolore**, **contrazione della muscolatura liscia vascolare**, aumentare la **permeabilità vascolare** e aumentare la chemotassi dei leucociti.
- ✚ La bradichinina induce la contrazione della muscolatura liscia più lentamente dell'istamina e potrebbe essere più importante durante le fasi più tardive dell'infiammazione.
- ✚ Con le prostaglandine, probabilmente provoca la retrazione delle cellule endoteliali ed aumenta la permeabilità vascolare.

Rote & Huether: Inflammation » In: Understanding Pathophysiology (Huether & McCance, eds.) Mosby, 3° ed

Seminario

## Sistema delle chinine - 3

- ✚ Il sistema delle chinine è attivato mediante stimolazione della cascata delle chinine plasmatiche.
- ✚ La pre-callicreina viene convertita in **callicreina** mediante una subunità, l'attivatore della precallicreina, generata nella cascata della coagulazione.
- ✚ La callicreina [**serina proteasi**] a sua volta converte il chininogeno in chinina, la principale bradichinina.
- ✚ Le callicreine tissutali della saliva, sudore, lacrime, urina e feci convertono il chininogeno del siero in callidina (lisina-bradichinina) che può essere convertita in bradichinina.
- ✚ Le chinine sono rapidamente degradate e quindi controllate dalle chininasi, enzimi presenti nel plasma e nei tessuti.

Rote & Huether: Inflammation » In: Understanding Pathophysiology (Huether & McCance, eds.) Mosby, 3° ed

## THE EMERGING ROLES OF HUMAN TISSUE KALLIKREINS IN CANCER

Carla A. Borgoño and Eleftherios P. Diamandis

**Abstract** | Human tissue kallikreins (hKs), which are encoded by the largest contiguous cluster of protease genes in the human genome, are secreted serine proteases with diverse expression patterns and physiological roles. Although primarily known for their clinical applicability as cancer biomarkers, recent evidence implicates hKs in many cancer-related processes, including cell-growth regulation, angiogenesis, invasion and metastasis. They have been shown to promote or inhibit neoplastic progression, acting individually and/or in cascades with other hKs and proteases, and might represent attractive targets for therapeutic intervention.

876 | NOVEMBER 2004 | VOLUME 4

www.nature.com/reviews/cancer

### Box 3 | Evidence for human tissue kallikrein cascades

Proteases are initially synthesized as inactive zymogens, which generally require limited (auto)proteolysis of their propeptide domains for conversion to their active forms. This type of activation mechanism can give rise to 'proteolytic cascades' of sequential latent zymogen activation, in which the activated form of one enzyme catalyses the processing of the following zymogen. Such cascades, involving serine proteases and those of other catalytic classes, are well-characterized in the digestive system and the coagulation–fibrinolysis pathways. Several lines of evidence indicate that human tissue kallikreins (hKs) exert their normal and pathological functions cooperatively through proteolytic cascades. All *KLK* genes colocalize to 19q13.4, are coordinately regulated, co-expressed in various tissues and bodily fluids, and concurrently up- or downregulated during tumour progression, and some hKs autoactivate and/or activate other hK zymogens.

Based on current knowledge, hK cascades might contribute to a range of bodily processes in specific tissues, including extracellular-matrix remodelling and the regulation of cellular proliferation, differentiation and apoptosis in the normal and neoplastic prostate tissues, and the regulation of the dissolution of the seminal clot shortly after ejaculation in seminal plasma (see figure, part a); and the regulation of skin desquamation (see figure, part b). It is likely that such cascades are operating in other organs, such as the pancreas and pituitary, and participate in hormone processing or in signal-transduction pathways involving cell-surface receptors such as protease-activated receptors. MMP, matrix metalloproteinase; TMPRSS2, transmembrane protease serine 2; uPA, urokinase plasminogen activator.

Borgoño CA, Diamandis EP. The emerging roles of human tissue kallikreins in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2004 Nov;4(11):876-90.