

# Il compartimento naturale dell'immunità innata: I recettori NLRs e l'inflammasoma

***Le proteine NLRs***  
(NBD leucine-rich  
repeat-containing receptor (NLR)  
family)

# Struttura delle proteine NLRs

Le proteine NLRs presentano un'organizzazione modulare:

1. Dominio amino-terminale **EBD** [Effector-Binding Domain]
2. Dominio centrale di oligomerizzazione, NOD [Nucleotide-Oligomerization Domain] o noto come **NACHT domain**
3. Estremità carbossilica, indicata come **LRD** [Ligand-Recognition Domain]

Le principali differenze tra le proteine NLRs si riscontrano a livello del modulo EBD, la cui funzione sembra essere quella di riconoscere specifici partners molecolari attraverso interazioni omo ed eterofiliche

# PRRs citosolici: la famiglia delle proteine NLR

Il genoma umano codifica 22 NLRs mentre quello murino ne codifica un numero maggiore.

## Caratteristiche comuni dei membri della famiglia NLR:

- a) Dominio **C-terminale** di ripetizioni ricche in leucina (**LRR**) coinvolto nel riconoscimento dei ligandi
- b) Dominio **NACHT** che media l'oligomerizzazione e che è essenziale per l'attivazione
- c) Dominio **effettore N-terminale** responsabile dell'interazione proteina-proteina con le molecole adattatrici

Domini principali all'N terminale

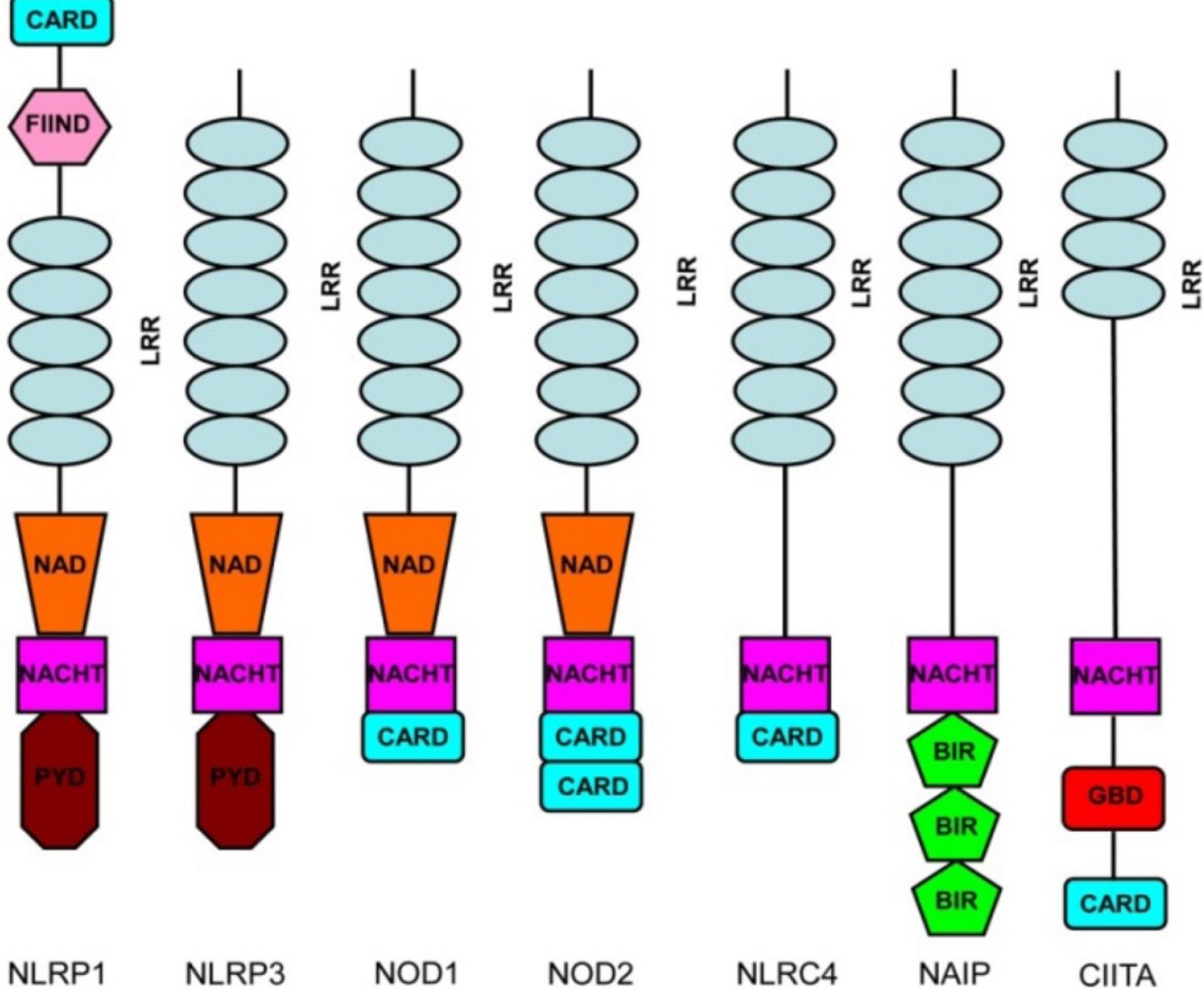
**CARD**: Caspase Activation Recruitment Domain

