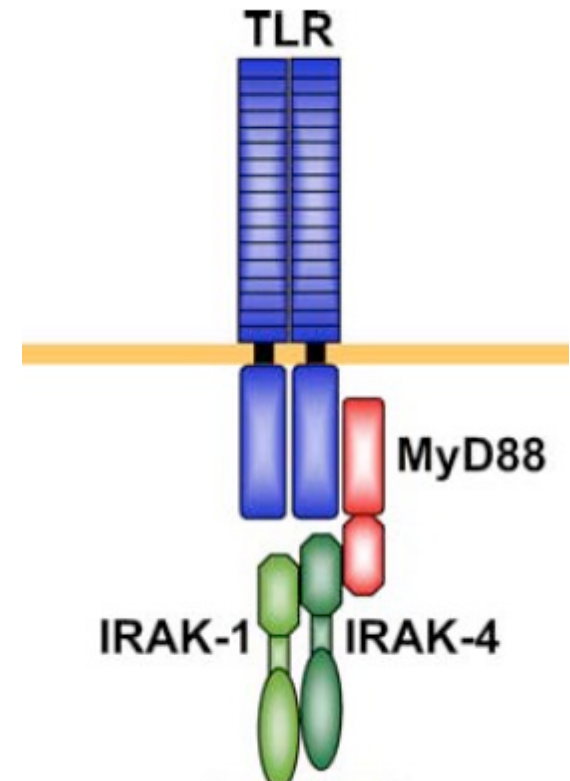




**Il compartimento naturale dell'immunità innata: I
recettori Toll-like (TLRs) e le proteine Nods
LEZIONE B**

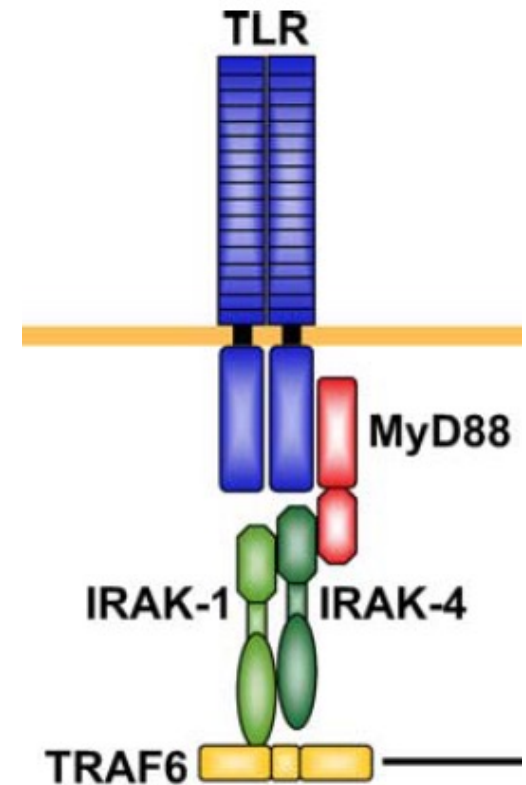
L'adattatore MyD88

- ◆ Il topo knockout MyD88 non risponde allo stimolo degli LPS
- ◆ MyD88 è essenziale per tutte le vie di segnalazione che portano alla produzione di una risposta infiammatoria
- ◆ MyD88s, una variante di splicing di MyD88 agisce da regolatore negativo della risposta MyD88-mediata
- ◆ MyD88 interagisce con il dominio TIR dei TLRs e recluta IRAK-4, IRAK-1 e TRAF-6

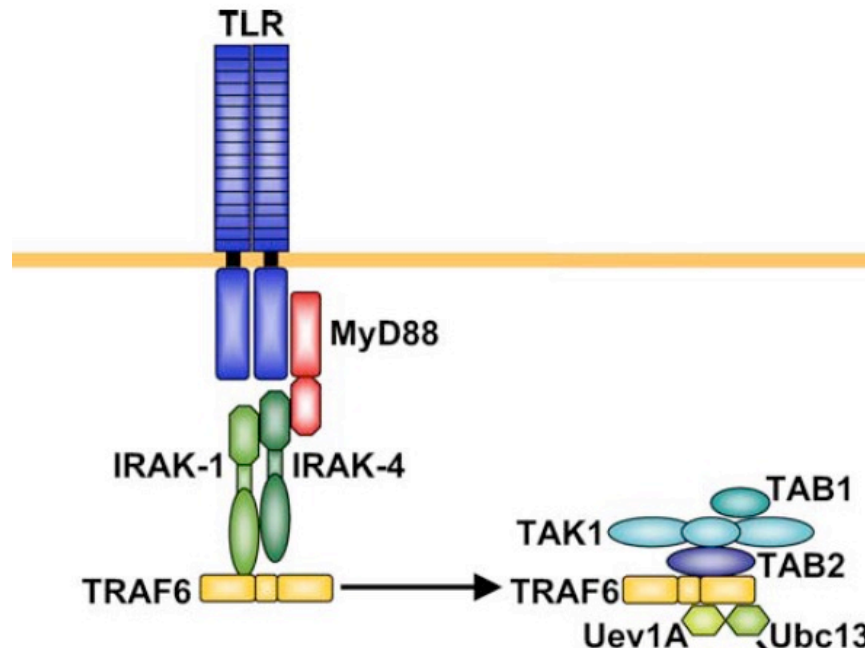


IRAK e TRAF6

- Il gruppo delle IRAKs comprende, IRAK1, IRAK-2, IRAK-M e IRAK-4
- Le IRAKs sono “serine/threonine kinases” di cui IRAK-4 e IRAK-1 sono auto e cross-chinasi.
- IRAK-4 fosforila IRAK-1
- IRAK-M ha un **ruolo inibitorio** nel TLR signaling
- TRAF6 è un membro della famiglia “TNF receptor associated factor (TRAF)”
- TRAF6 interagisce con IRAK-1 e da questo contatto ne risulterà attivato e ubiquitinizzato. Le ubiquitine agiscono come scaffold.
- La ligasi E2 ed i fattori Ubc13 e Uev1A si uniscono al complesso (queste ultime responsabili dell'ubiquitinazione)



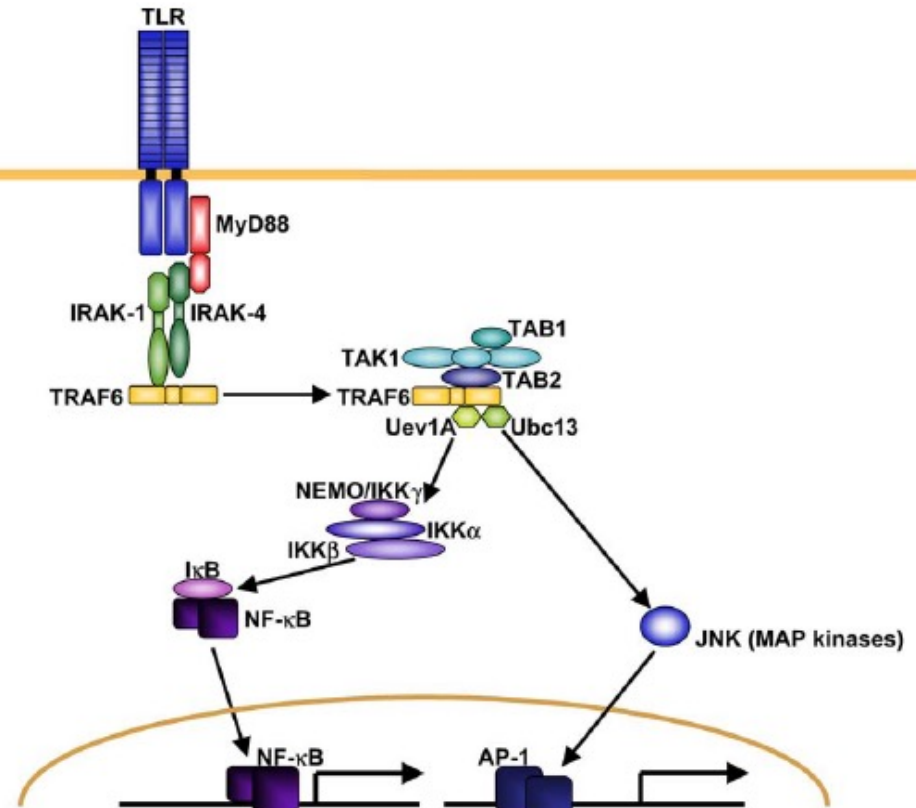
Il rilascio di IRAK e TRAF6

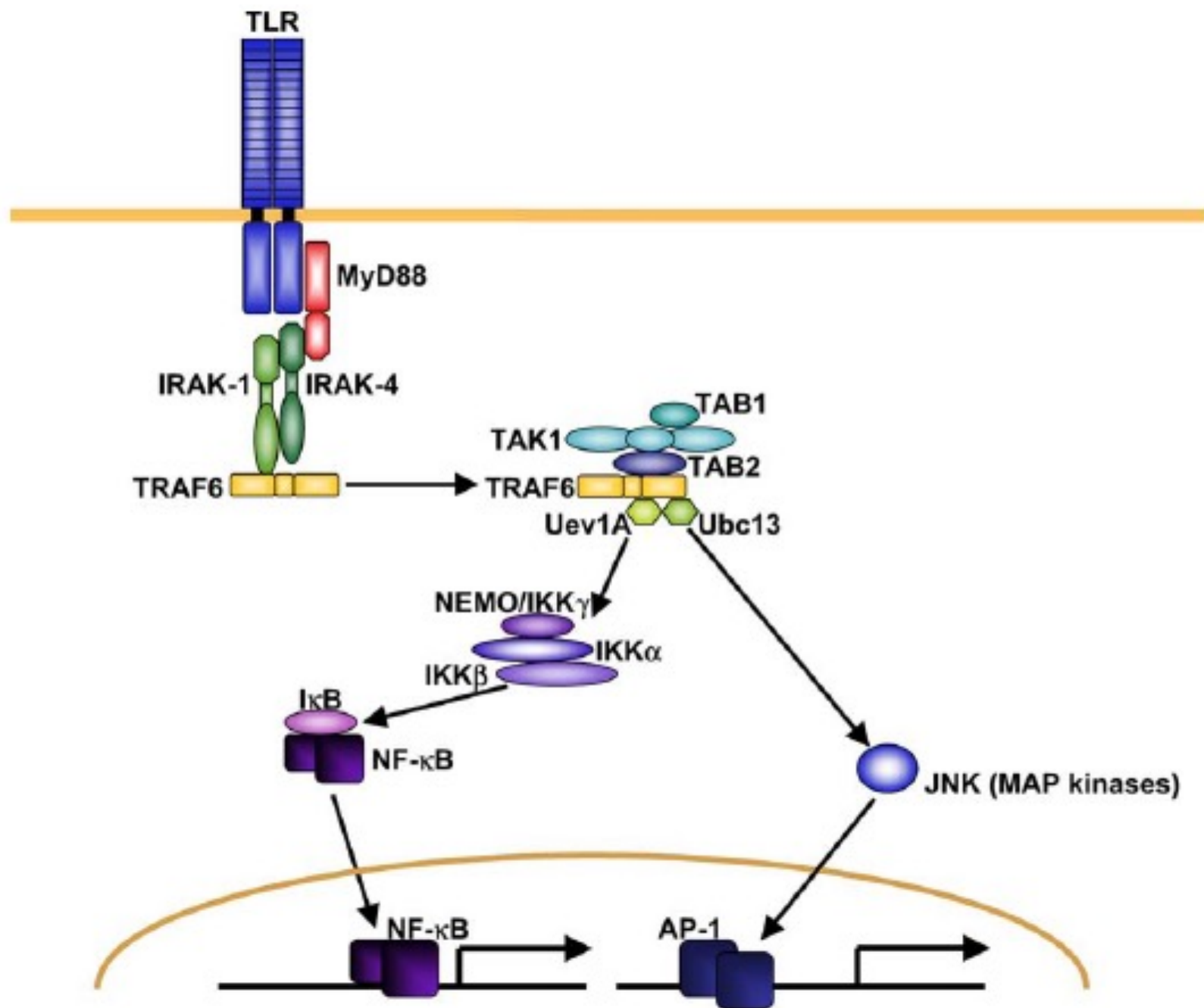


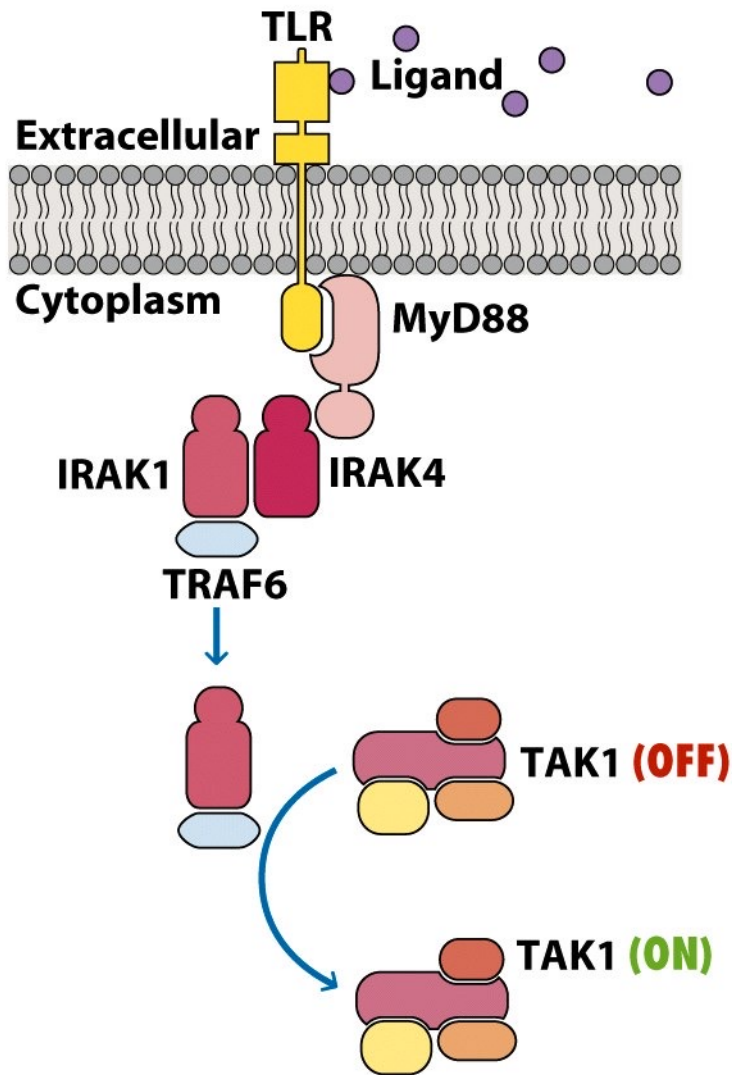
- Il complesso TRAF6/IRAK-1 si associa quindi con 3 proteine
 - TAK1 (TGF-beta activated kinase-1)
 - TAB1 (TAK1 binding proteins)
 - TAB2 (TAK1 binding proteins)
- Questo grande complesso si associa con la membrana

Attivazione di TAK-1

- Il complesso che include le proteine TRAF6, TAK1, TAB1, TAB2, Ubc13, Uev1A attiva TAK1.
- TAK1 viene fosforilato da IRAK1/4, si stacca e attraverso le code di ubiquitina prende contatto con il complesso IKK. TAK1 attivato può anche fosforilare le MAP chinasi
- Il complesso IKK consiste delle proteine IKK α , β e γ /NEMO di cui le proteine IKK α , β sono le protein chinasiche.
- La susseguente fosforilazione di I κ B ne determina la degradazione nel proteosoma e lo spostamento di NF- κ B al nucleo dove questo agirà da attivatore dei geni per le citochine pro-infiammatorie







1

Ligand binding to TLR triggers association of MyD88 with TIR domain and assembly of IRAK1/IRAK4 complex

2

IRAK4 phosphorylates IRAK1, creating a binding site for TRAF6

3

The IRAK1-TRAF6 complex dissociates and activates the protein kinase TAK1 complex

