



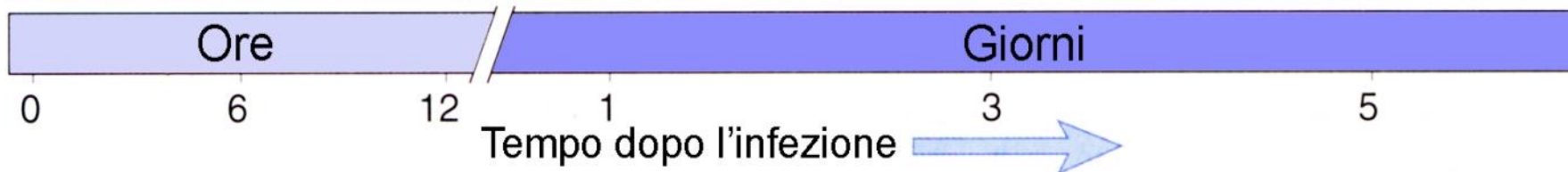
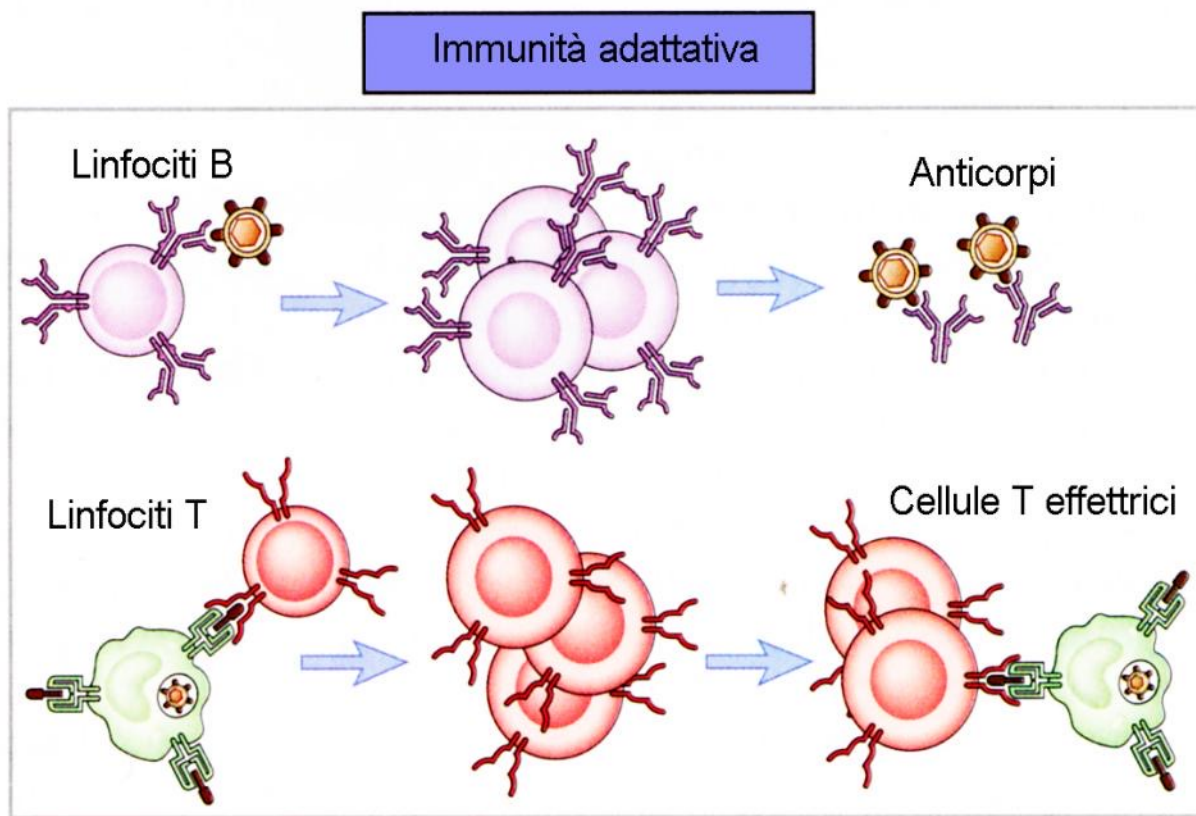
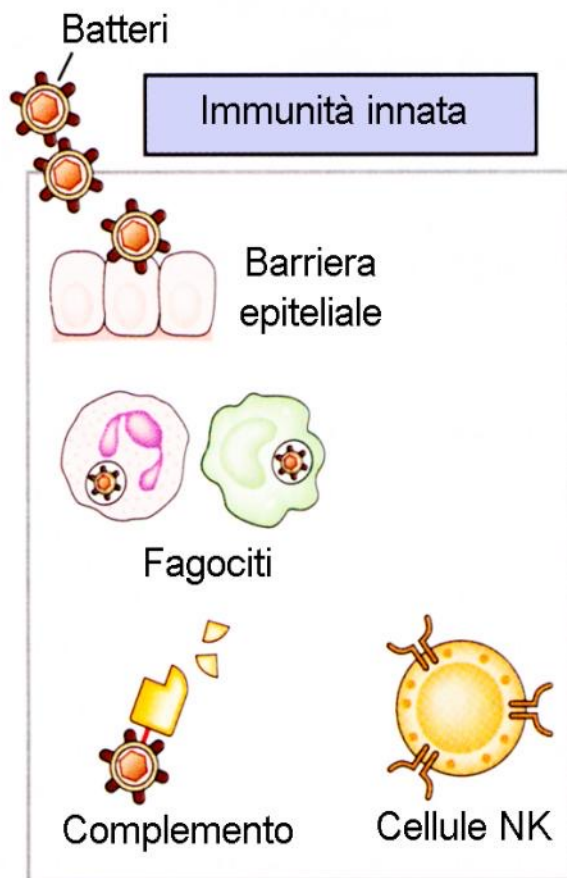
**Il compartimento naturale dell'immunità innata: I
recettori Toll-like (TLRs) e le proteine Nods
LEZIONE A**

Periodi disponibili: fine maggio-inizio giugno; dopo il 20 giugno; inizio luglio; dopo il 20 luglio

Gruppi tesine MCV 2023	Argomento (non ancora stabilito)	Periodo
Borgia Ginevra Denkiewicz Wiktoria Di Domenicantonio Irene Scalise Concetta		Fine luglio (possibilmente entro il 24/07)
Frate Gianluca Fava Giulia Carcea Alessandro		Inizio Luglio
Ragone Francesca Terrasi Alberta Michela Leo		Inizio luglio
Clara Cipolla Valeria Marsigliesi Vera Miozzi		Inizio luglio
Cristina De Palma Marine Mabily Eleonora Iamele Vilia Giannini		Inizio Luglio
karim el bahnsawy Daniele De Grossi Mazzorin Vincenzo Corrado		
Giorgio Puzone Bifulco Manuel Pacchiele Martina De Sanctis		Fine Luglio
Beatrice Longo Luigia Marotta Silvana Godente		Fine luglio
Samuele Amati Andrea Saglia Francesco Riccetelli Ilaria Zannini		Fine/metà giugno
Emanuela Russo Maria Gloria de Donatis Alessia		Inizio giugno

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*



Il sistema immunitario: la funzione

Riconosce gli organismi estranei “invasori”

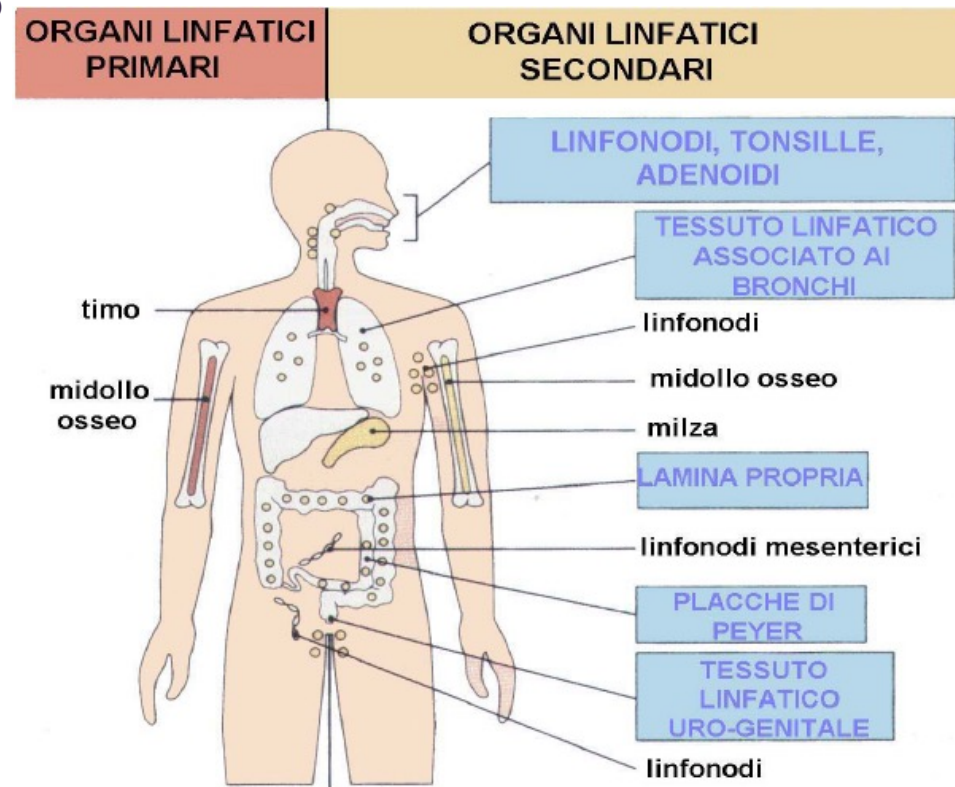
Previene/limita la loro diffusione

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



The Response to An Initial Infection Occurs in 3 Phases

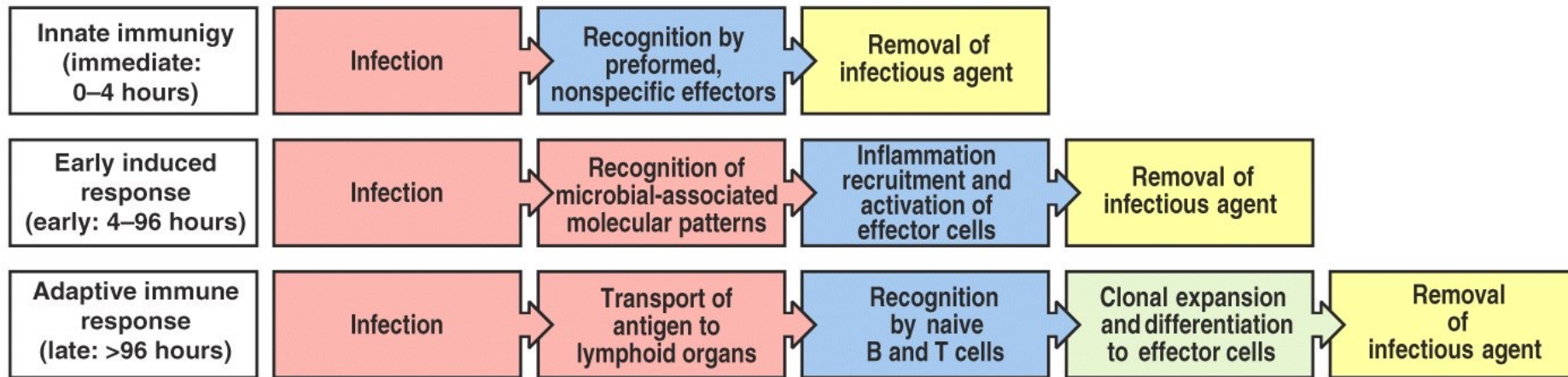


Figure 2-1 Immunobiology, 6/e. (© Garland Science 2005)