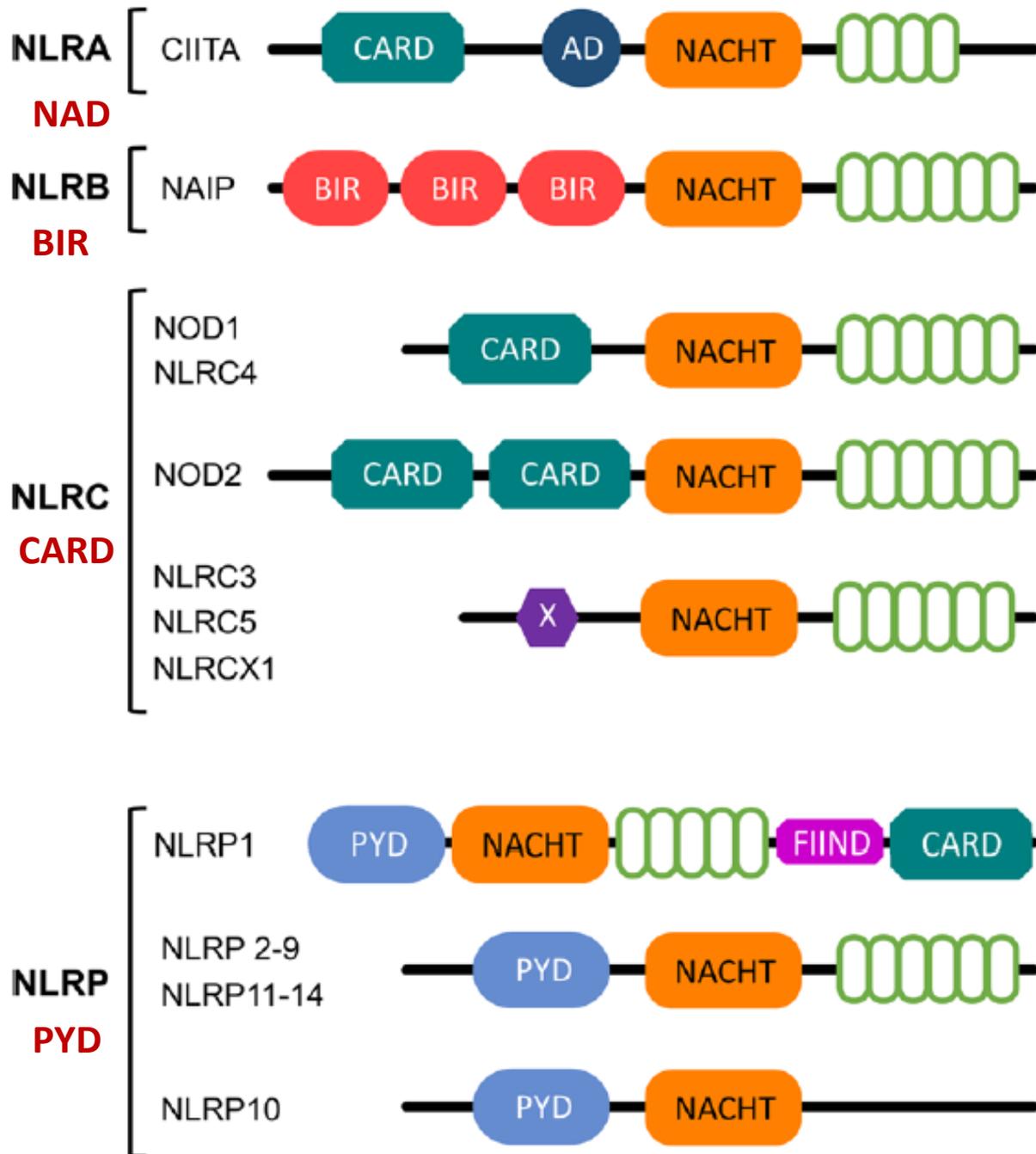
**PYD**: Pyrin Domain (11 NLRs contengono questo dominio)