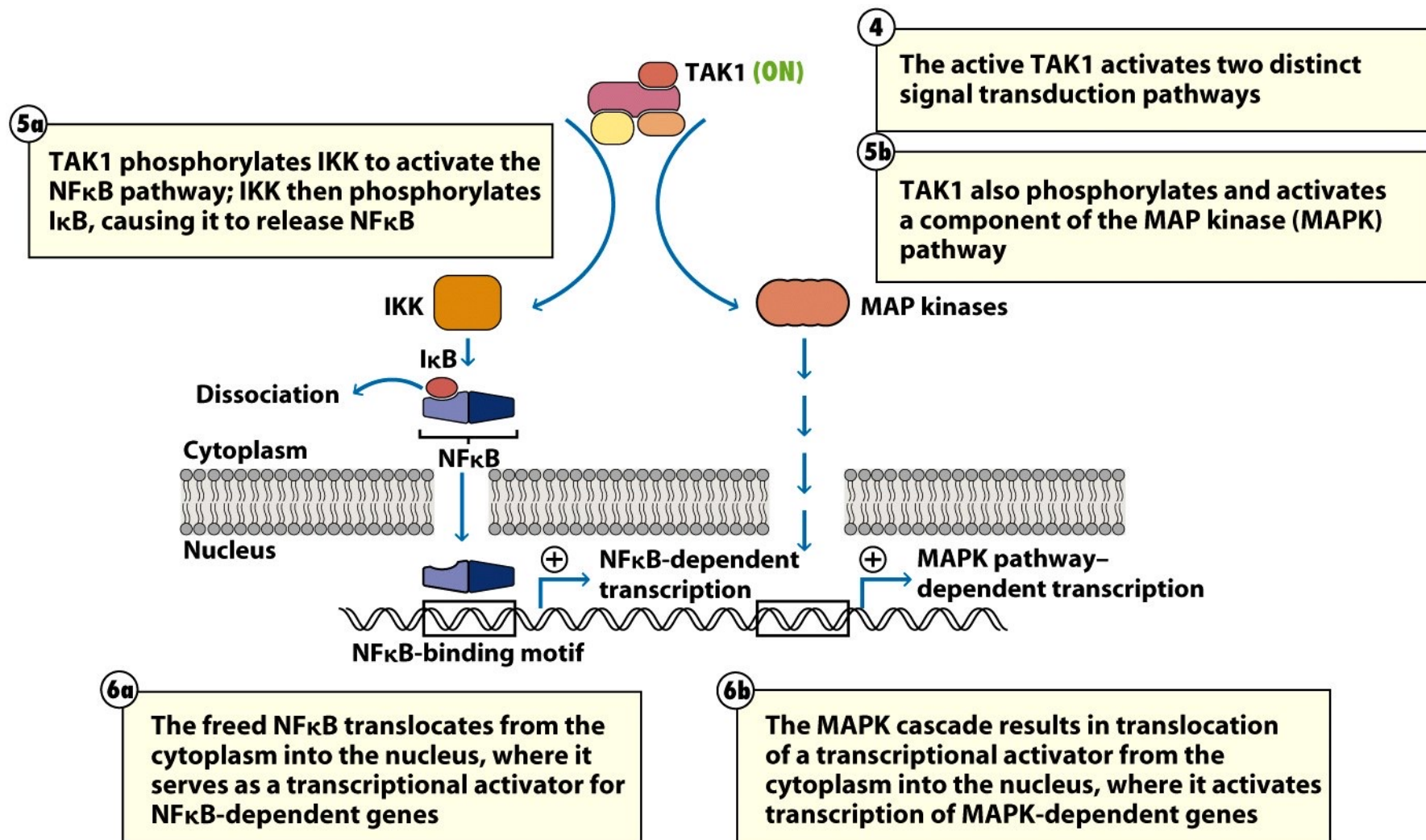
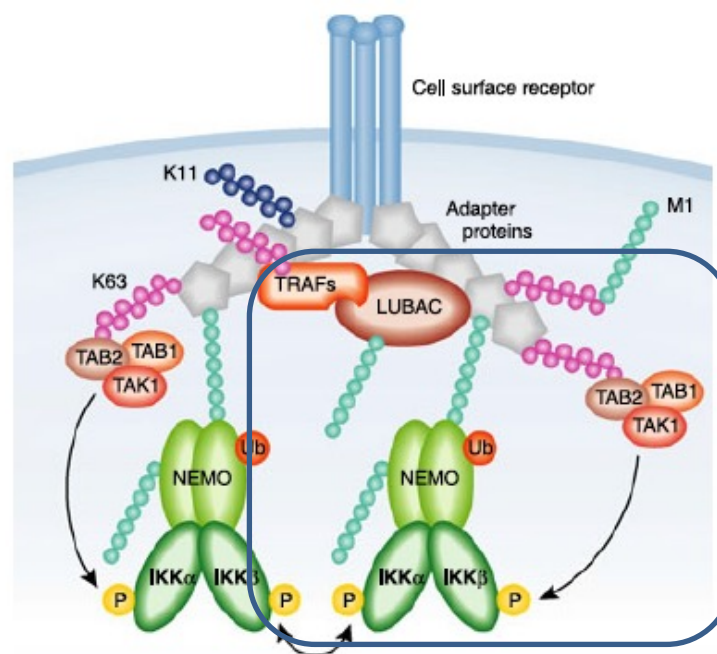
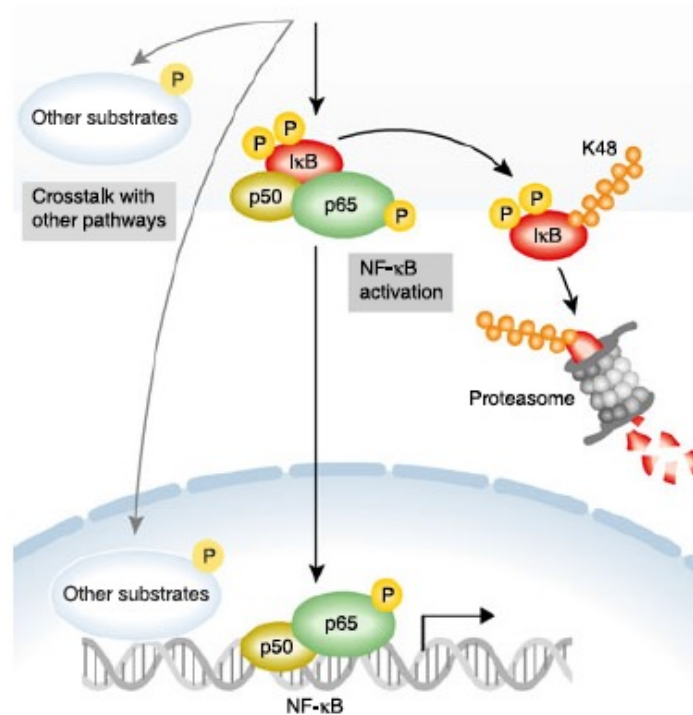


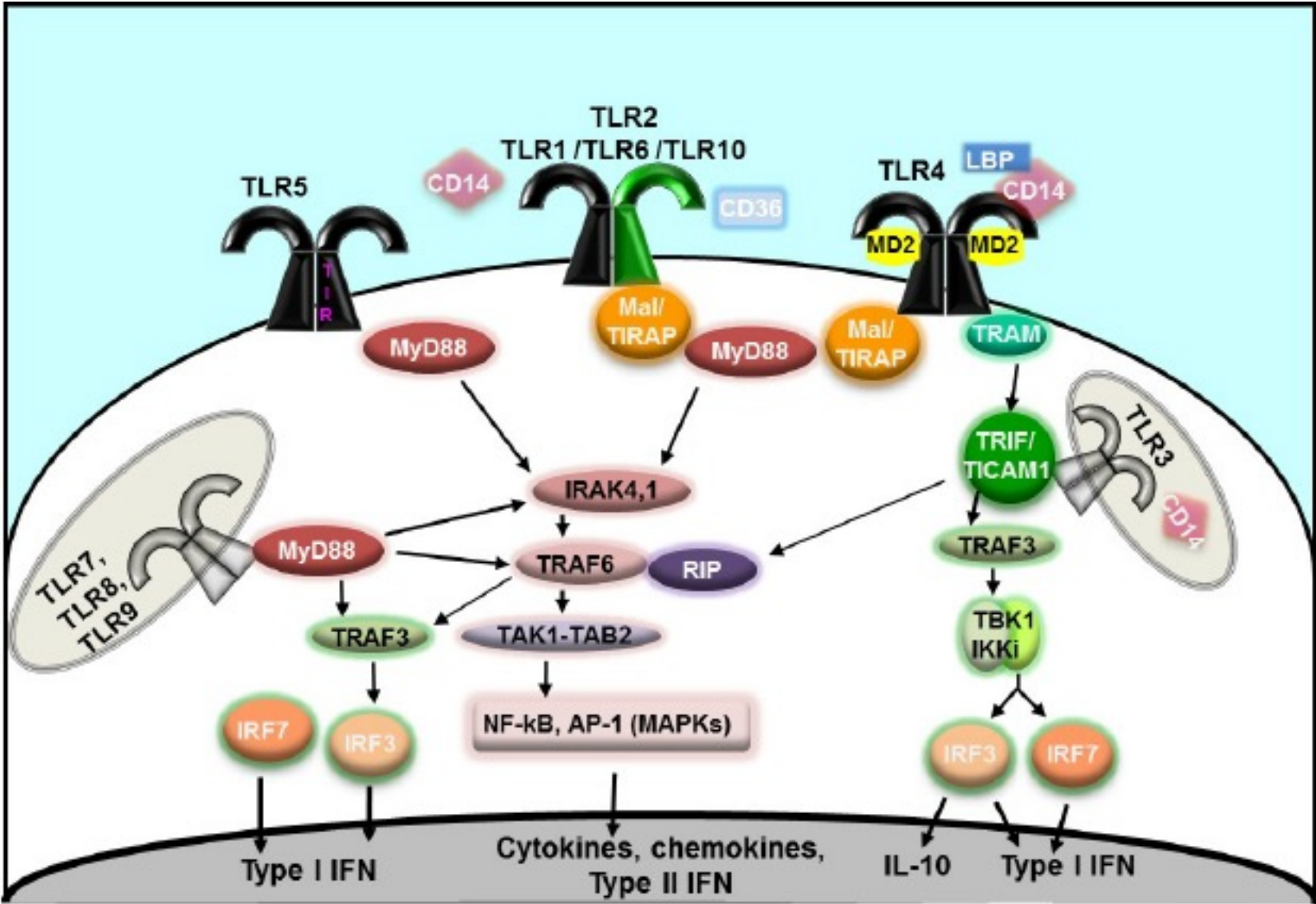
Figure 3-14 part 2
 Kuby IMMUNOLOGY, Sixth Edition
 © 2007 W. H. Freeman and Company

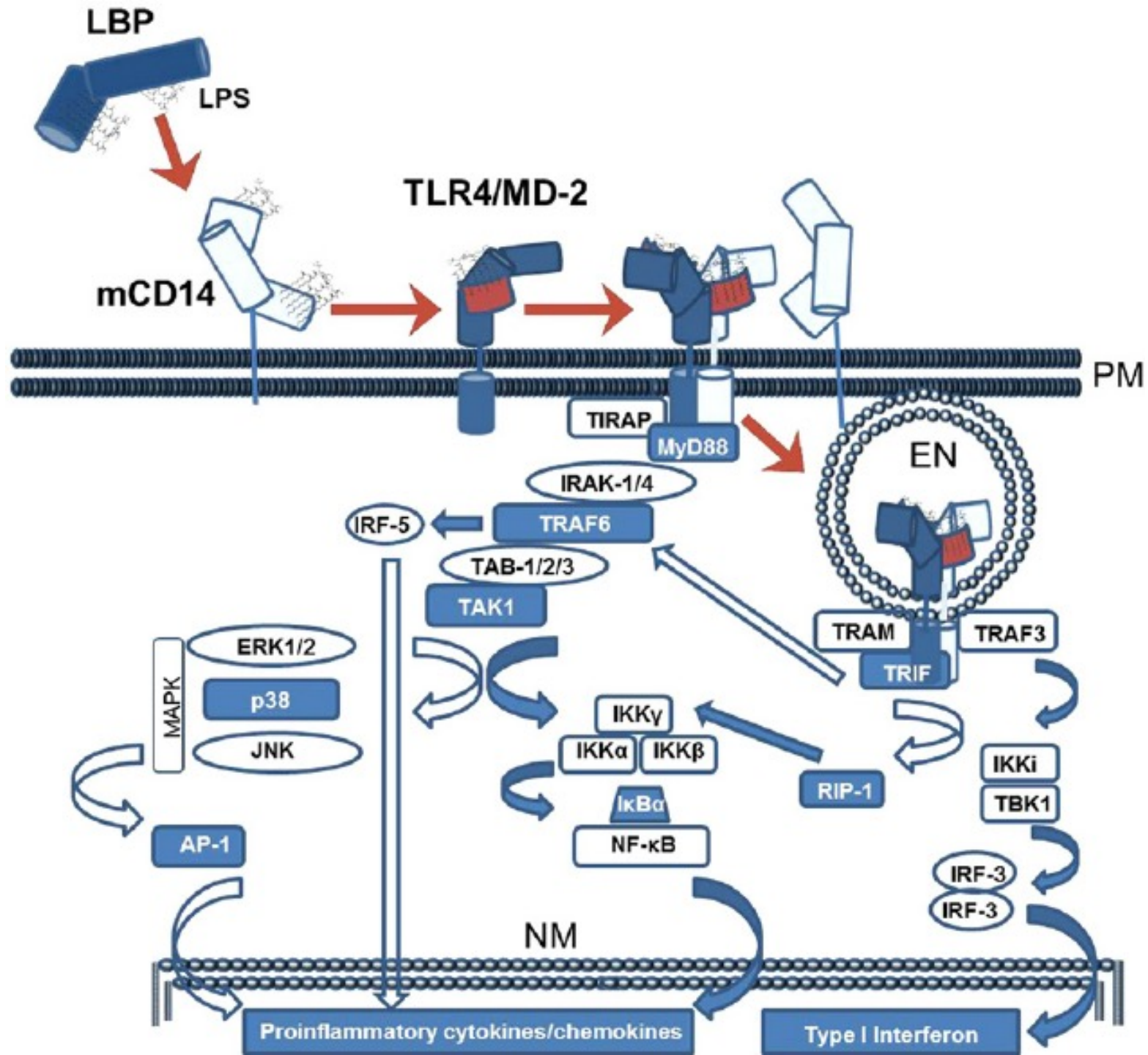


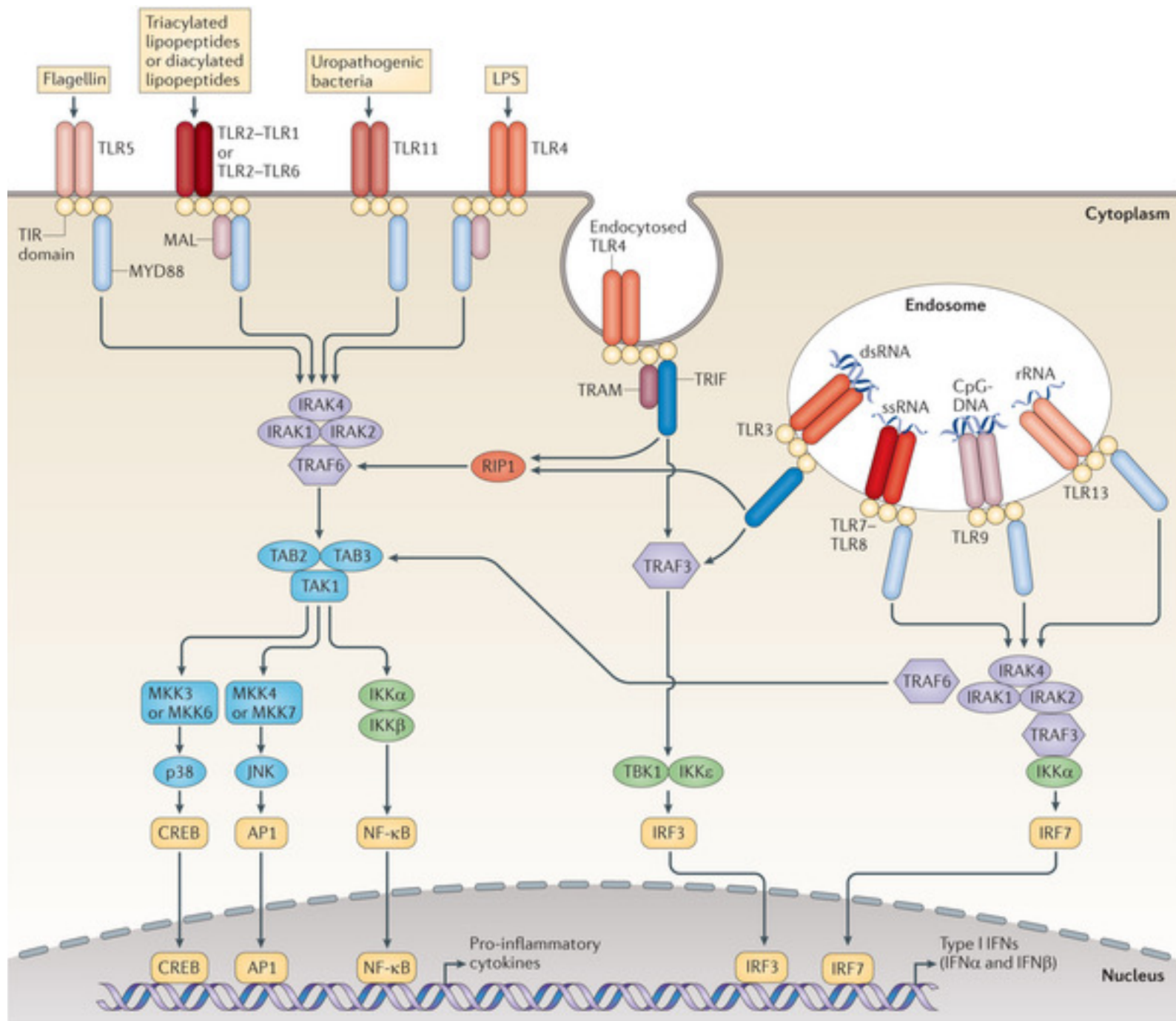
Linear ubiquitin chain-assembly complex (LUBAC)



La via mediata da TRIF (TIR domain-containing adaptor inducing IFN-beta) include le molecole TICAM1 e 2 (TIR-domain- containing adaptor molecule) e TRAM (TRIF-related adaptor molecules) (specifico per TLR4). TRIF interagisce con TBK1 e fosforila IRF3. TRIF ineragisce anche con RIP1 (Receptor Interacting Protein-1) per l'attivazione di NF-kappaB.





