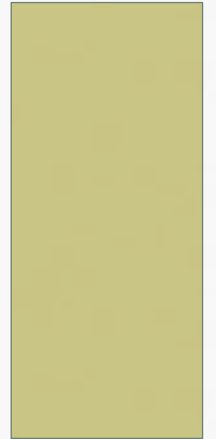




# IL COMPARTIMENTO NATURALE DELL'IMMUNITÀ INNATA

*Microbiologia e Virologia*



# Il sistema immunitario: la funzione

Riconosce gli organismi estranei “invasori”

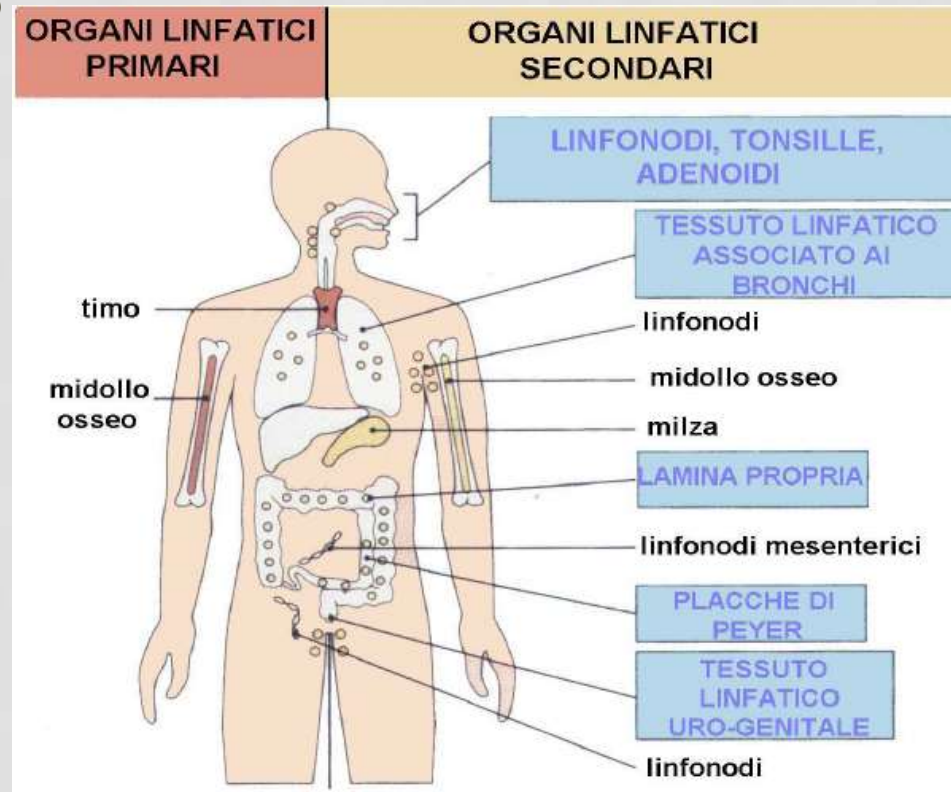
Previene/limita la loro diffusione

Eradica la loro presenza nell'organismo

Ritorna ad uno stato quiescente instaurando una condizione di protezione duratura (memoria immunologica)

Ma non solo....

È un sistema integrato di cellule professionali che collaborano e comunicano al fine di mantenere l'omeostasi



- Esistono due fondamentali sistemi di riconoscimento e di difesa, correlati tra loro: quello **dell'immunità innata**, detta anche naturale o nativa, in quanto pre-esistente all'esposizione agli agenti microbici o alle macromolecole estranee, e quello **dell'immunità adattativa**.
- La combinazione di questi due sistemi fornisce un'efficiente difesa contro i microrganismi patogeni o più in generale contro qualsiasi agente che venga riconosciuto come "non-self"

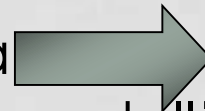
# I DUE TIPI DI IMMUNITÀ...QUALCHE NOZIONE

Immunità' innata o naturale  
pronta risposta (fase precoce)



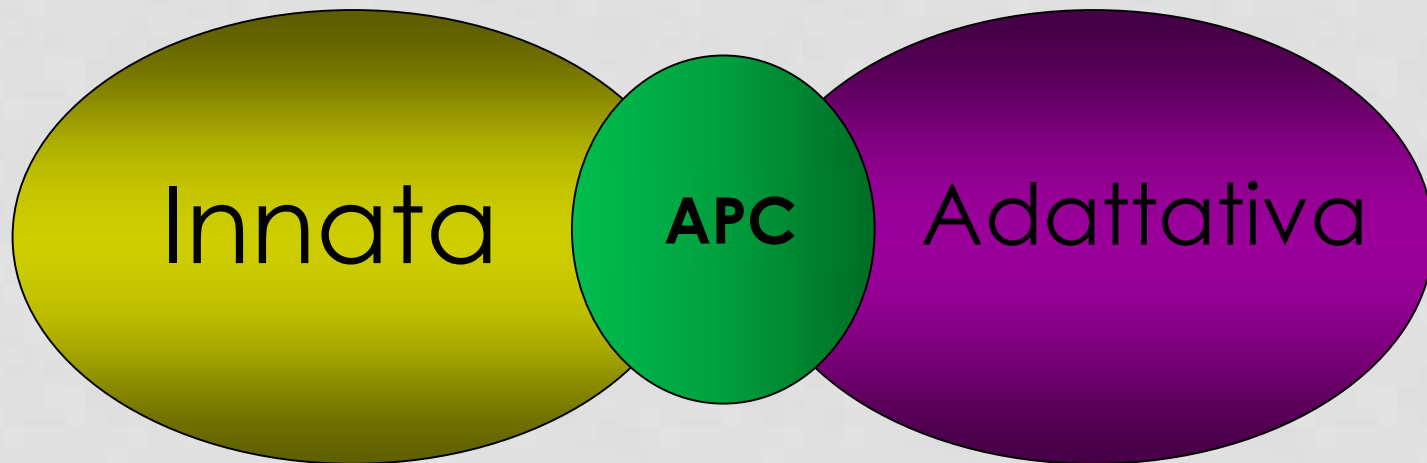
controllo/  
limitazione dell'infezione

Immunità' adattativa o acquisita  
(fase tardiva)



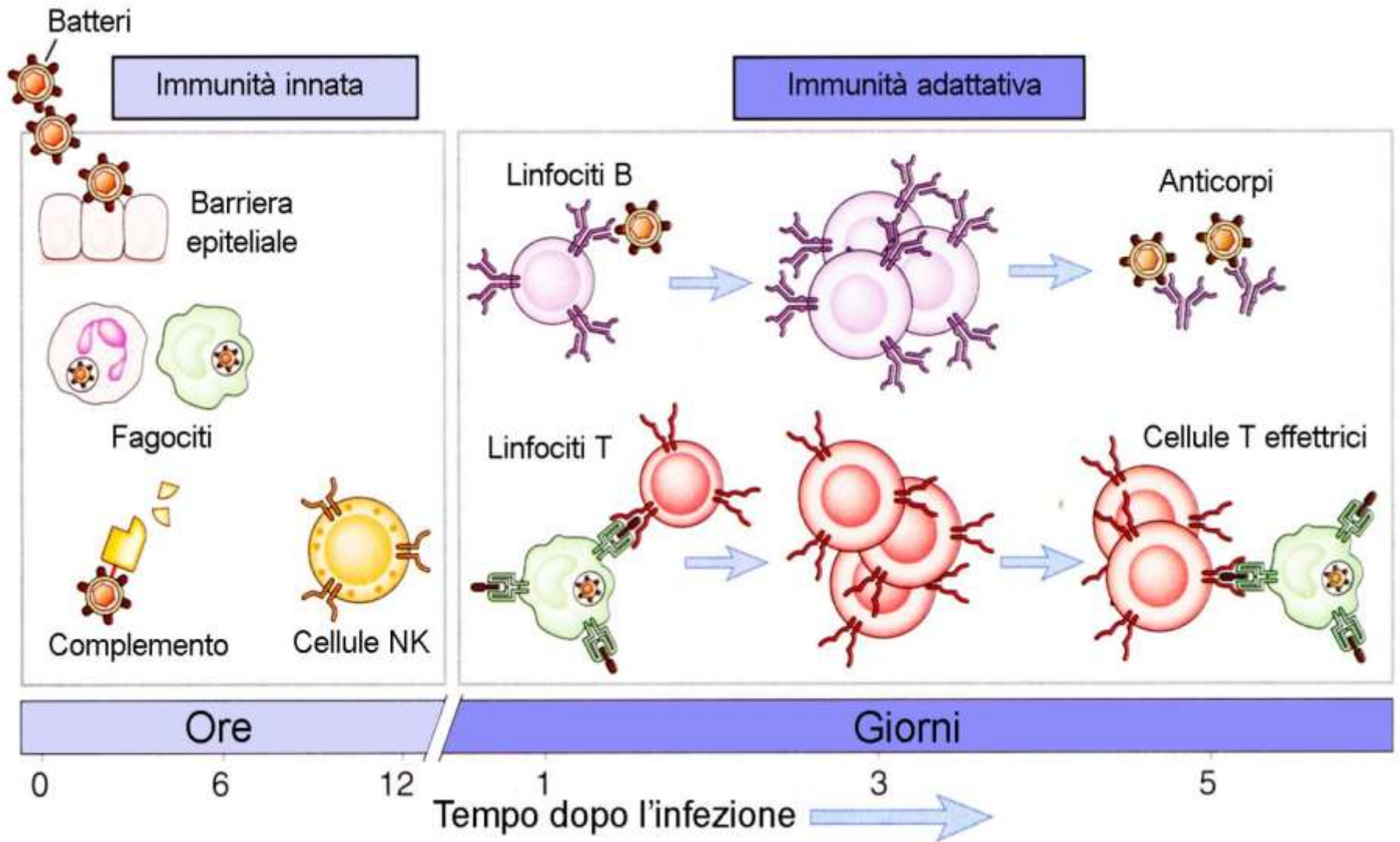
eradicazione più lenta  
dell'infezione

Immunità di lunga durata



# IMMUNITA' INNATA

- È un meccanismo di difesa dell'ospite contro le infezioni, altamente conservato
- Si ritrova in tutti gli organismi pluricellulari (al contrario dell'immunità adattativa che è presente solo nei vertebrati)
- Prima linea di difesa sempre attiva che può indurre l'attivazione del compartimento dell'immunità adattativa
- Fornisce protezione verso una grande varietà di patogeni in quanto manca di specificità
- È in grado di distinguere tra *self* e *non-self*



# The Response to An Initial Infection Occurs in 3 Phases

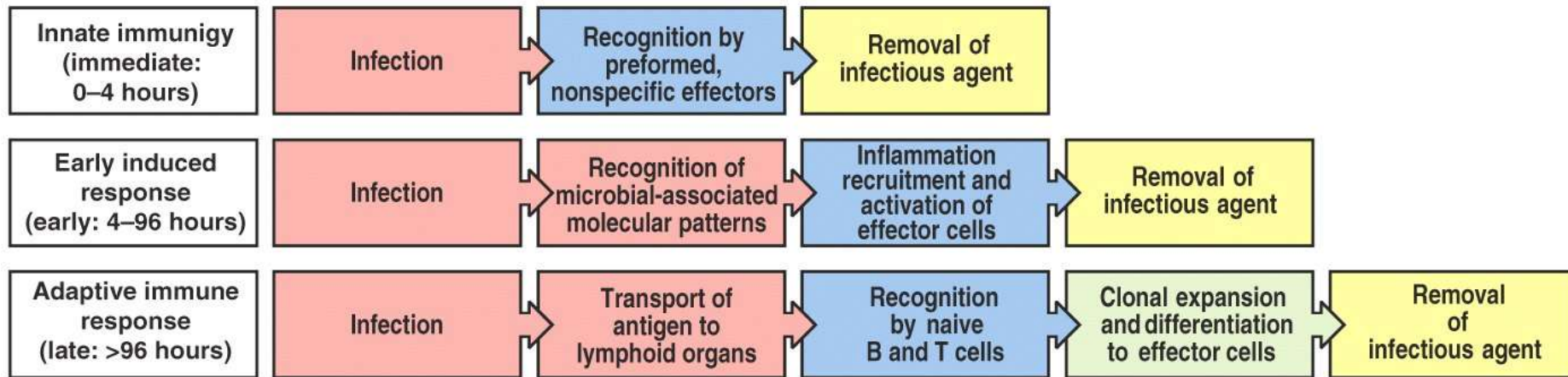


Figure 2-1 Immunobiology, 6/e. (© Garland Science 2005)