**BIR**: Baculovirus IAP Repeat

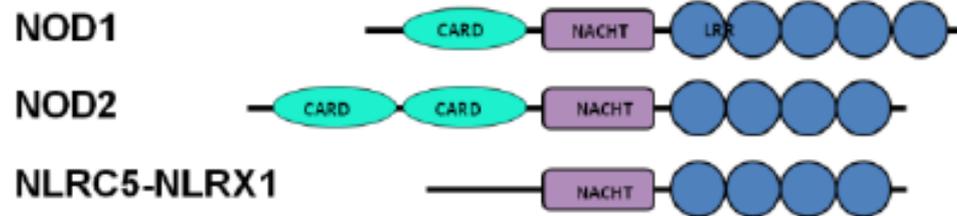
**NAD**: NBD associated domain

*AIM2* = *absent in melanoma 2*



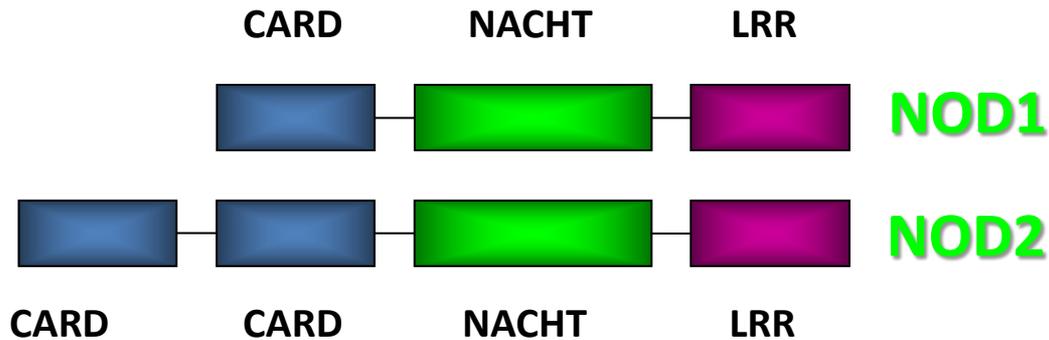


## NON-INFLAMMASOME ACTIVATING



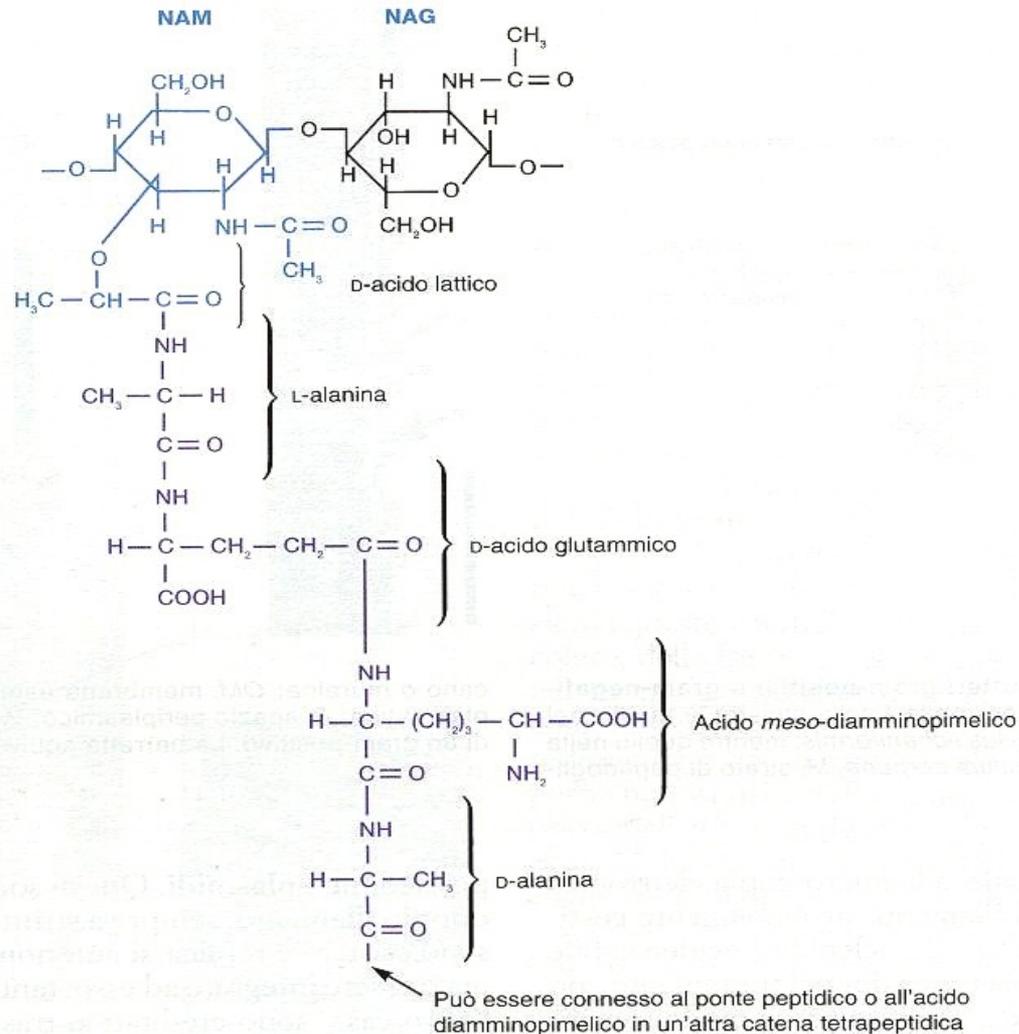
L'attività di queste proteine non è stata associata all'insorgenza dell'inflammasoma.