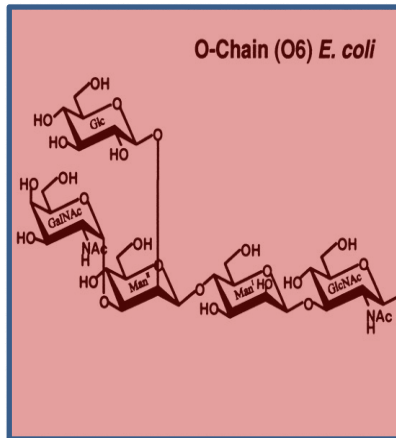


<https://www.youtube.com/watch?v=iVMIZy-Y3f8>

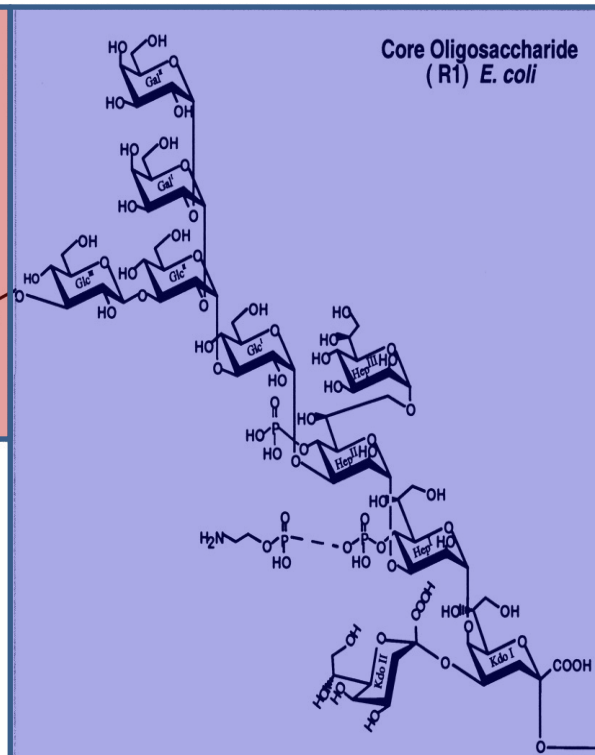
TLRs implicati nel riconoscimento di strutture batteriche

TLR4

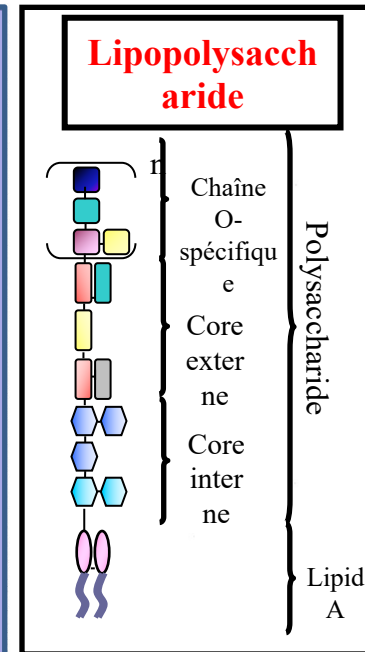
- Il primo TLR ad essere stato individuato mediante omologia di sequenza
- Topi C3H/HeJ che presentano una mutazione puntiforme nel dominio TIR di TLR4 sono non-responsivi agli LPS
 - Cosa riconosce?
 - LPS
 - Ligandi endogeni, Heat shock protein, oligosaccaridi di acido ialuronico, fibrinogeno
 - Pneumolisina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



O-chain

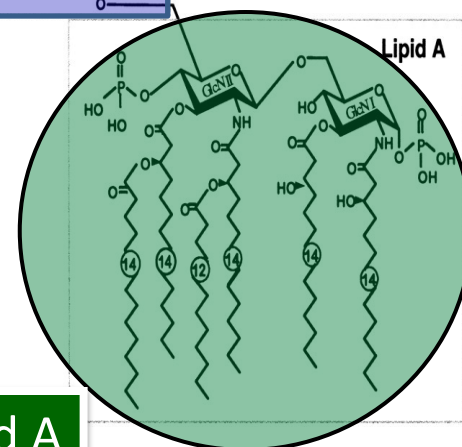


Core oligosaccharide

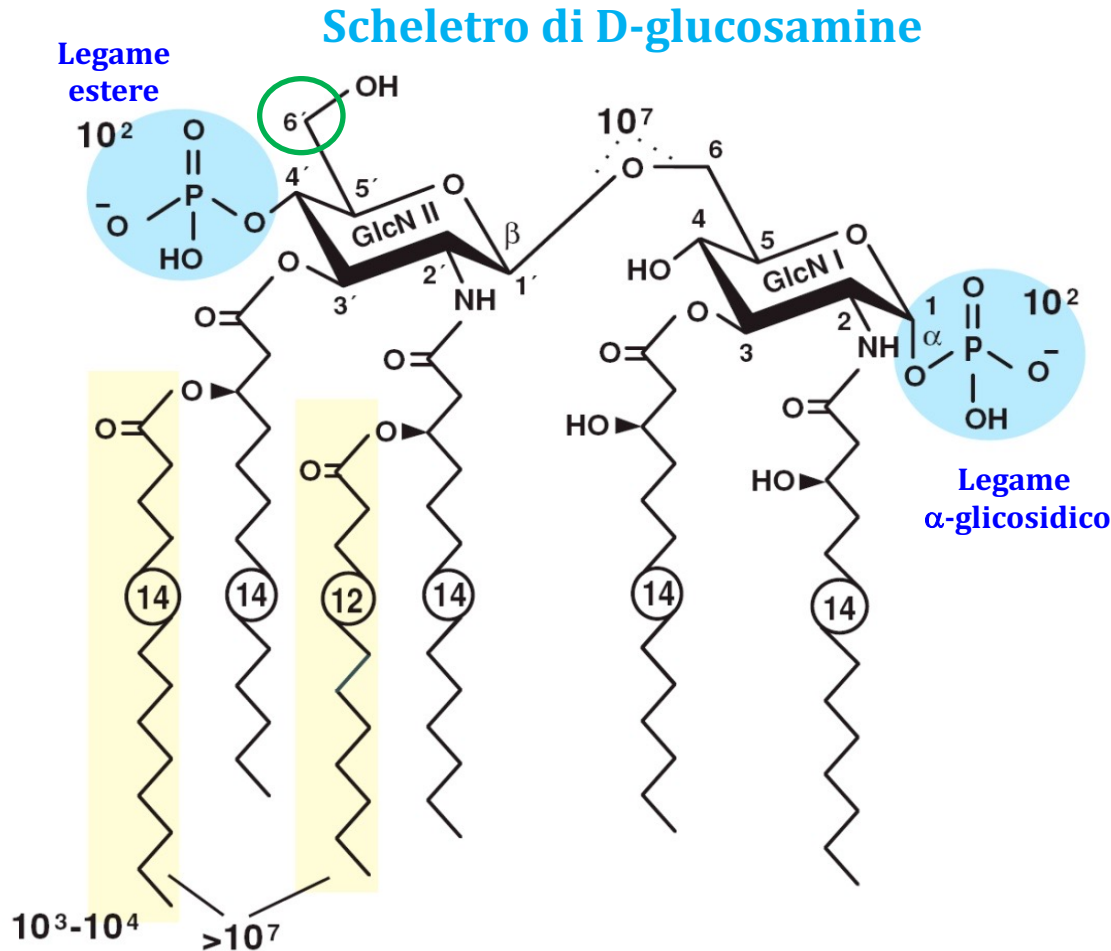


LPS is an **amphiphilic** and complex molecule and is composed of **lipidic** and **sugar** moieties

Lipid A



Lipide A: struttura delle Enterobacteriaceae



- lo scheletro è costituito da un disaccaride con legame β ,1-6

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

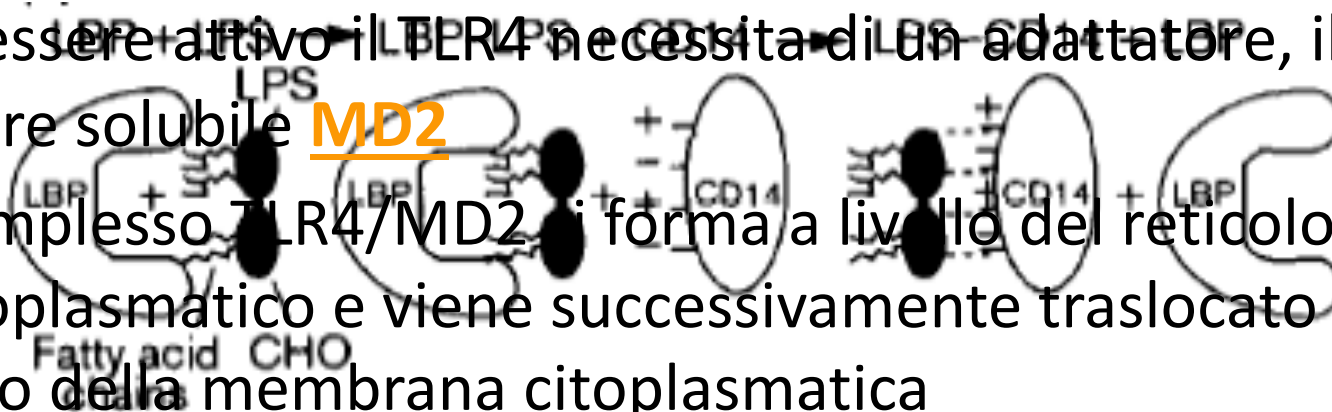
- sono presenti fino a 4 catene aciliche che a loro volta possono essere sostituite da ulteriori acidi grassi → **fino a 7 sostituenti acidi**

○ Posizione di attacco della regione polisaccaridica

Adattatori molecolari del TLR4

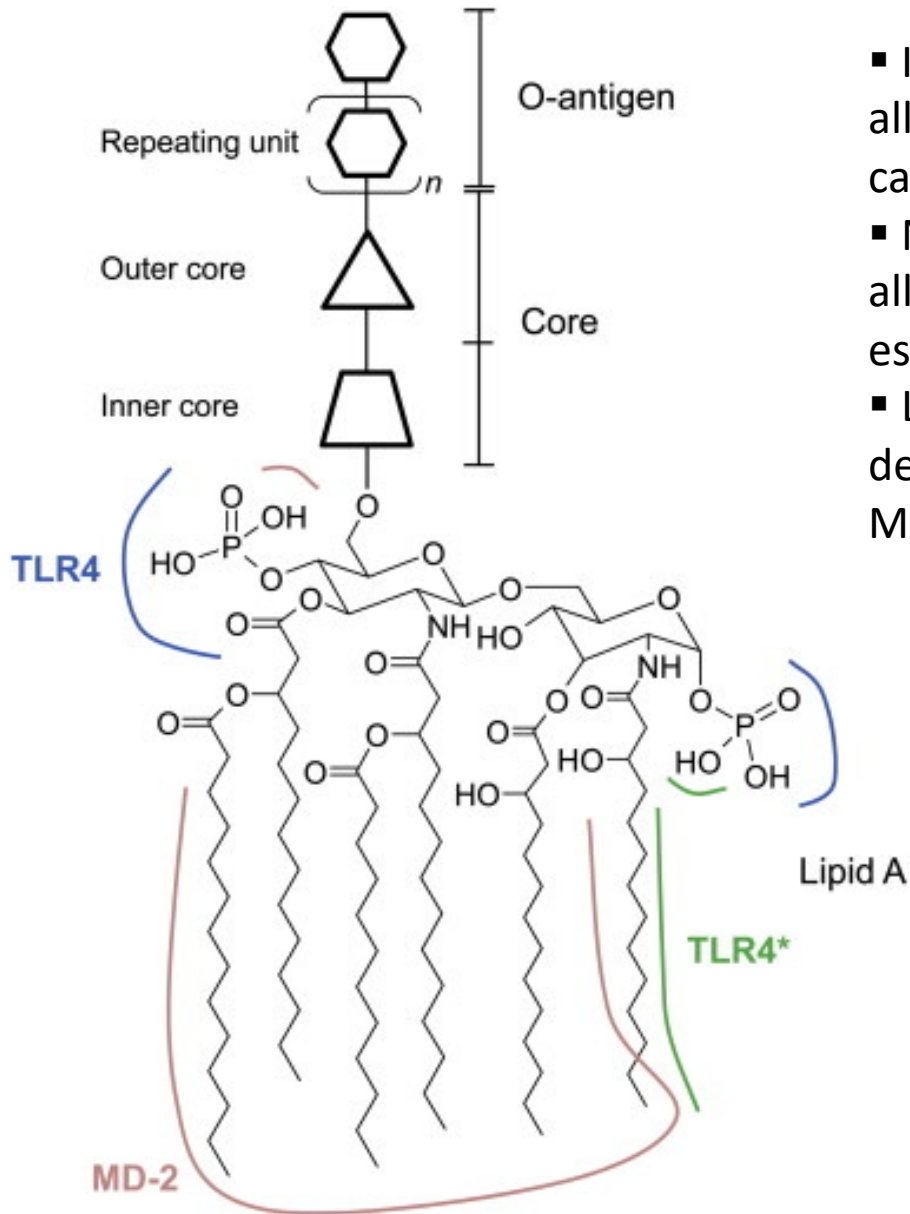
- Gli LPS nel siero vengono legati da LPS-binding protein (**LBP**) e trasportati alle cellule target
- Le LBP mediano il trasferimento di monomeri di LPS al **CD14** che facilita il riconoscimento da parte del TLR4