Cell types of innate immunity



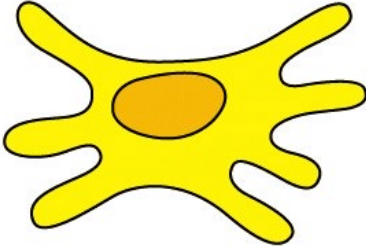
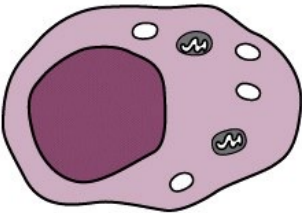
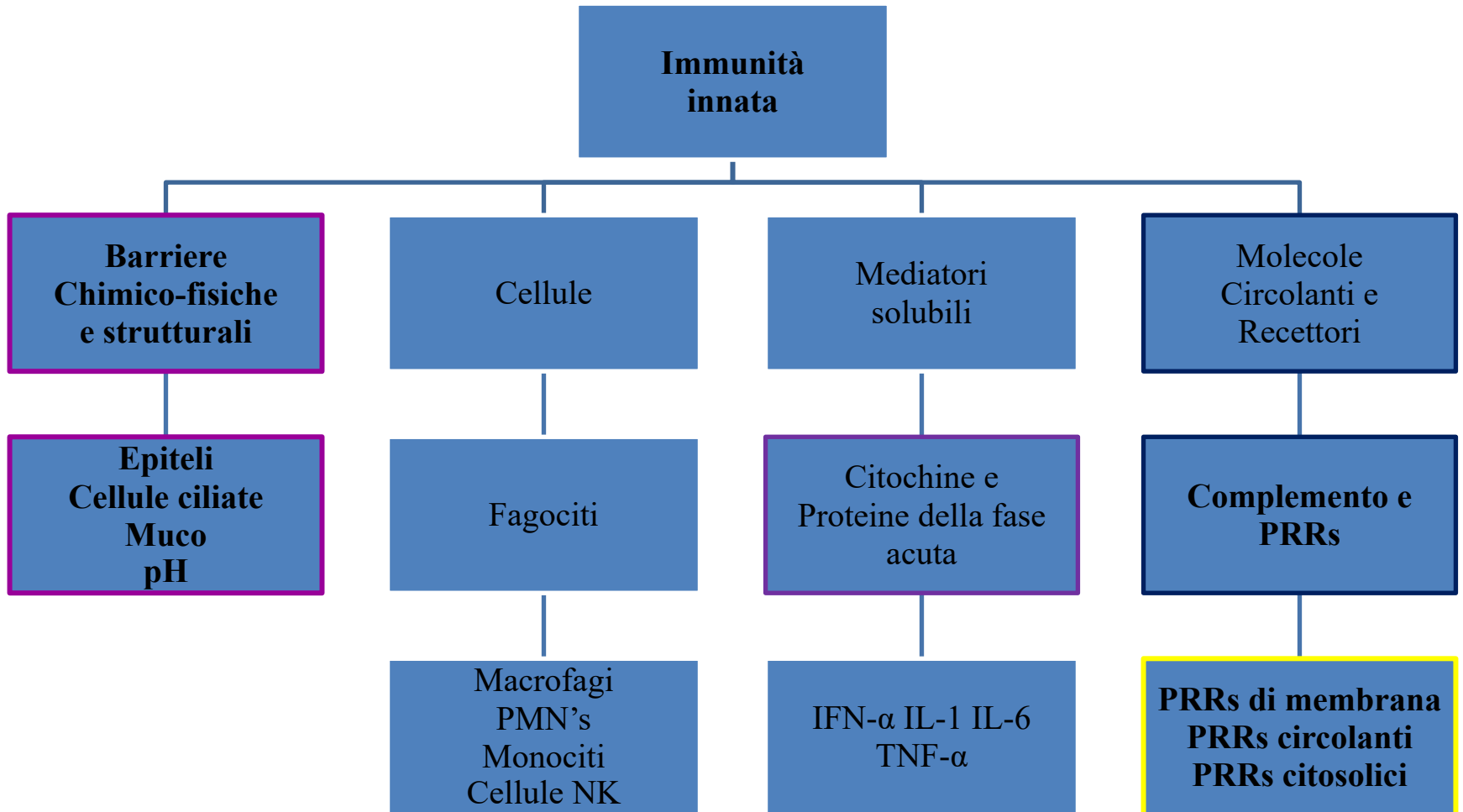
Cell type	 Neutrophils	 Macrophages	 Dendritic cells	 Natural killer cells
Function	Phagocytosis Reactive oxygen and nitrogen species Antimicrobial peptides	Phagocytosis Inflammatory mediators Antigen presentation Reactive oxygen and nitrogen species Cytokines Complement proteins	Antigen presentation 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

I meccanismi dell'immunità innata



I due tipi di immunità...qualche nozione

Immunità innata o naturale
pronta risposta (fase precoce)
dell'infezione



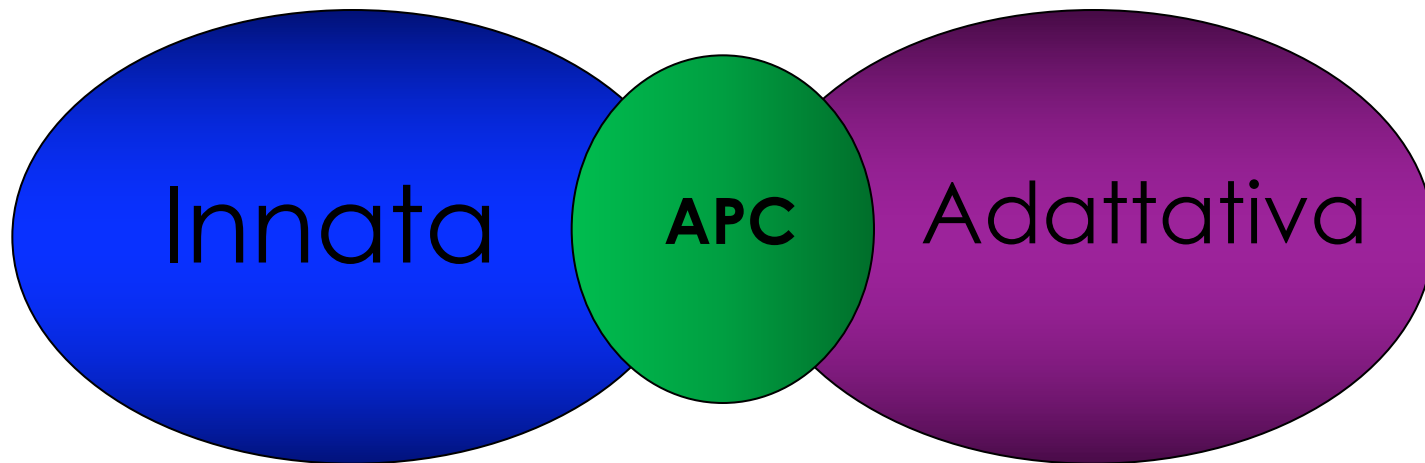
controllo/
limitazione

Immunità adattativa o acquisita
lenta
(fase tardiva)



eradicazione più
dell'infezione

Immunità di lunga durata



Immunità innata e adattativa: Proprieta'

Proprietà	Innata	Adattativa
Recettori	Fissati nel genoma Non è necessario il riarrangiamento	Codificati in segmenti genici Il riarrangiamento è necessario
Distribuzione	Non clonale Tutte le cellule di una classe identica	Clonale Tutte le cellule di una distinta classe
Ligandi	Molecole conservate	Singoli elementi di molecole
Discriminazione self-non self	Perfetta: selezionata durante l'evoluzione	Imperfetta: selezionata nelle cellule somatiche dell'individuo
Tempo di azione	Immediata attivazione degli effettori	Ritardata attivazione degli effettori

Immunità innata e adattativa: similitudini e differenze

Proprietà	Innata	Adattativa
Barriere Chimico Fisiche	Epiteli, Muco, pH, Temperatura	Tessuti linfoide associate alle mucose (MALT) 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- α)	(IL-2, IFN- γ)

[illegible]

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 (pentraxina PTX3, filcoline..**
 - b) **di membrana (TLRs, lectine)**
 - c) **citosolici (proteine Nods/RLRs)**

Notevoli omologie strutturali e funzionali con i geni *R* delle piante

PAMPs: Pathogen-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

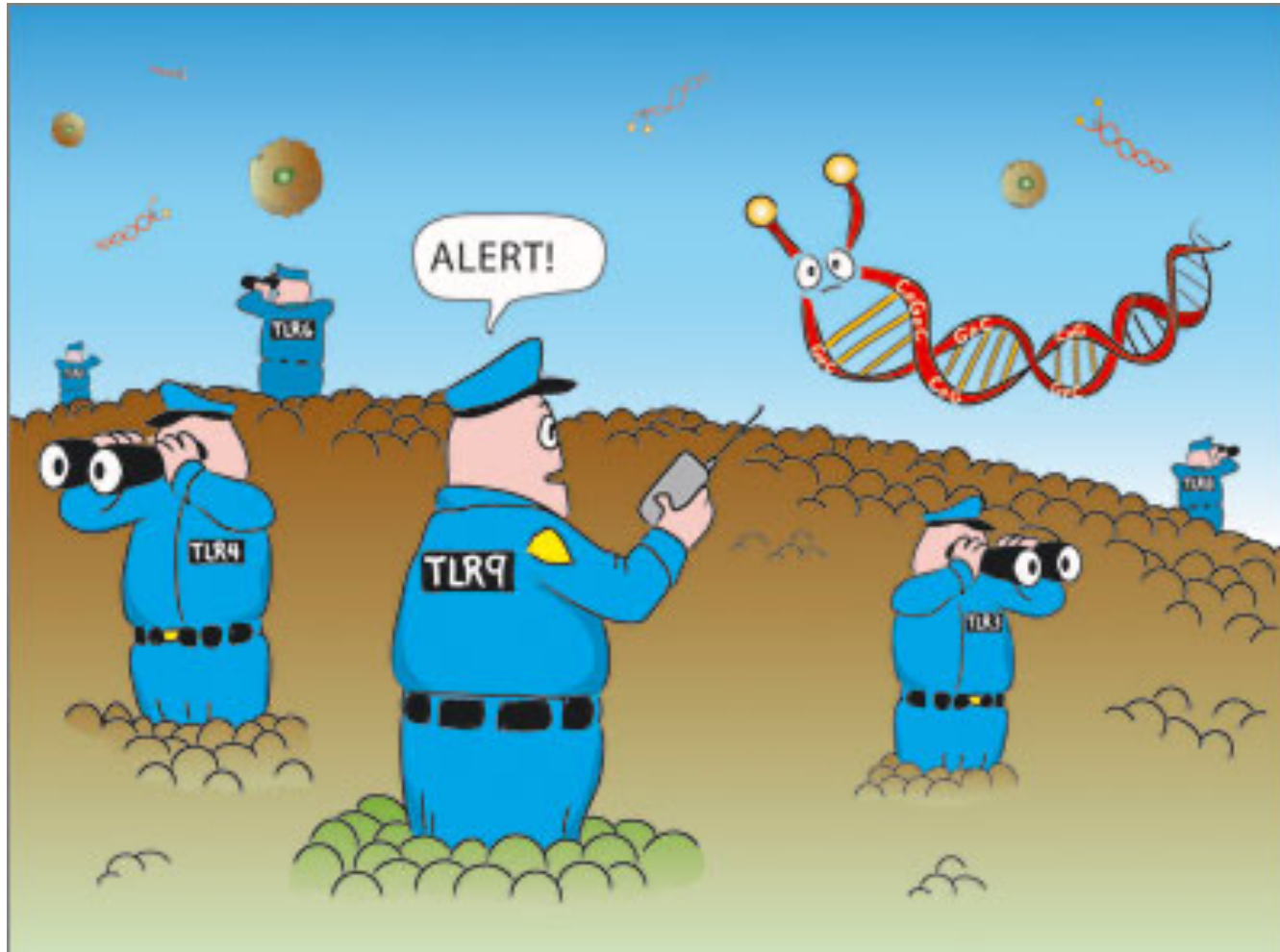
PAMPs – ligandi dei PRRs

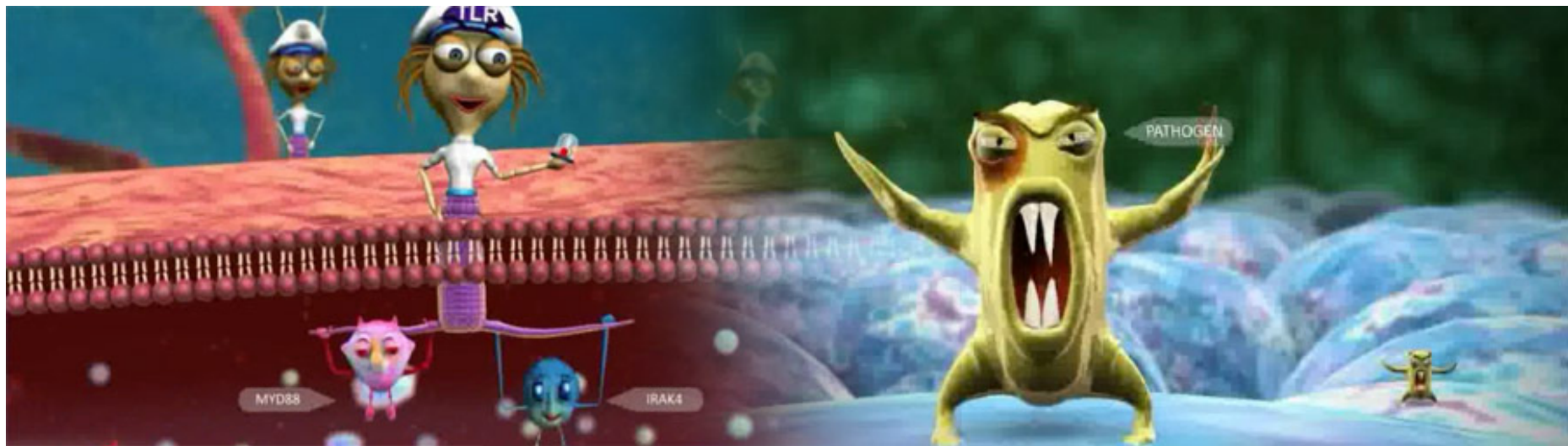
- Componenti della parete cellulare batterica: **lipopolisaccaride (LPS)**, **lipoproteine batteriche (BLPs)**, **acido lipoteicoico (LTA)**, **peptidoglicano (PGN)**, **sequenze DNA ricco in guanina e citosina ipo-metilato (CpG)**
- DNA e RNA virale
- Componenti della parete cellulare dei funghi: zimozani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

PAMPs-PRRs

- 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
 - Azione diretta sui linfociti B naive (proliferazione e differenziazione)
 - Azione diretta sui linfociti T effettori e memory
- L'attivazione dei PRRs è un meccanismo di protezione per l'ospite ma la sovraregolazione dei PRRs può causare malattie gravi

Toll-like receptors (TLRs)