# Le proteine Nod1 e Nod2



- Funzionano come sensori intracellulari
- Riconoscono **frammenti di PGN** mediante il dominio LRR

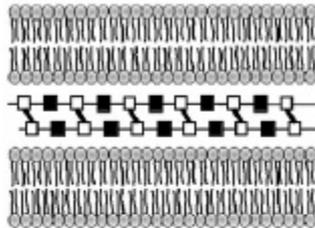
# Il Peptidoglicano (PGN)



# Quali sono i motivi riconosciuti da Nod1 e Nod2?

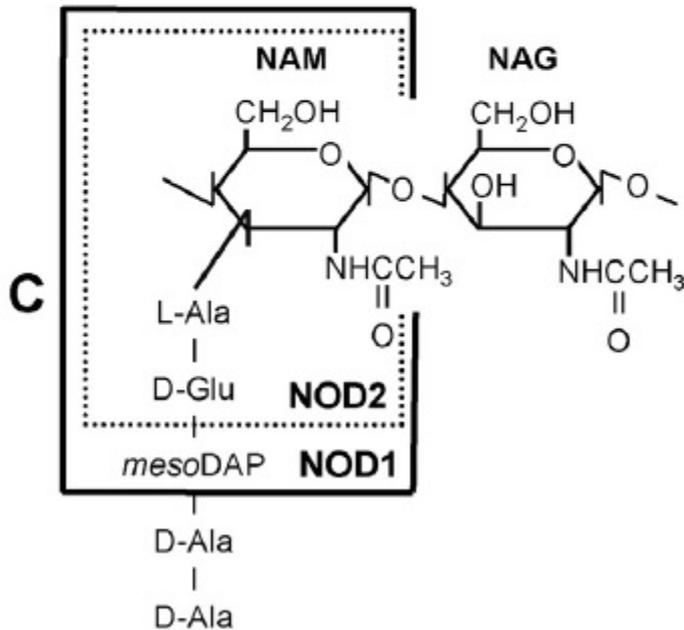
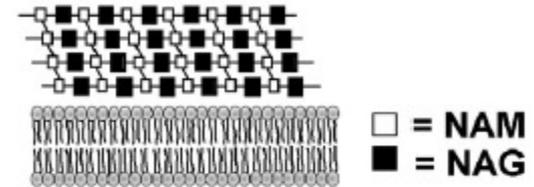
**mesoDAP type PG from Gram negative bacteria**