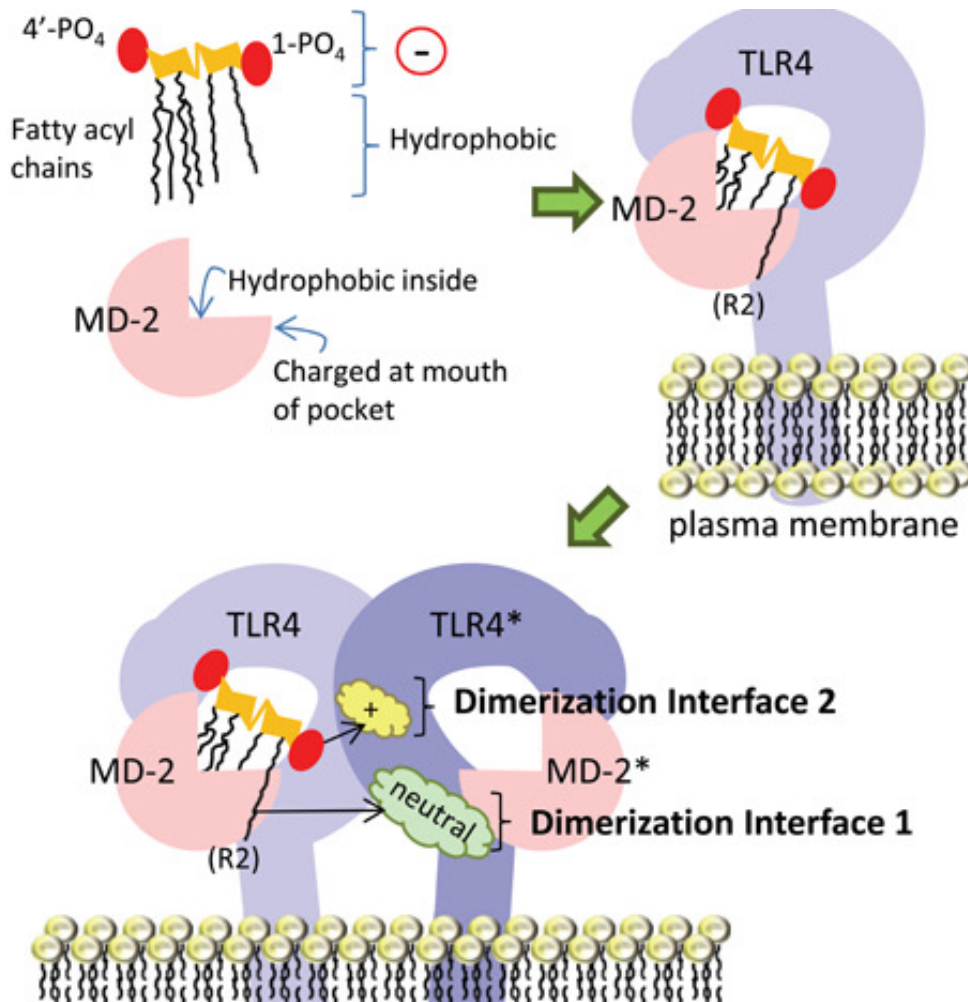
- Per essere attivo il TLR4 necessita di un adattatore, il fattore solubile **MD2**
- Il complesso TLR4/MD2 si forma a livello del reticolo endoplasmatico e viene successivamente traslocato a livello della membrana citoplasmatica



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
- 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





Il numero delle catene aciliche influenza il riconoscimento del TLR4

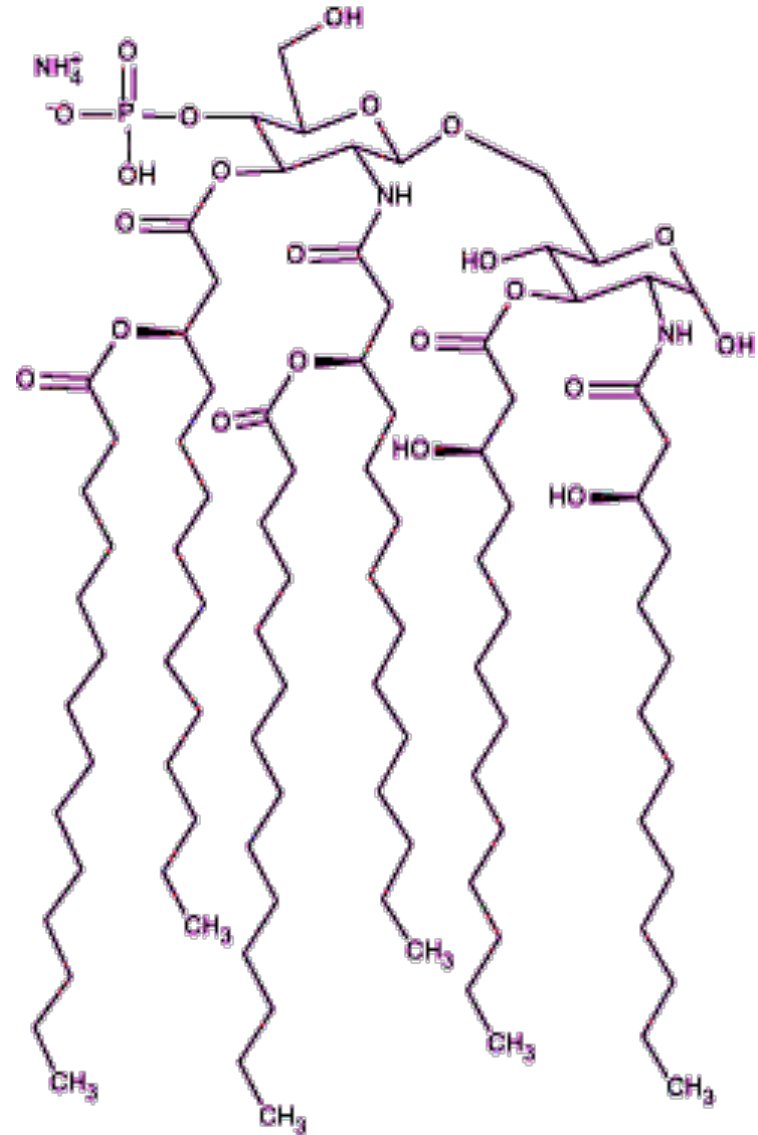
Do you know what **MPLA** means?

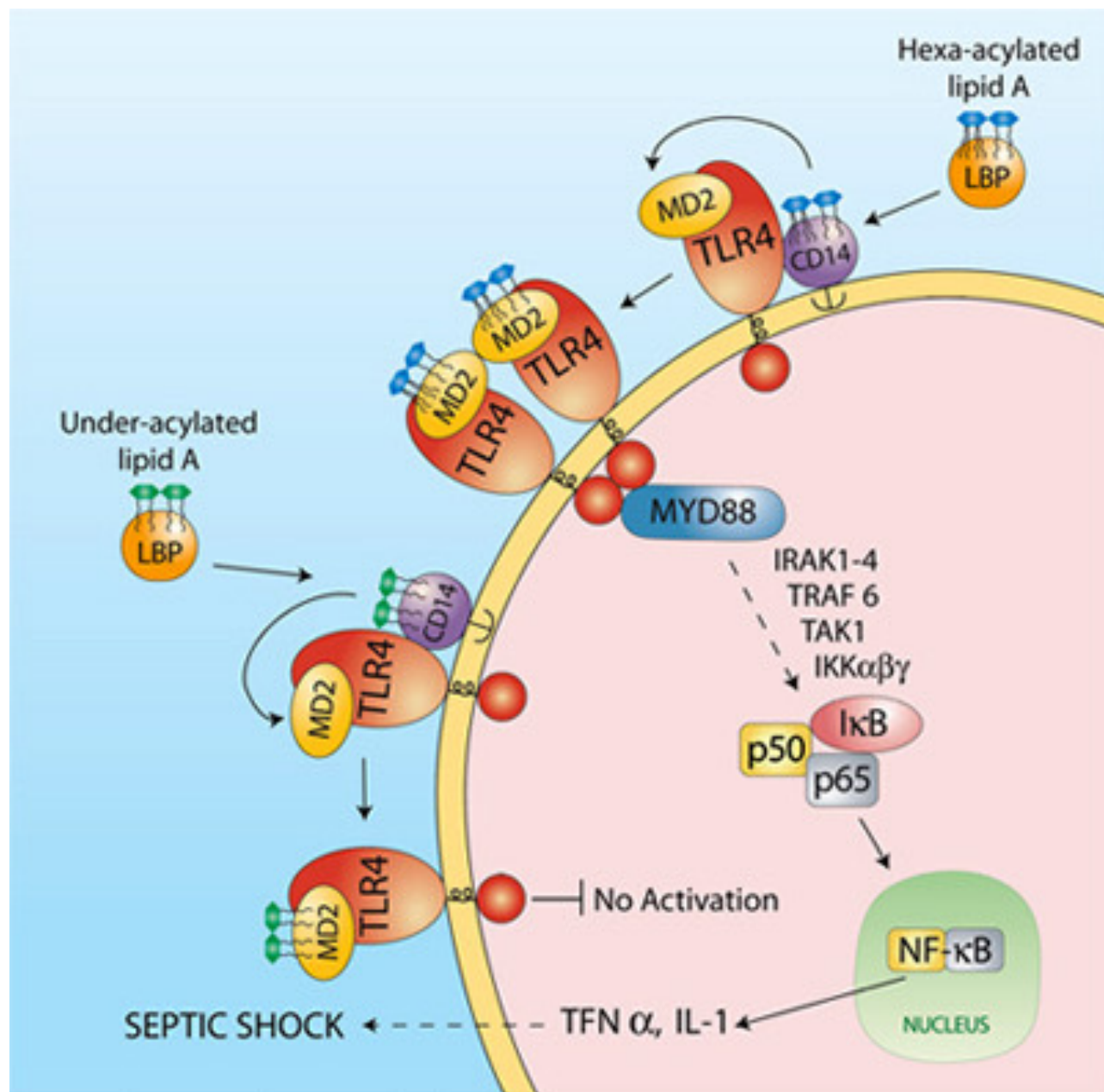
monophosphoryl lipid A
adjuvant



By AcronymsAndSlang.com

MONOFOSFORIL LIPIDE A (MPLA): UN ADIUVANTE PER VACCINI AD USO UMANO



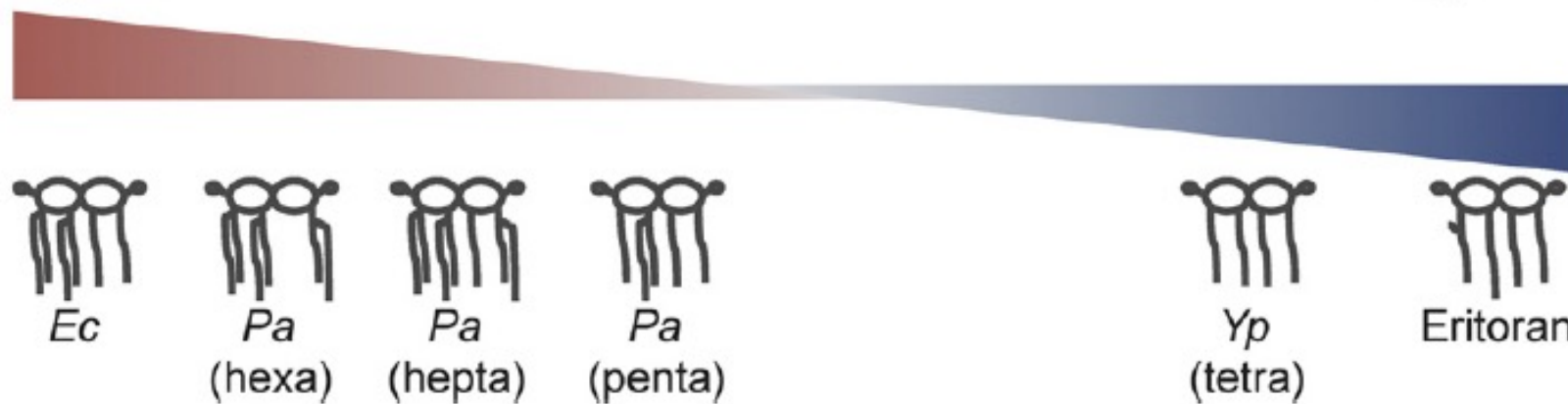


B.

MD2-TLR4/Lipid A SAR Spectrum

Agonists

Antagonists



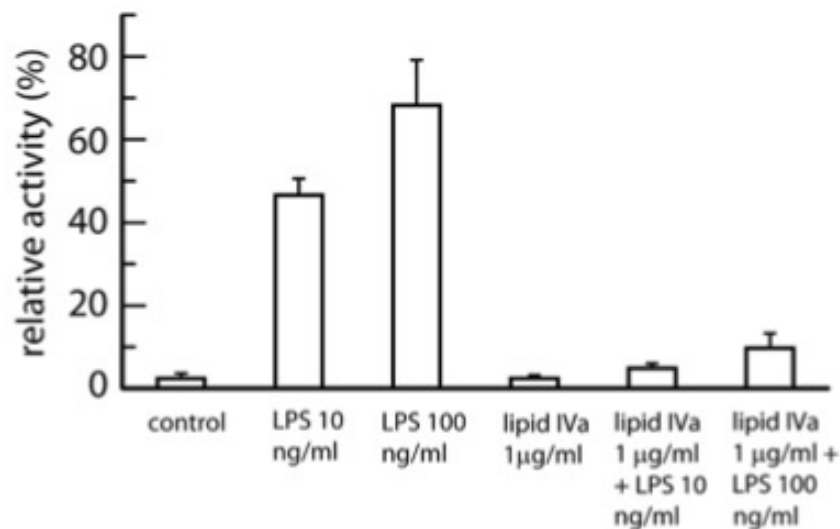
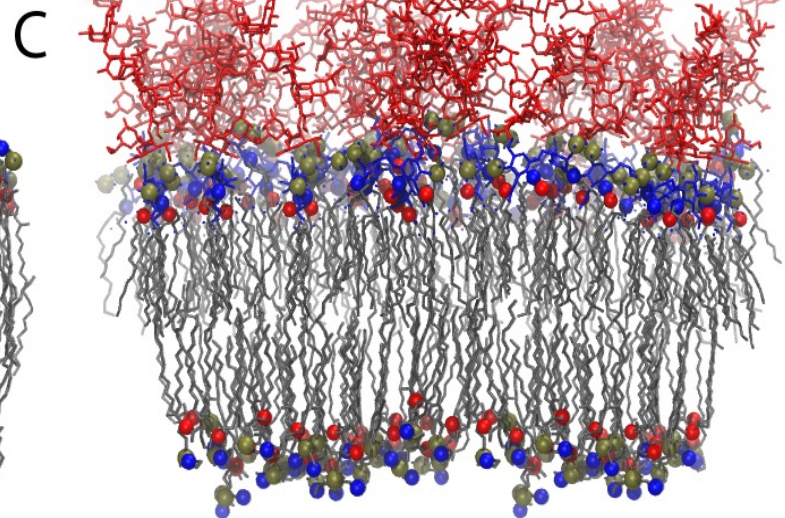
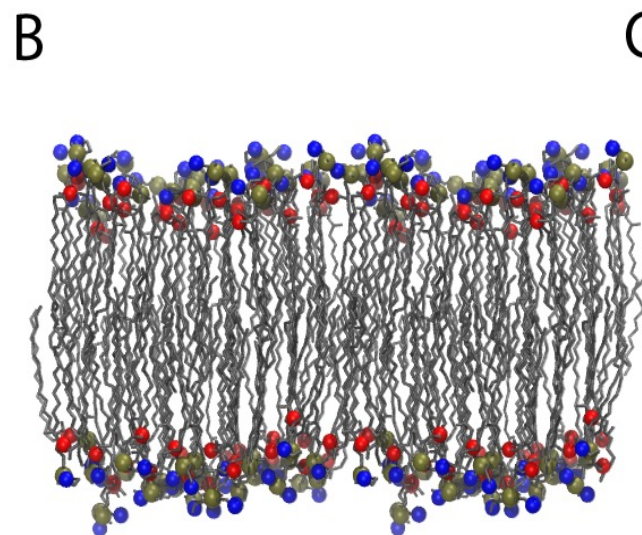
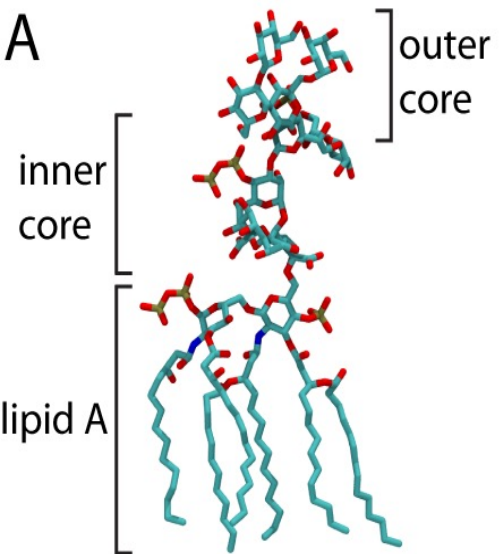
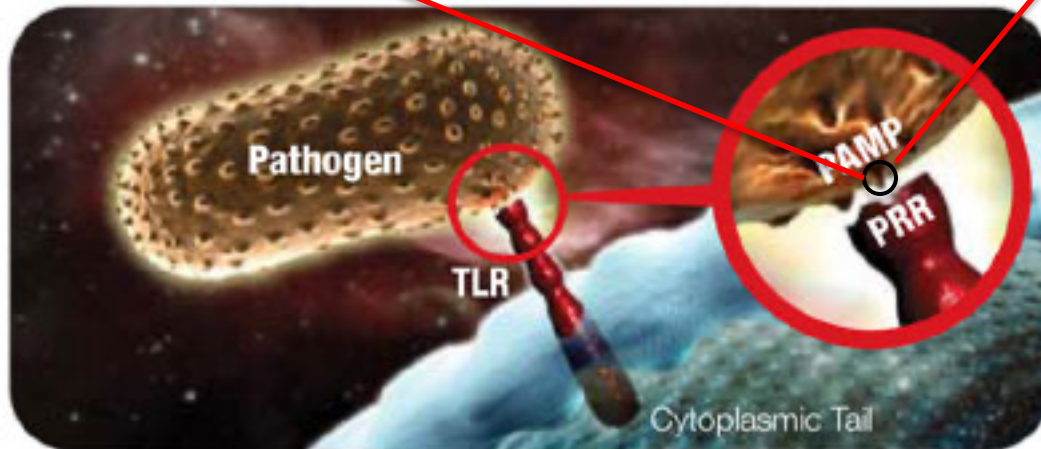
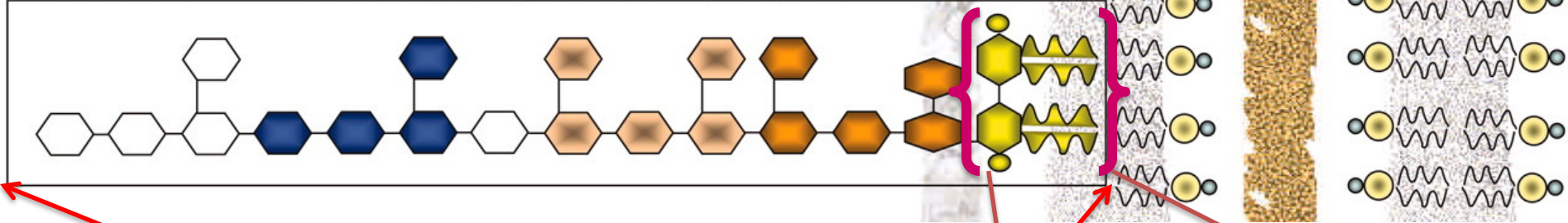