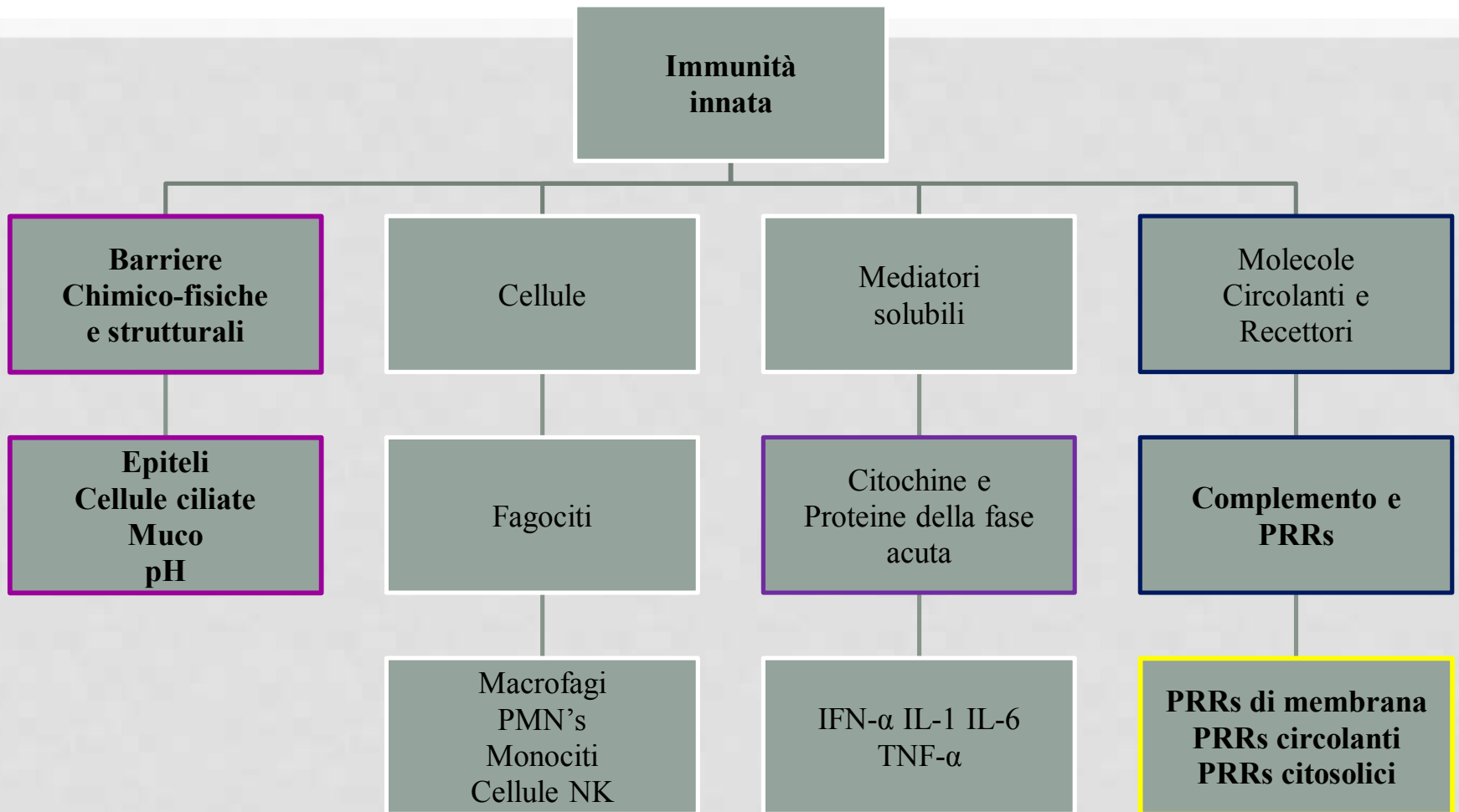


# IMMUNITÀ INNATA E ADATTATIVA: SIMILITUDINI E DIFFERENZE

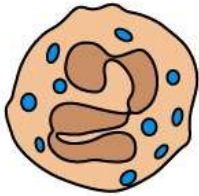

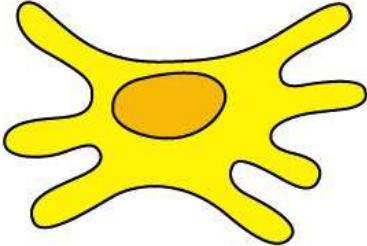
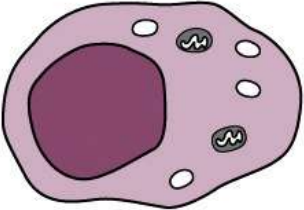
Proprietà	Innata	Adattativa
Barriere Chimico Fisiche	Epiteli, Muco, pH, Temperatura	Tessuti linfoidei associate alle mucose ( <b>MALT</b> )  Anticorpi nelle secrezioni
Molecole circolanti	Recettori circolanti Recettori di membrana Recettori intracellulari, Complemento	Anticorpi
Componente cellulare	Fagociti: macrofagi, cellule dendritiche, leucociti polimorfonucleati, cellule Natural killer	Linfociti T e B
Mediatori solubili	Citochine: (IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ )	(IL-2, IFN- $\gamma$ )



# I MECCANISMI DELL'IMMUNITÀ INNATA



# Cell types of innate immunity

				
<b>Cell type</b>	<b>Neutrophils</b>	<b>Macrophages</b>	<b>Dendritic cells</b>	<b>Natural killer cells</b>
<b>Function</b>	Phagocytosis Reactive oxygen and nitrogen species Antimicrobial peptides	Phagocytosis Inflammatory mediators Antigen presentation Reactive oxygen and nitrogen species Cytokines Complement proteins	Antigen presentation Costimulatory signals Reactive oxygen species Interferon Cytokines	Lysis of viral-infected cells Interferon Macrophage activation

**Figure 3-12**  
*Kuby IMMUNOLOGY, Sixth Edition*  
 © 2007 W. H. Freeman and Company



# PAMPS O MAMPS: PATHOGEN (MICROBIAL)-ASSOCIATED MOLECULAR PATTERNS

- Funghi, batteri e virus producono una serie di molecole (PAMPs) che possono essere riconosciute dall'ospite
- Prodotti da microrganismi e NON dalle cellule eucariotiche
- Conservati tra i microrganismi di una data classe
- Essenziali per la sopravvivenza microbica
- Prodotti da microrganismi patogeni e NON patogeni (MAMPs: Microbe-Associated Molecular Patterns)
- Funzione ed espressione trascrizionale diversa dai fattori di virulenza

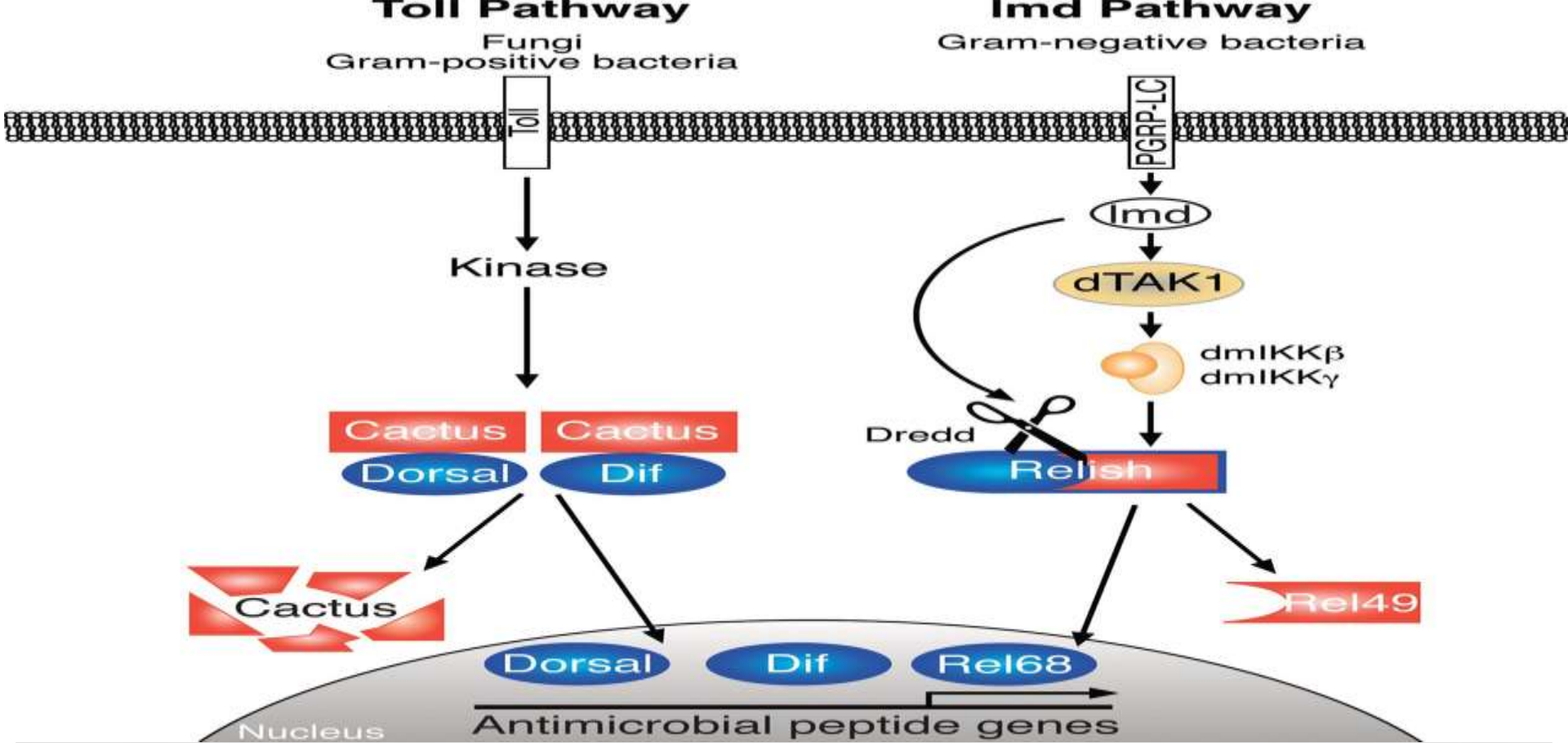
# I PAMPs

	<b>PAMPs</b>
<b>Batteri</b>	Presenti su tutti i microrganismi, patogeni e commensali
<b>Espressione</b>	Costitutiva
<b>Localizzazione</b>	Cromosomale
<b>Funzione</b>	Strutturale
<b>Frequenza di mutazione</b>	Molto bassa
<b>Grado di conservazione</b>	Molto alto tra i membri di una data classe

# PAMPS BATTERICI..... E NON SOLO

- Componenti della parete cellulare batterica: **lipopolisaccaride (LPS)**, **lipoproteine batteriche (BLPs)**, **acido lipoteicoico (LTA)**, **peptidoglicano (PGN)**, **sequenze DNA ricco in guanina e citosina ipo-metilato (CpG)**
- DNA e RNA virale
- Componenti della parete cellulare dei funghi: zimosani e ife
- Alcuni costituenti dei Protozoi
- Elminti e altri costituenti di parassiti?
- Cellule apoptotiche
- Ligandi endogeni (**DAMPs**): HSP60
- Auto-antigeni ?





The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2011



**TLR-4 receptor**



"Jules A. Hoffmann - Nobel Lecture: The Host Defense of Insects: A Paradigm for Innate Immunity".

"Bruce A. Beutler - Nobel Lecture: How Mammals Sense Infection: From Endotoxin to the Toll-like Receptors".



"Ralph M. Steinman - Nobel Lecture: the Discovery of Dendritic Cells".



TLR-4 receptor

Premio Nobel 1995



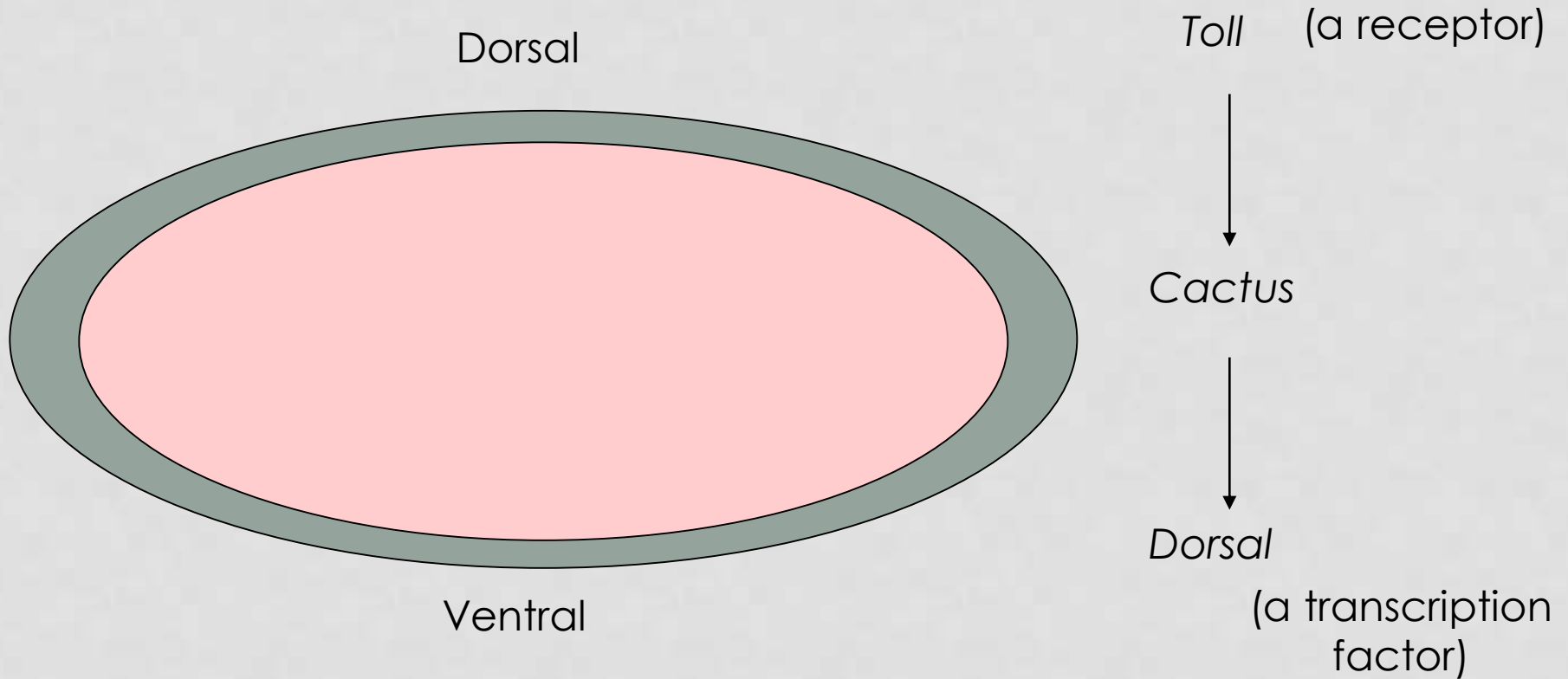
# Le mutazioni nel gene *Toll* determinano la morte del moscerino in seguito a infezioni fungine