**A**

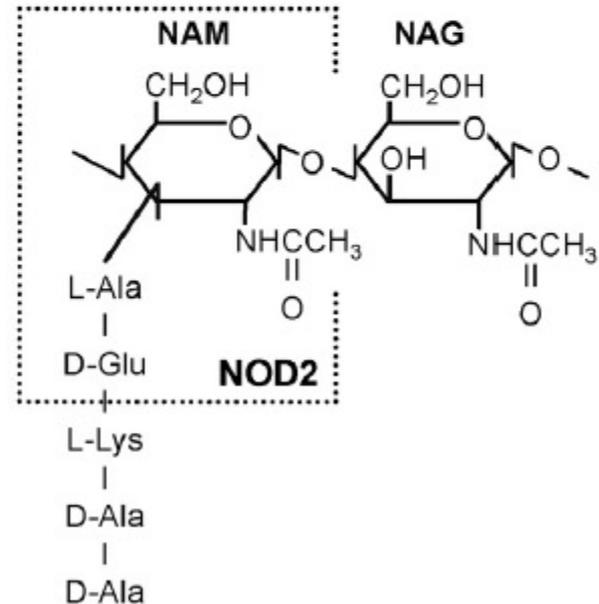


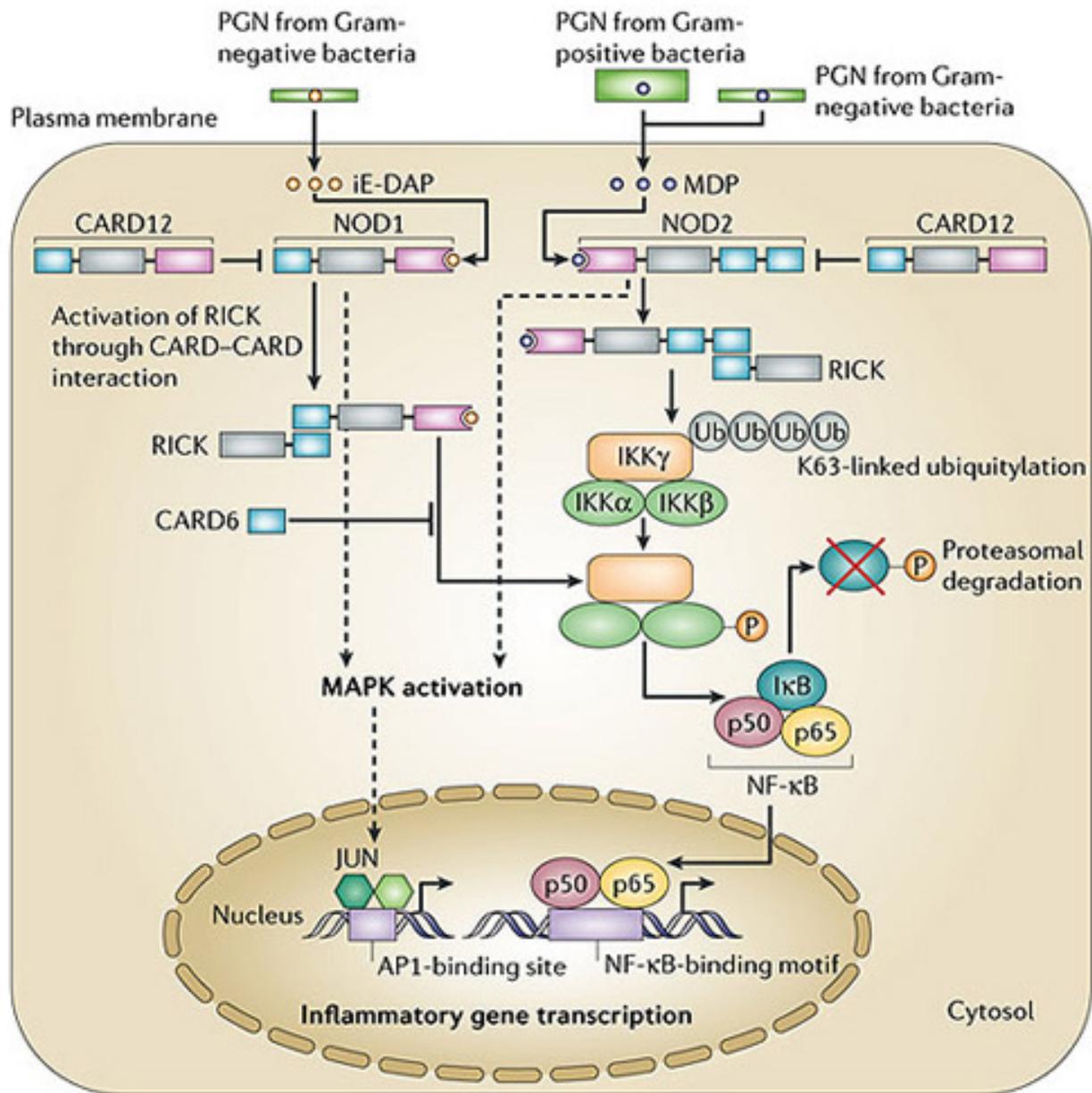
**Lys type PG from Gram positive bacteria (except *Bacillus* sp, *Mycobacterium* sp etc)**