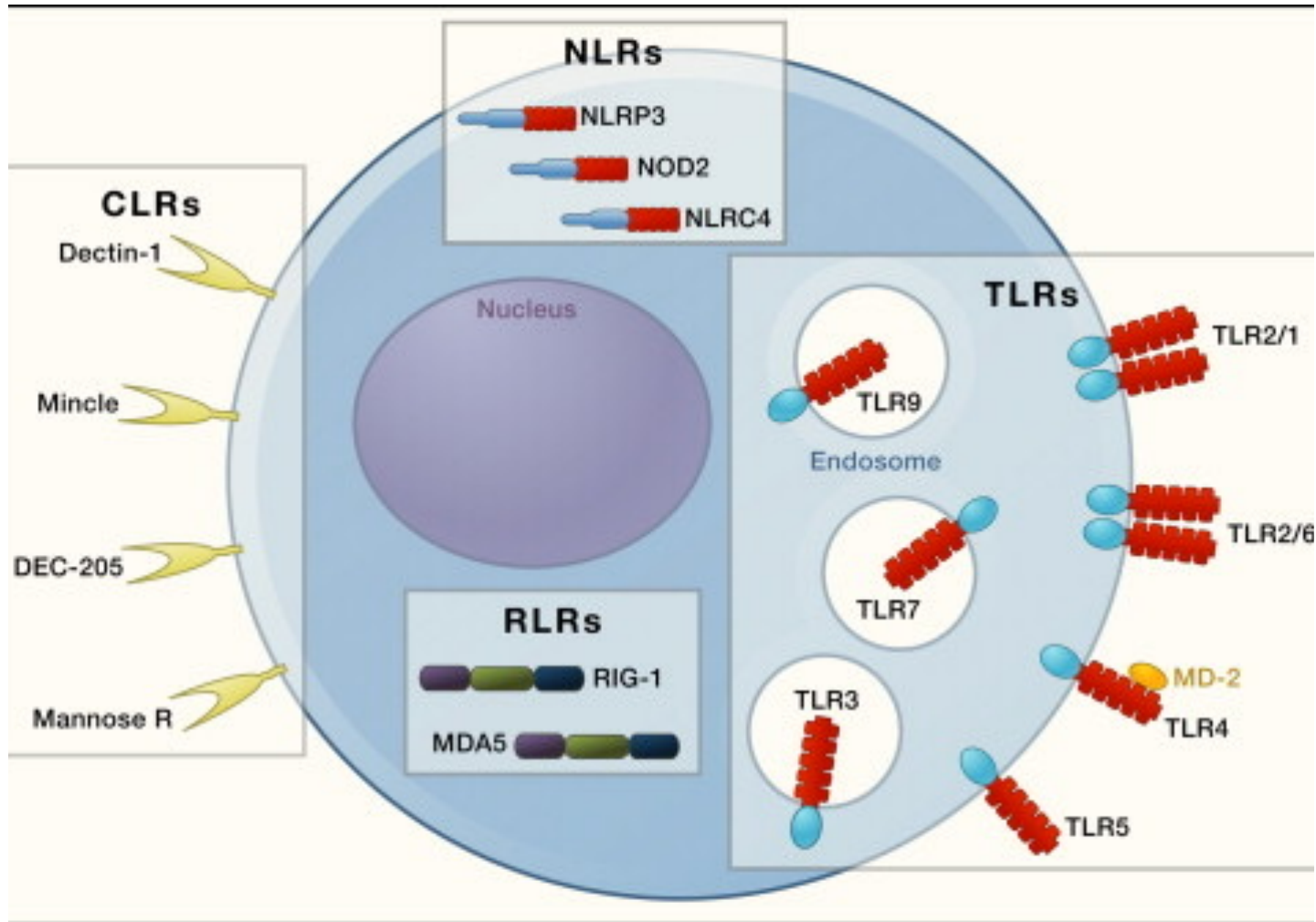


Toll-like receptors (TLRs)

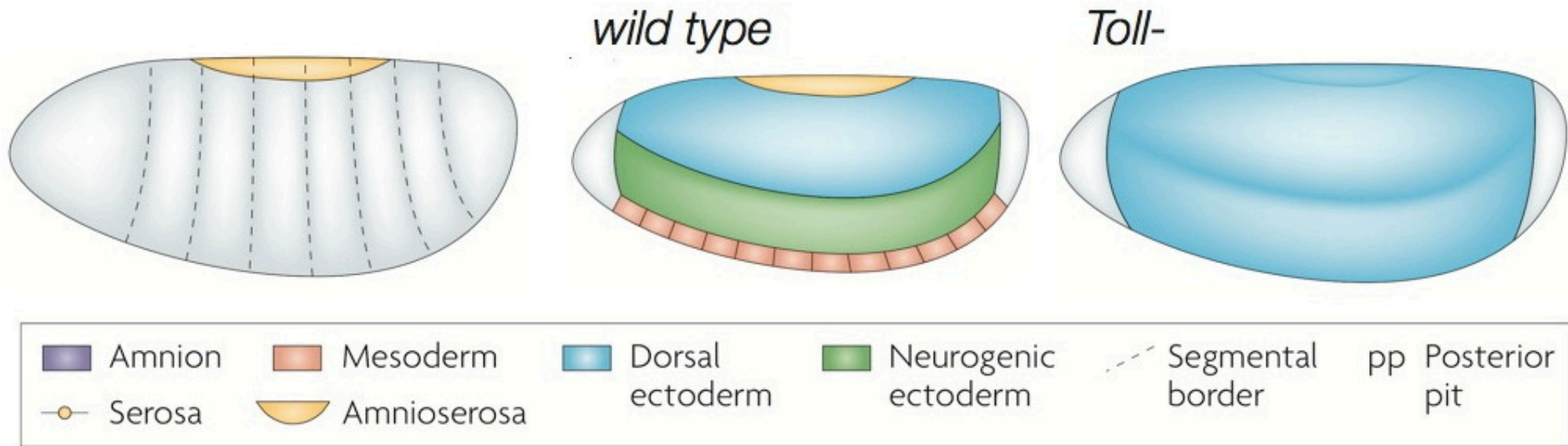
- Ad oggi sono noti 13 TLRs: 10 nell'uomo (hTLRs), 13 nel topo (mTLRs)
- I primi nove TLRs (TLR1-TLR9) mostrano un elevato grado di conservazione strutturale e funzionale tra topo e uomo
- Con eccezione del TLR8 il cui ligando nel topo non è stato ancora identificato
- mTLR10 non è funzionale come conseguenza di un'inserzione retrovirale
- hTLR11 non funzionale a causa di un prematuro codon di stop nella sequenza codificante
- mTLR11/12 profilina (*Toxoplasma gondii*)
- mTLR13 RNA ribosomiale 23s

PAMPs E PRRs

C-type lectin receptors (CLRs)



The Toll mutation in *D melanogaster* (C Nusslein-Volhard and colleagues)



drawing from Sommer, Nat Rev Genetics 10:416, 2009

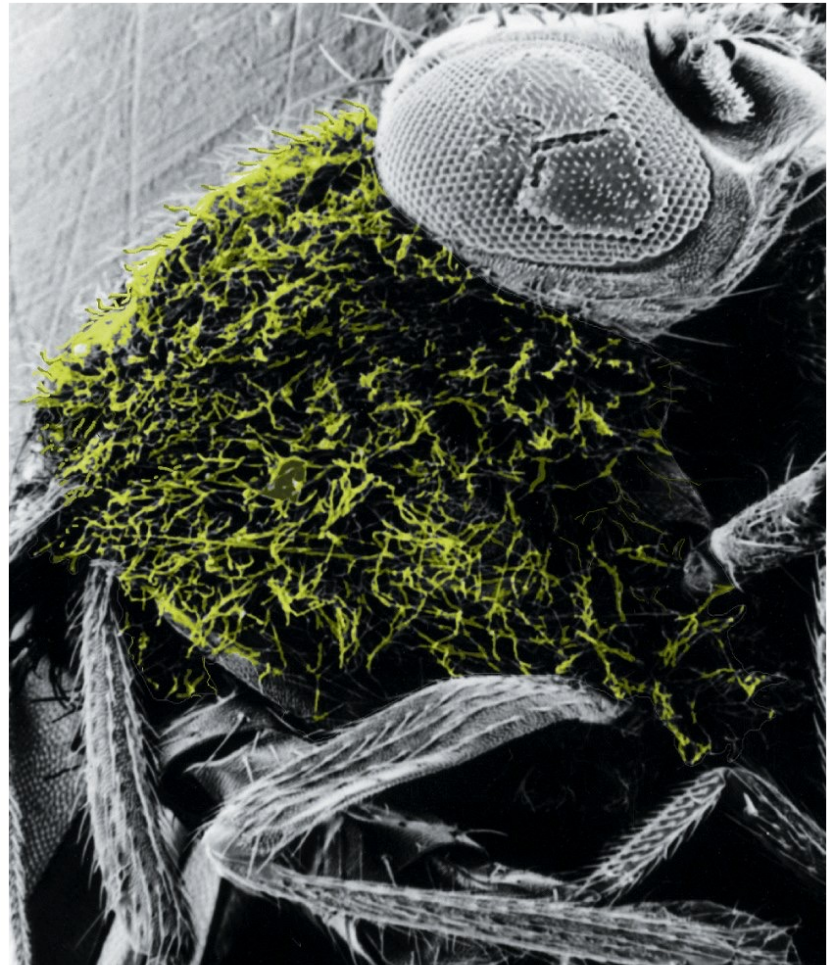


Premio Nobel 1995

- La proteina recettoriale **Toll** è stata identificata per la prima volta nel 1985 dalla biologa tedesca **Christiane Nüsslein-Volhard** e da i suoi collaboratori nell'ambito di alcune ricerche volte ad identificare i geni coinvolti nello sviluppo embrionale di *Drosophila melanogaster*.
- Gli esami effettuati da questi ricercatori, basati sulla tecnica di “mutagenesi di saturazione” sviluppata da Christiane Nüsslein-Volhard e Eric F. Wieschaus, identificarono un gruppo di 10-15 geni responsabili del controllo della segmentazione embrionale. Per questo approccio pioneristico essi vennero insigniti, insieme a Edward B. Lewis, del Premio Nobel per la Medicina nel 1995.
- Si racconta che il nome “Toll” fu coniato da Nusslein-Volhard, che, dopo aver osservato al microscopio il mutante del moscerino, esclamò “das war toll”, un'espressione difficile da rendere con esattezza in italiano ma all'incirca significa “bizzarro”, “incredibile”, “folle”.
- Gli embrioni infatti erano “dorsalizzati” e mancavano delle strutture ventrali.

- Il sequenziamento di Toll, nel 1988, rivelò una struttura tripartita con una regione N-terminale, una sequenza transmembrana e un dominio C-terminale di struttura e funzione sconosciuta.
- Un importante sviluppo, nei primi anni 90, fu la scoperta che il dominio C-terminale aveva un alto grado di omologia con il dominio segnale del recettore per l'interleuchina-1 (IL-1) dei vertebrati.
- Nel 1995 il gruppo di Hoffmann scoprì che in *Drosophila* Toll e alcuni altri membri del gruppo dorsale avevano anche importanti ruoli nella risposta immunitaria innata contro infezioni fungine (Leulier and Lemaitre, 2008).
- I ricercatori notarono che mutazioni che causano perdita di funzione di Toll, compromettevano la sopravvivenza dei moscerini adulti infettati da un particolare fungo, *Aspergillus fumigatus*, e la trascrizione del peptide antifungino drosomicina, indicando che Toll aveva un ruolo nella difesa dell'ospite dai funghi.

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

- Il primo omologo umano del gene Toll di *Drosophila* fu descritto nel 1994 prima che la funzione immunitaria del Toll in *Drosophila* fosse conosciuta.
- Si dedusse quindi che TIL (ora conosciuto come TLR1) potesse partecipare allo sviluppo nei mammiferi (Nomura, et al., 1994)
- Nel 1997 Charles Janeway e Ruslan Medzhitov clonarono con successo un altro omologo di Toll, ora conosciuto come TLR4, e mostrarono che era in grado di attivare il fattore di trascrizione Nuclear Factor Kappa B (NF- κ B) (Janeway and Medzhitov, 2002).
- La rilevanza immunitaria del TLR4 nei mammiferi fu chiaramente mostrata da Beutler e colleghi in un modello murino.
- Nel 1998 questi ricercatori dimostrarono che topi che non erano in grado di rispondere agli LPS presentavano mutazioni con perdita di funzione per il recettore. Questi studi identificarono il recettore TLR4 come uno dei componenti chiave coinvolto nel riconoscimento dell'"LPS.
- Le due scoperte di Hoffmann e Beutler consentirono di identificare un sistema molecolare sensorio (Toll/TLR), comune ad insetti e mammiferi, essenziale per indurre la prima linea di difesa dell'"ospite contro l'"attacco di /microrganismi, e valsero loro il premio Nobel per la Medicina o Fisiologia nel 2011