Lemaitre *et al.*, Cell **86**: 973–983



Figure 3-8  
Kuby IMMUNOLOGY, Sixth Edition  
© 2007 W.H. Freeman and Company

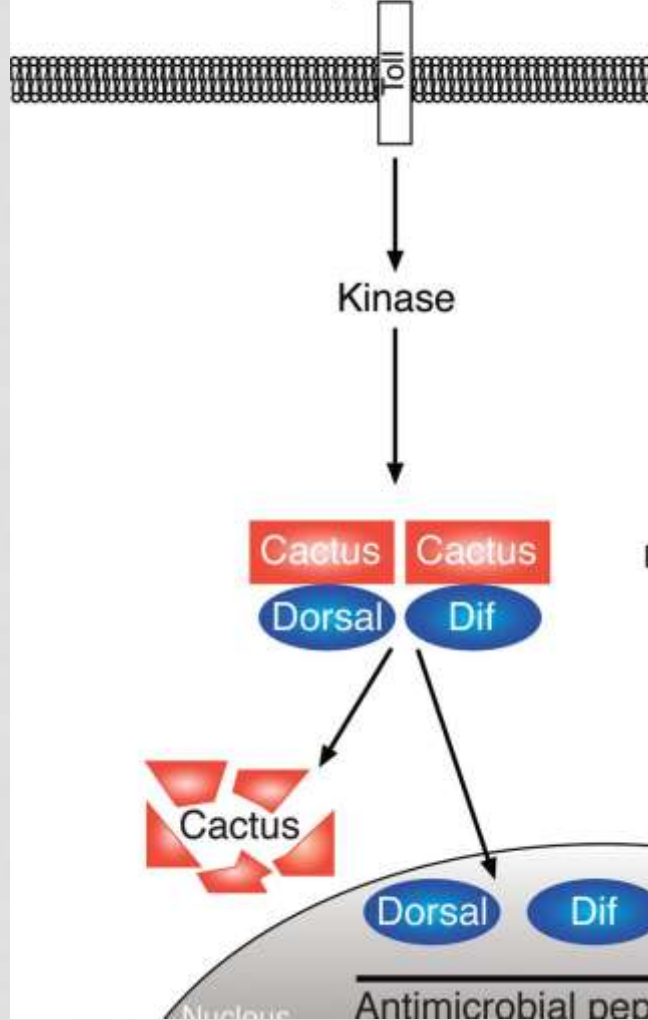
# THE DORSAL SIGNALING PATHWAY CONTROLS DORSAL/VENTRAL POLARITY IN THE *DROSOPHILA* EARLY EMBRYO



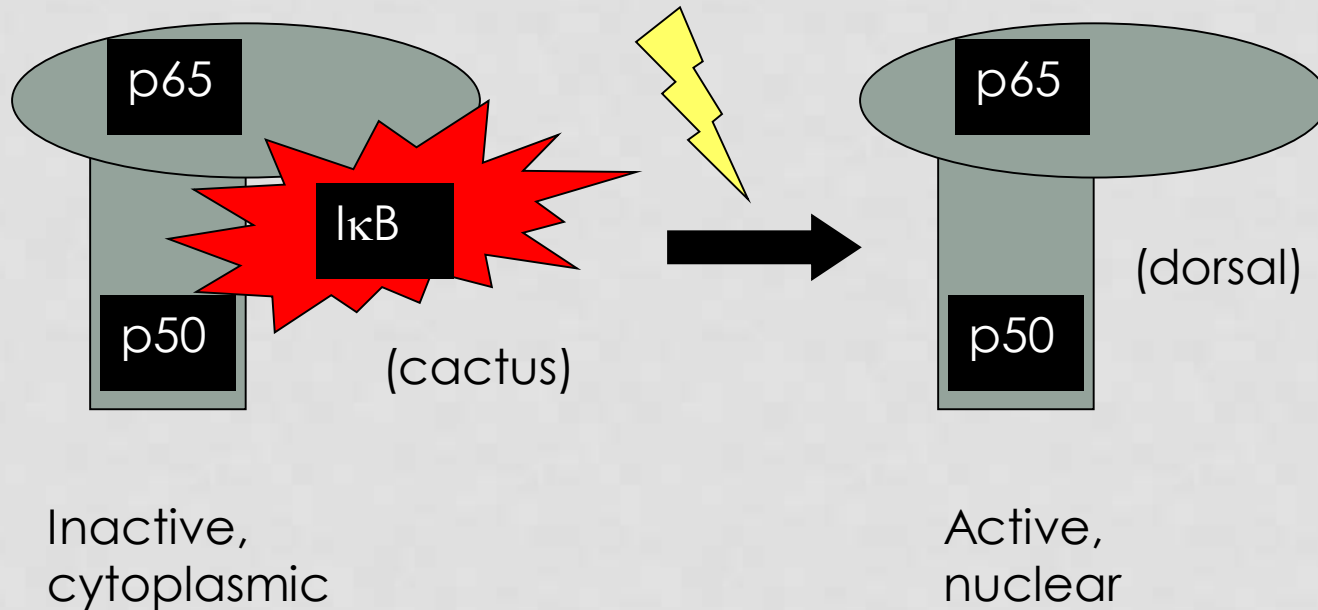
"Toll" is German slang for "weird"

# Toll Pathway

Fungi  
Gram-positive bacteria



# NF- $\kappa$ B: A CRITICAL TRANSCRIPTION FACTOR FOR INNATE IMMUNITY



Mutant mice lacking NF- $\kappa$ B subunits have defects in innate immunity.

What is the mammalian receptor that leads to NF- $\kappa$ B activation in response to infection?

# The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2011



## TLR-4 receptor



**"Bruce A. Beutler - Nobel Lecture:  
How Mammals Sense Infection: From  
Endotoxin to the Toll-like Receptors".**

**"Jules A. Hoffmann - Nobel Lecture:  
The Host Defense of Insects: A  
Paradigm for Innate Immunity".**



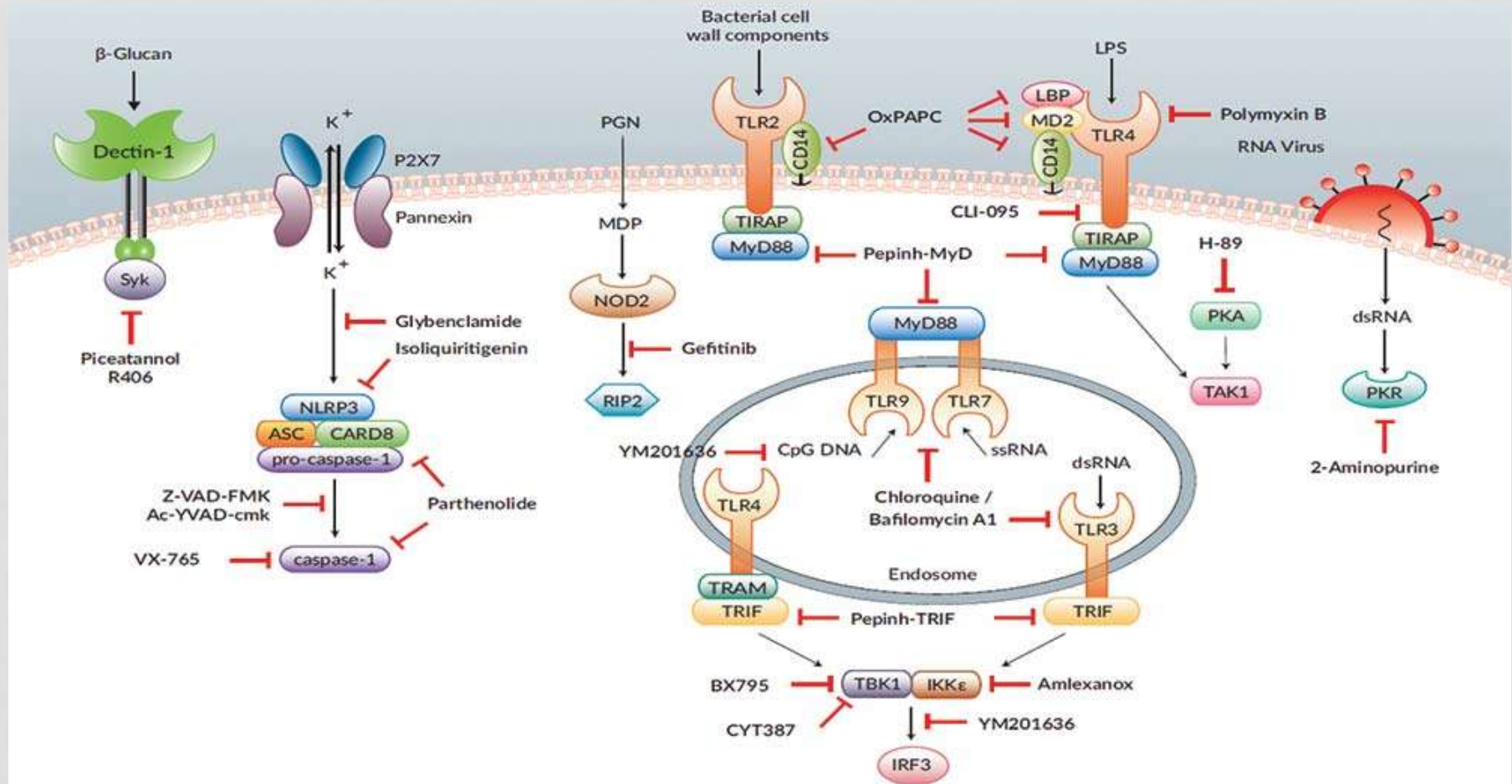
**"Ralph M. Steinman  
- Nobel Lecture:  
the Discovery  
of Dendritic  
Cells".**



**TLR-4 receptor**



# I PAMPs vengono riconosciuti dai PRRs ovvero dai PATTERN RECOGNITION RECEPTORS

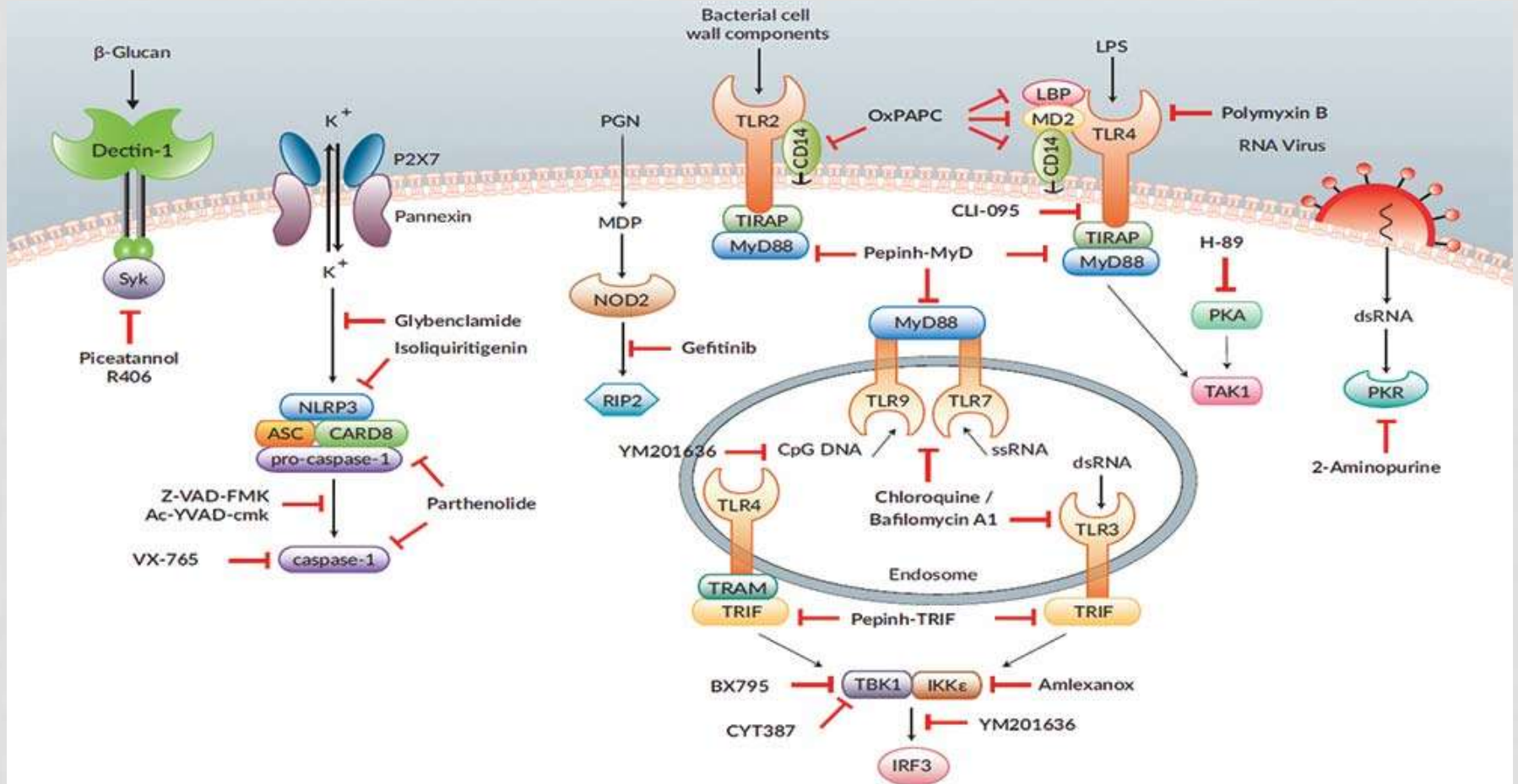


# PATTERN-RECOGNITION RECEPTORS, PRRS

1. Sono molecole recettoriali che riconoscono motivi conservati nell'ambito dei microrganismi (PAMPs)
2. Recettori geneticamente determinati nella linea germinale
3. Sono espressi in diversi tipi cellulari (macrofagi, DC, mast-cells, cellule NK, cellule epiteliali, endoteliali, fibroblasti)
4. Possono essere:
  - a) **circolanti (es. pentrassine, Filcoline)**
  - b) **di membrana (TLRs, )**
  - c) **citosolici (proteine Nods/RLRs)**