Figure 2. Signaling characteristics of MD-2/TLR4, in cells stimulated with LPS, LPIVa, or both in combination. HEK293 cells were transiently transfected with human TLR4, MD-2 and CD14, together with reporter constructs NF- κ B-luc and phRG-TK. Cells were stimulated 48 hours later for 6 hours. Data are from a representative experiment (n = 3 experiments) and expressed as triplicate mean \pm SEM for that experiment. LPS activated human TLR4 dose-dependently, whereas LPIVa showed no agonist activity and antagonised LPS at both concentrations of agonist.

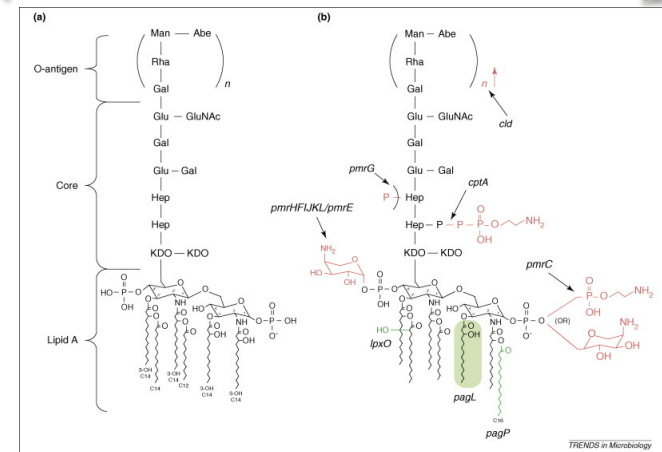
.....



PER EVADERE IL RICONOSCIMENTO DA PARTE DEL SISTEMA IMMUNITARIO I BATTERI MODIFICANO LE STRUTTURE (ES. LE MODIFICAZIONI DEGLI LPS)

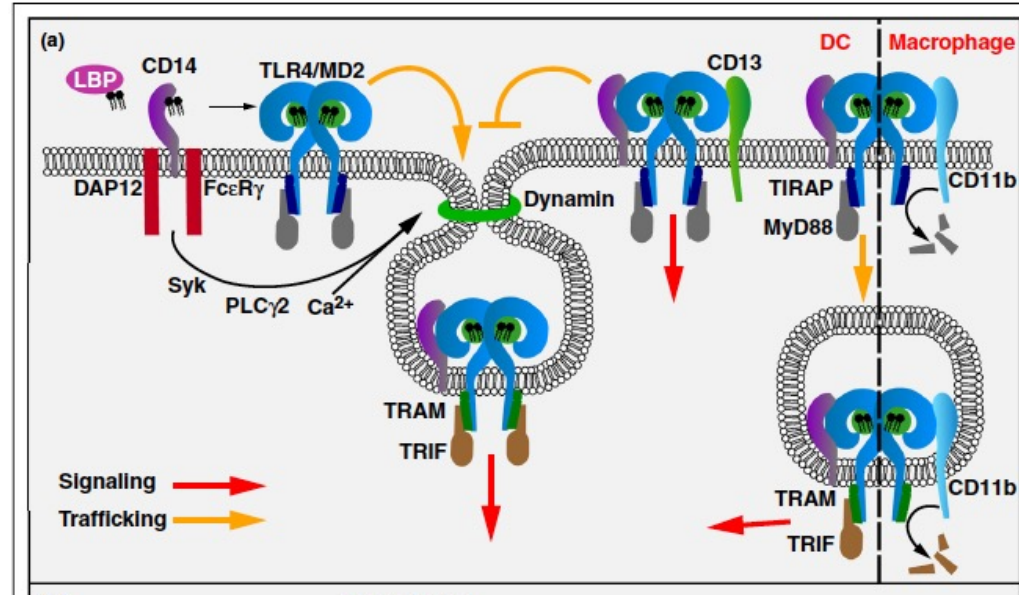
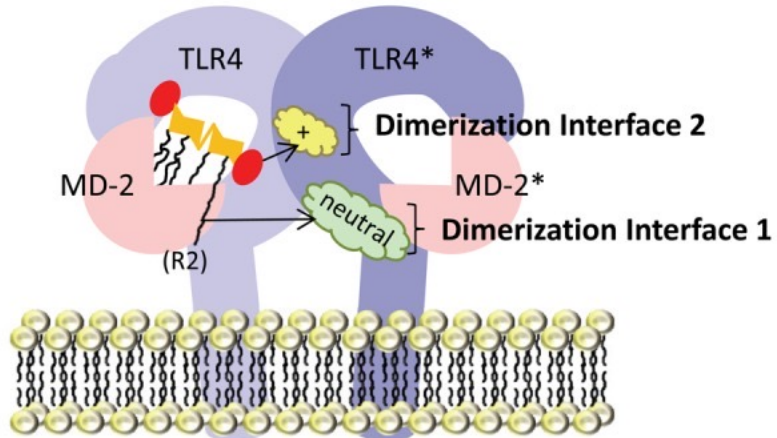
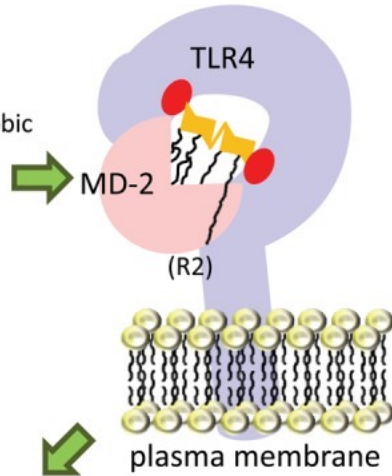
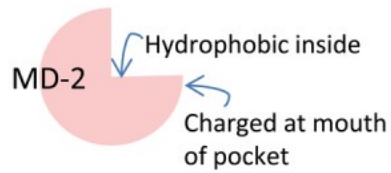
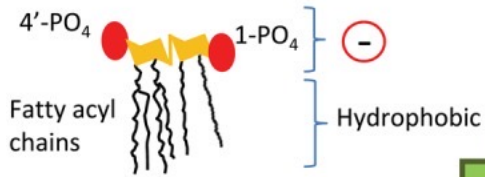


LPS+PRR

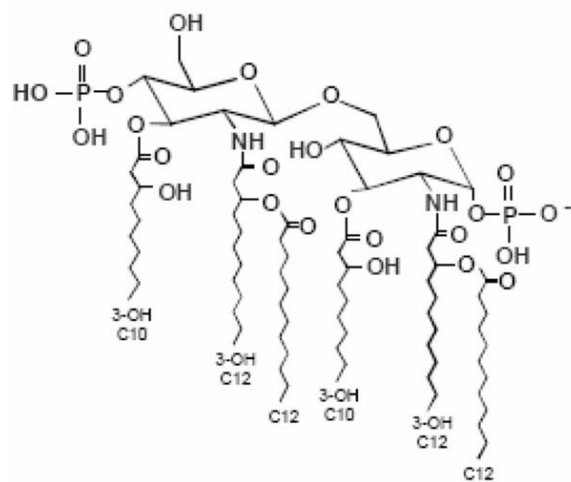
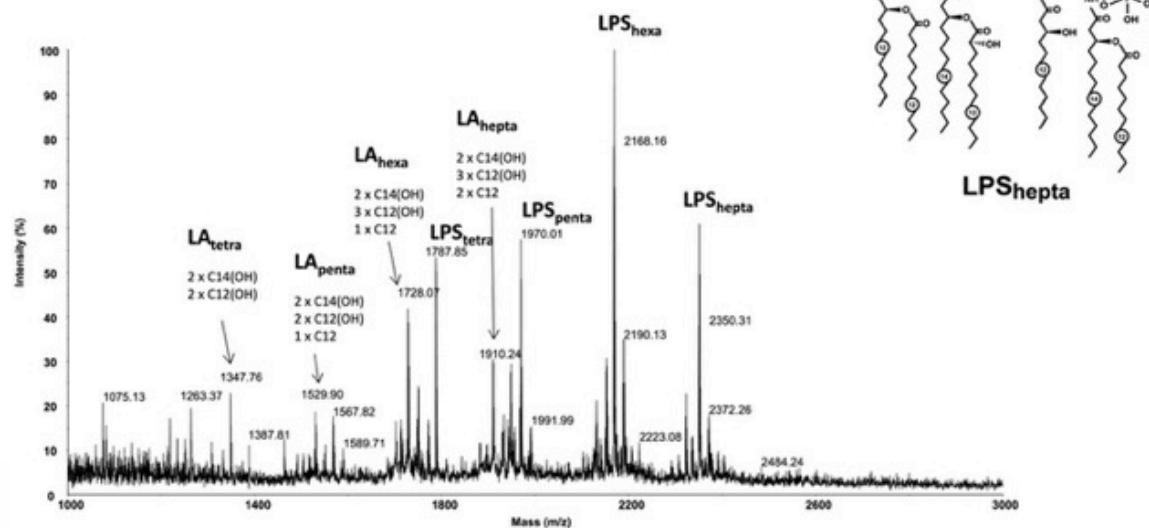


Modificazioni del Lipide A

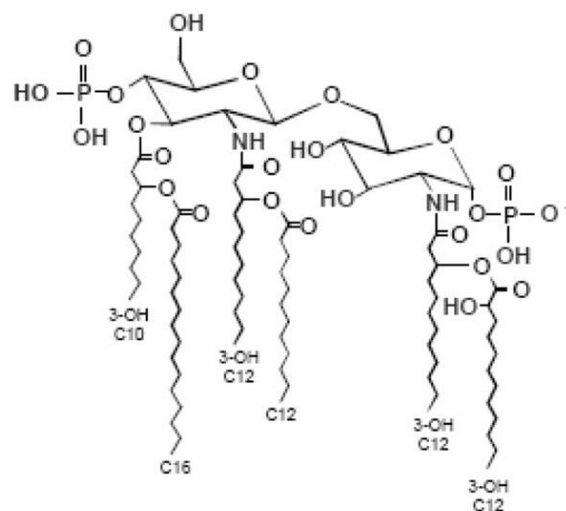
Hexa-acyl *E. coli* lipid A



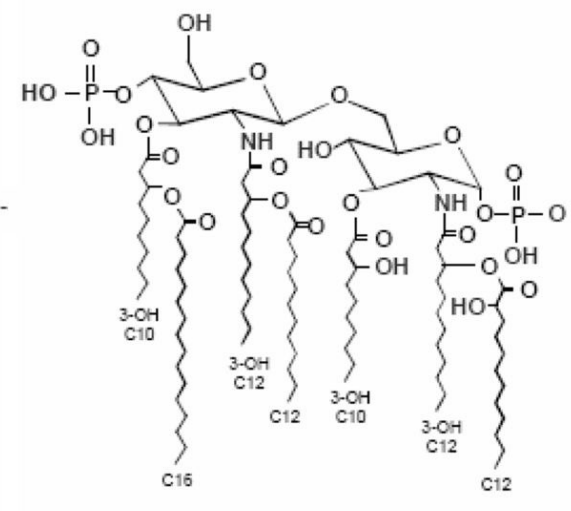
A



Environmental
 $m/z = 1616$



CF - Mild
 $m/z = 1447$



CF - Severe
 $m/z = 1855$

Lipide A: il caso di *E. coli*

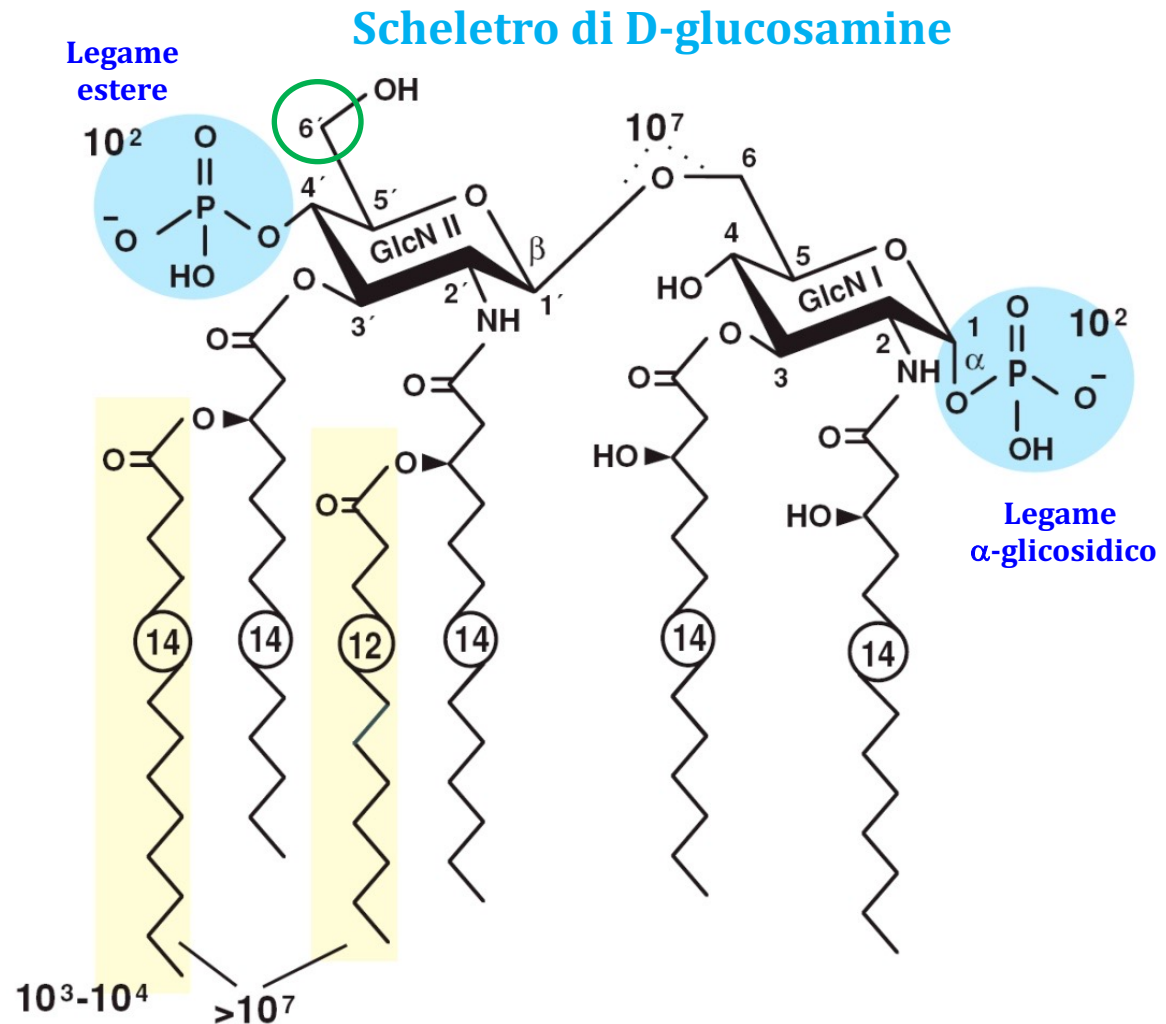
- ✓ Il lipide A di *E. coli* viene generalmente riportato come **esa-acilato**; in quantità più o meno variabili anche le specie **penta** e **tetracilate**.
- ✓ Gli acidi grassi principali hanno un numero di atomi di carbonio compresi tra C10 e C16
C18 e C21 in *H. pylori* e *C. trachomatis*
- ✓ Il numero di catene aciliche varia considerevolmente e ha un effetto diretto sulla tossicità dell'LPS
- ✓ Gli acidi grassi idrossilati sono legati allo scheletro glucidico mediante legami esterici o amidici in posizione 2 e 2' e 3 e 3'