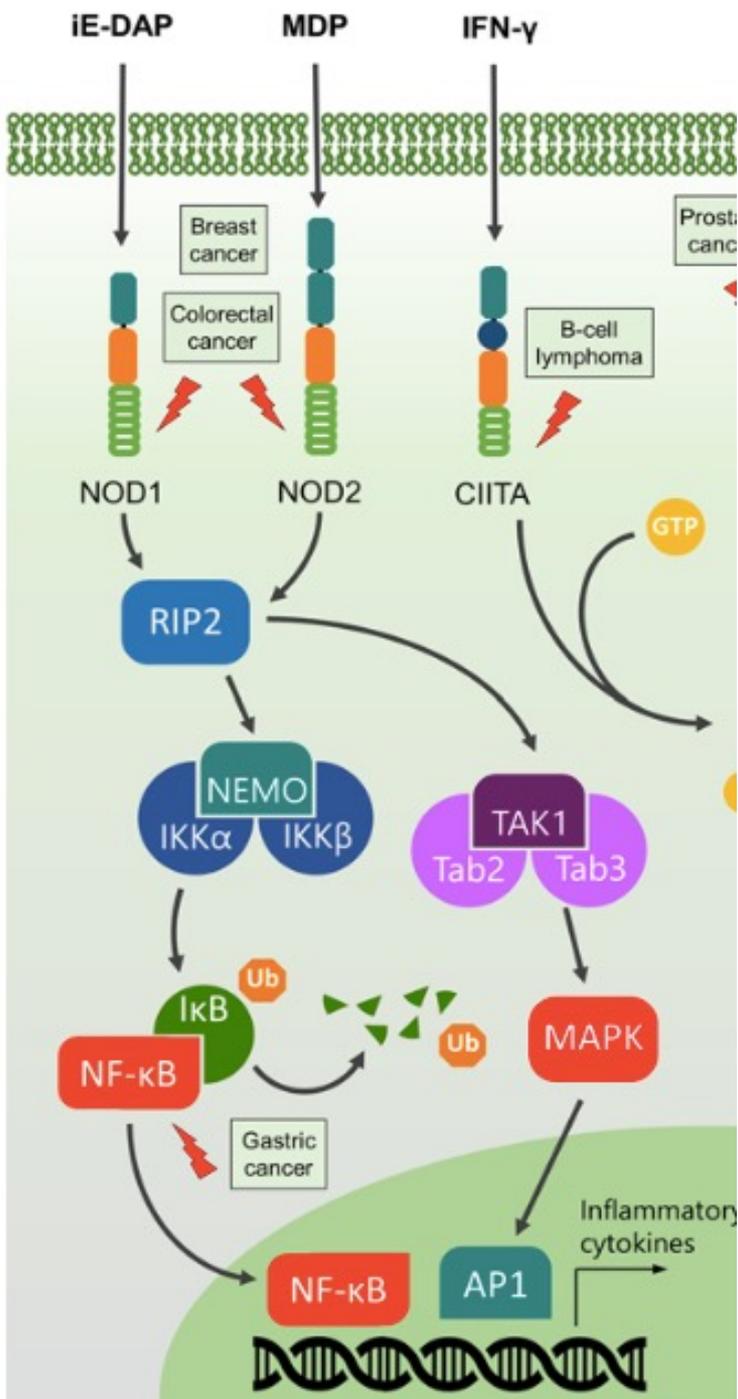
**B**



**D**







I frammenti di PGN che vengono trasportati attraverso la membrana vengono prontamente riconosciuti dai recettori NOD.