# PAMPs E PRRs



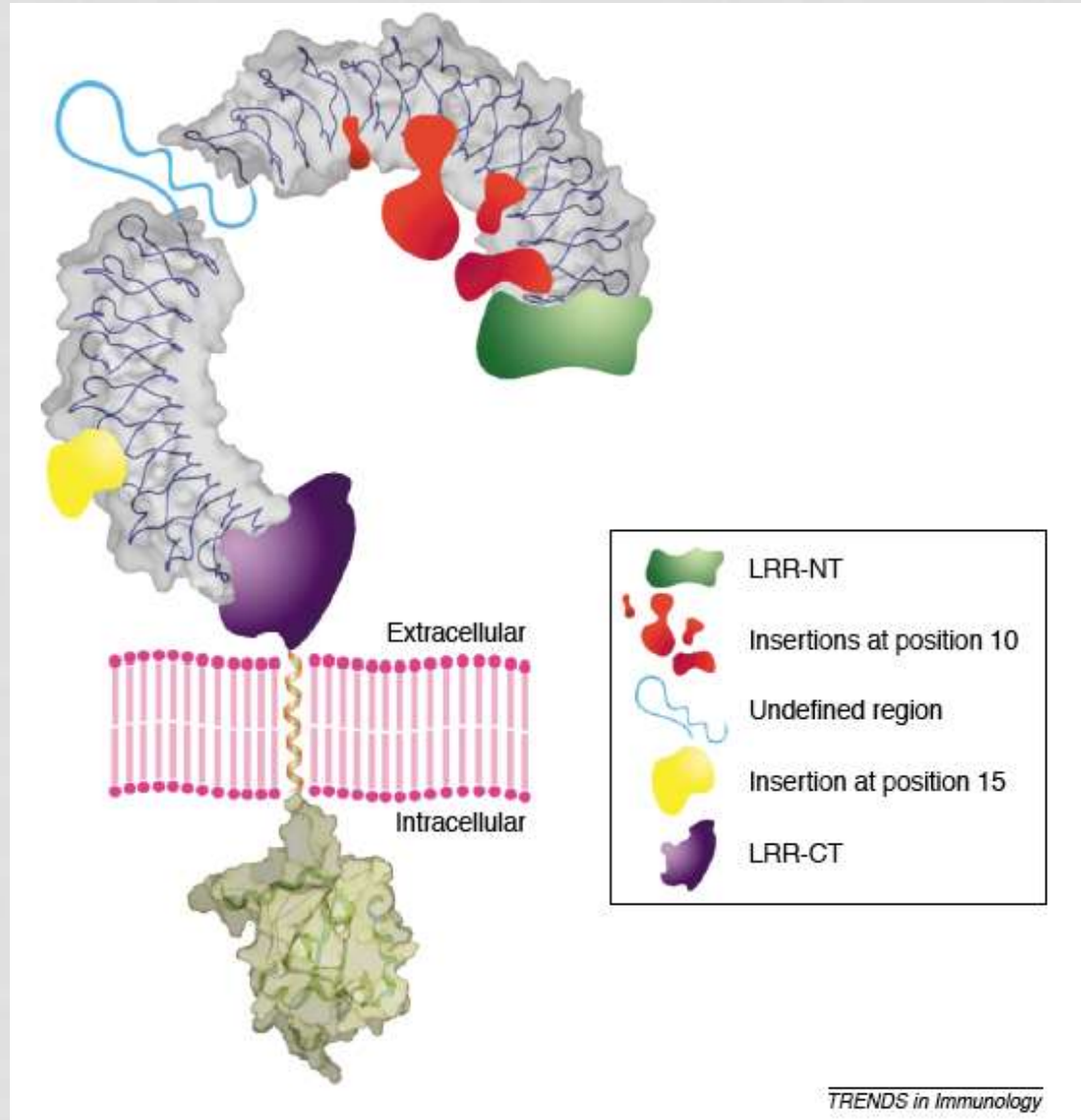
# I Toll-like receptors (TLRs)



# Struttura dei TLRs

3 domini:

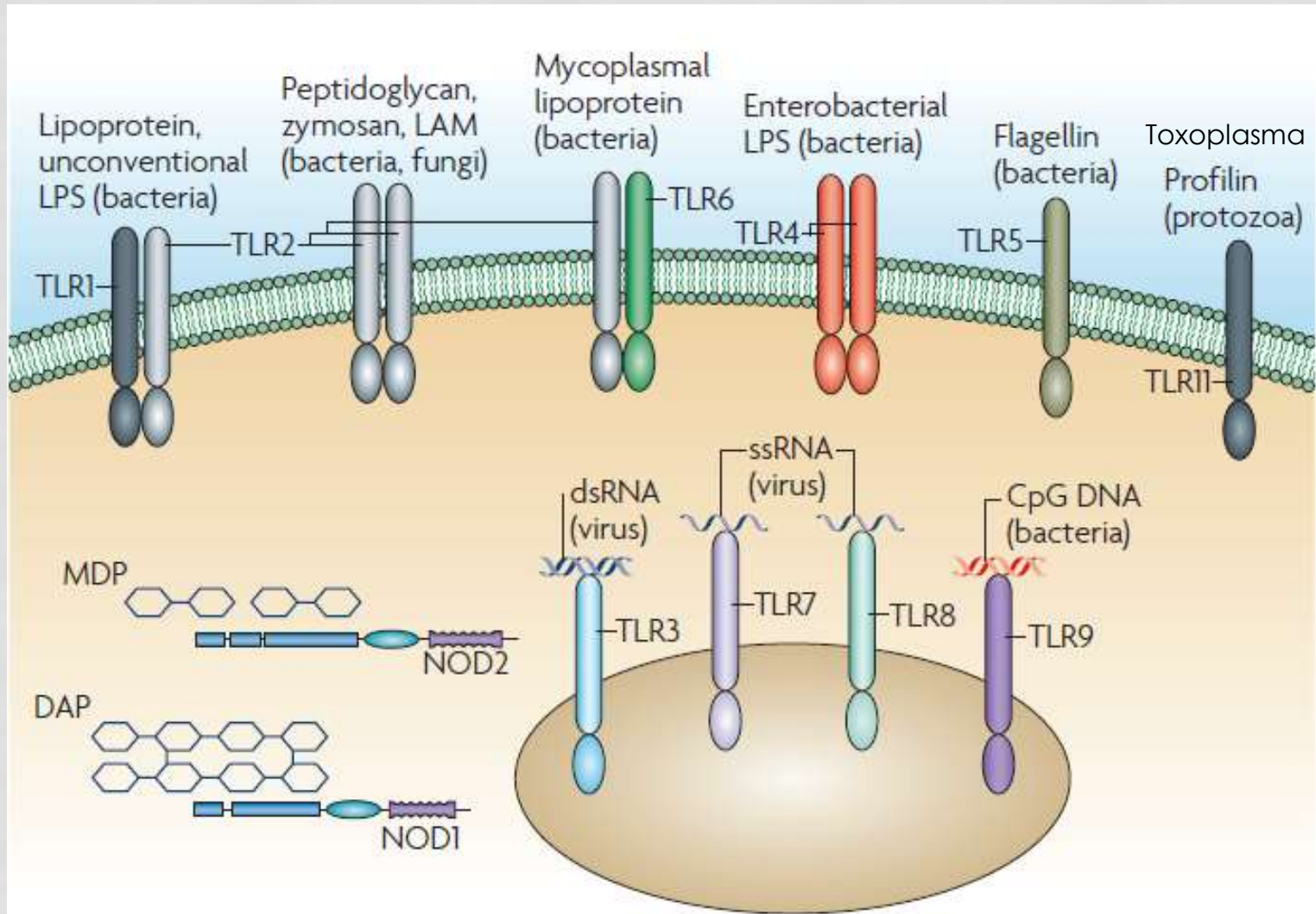
- Extracellulare, LRR( Leucin Rich Repeat)
- Transmembrana
- Intracellulare, TIR (Toll IL-1 Receptor)



# I Toll-like receptors (TLRs)

- Ad oggi sono noti 13 TLRs: 10 nell'uomo (hTLRs), 13 nel topo (mTLRs)
- I primi nove TLRs (TLR1-TLR9) mostrano un elevato grado di conservazione strutturale e funzionale tra topo e uomo
- Con eccezione del TLR8 il cui ligando nel topo non è stato ancora identificato
- mTLR10 non è funzionale come conseguenza di un'inserzione retrovirale
- hTLR11 non è funzionale a causa di un prematuro codon di stop nella sequenza codificante

# I PRRS DI MEMBRANA: I RECETTORI TLRs





© 2005 Disney Pixar. All Rights Reserved.  
Disney Pixar Presents The Incredibles

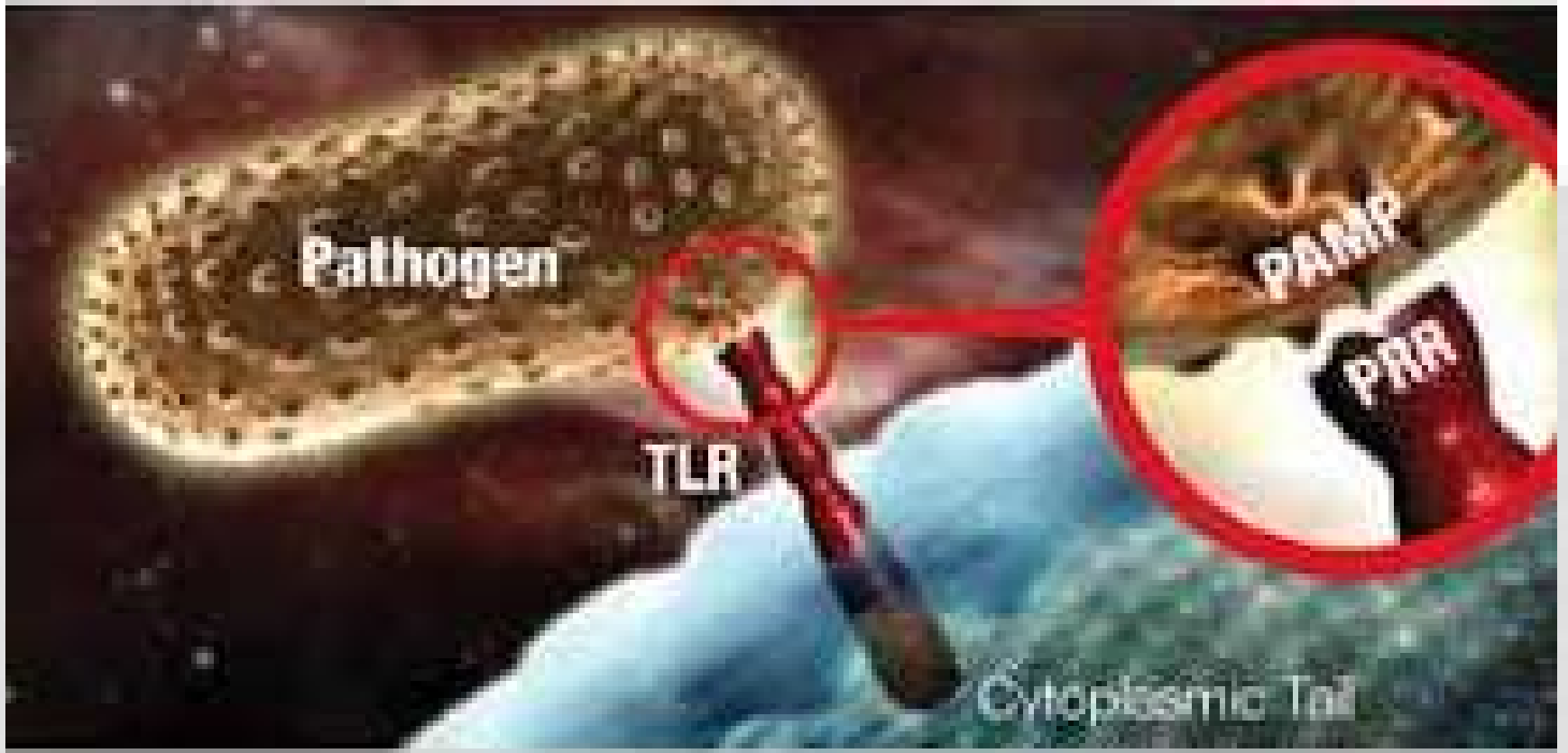
PRRs	PAMPs	Species (microbes)
<i>TLR</i>		
TLR2/1	Triacyl lipopeptides	Bacteria and mycobacteria
TLR2/6	Diacyl lipopeptides LTA Zymosan	<i>Mycoplasma</i> Gram-positive bacteria Fungi ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> )
TLR2	Phospholipomannan Glucuronoxylomannan tGPI-mucin PDG Porins Lipoarabinomannan Hemagglutinin protein ND	Fungi ( <i>Candida albicans</i> ) Fungi ( <i>Cryptococcus neoformans</i> ) Parasites ( <i>Trypanosoma cruzi</i> ) Gram-positive bacteria Bacteria ( <i>Neisseria</i> ) Mycobacteria Viruses (measles virus) Viruses (HSV-1, HCMV)
TLR3	dsRNA poly(I:C)	Viruses (reovirus, RSV, West Nile virus) Synthetic
TLR4	LPS MPL	Gram-negative bacteria Synthetic
TLR5	Flagellin	Flagellated bacteria
TLR7/8	ssRNA R-848 (imidazoquinolines)	Viruses (HIV, influenza virus) Synthetic
TLR9	CpG-DNA CpG-ODN DNA Hemozoin	Bacteria Synthetic Bacteria and viruses (HSV-1, HSV-2, MCMV) Malaria parasite
TLR11	Profilin ND	Parasites ( <i>Toxoplasma gondii</i> ) Uropathogenic bacteria



# PAMP-PRR

- I PAMPs possono essere riconosciuti da molecole recettoriali dell'ospite (PRRs)
- In seguito al riconoscimento dei PAMPs mediato dai PRRs diversi tipi cellulari possono portare ad una potente risposta di tipo protettivo che include:
  - **Reclutamento di cellule fagocitiche**
  - **Secrezione di peptidi anti-microbici**
  - **Sintesi e Rilascio di citochine/chemochine pro- e anti-infiammatorie**
  - **Istruzione delle cellule dendritiche a promuovere la generazione di una risposta immunitaria adattativa**
- L'attivazione dei PRRs è un meccanismo di protezione per l'ospite ma la sovra-stimolazione dei PRRs può causare malattie gravi