The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2011



TLR-4 receptor

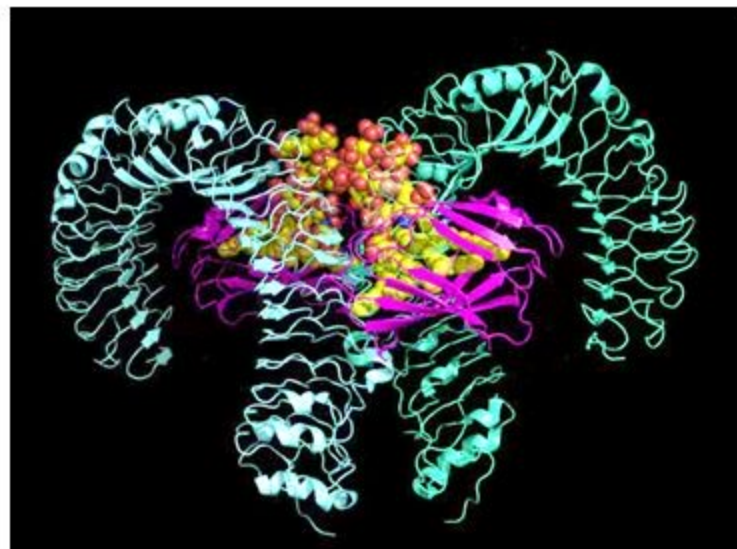


**"Bruce A. Beutler - Nobel Lecture:
How Mammals Sense Infection: From
Endotoxin to the Toll-like Receptors".**

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

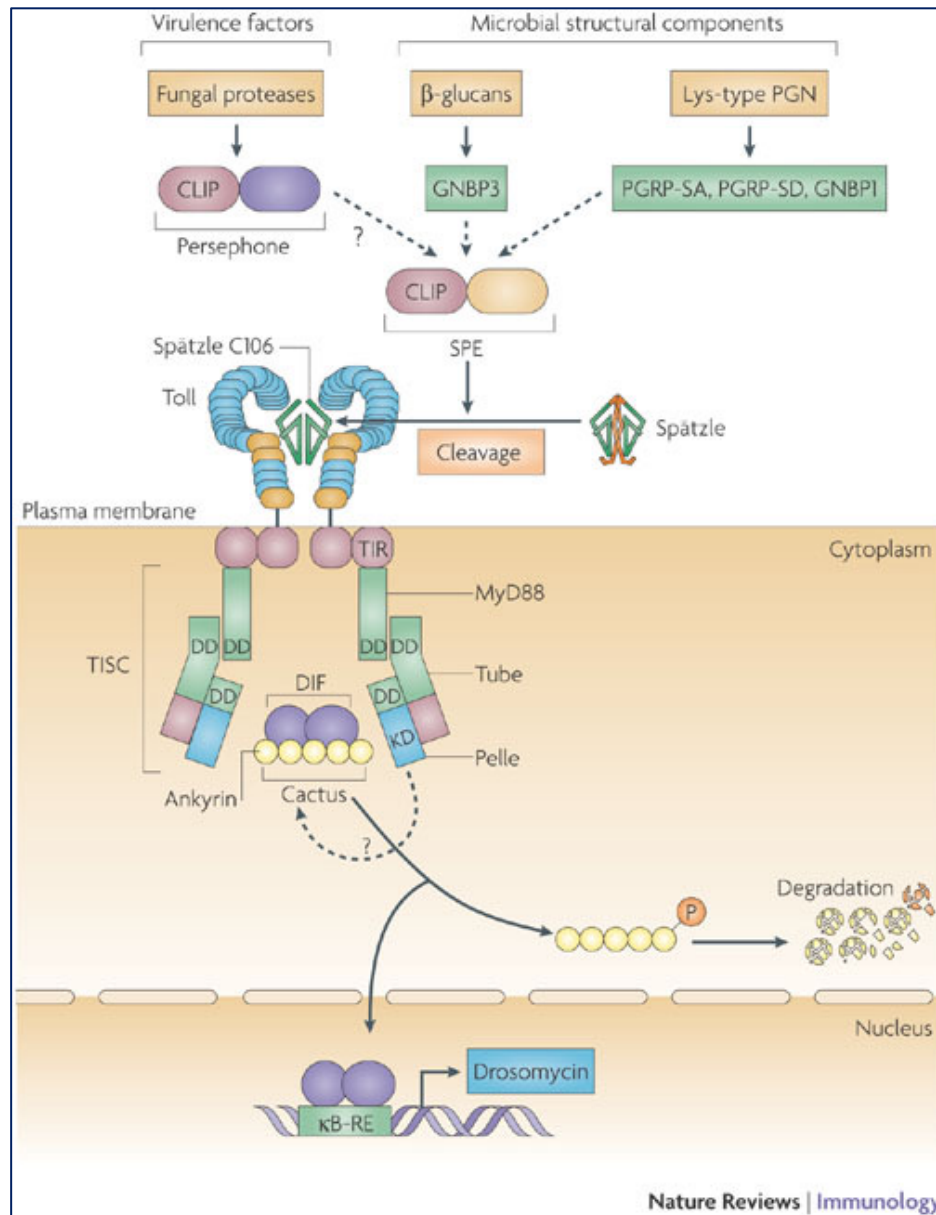


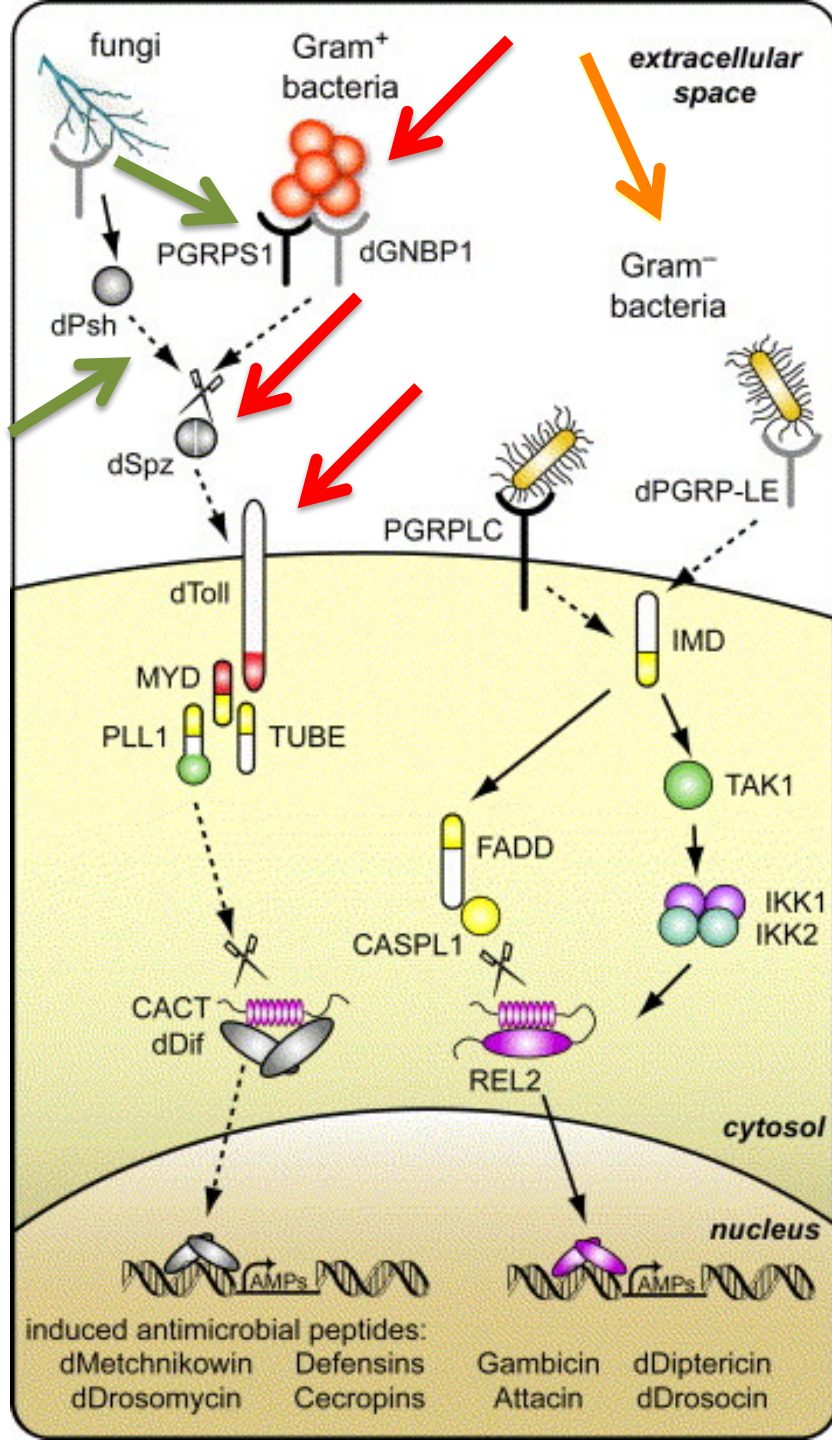
**"Ralph M. Steinman
- Nobel Lecture:
the Discovery
of Dendritic
Cells".**