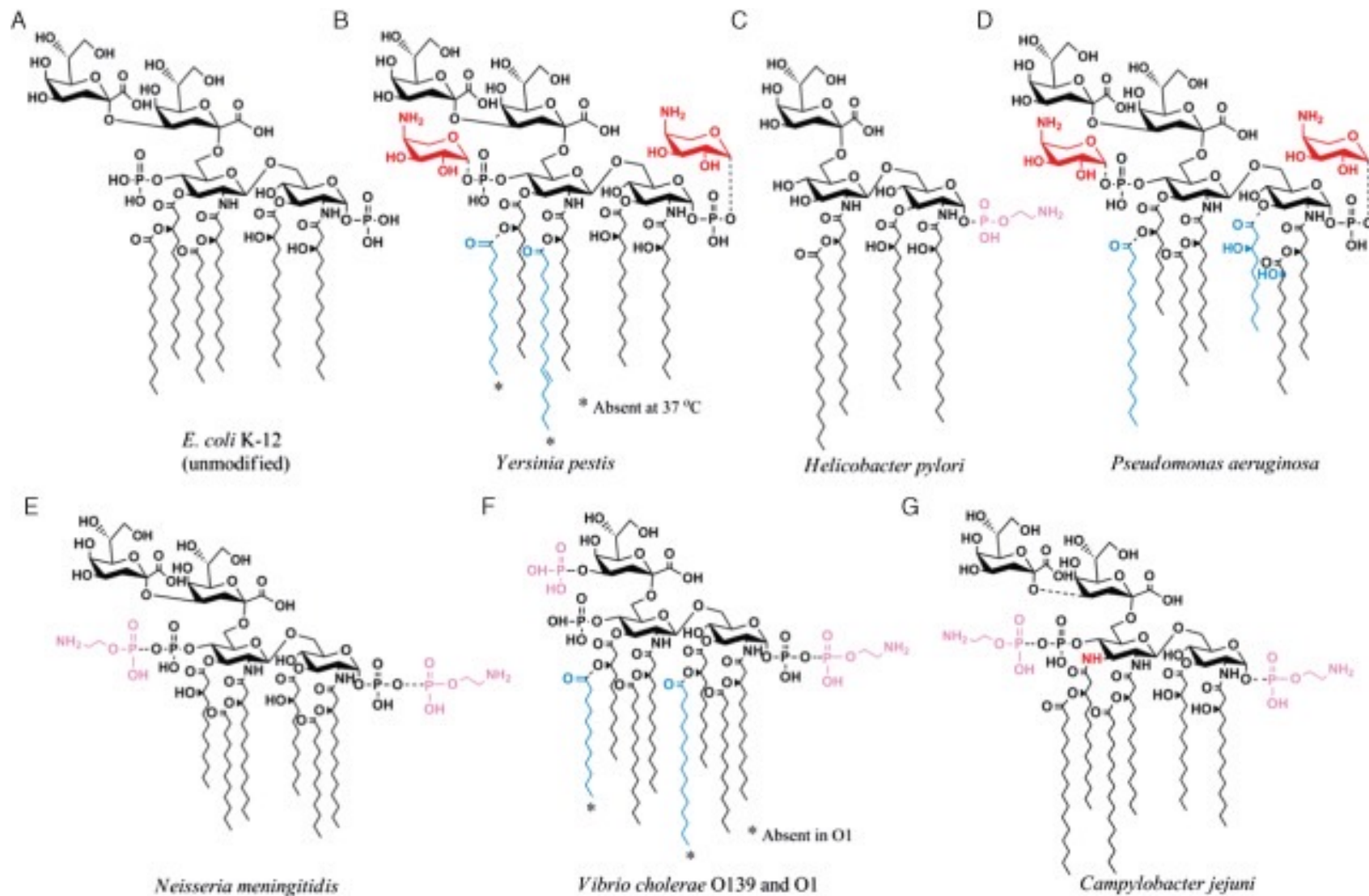
Lipide A: variazioni del *pattern* di acilazione

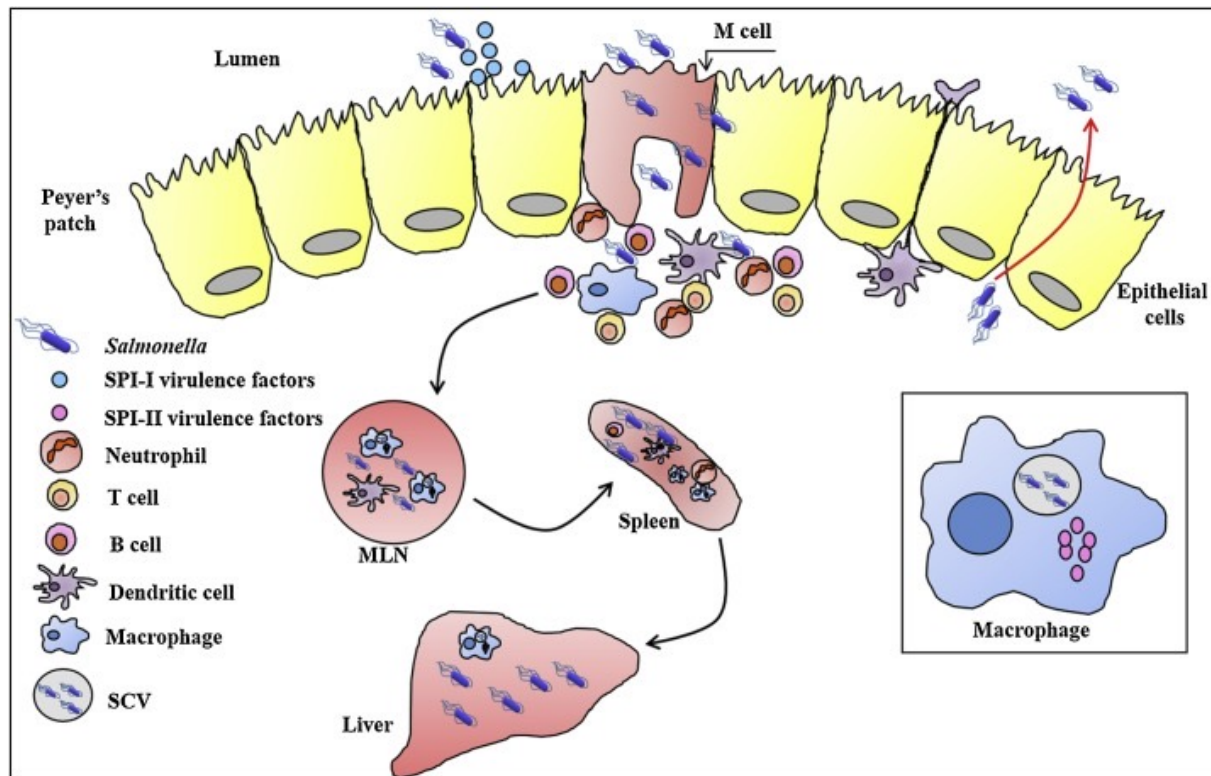
Le principali variazioni

riguardano:

1. Il numero delle catene di acidi grassi
2. La posizione relativa delle catene di acidi grassi
3. La natura dei gruppi acilici
 - acido miristico
 - acido palmitico
 - acido stearico
 - acido laurico

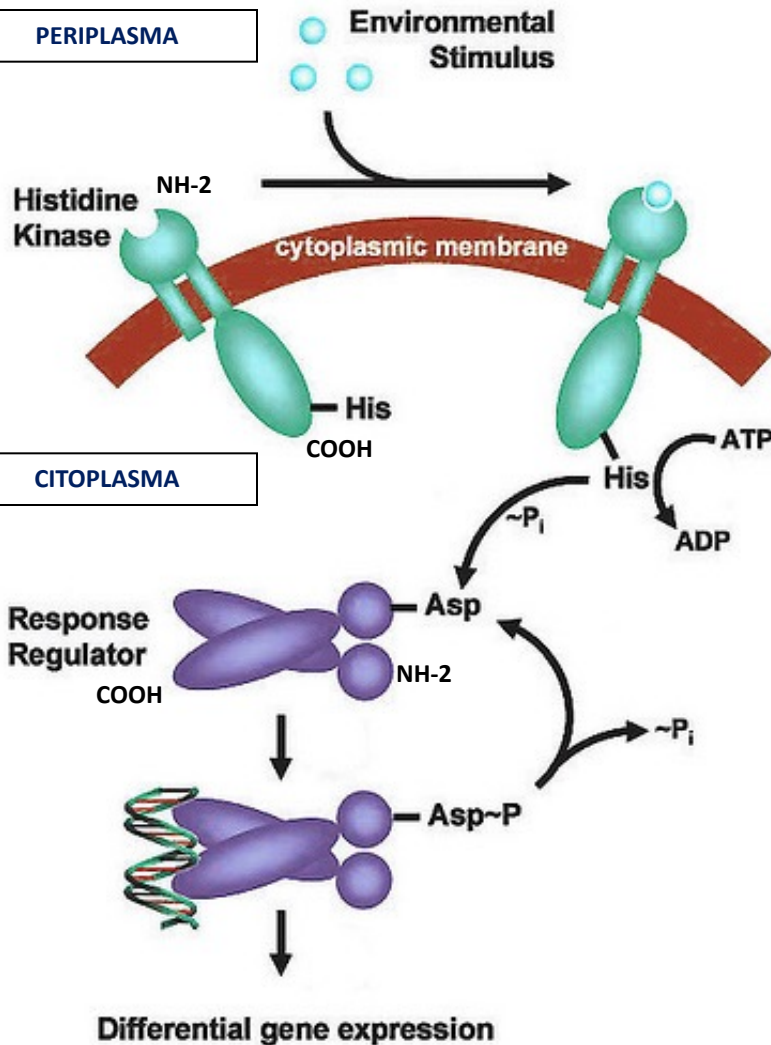






Modificazioni del Lipide A: il caso di *Salmonella* [2]

sistemi di percezione sensoriale a due componenti



➤ Caratterizzazione in seguito all'individuazione di mutazioni pleiotropiche in *E. coli*, *Salmonella*.

➤ Due componenti:

1. **Sensore** (proteina di membrana)
2. **Regolatore di risposta** (citosolico)

Sensore: **dominio sensoriale** e un **dominio del trasmettitore**

Regolatore: **Dominio di ricezione** e un **dominio di legame al DNA**

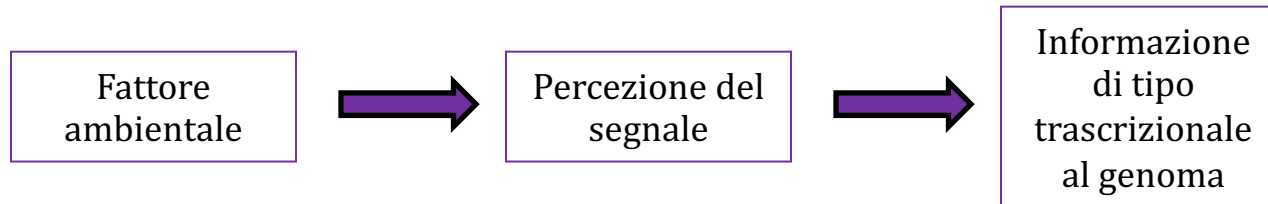
Modificazioni del Lipide A: il caso di *Salmonella* [3]

Il sistema PhoP/PhoQ

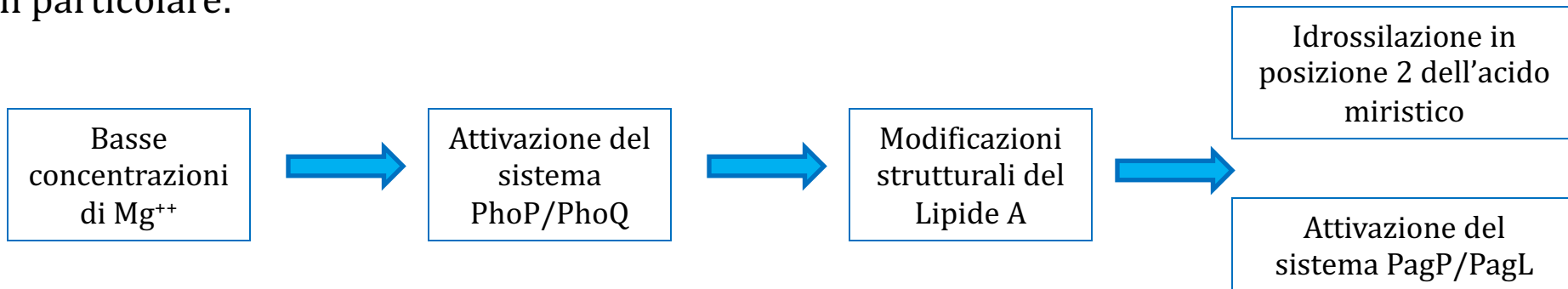
PhoP: attivatore/repressore trascrizionale

PhoQ: protein chinasi

Il complesso PhoP/PhoQ può regolare (attivare o reprimere) simultaneamente più di 40 geni differenti