# VIE DI SEGNALAZIONE ATTIVATE DAI TLRs

In seguito a dimerizzazione si hanno DUE vie di segnalazione

## Via MyD88 dipendente (tutti i TLRs ad eccezione del TLR3):

- Attivata dalla maggior parte dei TLRs in risposta al legame con un agonista
- Induce l'attivazione delle MAP chinasi e di NF- $\kappa$ B
- Induce l'espressione di citochine infiammatorie

## Via MyD88 indipendente (TLR3 e TLR4):

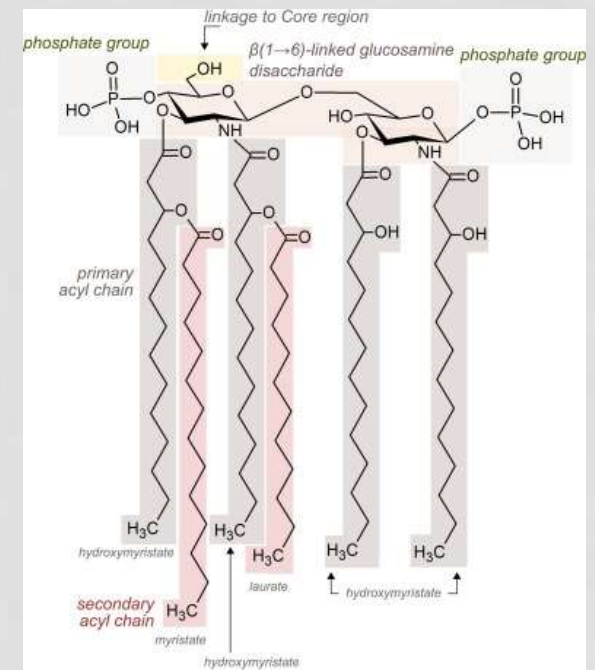
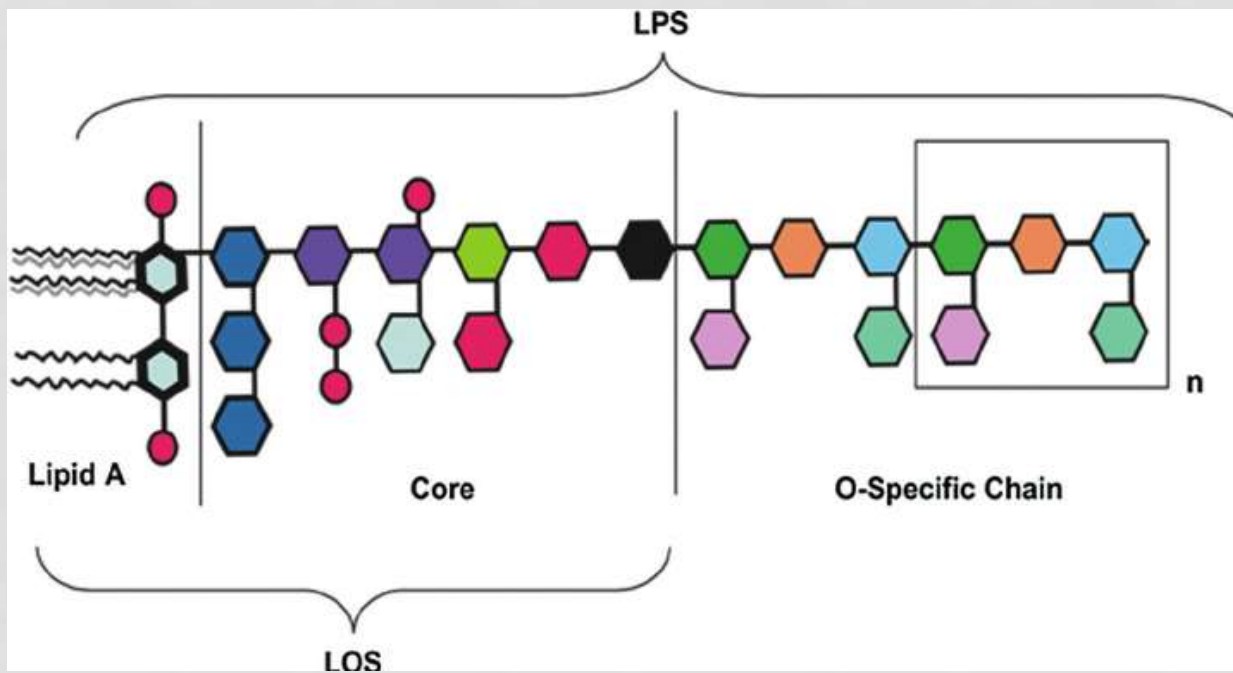
- Induce l'attivazione di IRF-3 e la produzione di interferon di tipo I
- Induce l'espressione di citochine infiammatorie
- Induce la maturazione di cellule dendritiche

# **TLRs implicati nel riconoscimento di strutture batteriche**

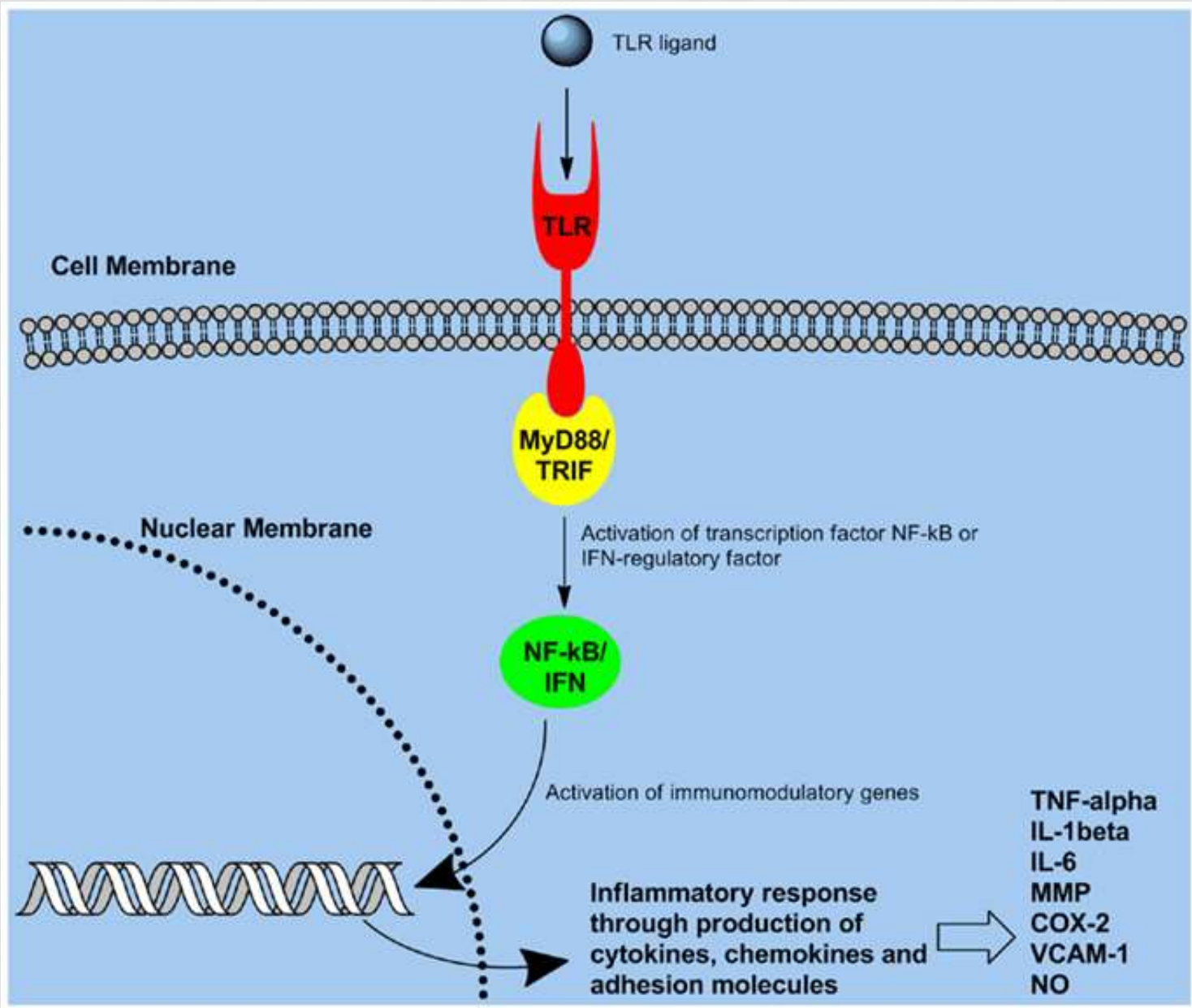
# TLR4

- Il primo TLR ad essere stato individuato mediante omologia di sequenza
- Topi C3H/HeJ che presentano una mutazione puntiforme nel dominio TIR di TLR4 sono non-responsivi agli LPS
- Cosa riconosce?
  - **LPS**
  - Ligandi endogeni, Heat shock protein, oligosaccaridi di acido ialuronico, fibrinogeno
  - Pneumolisina di *S. pneumoniae*