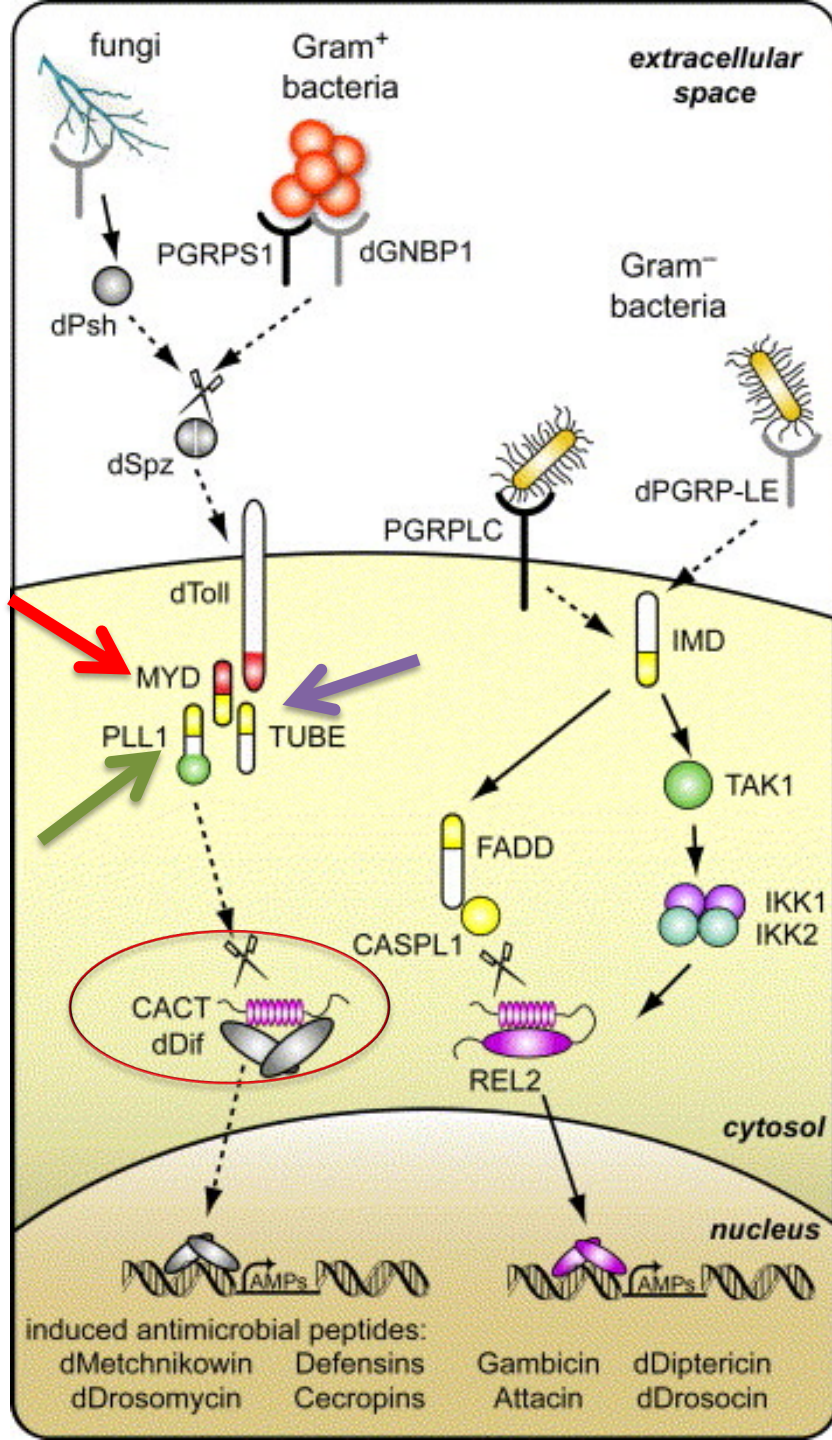
TLR-4 receptor

Il Recettore Toll di *Drosophila*



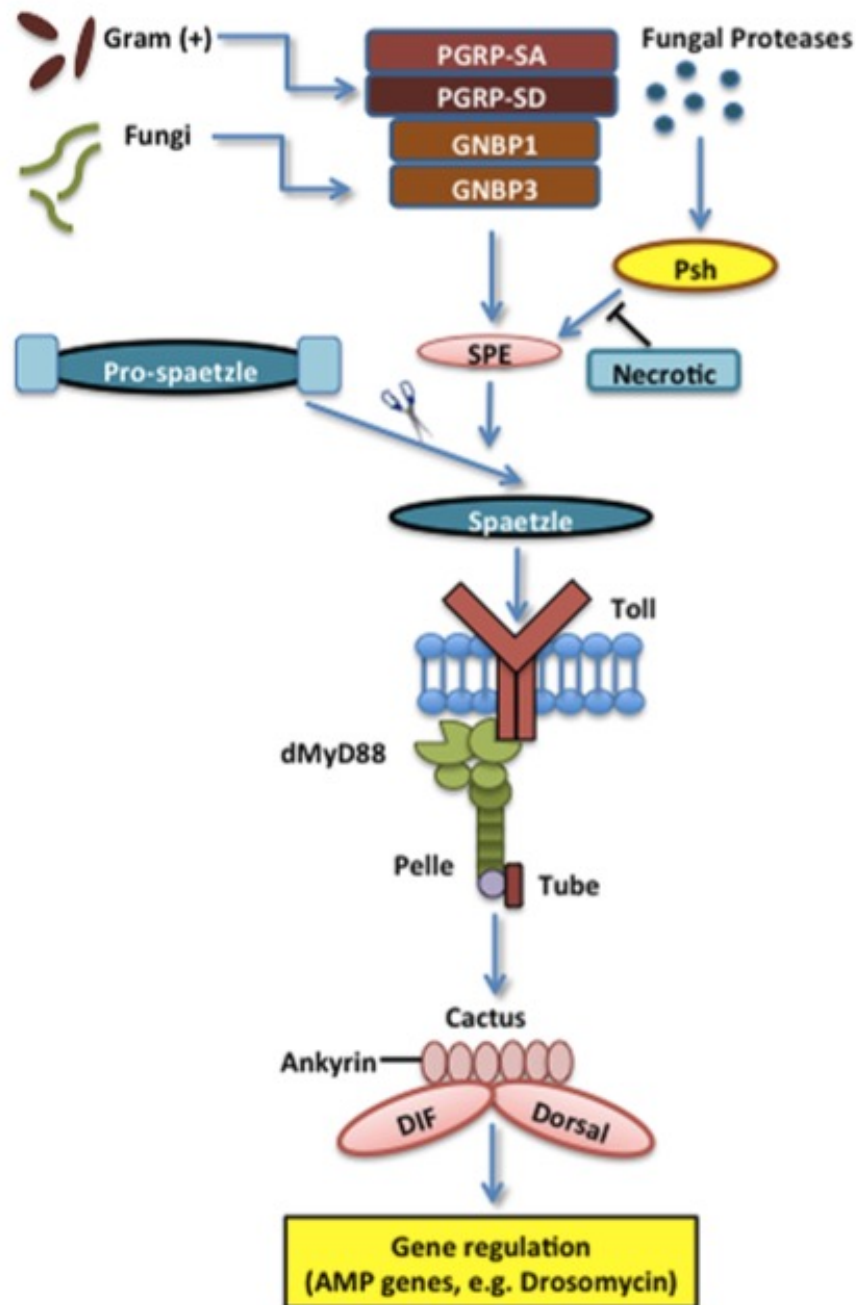


- In *Drosophila* i funghi ed i batteri Gram-positivi vengono riconosciuti dal sistema Toll, mentre i batteri Gram-negativi vengono riconosciuti dal sistema Imd.
- Il riconoscimento del PGN dei batteri Gram-positivi avviene attraverso le proteine PGRP-SA e PGRP-SD (PGRPS1). L'altra proteina coinvolta nel riconoscimento è GNB-1/3.
- I funghi vengono invece riconosciuti dalla serin proteasi Persephone (dPsh) e dall'inibitore proteasico Necrotic.
- Entrambi i pathways impattano sul processamento di Spatzle. La forma troncata di Spz può legarsi a Toll e mediare l'inizio del signaling. La multimerizzazione di Toll aumenta l'attività di signaling.

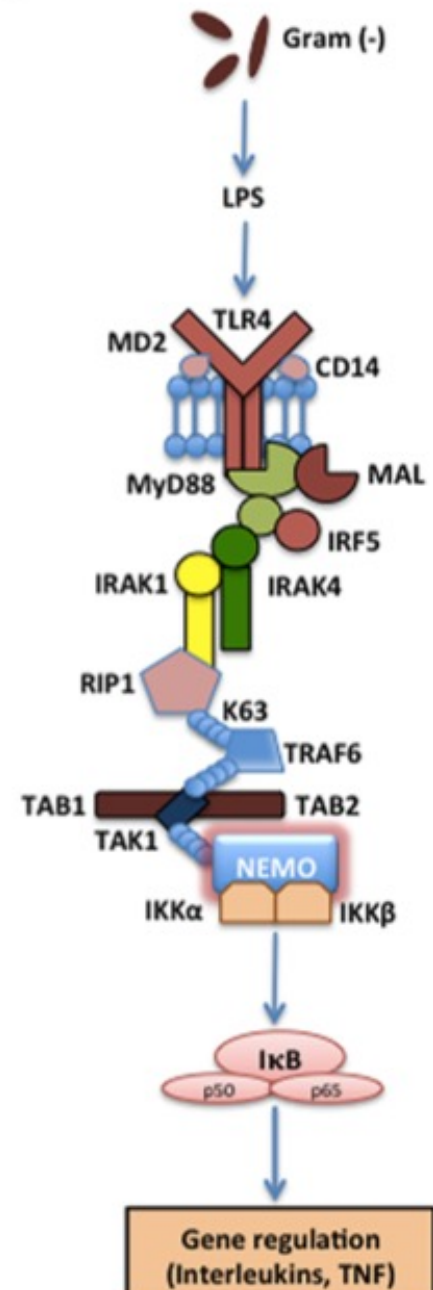


- L'attivazione di Toll porta al reclutamento di Myd88, Pelle e Tube.
- Myd88 e Tube sono adattatori mentre Pelle è una serin-treonin chinasi.
- Pelle attivato agisce sui complessi Dorsal-Cactus e Dif-Cactus. Dif e Dorsal sono omologhi di NF-kappaB e sono mantenuti nel citoplasma da Cactus (che agisce omologamente ad IkappaB)

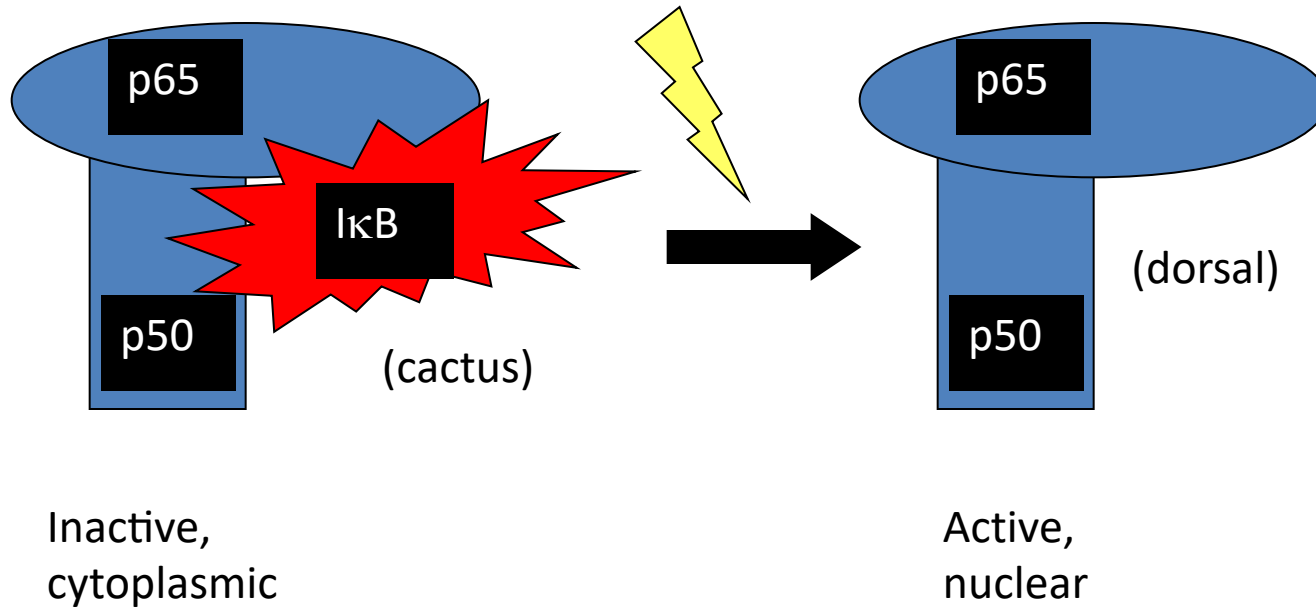
A

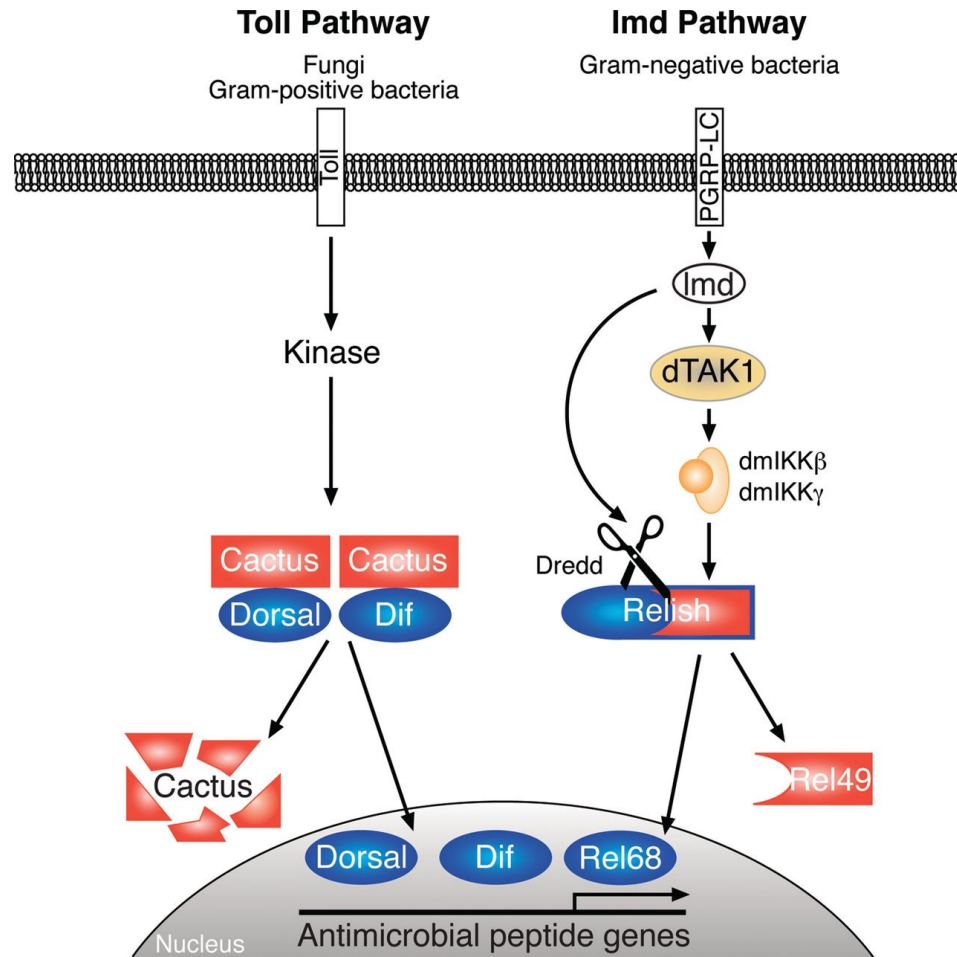


B



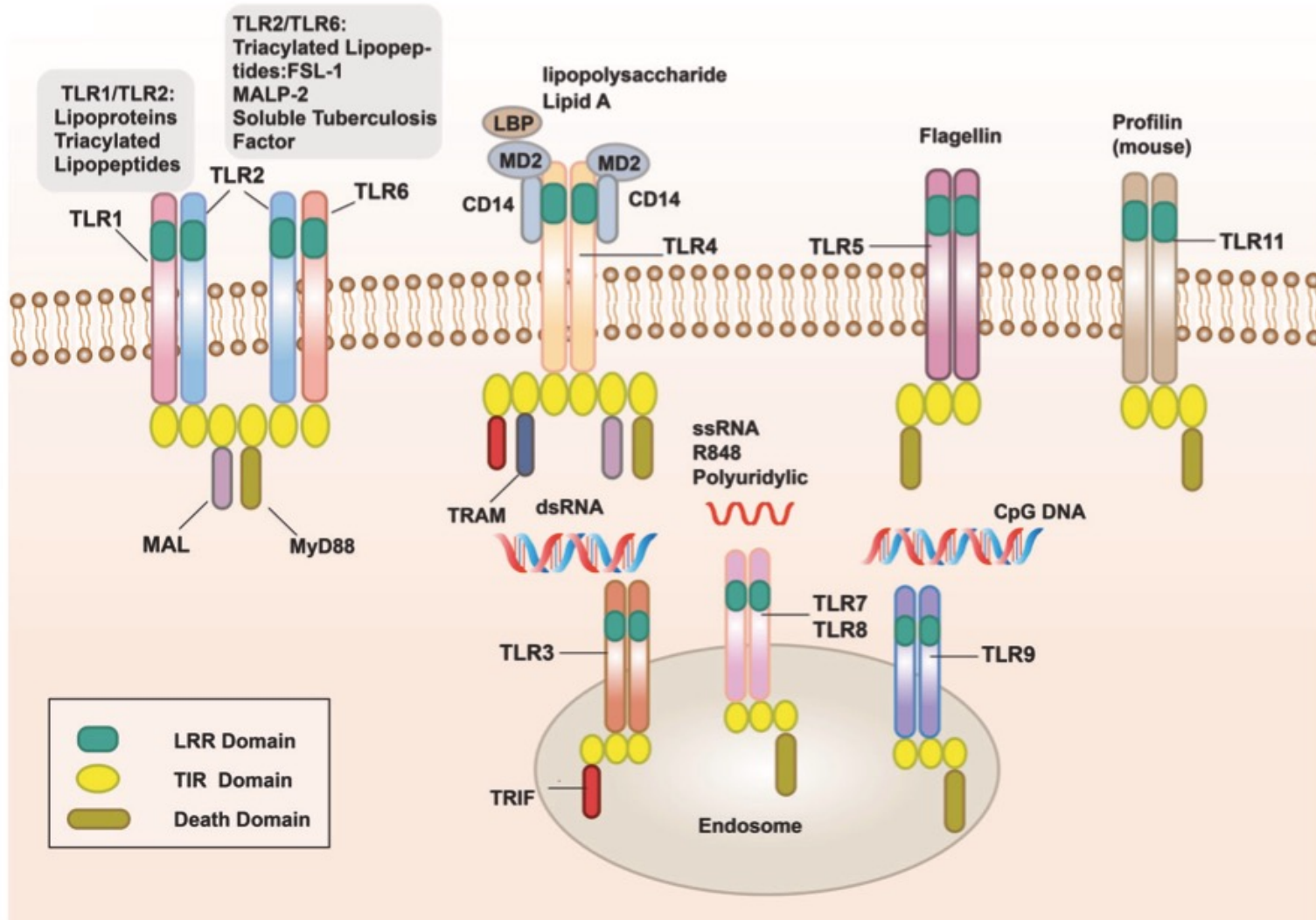
NF- κ B: A critical transcription factor for innate immunity