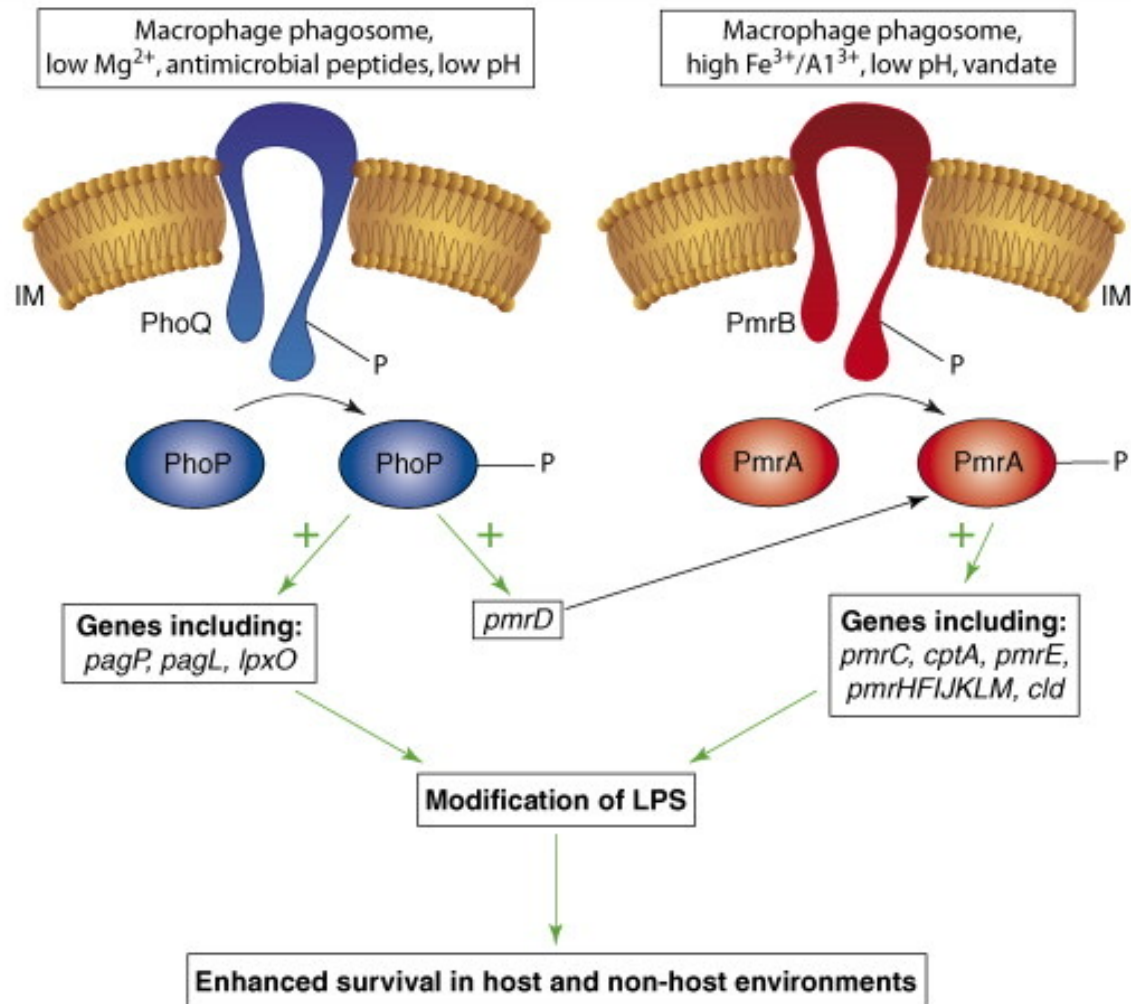
In particolare:



Modificazioni del Lipide A: il caso di *Salmonella* [4]

Il sistema PhoP/PhoQ

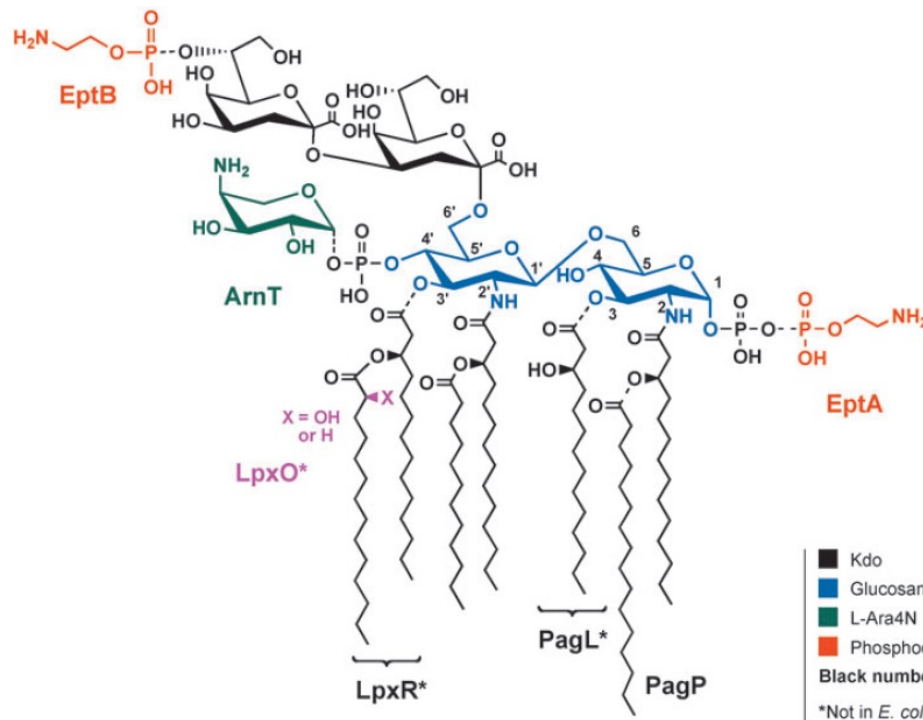
Il sistema PmrA/PmrB



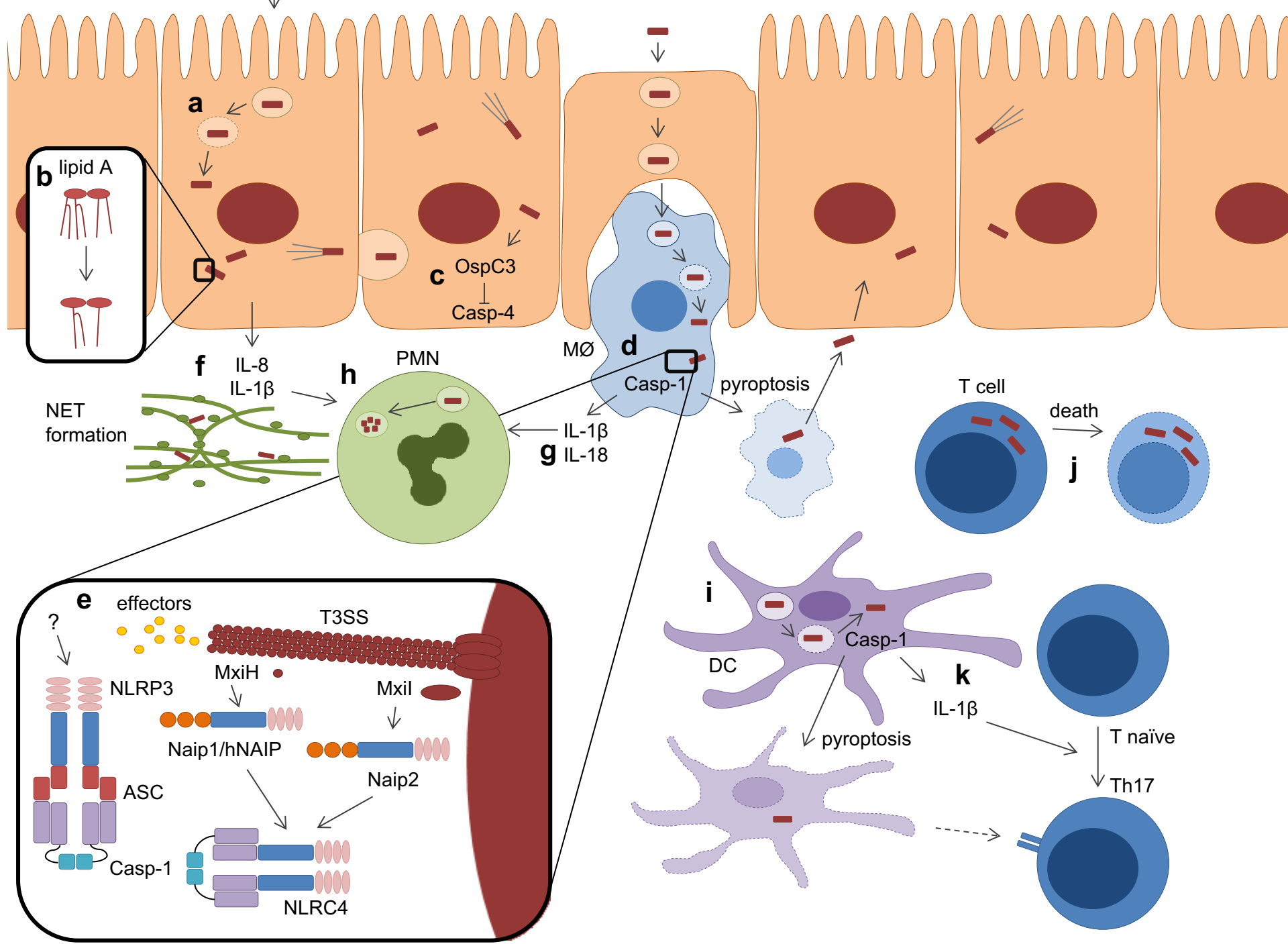
Il sistema PmrA/PmrB

Modificazioni del Lipide A: il caso di *Salmonella* [4]

- **LpxR**: lipasi della membrana esterna (deacilasi); è sotto il controllo del sistema PhoP/PhoQ
- **LpxO**: enzima della membrana interna che idrossila le catene aciliche secondarie



Gli enzimi LpxR, LpxO e PagL non sono presenti in *E. coli* K12. Quando sovrespressi in *E. coli* K12 determinano le tipiche modifiche del Lipide A osservate in *Salmonella*.

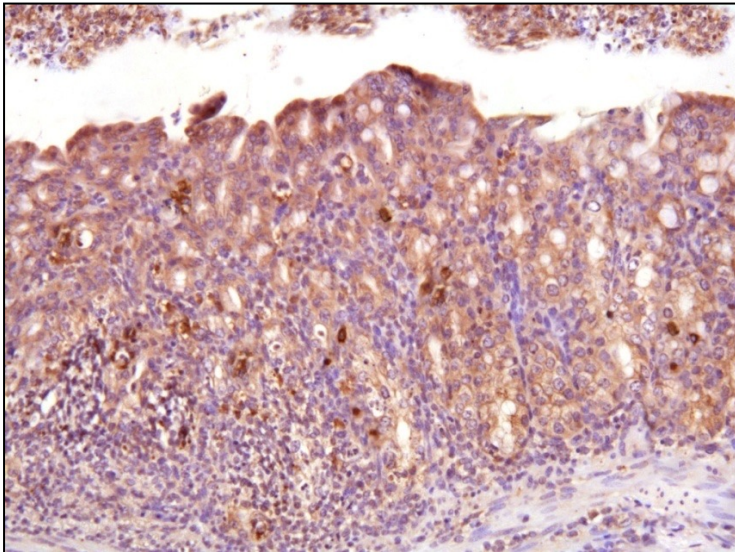


**COLONIC MUCOSA OF GUINEA PIGS
INTRARECTALLY INFECTED WITH
*S.FLEXNERI***

Anti-LPS

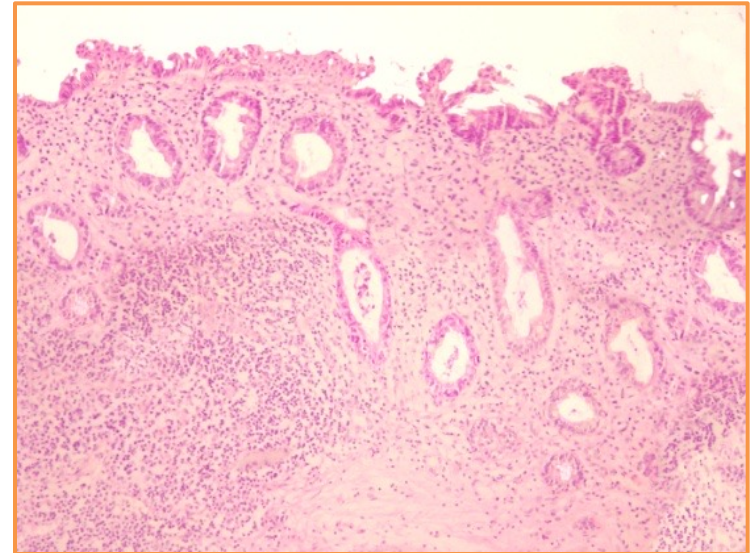


Anti-LPS

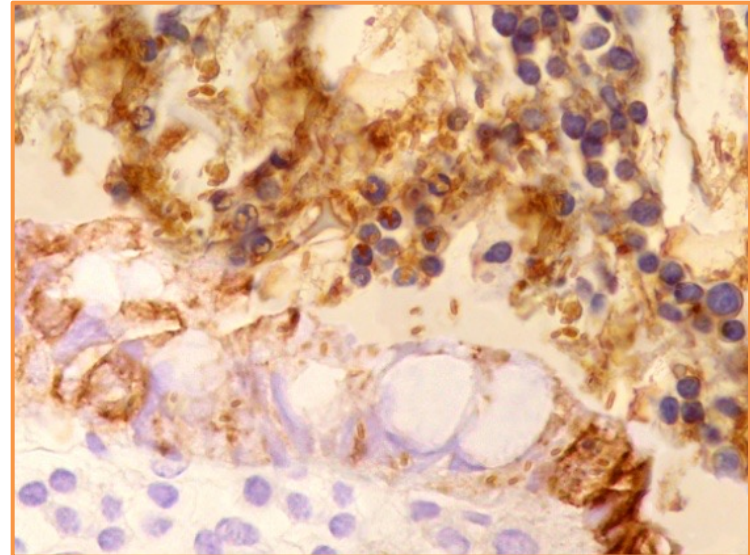


**EX VIVO
HUMAN COLON ORGAN CULTURE (EVOC)
MODEL OF INFECTION**

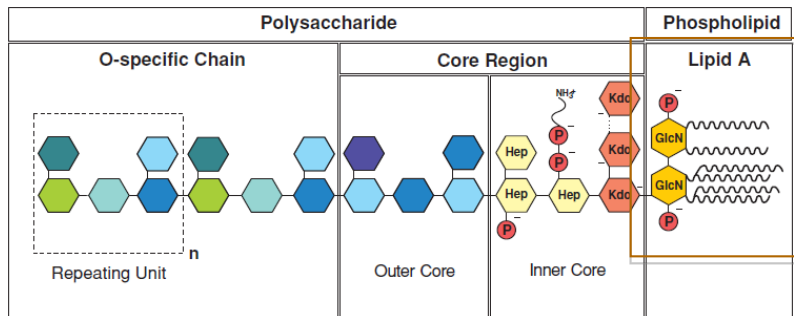
H/E



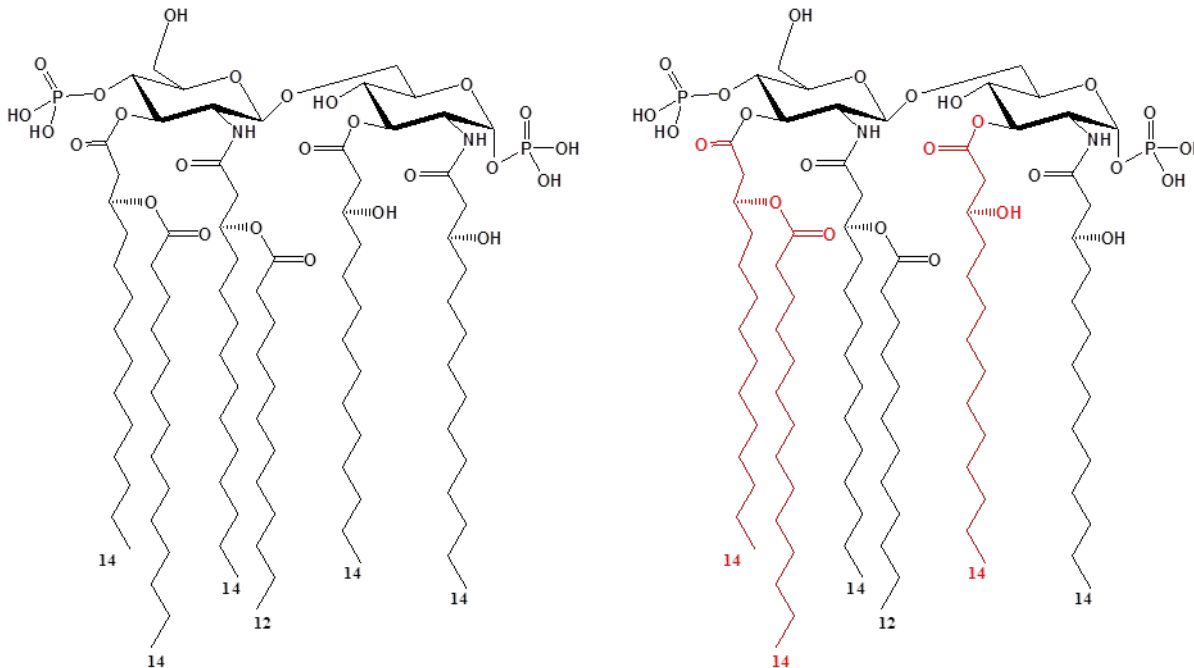
Anti-LPS



LPS: acellular vs intracellular LPS



Paciello et al, 2013



Acellular LPS

Intracellular LPS

The Lipid A of intracellular bacteria is characterized by tri-, tetra- and penta-acylated lipid A, compared to hexa-acylated lipid A of *in vitro* grown bacteria.