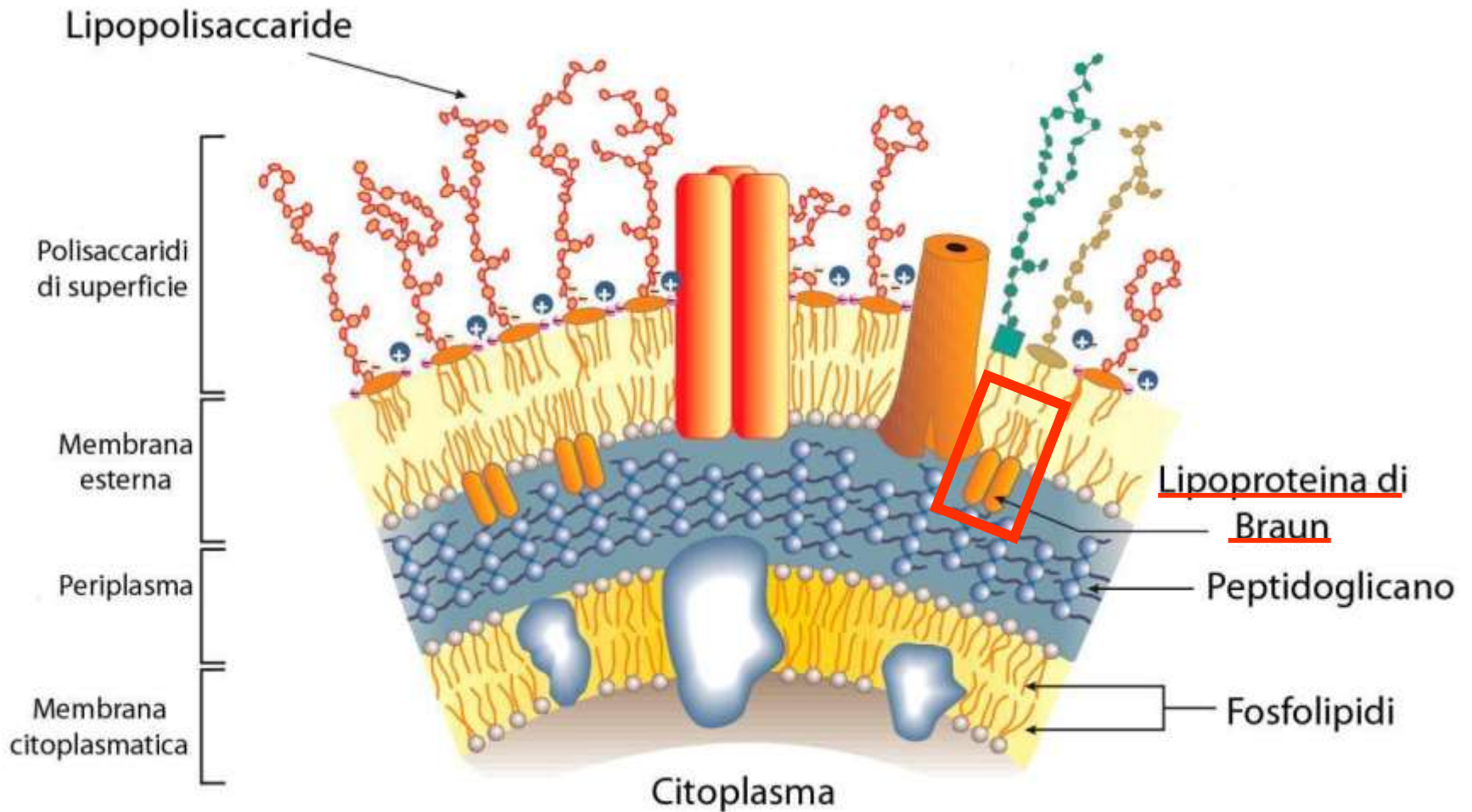
# IL LIPIDE A VIENE RICONOSCIUTO DAL COMPLESSO RECETTORIALE DEL TLR4





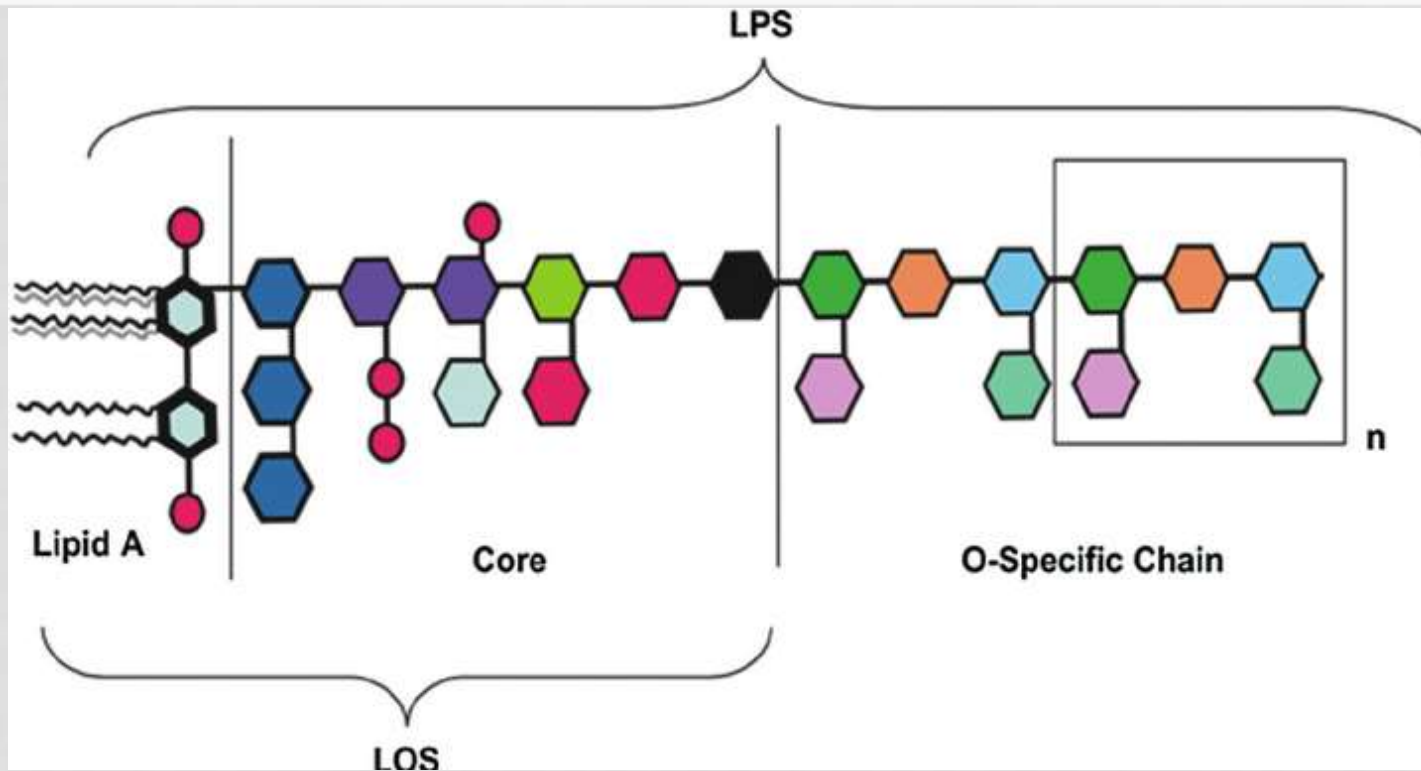


# LPS



# L'LPS: LA STRUTTURA

- ✓ Regione lipofilica, il **Lipide A**
- ✓ **Regione oligo/polisaccaridica** idrofilica legata covalentemente

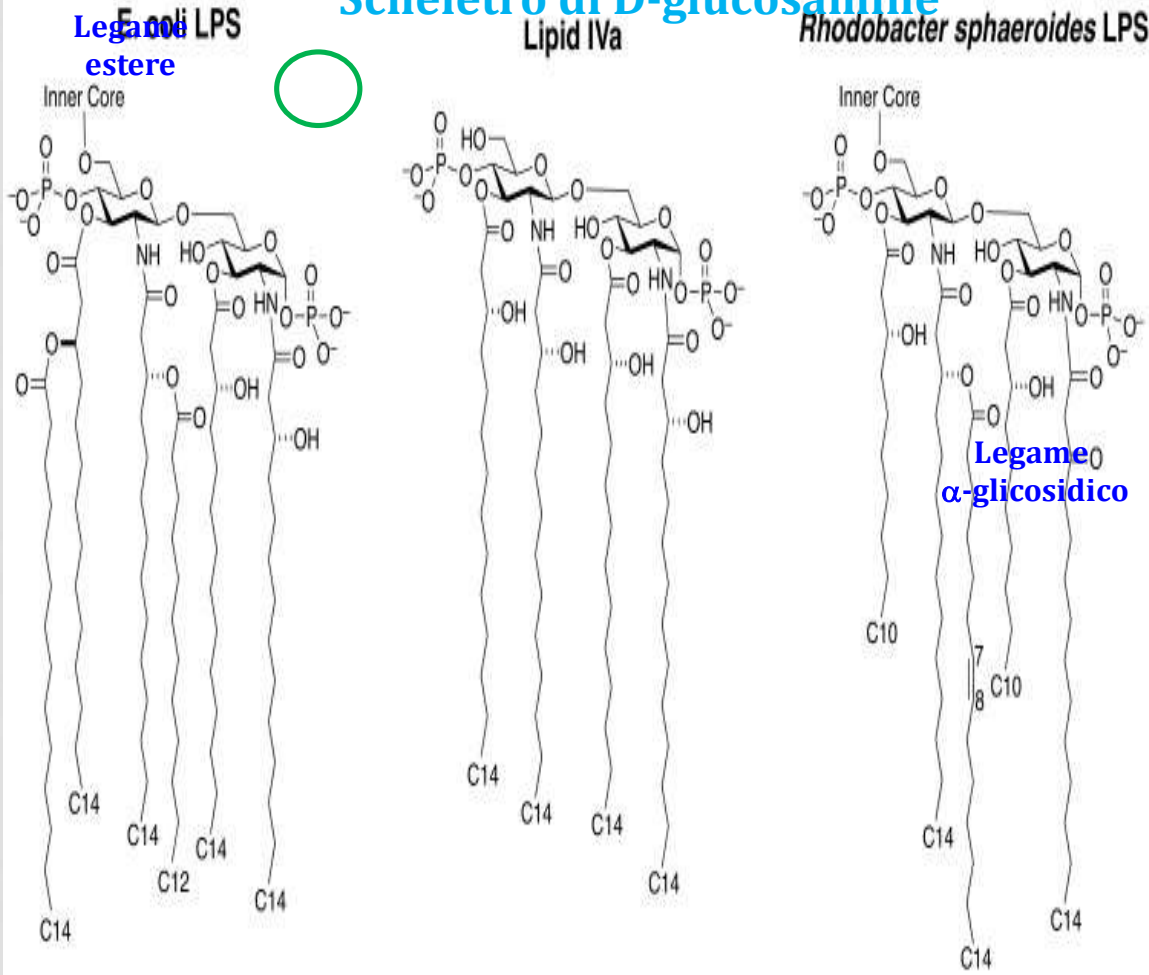


- ✓ Stabilizzazione delle molecole di LPS mediante il legame con cationi divalenti
- ✓ Funzione di barriera impermeabile

(Polimixine, poliamine, peptidi e proteine cationiche, agenti chelanti [EDTA])

# LIPIDE A: STRUTTURA DELLE ENTEROBACTERIACEAE

## Scheletro di D-glucosamine



- lo scheletro è costituito da un disaccaride con legame  $\beta,1-6$

- sono presenti due gruppi fosforici (solitamente il Lipide A è monofosforilato)

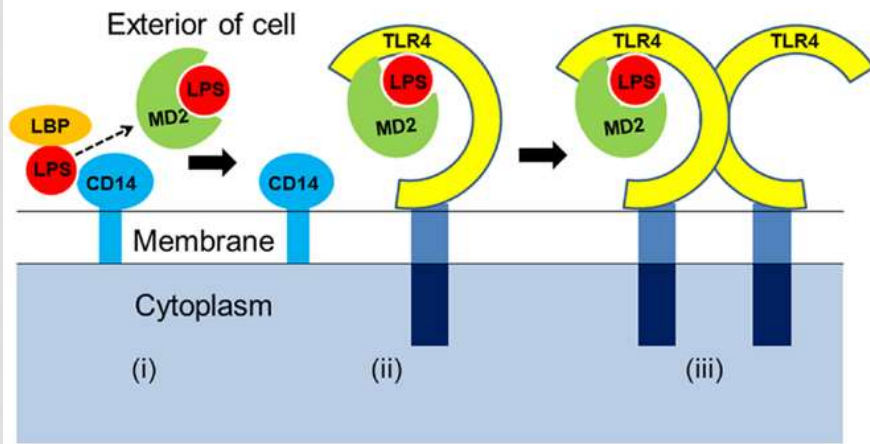
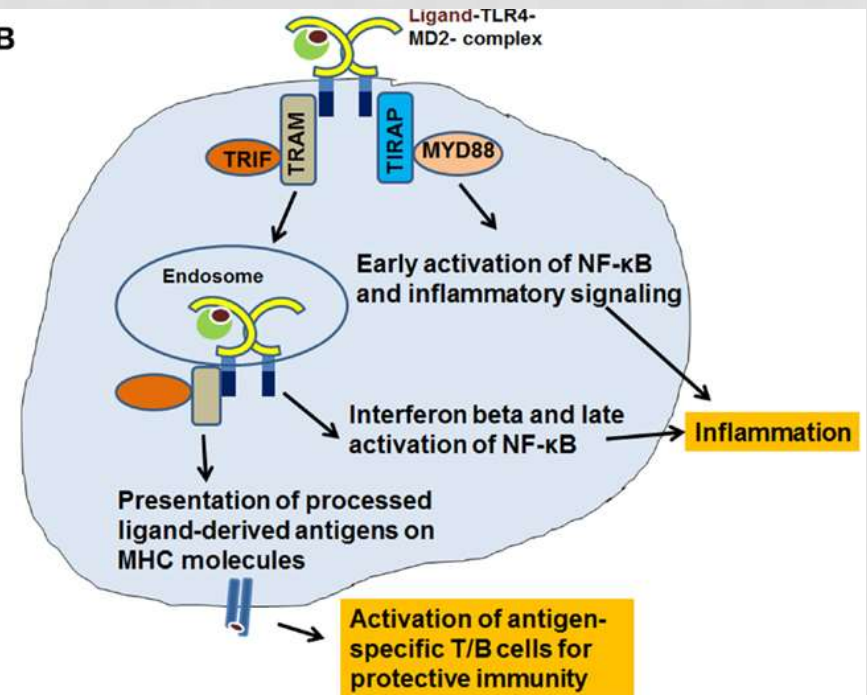
- sono presenti fino a 4 catene aciliche che a loro volta possono essere sostituite da ulteriori acidi grassi  $\rightarrow$  fino a 7 sostituenti acidi

○ Posizione di attacco della regione polisaccaridica

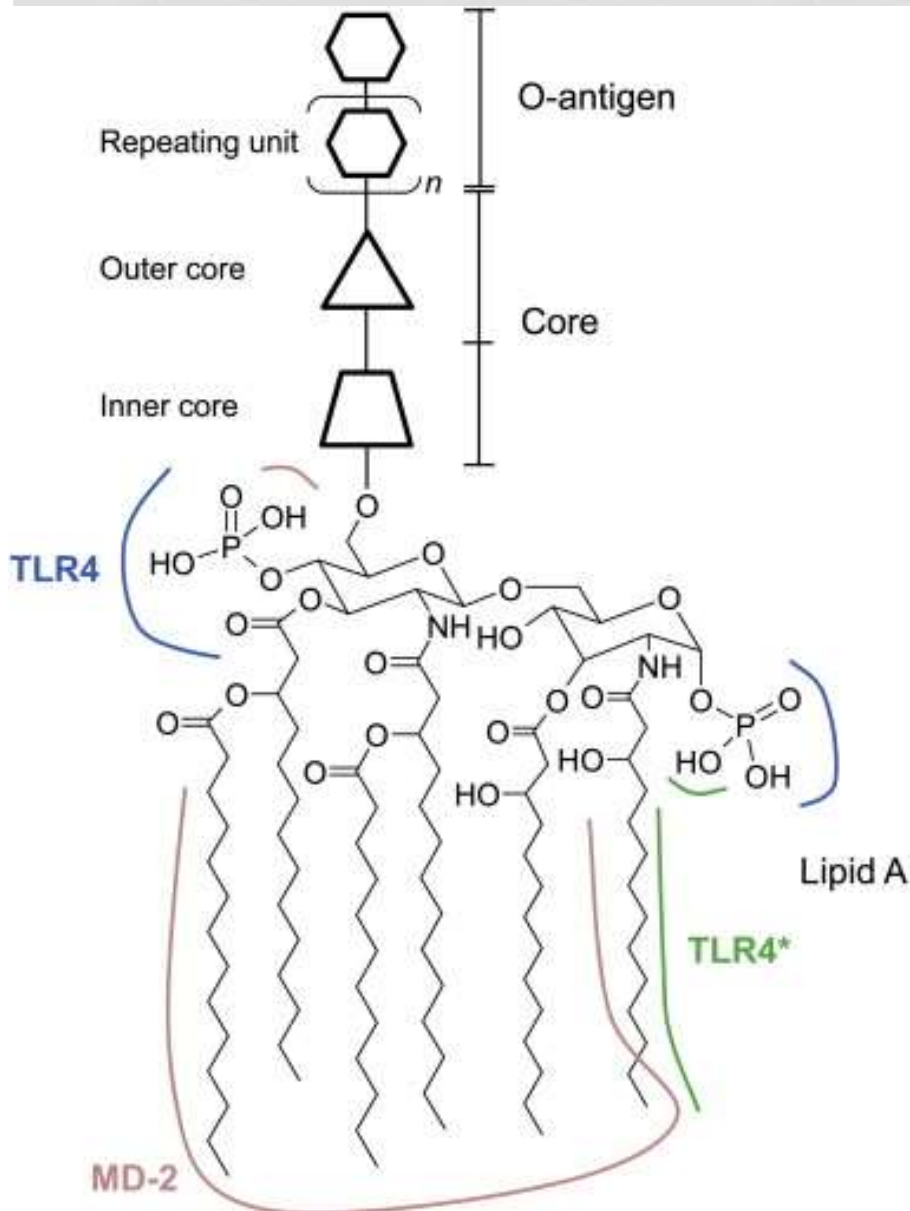
# ADATTATORI MOLECOLARI DEL TLR4

- Per essere attivo il TLR4 necessita di un adattatore, il fattore solubile **MD2**
- Il complesso TLR4/MD2 si forma a livello del reticolo endoplasmatico e viene successivamente traslocato a livello della membrana citoplasmatica
- Gli LPS nel siero vengono legati da LPS-binding protein (**LBP**) e trasportati alle cellule target
- Le LBP mediano il trasferimento di monomeri di LPS al **CD14** che facilita il riconoscimento da parte del TLR4/MD2