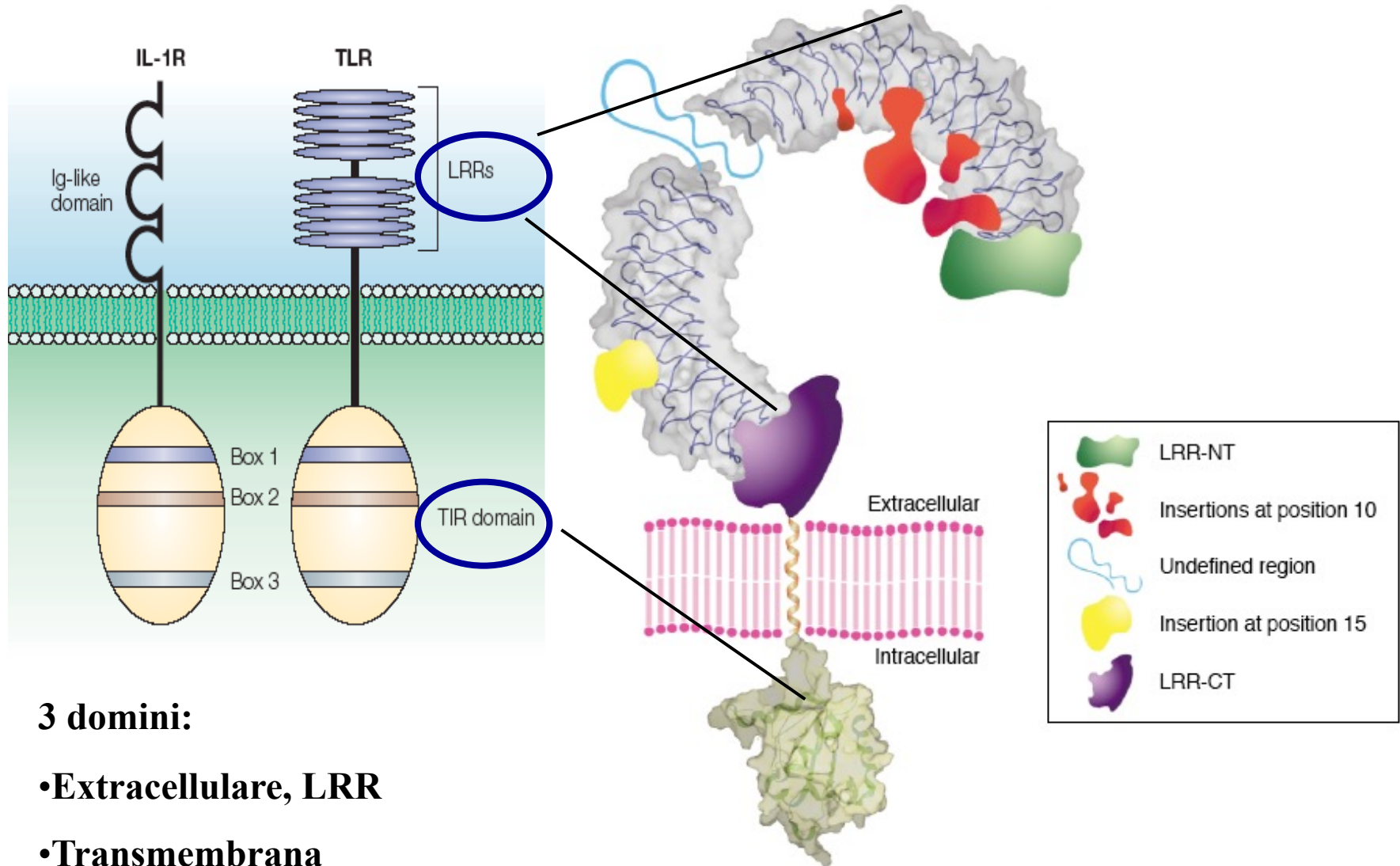


I PRRs di membrana: i recettori TLRs

Pattern recognition receptors in health and diseases
Li and Wu



Struttura dei TLRs



3 domini:

- **Extracellulare, LRR**
- **Transmembrana**
- **Intracellulare, TIR**

TIR: Toll interleukin-1 Receptor

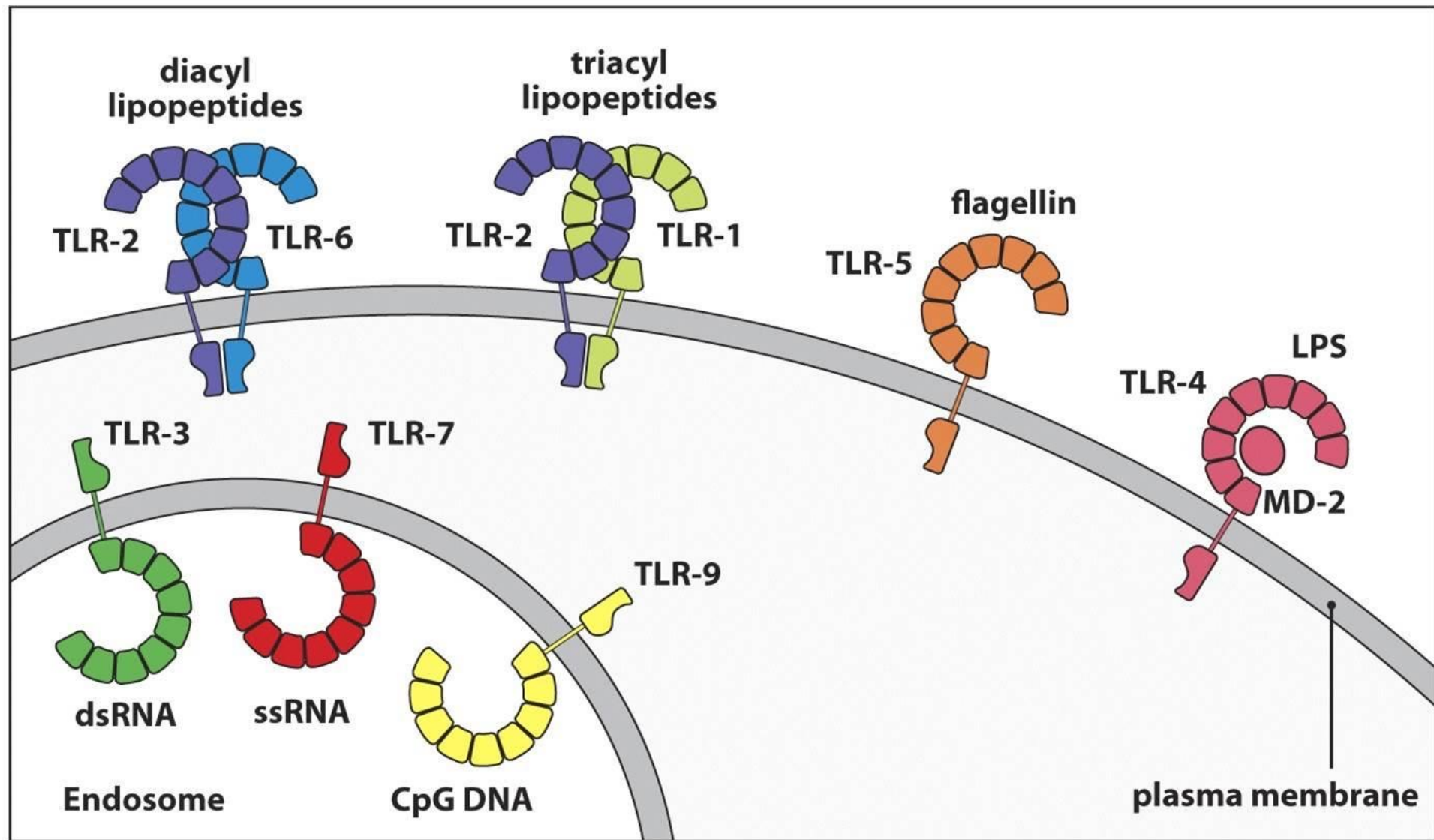


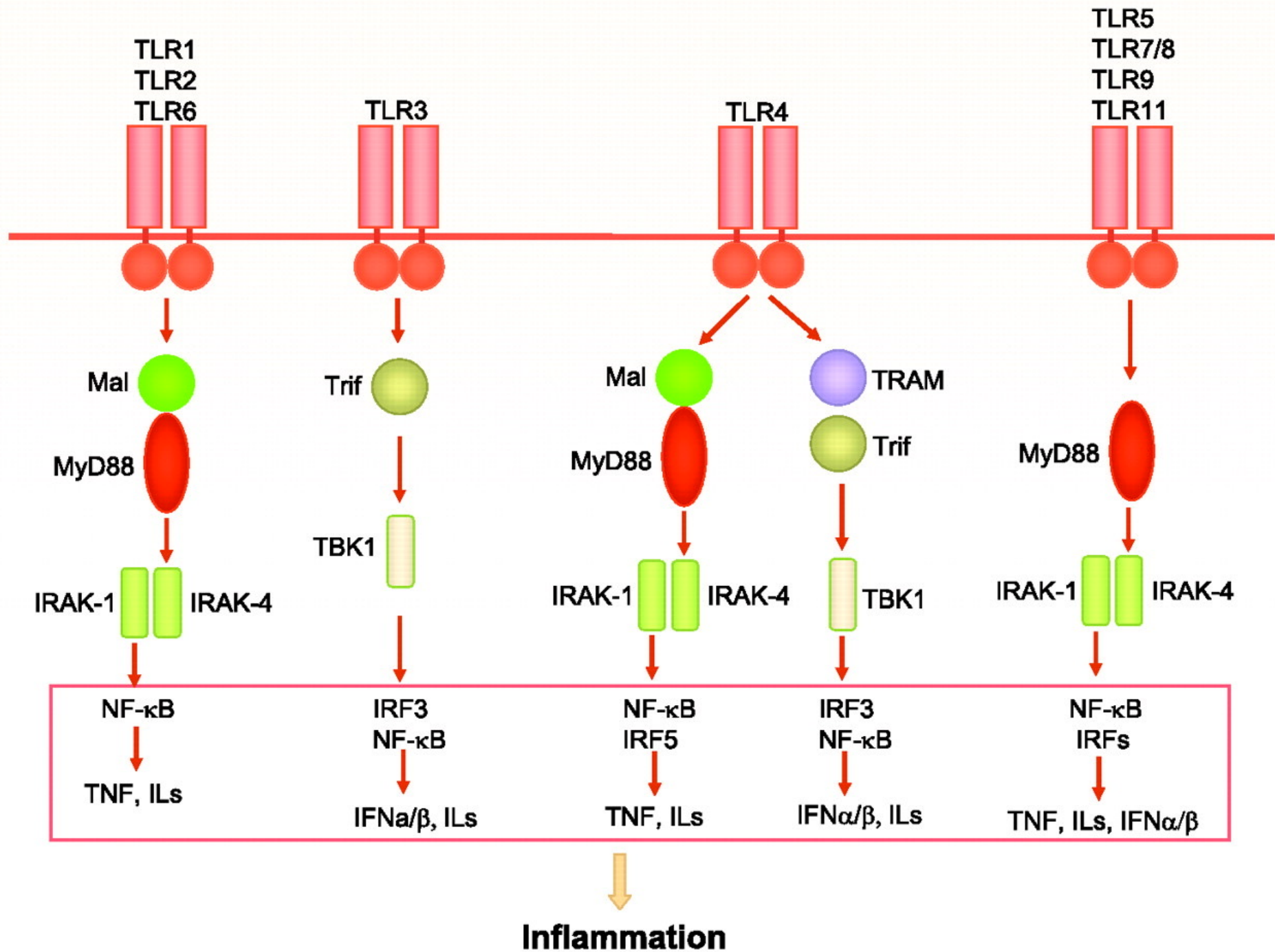
Figure 3.10 Janeway's Immunobiology, 8ed. (© Garland Science 2012)