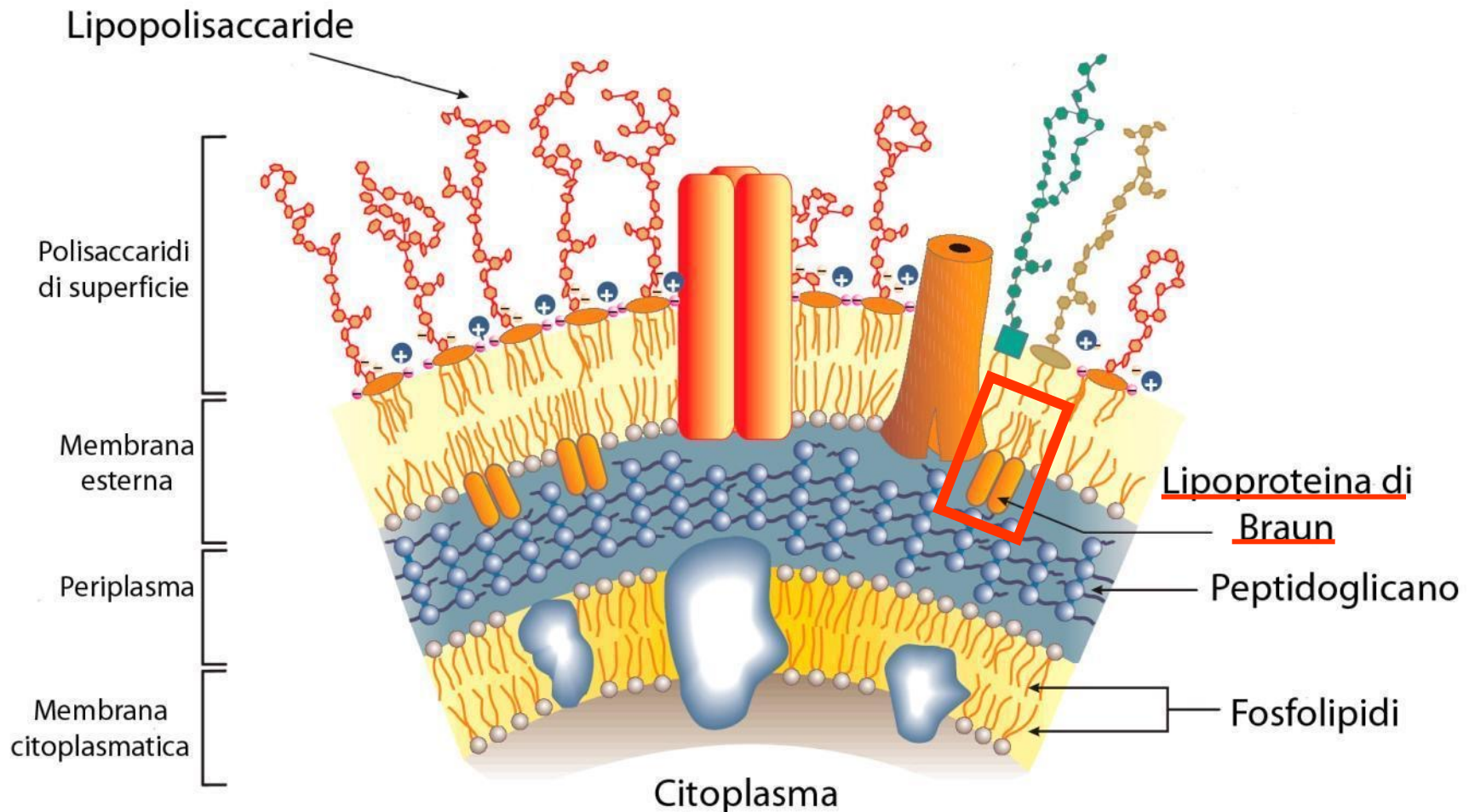
TLR2

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

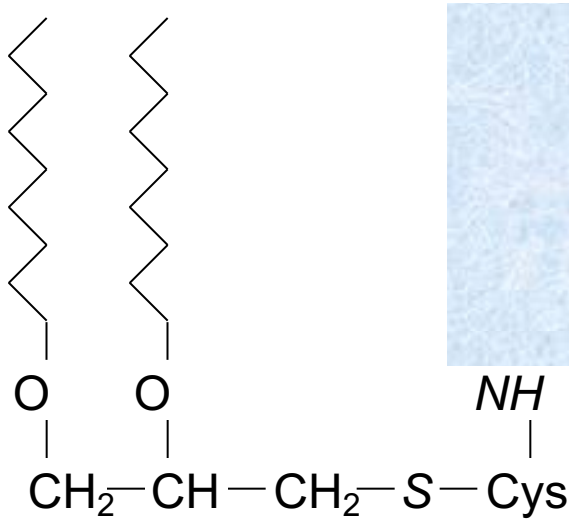
Come può riconoscere un così vasto spettro di componenti microbici?

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

Le lipoproteine



lipoproteine



Lipoproteine triacilate

Lipoproteine diacilate

Es: MALP2 (macrophage-activating lipopeptide da *Mycoplasma fermentans*)

LIPOPROTEINA

$$(aa)_{56}$$
$$\text{Lys} - \text{NH}_2$$

COOH

D-Ala

m-Dap —NH₂

D-Glu

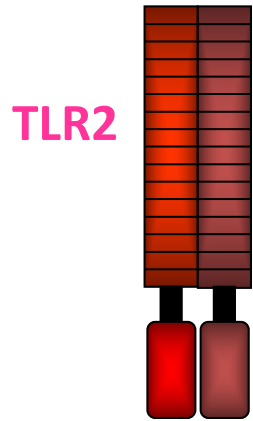
L-Ala

PEPTIDOGLICANO

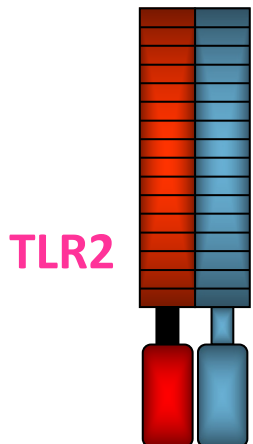
L-Ala
|
XXXXXXX-----GlcNAc—MurNAc-----XXXXXXXXXXXXX

PEPTIDOGLICANO

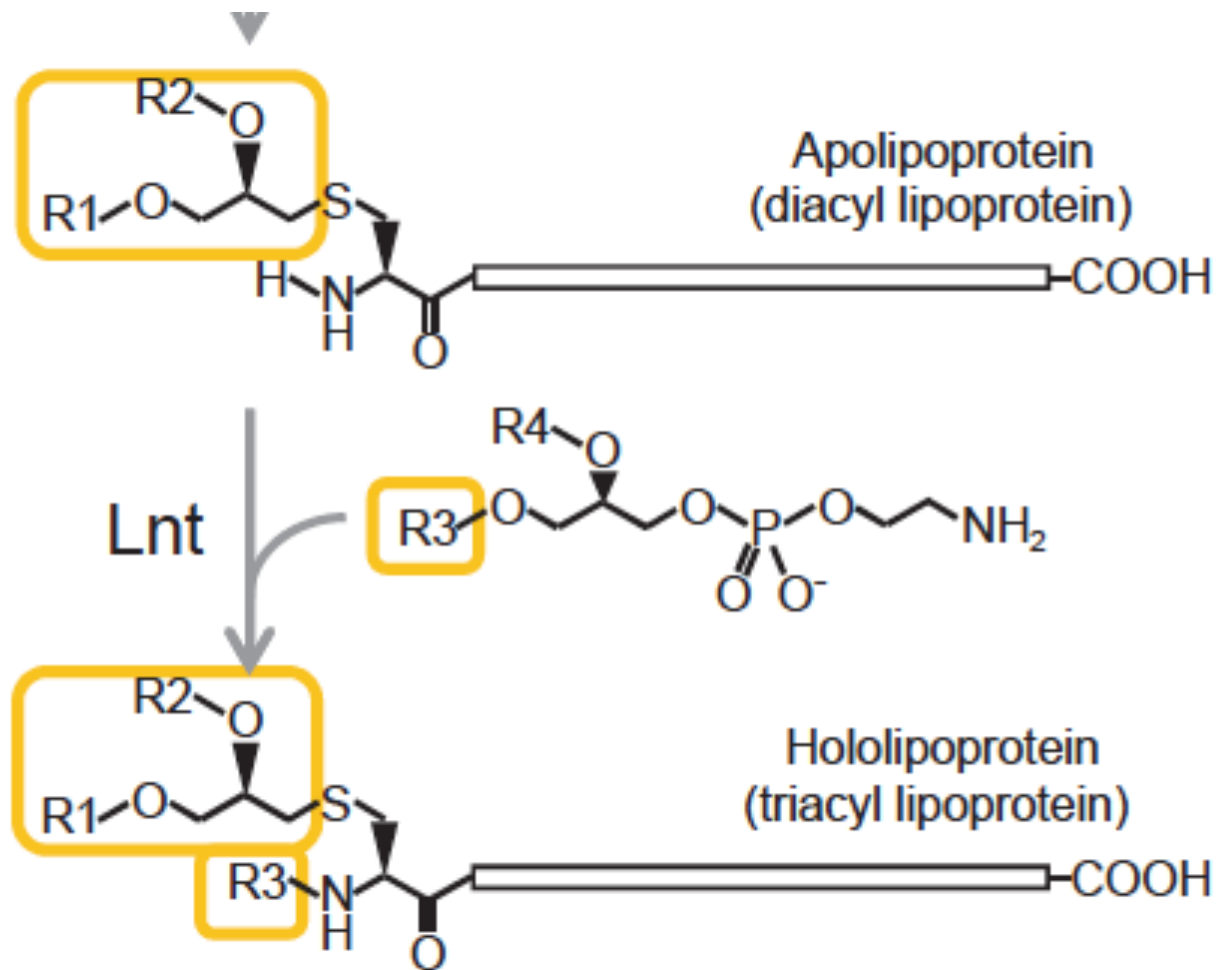
Gli eterodimeri di TLR2



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



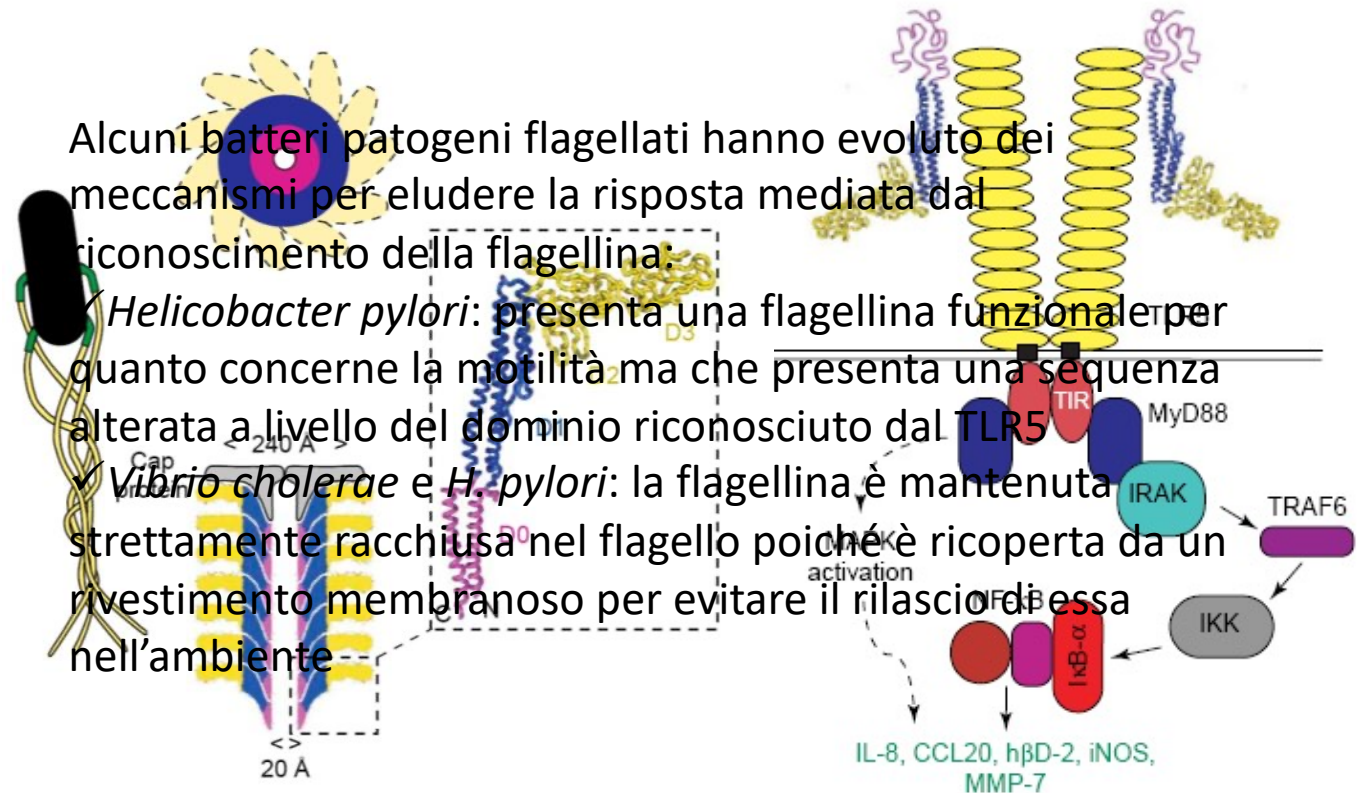
L'eterodimero **TLR2/6** riconosce le lipoproteine diacilate



TLR5

Il motivo batterico riconosciuto è rappresentato da una **sequenza** altamente conservata tra diverse specie batteriche **di 13 amminoacidi** della flagellina (D1).

Il TLR5 interagisce con una **specifica conformazione del dominio D1** della flagellina



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
- CpG inducono produzione di IL-6, IL-12 e TNF α e l'attivazione di NF- κ B e JNK
- **Alcuni DNA virali (HSV, citomegalovirus)** inducono attivazione di TLR9
- **Plasmodio della malaria** induce risposta mediata da TLR9

TLRs implicati nel riconoscimento di strutture virali

TLR3

- **Riconosce dsRNA**
- Il dsRNA è o il genoma virale (reovirus) o è prodotto da molti virus come intermedio del loro ciclo replicativo. I dsRNA inducono la sintesi di interferoni di tipo I (IFN- α/β) ad attività anti-virale e immunostimolatoria

TLR7 e TLR8

- Presentano un'elevata omologia
- Riconoscono:
 - **ssRNA ricchi in uridina** come quelli del **virus dell'immunodeficienza umana** e del **virus dell'influenza**
 - composti sintetici quali imidazochinoloni
 - **Streptococchi** di Gruppo B

Sono espressi a livello della membrana endosomiale e questo potrebbe spiegare la mancata attivazione da parte degli RNA normalmente presenti nelle cellule

Altri PRRs presenti sulla membrana e che legano componenti batteriche

- **Lectina di tipo C** (recettore per il mannosio)

Presente su tutti i fagociti riconosce i \ residui di mannosio e di fruttosio(batteri) e dei glucani (funghi).

- **Recettori Scavenger:**

Presenti su tutti i fagociti riconoscono alcuni polimeri anionici e lipoproteine acetilate a bassa densità

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