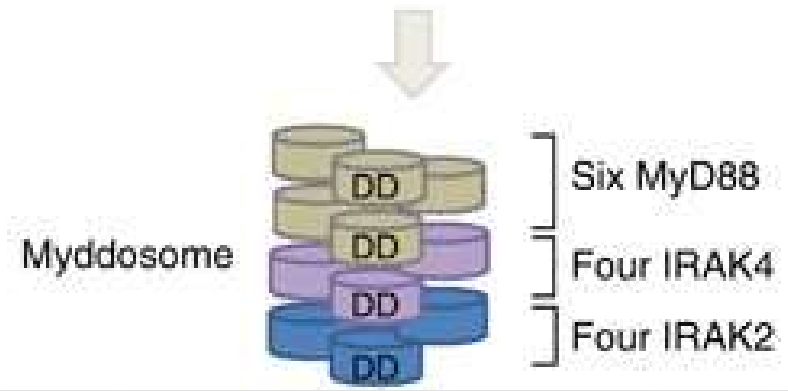
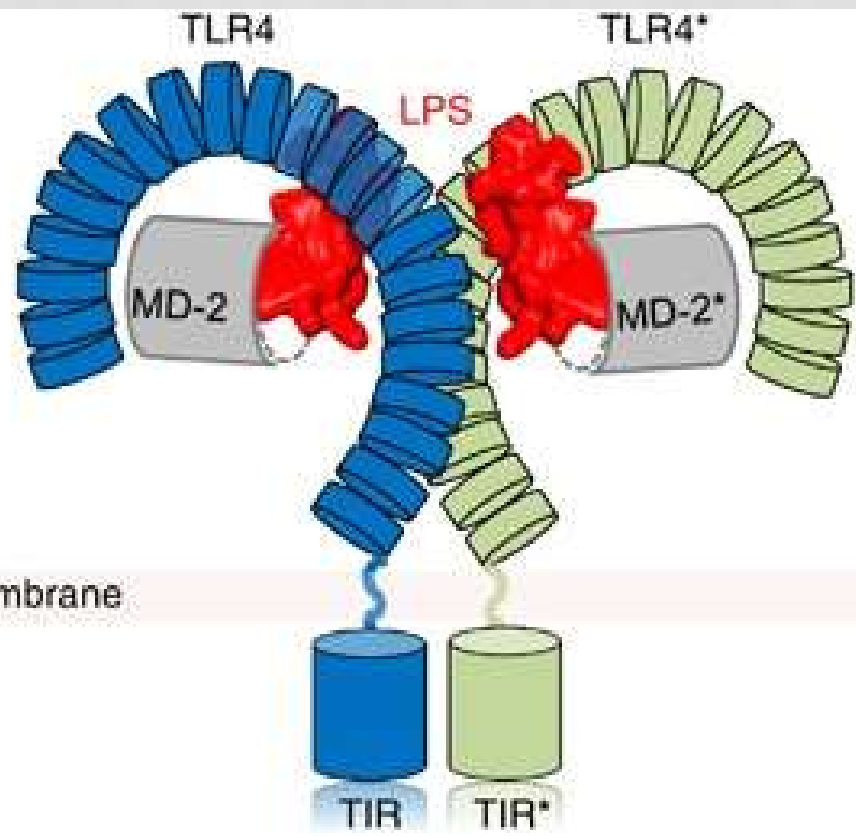
**A****B**

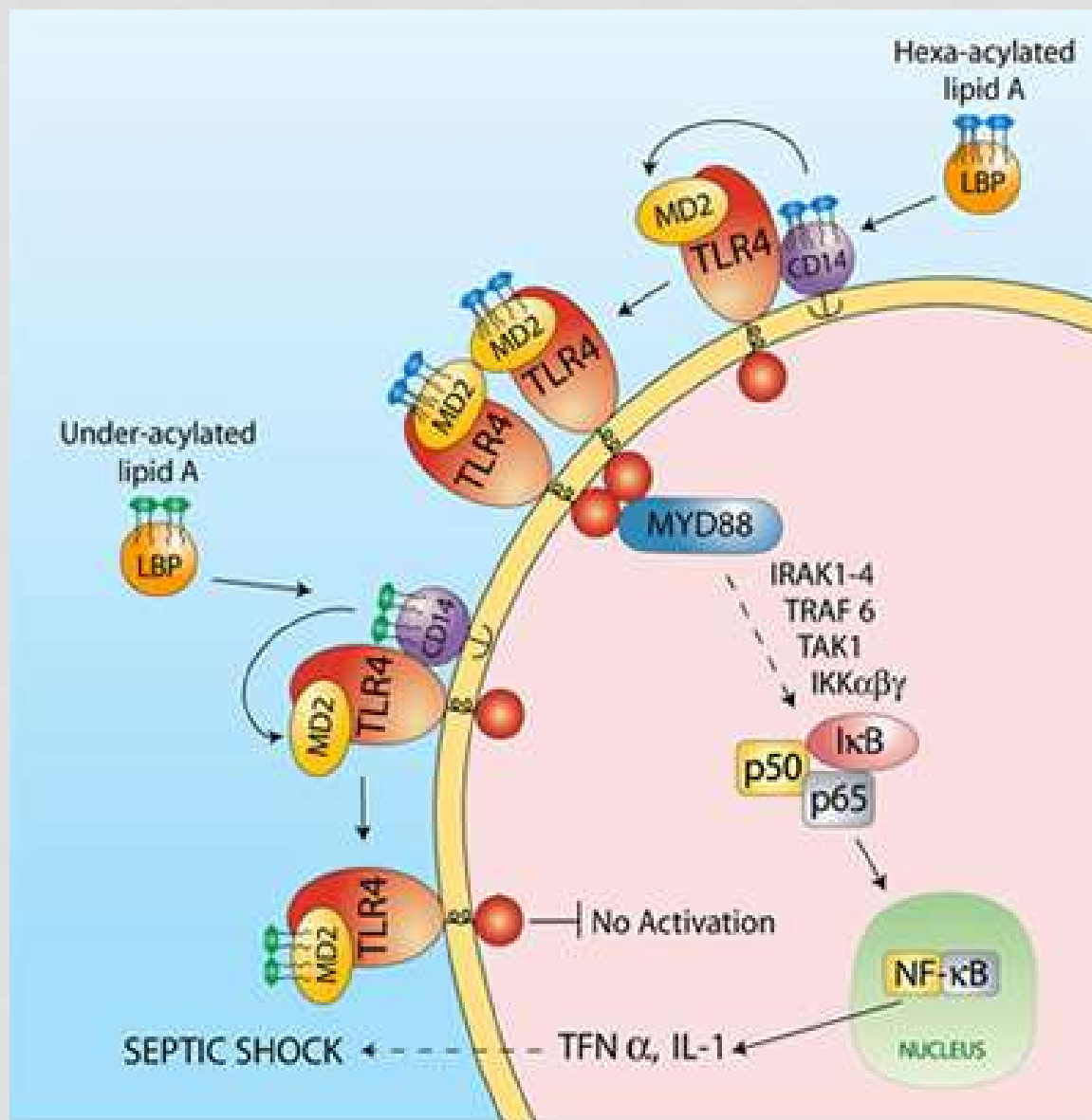
# L'adattatore MD2

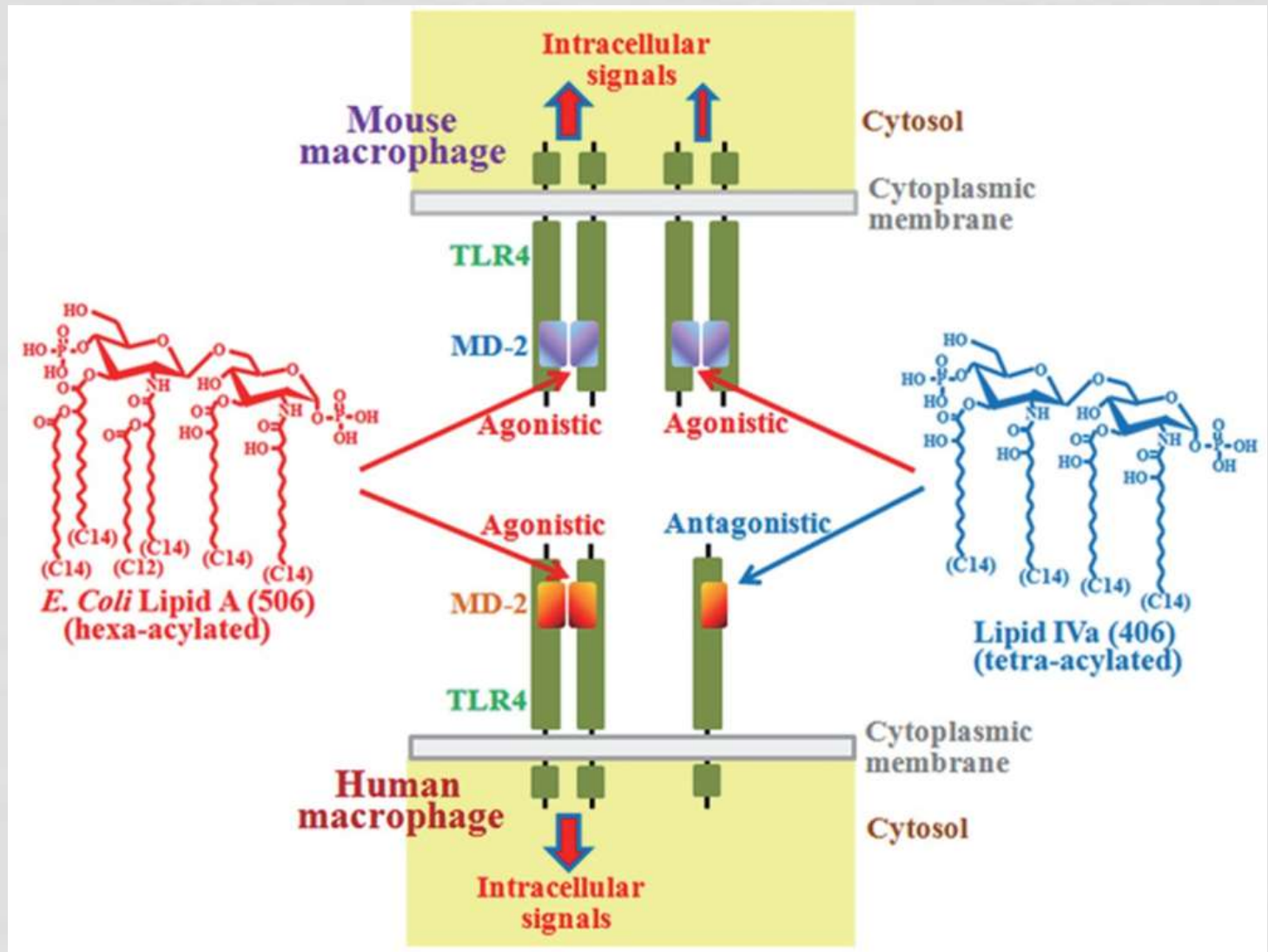


- Il corecettore MD2 possiede una tasca, una cavità all'interno della quale vengono alloggiati 5 delle 6 catene aciliche del lipide A di *E.coli*
- Negli LPS esacilati, la sesta catena di acido grasso è all'esterno della tasca, a contatto con l'ambiente esterno
- Le proprietà agoniste o antagoniste dell'LPS sono dettate dalla stechiometria delle catene aciliche con MD2