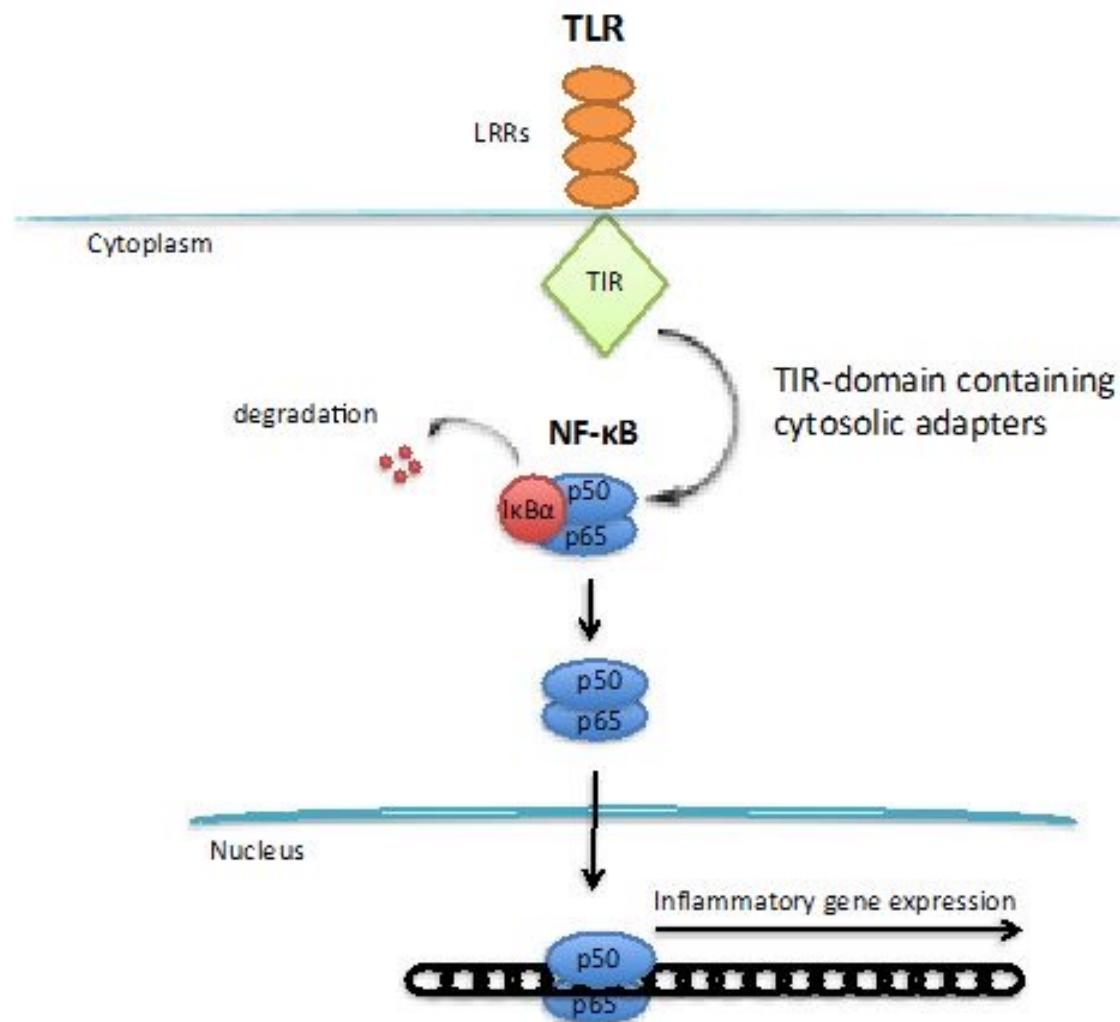
1392_2021_Article_687.pdf (pagina 2 di 24)

			Cellular distribution	PAMP	Sources	Signaling pathways	
Toll-like receptors (TLRs)	TLR1 (TLR1–TLR2) TLR2 (TLR1–TLR2, TLR2–TLR6)	LRR domain–transmembrane domain–TIR domain (extracellular to intracellular)	Mo, DC, Ma, Eo, Ba	Triacyl lipopeptide	Bacteria	Most TLRs: MyD88-dependent pathways; TLR3: TRIF-dependent pathways; TLR4: MyD88-dependent pathways and TRIF-dependent pathways	
			Mo, DC, Ma, Eo, Ba	Lipoteichoic acid	Bacteria		
				Arabinomannan	Mycobacterium		
				Peptidoglycan	Bacteria		
				Zymosan	Fungi		
	TLR3 TLR4 (MD-2/CD14) TLR5 TLR6 (TLR2–TLR6) TLR7		Mφ, DC, IEC	Lipoprotein	Mycoplasma		
				Pore protein	Neisseria		
				dsRNA	Virus		
			Mφ, DC, Ma, Eo	Lipopolysaccharides	Bacteria		
				Heat-shock proteins	Host		
	TLR8 TLR9 TLR10 (human) TLR11 (mouse) TLR12 (mouse) TLR13 (mouse)		IEC	Flagellin	Bacteria		
			Mo, DC, Ma, Eo, Ba	Lipoteichoic acid	Bacteria		
				Peptidoglycan	Bacteria		
			pDC, Mφ, Eo	ssRNA	Virus		
				Imidazoquinoline	Artificially synthesized		
Nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors (NLRs)	NOD1 NOD2	LRR domain–NBD–effector domains	Mφ, N	ssRNA	Virus	RIP2–TAK1–NF-κB pathways	
			pDC, Eo, Ba	Non-methylated CpG DNA	Bacteria, Virus		
	RIG-I-like receptors (RLRs)	(RD)–CTD–DexD/H helicase domain–CARD	pDC, Eo, Ba	dsRNA	Virus	MAVS–TRAF6–NF-κB/TBK1 pathways	
			Mφ, DC	Profilin and related proteins	<i>Toxoplasma gondii</i>		
			DC	Profilin and related proteins	<i>Toxoplasma gondii</i>		
	MDA5 LGP2		Unknown	23s ribosomal RNA	Bacteria		
C-type lectin receptors (CLRs)	Dectin-1 Dectin-2	CTLD–ITAM	IE-DAP	Gram negative bacteria			
				MDP		Gram-negative bacteria, Gram-positive bacteria	
Absent in melanoma-2-like receptors (ALRs)	ALRs	HIN-200-PYD	Cytosol	5'-triphosphorylated RNA, short-chain dsRNA	Virus		
				poly IC, long-chain dsRNA	Virus		
				dsRNA	Virus		
			DC, Mφ	β-Glucan	Fungus	Tyrosine kinase-dependent and non-tyrosine kinase-dependent pathways	
				α-Mannan	Fungus		
			Cytosol	dsDNA	Bacteria	Inflammasome–pyroptosis	

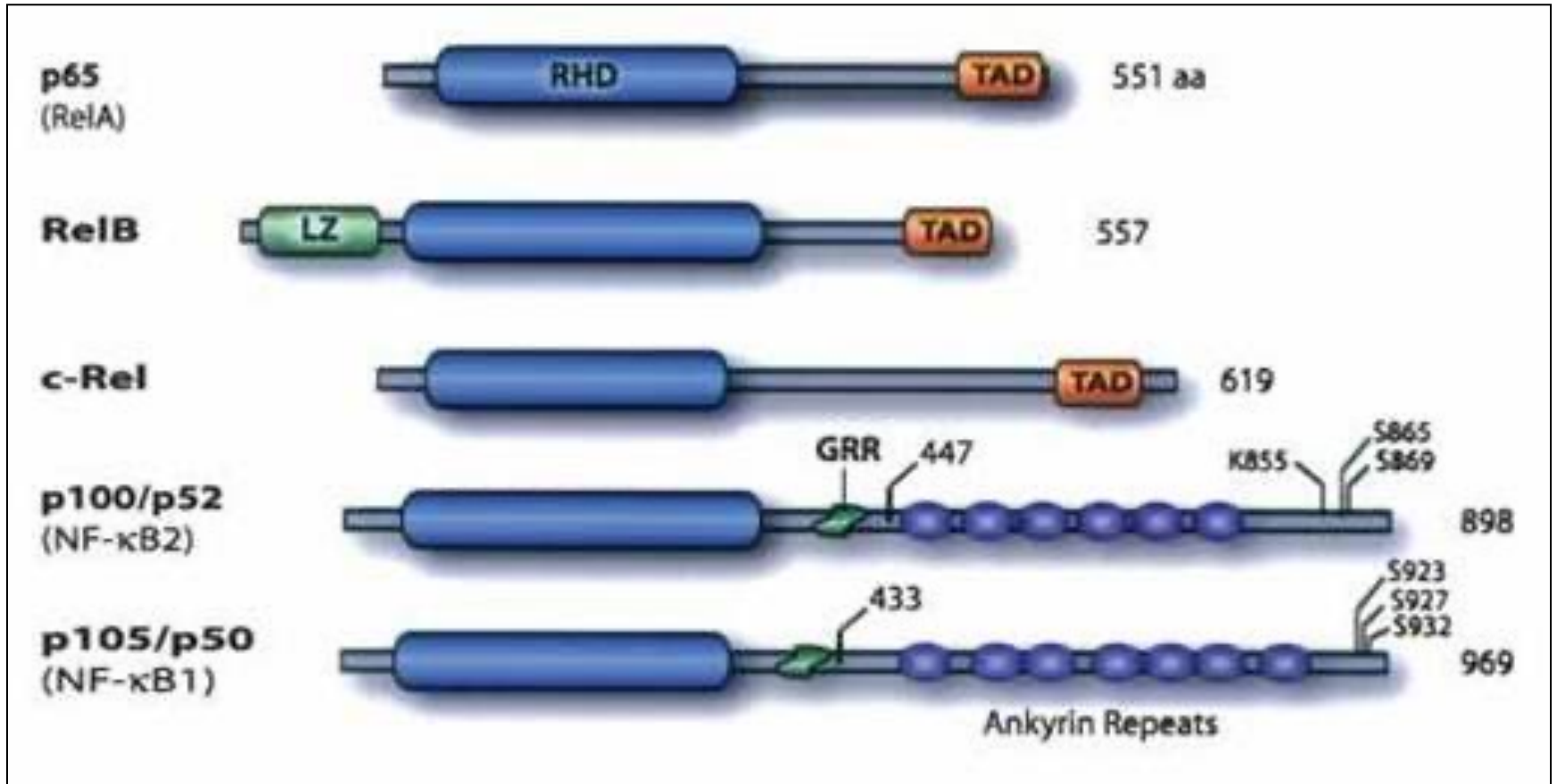
LRR leucine-rich repeat, TIR Toll/IL-1R domain, NBD nucleotide-binding domain, RD repressor domain, CTD C-terminal domain, CARD caspase activation and recruitment domain, CTLD C-type lectin-like domains, ITAM immunoreceptor tyrosine-based activation motif, PYD pyrin domain, Mo monocyte, DC dendritic cell, Ma mastocyte, Eo eosinophils, Ba basophils, pDC plasmacytoid dendritic cell, IEC intestinal epithelial cell, N neutrophil, dsRNA double-stranded RNA, ssRNA single-stranded RNA, iE-DAP γ-D-glutamate-meso-diaminopimelic acid, MDP muramyl dipeptide, MyD88 myeloid differentiation factor 88, TRIF TIR domain-containing adaptor protein-inducing interferon β, RIP2 receptor-interacting serine-threonine protein 2, TAK1 transforming growth factor-β-activated kinase 1, NF-κB nuclear factor κB, MAVS mitochondrial antiviral signaling protein, TRAF6 tumor necrosis factor receptor-associated factor, TBK1 TANK-binding kinase 1