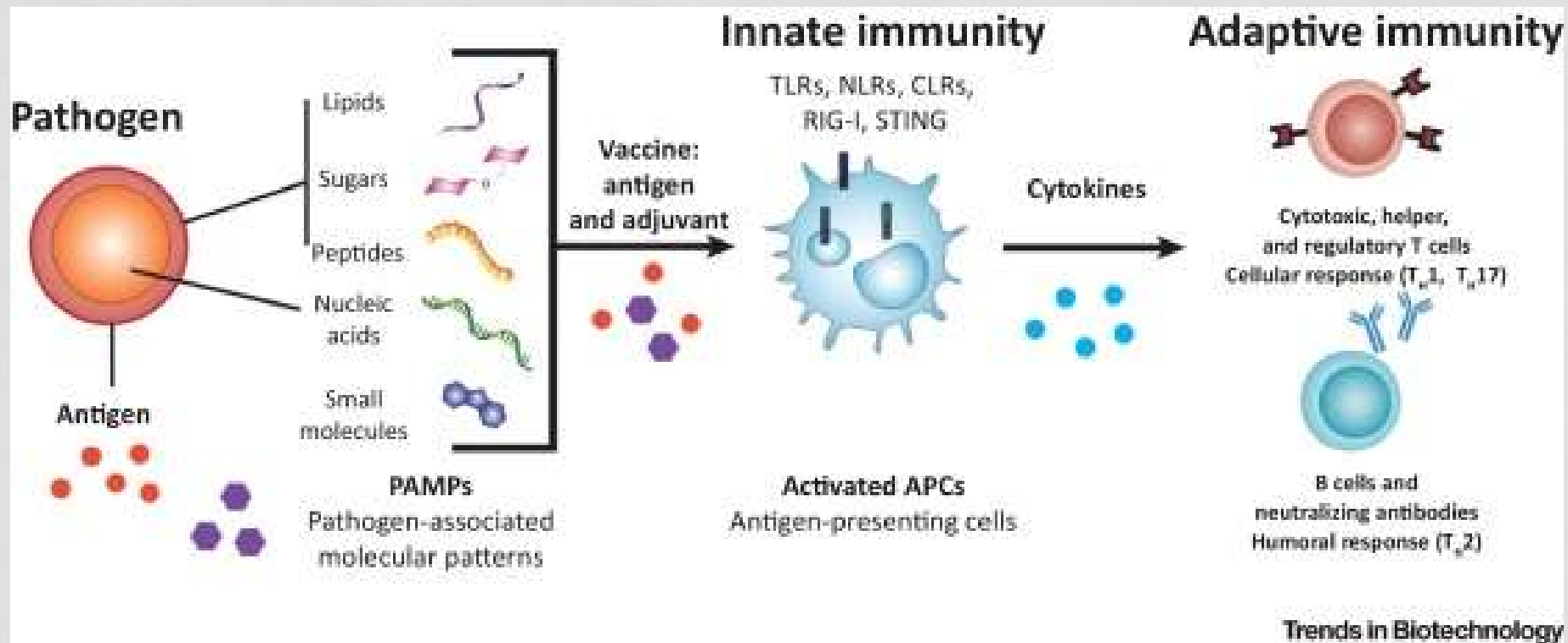












Extravascular dermis

Bite from infected flea



*Y. pestis*

Lymph node

Bubonic plague

Blood

*Y. pestis*

In respiratory droplets

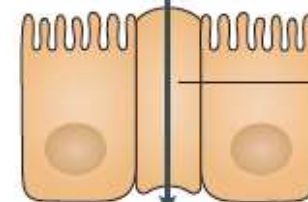
Lungs

Pneumonic plague

Lymph node

Mesenteric lymph nodes

Ingested *Y. enterocolitica* or *Y. pseudotuberculosis*



M cell in the small intestine



Macrophage

Lymph node

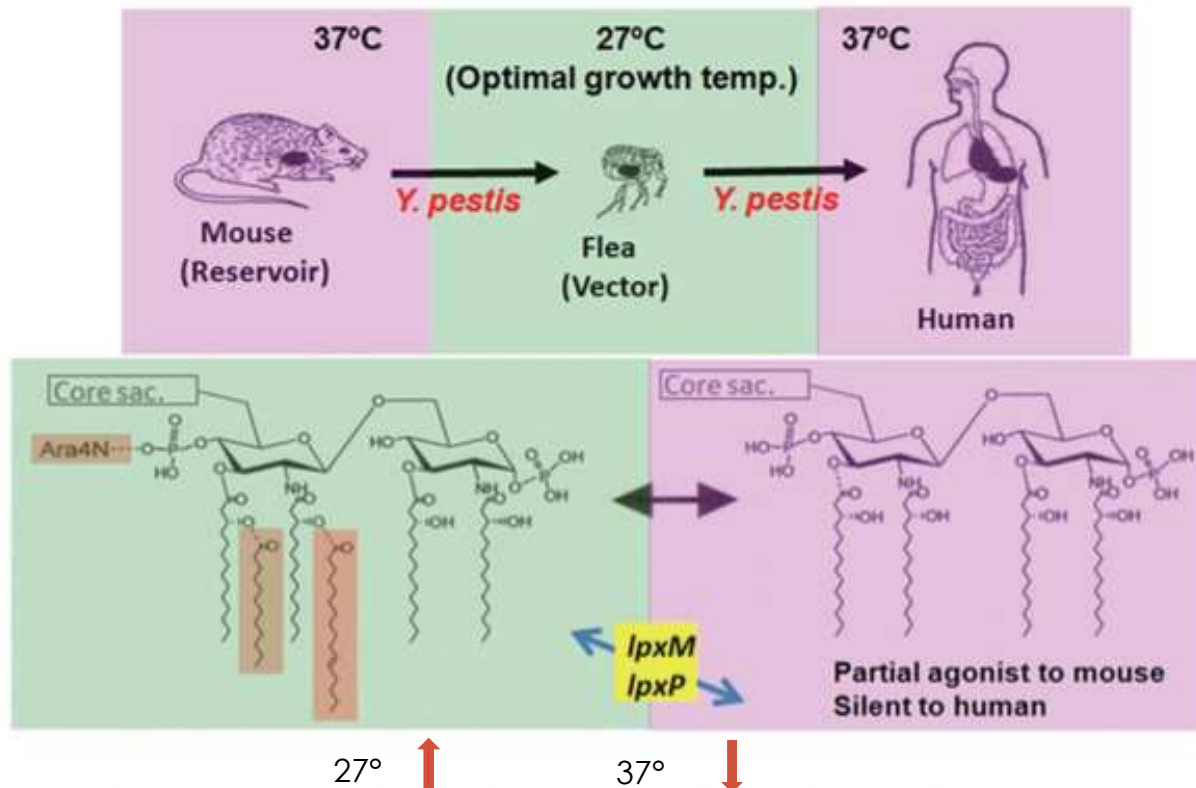
Localized infection

Rare event

Systemic infection

M cell, microfold cell.



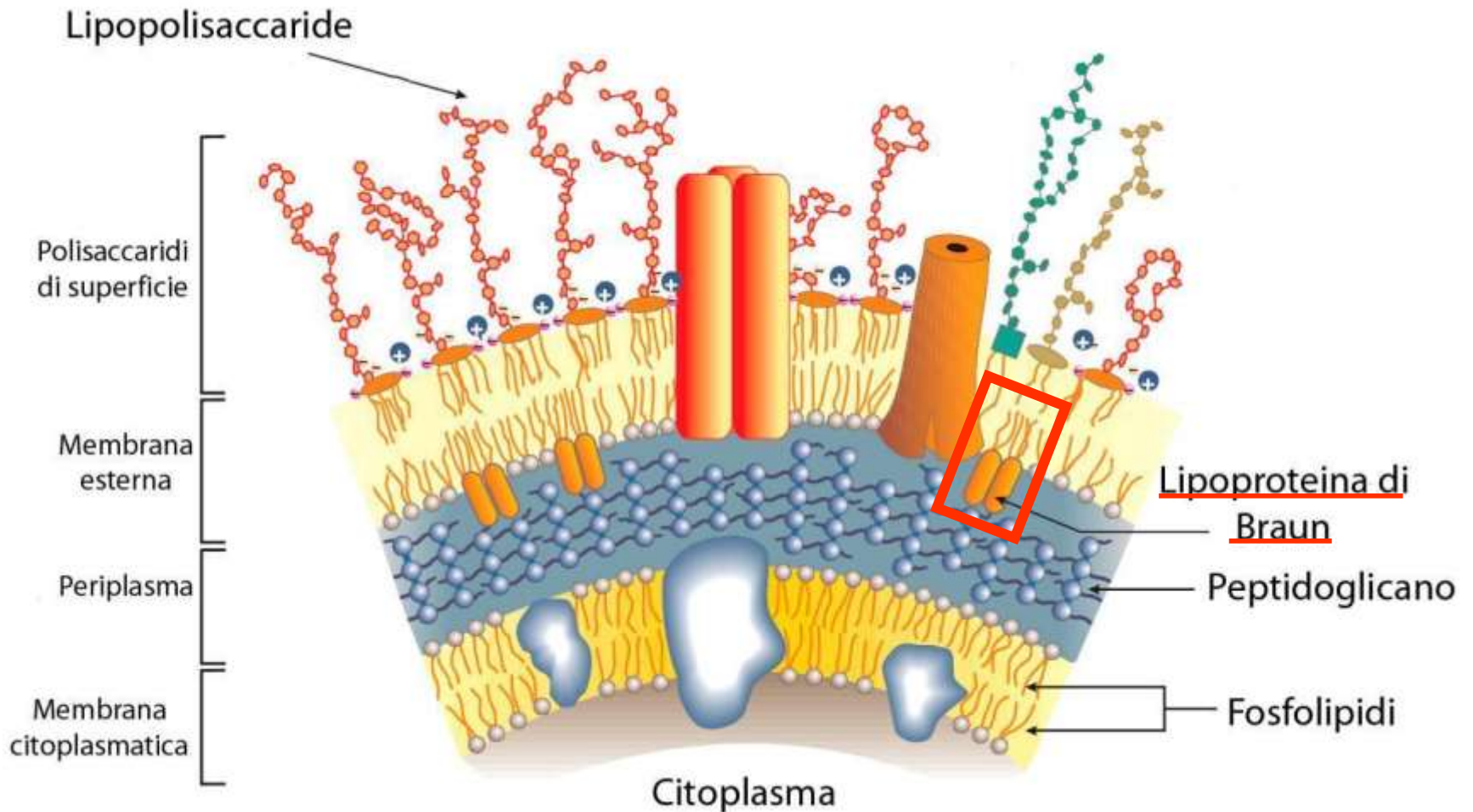


**FIGURE 3 | Infection cycle of *Y. pestis* and temperature-dependent alteration of its lipid A structures.** *Y. pestis*, a causative agent of plague, grows in mice at 37°C by possessing a tetra-acylated type as its major lipid A species. This lipid A species acts as a partial agonist to mouse cells, and *Y. pestis* is recognized by the mouse innate immune system to some extent but not enough to eliminate it completely. As a result, moderate amounts of the bacteria can survive in mice for a prolonged period, and infected mice serve as a reservoir of *Y. pestis*. Through flea bites, this bacterium moves into fleas and grows actively at 27°C, its optimal growth

temperature. At this temperature, expression of the late acyltransferase genes (*lpxM* and *lpxP*) is upregulated, and a hexa-acylated type becomes predominant among its lipid A species. Then, the bacterium moves into a human body through the bite of an infected flea and grows at 37°C. At this temperature, the expression of the late acyltransferase genes is downregulated, and the major lipid A species shift to the tetra-acylated type. *Y. pestis* containing such lipid A species is not sensed (is silent) by the human TLR4-mediated innate immune system, and the bacteria can grow freely and induce severe diseases.



# LE LIPOPROTEINE





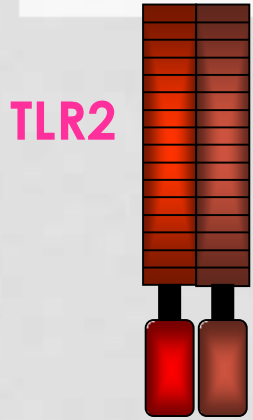
# TLR2

- Riconosce molteplici componenti batteriche:
  - **Lipoproteine/lipopeptidi**
  - **Acidi lipoteicoici**
  - Lipoarabinomannani dei micobatteri
  - Zimosani dei funghi (*S. cerevisiae*)
  - **LPS atipici (*Porphyromonas gingivalis*, *Helicobacter pylori*)**
  - HSV e VZV (varicella-zoster virus)

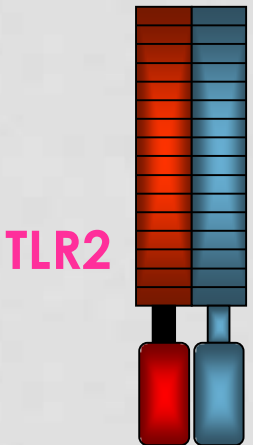
Come può riconoscere un così vasto spettro di componenti microbici?

1. TLR2 è in grado di formare eterodimeri (con TLR1 o TLR6)
2. *Interagisce con altri recettori, per esempio dectin-1 (zimosani)*
3. Può interagire anche con il CD14 che induce risposte potenziate verso alcuni PAMPs

# GLI ETERODIMERI DI TLR2



**TLR1** L'eterodimero **TLR2/1** riconosce le lipoproteine triacilate



L'eterodimero **TLR2/6** riconosce le lipoproteine diacilate



Alcuni batteri patogeni flagellati hanno evoluto dei meccanismi per eludere la risposta mediata dal riconoscimento della flagellina:

✓ *Helicobacter pylori*: presenta una flagellina funzionale per quanto concerne la motilità ma che presenta una sequenza alterata a livello del dominio riconosciuto dal TLR5

✓ *Vibrio cholerae* e *H. pylori*: la flagellina è mantenuta strettamente racchiusa nel flagello poiché è ricoperta da un rivestimento membranoso per evitare il rilascio di essa nell'ambiente

# TLR9

- Riconosce **oligonucleotidi CpG ipo-metilati**
- Questi sono motivi abbondanti nel genoma batterico, mentre nei mammiferi la frequenza è altamente ridotta e in più quando presenti sono altamente metilati
- Il TLR9 in condizioni fisiologiche si localizza a livello del **RE** ma **agisce a livello endosomiale**
- I batteri in seguito a fagocitosi si ritrovano a livello dell'endosoma dove un ambiente acido e riducente porta alla degradazione del DNA batterico in **ssCpG**
- Il TLR9 sembra essere coinvolto nella patogenesi di alcune malattie autoimmuni attraverso il riconoscimento di strutture cromatiniche
- **Alcuni DNA virali (HSV, citomegalovirus)** inducono attivazione di TLR9
- **Plasmodio della malaria** induce risposta mediata da TLR9



PRRs	PAMPs	Species (microbes)
<i>TLR</i>		
TLR2/1	Triacyl lipopeptides	Bacteria and mycobacteria
TLR2/6	Diacyl lipopeptides LTA Zymosan	<i>Mycoplasma</i> Gram-positive bacteria Fungi ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> )
TLR2	Phospholipomannan Glucuronoxylomannan tGPI-mucin PDG Porins Lipoarabinomannan Hemagglutinin protein ND	Fungi ( <i>Candida albicans</i> ) Fungi ( <i>Cryptococcus neoformans</i> ) Parasites ( <i>Trypanosoma cruzi</i> ) Gram-positive bacteria Bacteria ( <i>Neisseria</i> ) Mycobacteria Viruses (measles virus) Viruses (HSV-1, HCMV)
TLR3	dsRNA poly(I:C)	Viruses (reovirus, RSV, West Nile virus) Synthetic
TLR4	LPS MPL	Gram-negative bacteria Synthetic
TLR5	Flagellin	Flagellated bacteria
TLR7/8	ssRNA R-848 (imidazoquinolines)	Viruses (HIV, influenza virus) Synthetic
TLR9	CpG-DNA CpG-ODN DNA Hemozoin	Bacteria Synthetic Bacteria and viruses (HSV-1, HSV-2, MCMV) Malaria parasite
TLR11	Profilin ND	Parasites ( <i>Toxoplasma gondii</i> ) Uropathogenic bacteria

RECOGNITION

PATHWAYS

FUNCTIONS