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

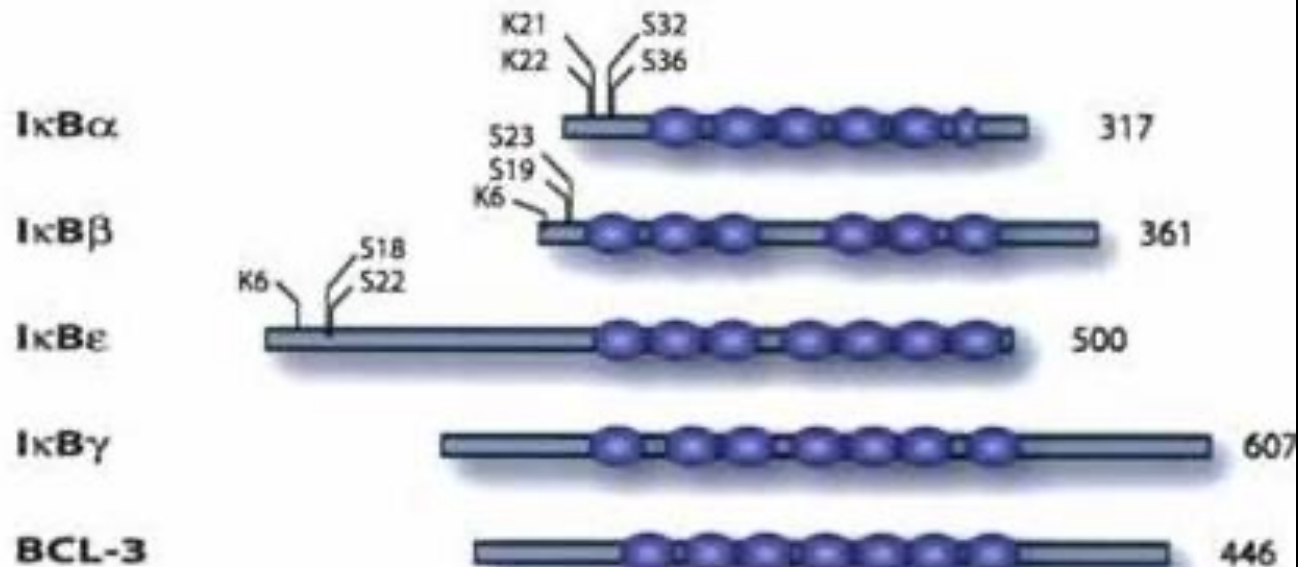




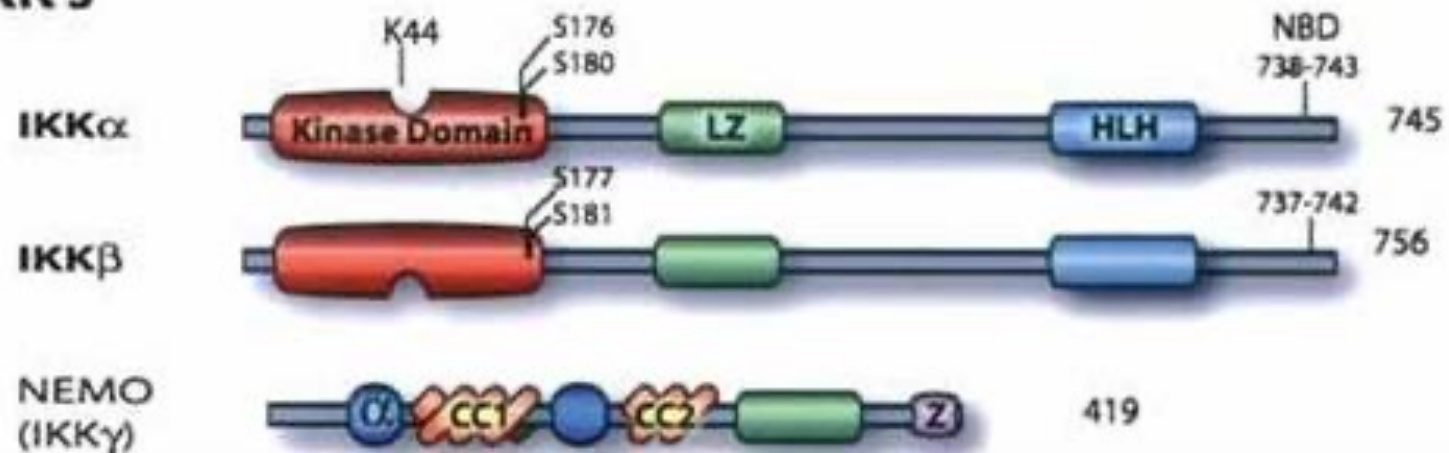
La famiglia NF-kappaB



I κ B Family

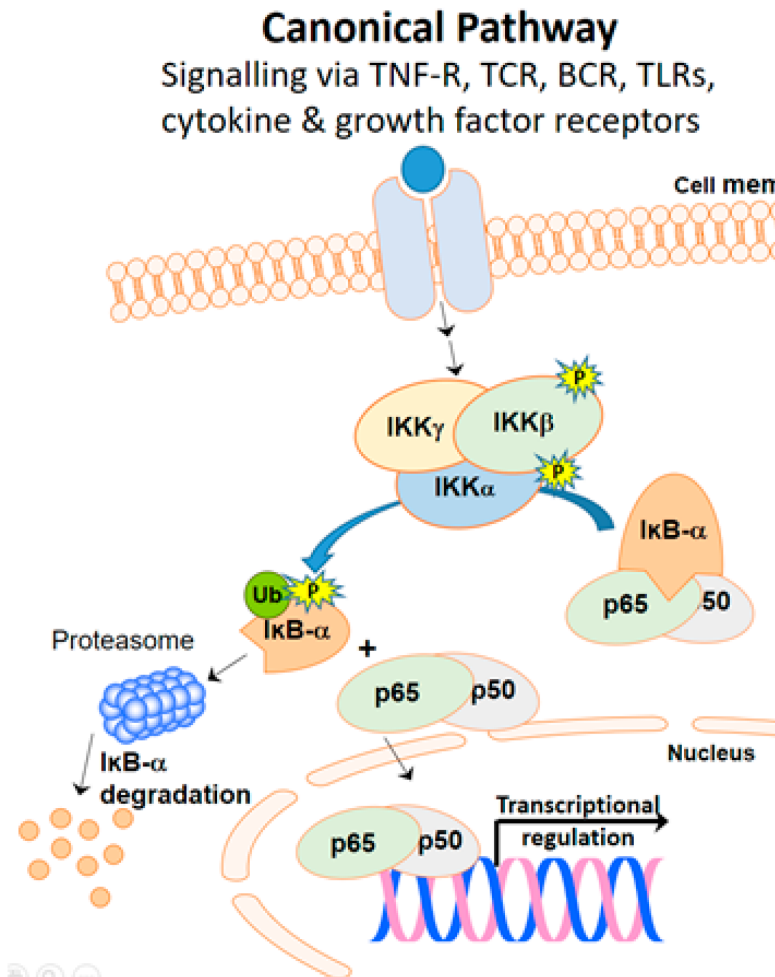


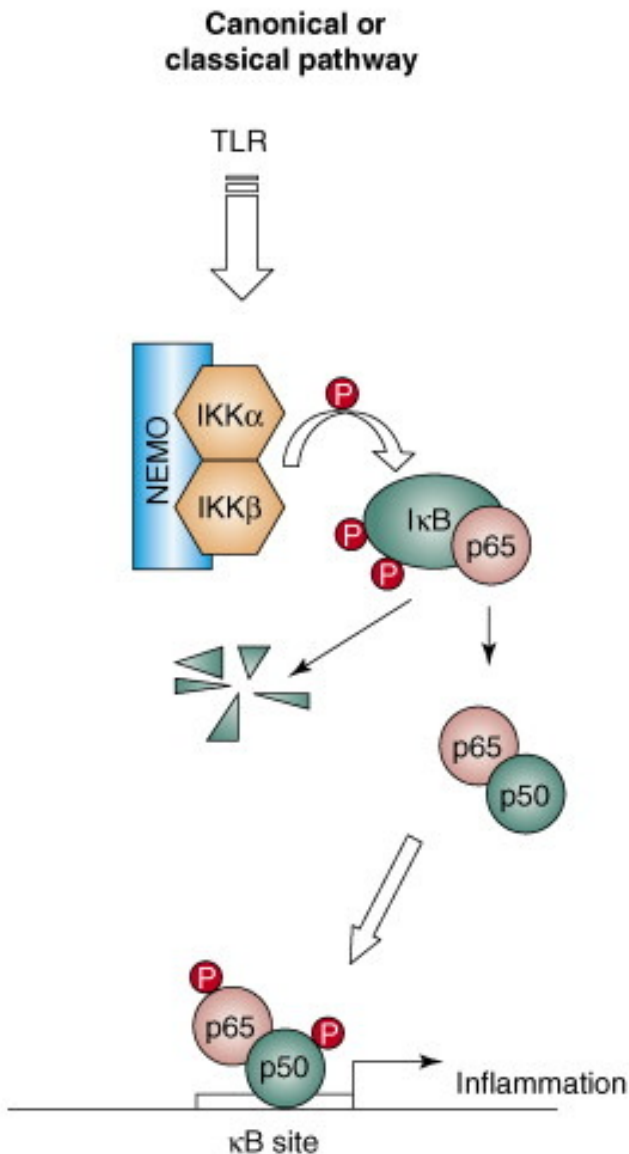
IKK's



- La regolazione dell'attivazione di NF- κ B è mediata da una classe di proteine inibitrici, (I κ B).
- I membri della famiglia degli inibitori di κ B (**I κ B- α , I κ B- β , I κ B- ϵ** e Bcl-3).
- I meccanismi di trasduzione del segnale culminano nell'attivazione delle chinasi di I κ B (IKK), che fosforilano rapidamente l'inibitore su due specifici residui di serina 32 e 36.

I κ B fosforilato è riconosciuto da una ligasi dell'ubiquitina SCF ^{β -TrCp} che ne induce l'ubiquitinizzazione (in corrispondenza delle lisine 21 e 22) e la conseguente degradazione al proteasoma 26S. L'esposizione della sequenza NLS sul complesso p50/p65 rende NF- κ B capace di traslocare al nucleo e legare le specifiche consensus su promotori di geni target





- NF- κ B è libero di dimerizzare poiché il dominio DBD (DNA Binding Domain), con cui legava I κ B, è lo stesso utilizzato per dimerizzare e per legare il DNA.
- NF- κ B entra nel nucleo e promuove la trascrizione delle citochine proinfiammatorie, TNF α (Tumor Necrosis Factor α), IL-6, IL-12, IL-1 e chemochine IL-8 e MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein-1) per l'avvio della risposta dell'immunità innata alla presenza del patogeno;

Vie di segnalazione attivate dai TLRs

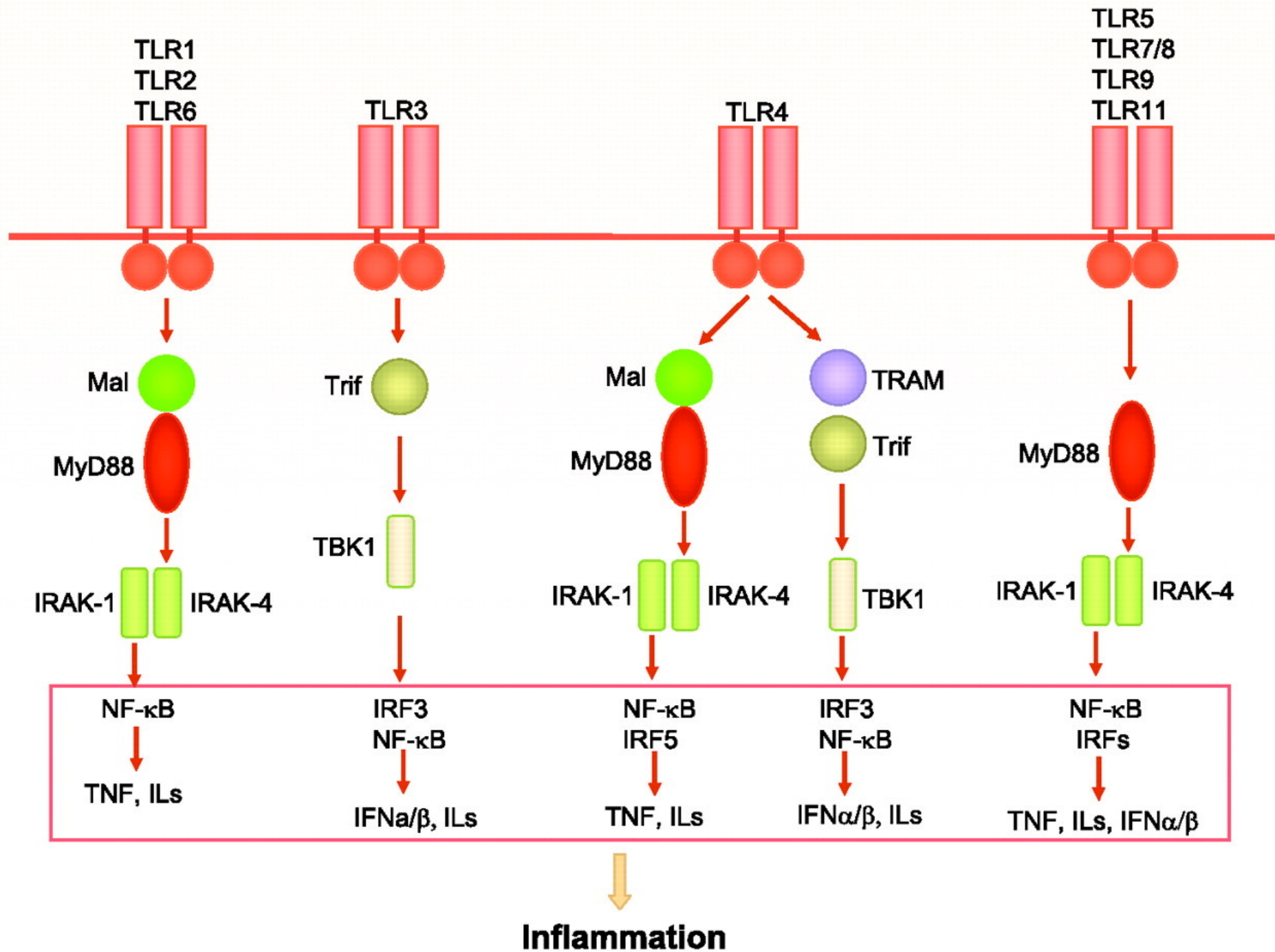
In seguito a dimerizzazione si hanno DUE vie di segnalazione

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- κ B
- Attivazione di geni interferonici IRF5 mediati
- Determina una up-regolazione delle molecole co-stimolatorie e MHC sulla superficie cellulare

Via MyD88 indipendente (TLR3 e TLR4):

- Induce l'attivazione di IRF-3 e la produzione di interferon di tipo I
- Incrementa le molecole co-stimolatorie e MHC sulla superficie cellulare
- Induce l'espressione di citochine infiammatorie
- Induce la maturazione di cellule dendritiche



- Una volta attivati dall'interazione con i componenti microbici, i recettori Toll-like dimerizzano e vanno incontro ad una modificazione conformazionale che porta al reclutamento di adattatori ed effettori molecolari.
- Le proteine e gli effettori molecolari, meglio caratterizzati e studiati, tra le vie di segnalazione dei TLRs, comprendono: **MyD88** (myeloid differentiation primary-response protein 88), e **TRIF** (TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β); le chinasi **IRAKs** (IL-1R-associated kinases), la chinasi **TAK1** (transforming growth factor- β -activated kinase 1), l'adattatore **TRAM** (TRIF-related Adaptor Molecule) **TRAF6** (tumor-necrosis factor-receptor-associated factor 6).**Mal**: MyD88 adaptor-like