NOD1 e NOD2 legati al ligando auto-oligomerizzano attraverso interazioni CARD-CARD, utilizzando la membrana endosomiale come impalcatura per l'assemblaggio del complesso.

Le proteine NOD oligomerizzate attivano il signaling mediante la chinasi RIP2 (RICK) (serin/treonin interacting protein 2), che, a sua volta, media l'attivazione del fattore nucleare  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) attraverso (NEMO) / IKK $\gamma$ , e di conseguenza, la poliubitinazione di I $\kappa$ B e infine la produzione di citochine infiammatorie.

Inoltre, RIP2 "poli-ubiquitinato" recluta anche TAB (TGF- $\beta$ -activated kinase 1 and MAP3K7-binding protein) e la sua chinasi associata TAK1 (TGF- $\beta$ -activated kinase 1). TAK1 è un attivatore a valle della cascata di attivazioni delle MAPK, che attivano le MAPK JNK e p38 culminando con l'attività trascrizionale di AP-1 e la produzione delle citochine proinfiammatorie.

# Quali gli effetti dell'attivazione di Nod1 e Nod2?

- Nelle **cellule dendritiche**, nei **macrofagi** e nei **monociti** si ha la produzione di citochine pro-infiammatorie (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, CXCL-8, IL-12p70), ossido nitrico (NO), espressione di molecole co-stimolatorie e molecole di adesione
- Nelle **cellule epiteliali** si ha la produzione di mediatori pro-infiammatori (TNF $\alpha$ , CXCL-8, MIP2) peptidi antimicrobici ( $\beta$ -defensine)

## Malattie associate a NOD1 e NOD2

Malattia	Mutazioni	Caratteristiche
<b>NOD1</b>		
Infezione di <i>Helicobacter pylori</i>	nessuna mutazione	trasporto di PGN nelle cellule epiteliali attraverso sistema di secrezione di tipo IV
Infezione di <i>Chlamidia pneumoniae</i>	nessuna mutazione	Attivazione di NF- $\kappa$ B nelle cellule endoteliali
Infiammazioni croniche dell'intestino	polimorfismi nel dominio LRR	Fattori di rischio per IBD
Asma	polimorfismi nel dominio LRR	Fattori di rischio per l'asma

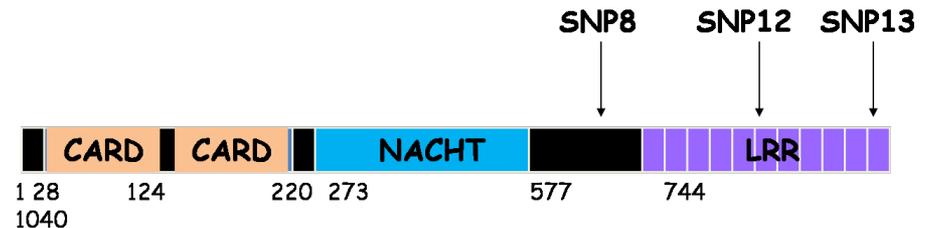
## NOD2

Morbo di Crohn	Arg702Trp; Gly908Arg Leu1007fsinsCys	difetto nell'attivazione di NF- $\kappa$ B
Blau Syndrome	Arg334Trp; Arg334Gln Leu469Phe	costitutiva attivazione di NF- $\kappa$ B

# Morbo di Crohn

- Processo infiammatorio transmurale e discontinuo
- Presenza di granulomi
- Ascessi fistolosi e aree di ulcerazione
- Dolori addominali associati a diarrea
- Ispessimento dell'intestino
- Febbre
- Manifestazioni extraintestinali a carico delle articolazioni, della cute, del fegato e degli occhi

Nei malati di Crohn si ha un'incidenza dell'80% di un polimorfismo in Nod2



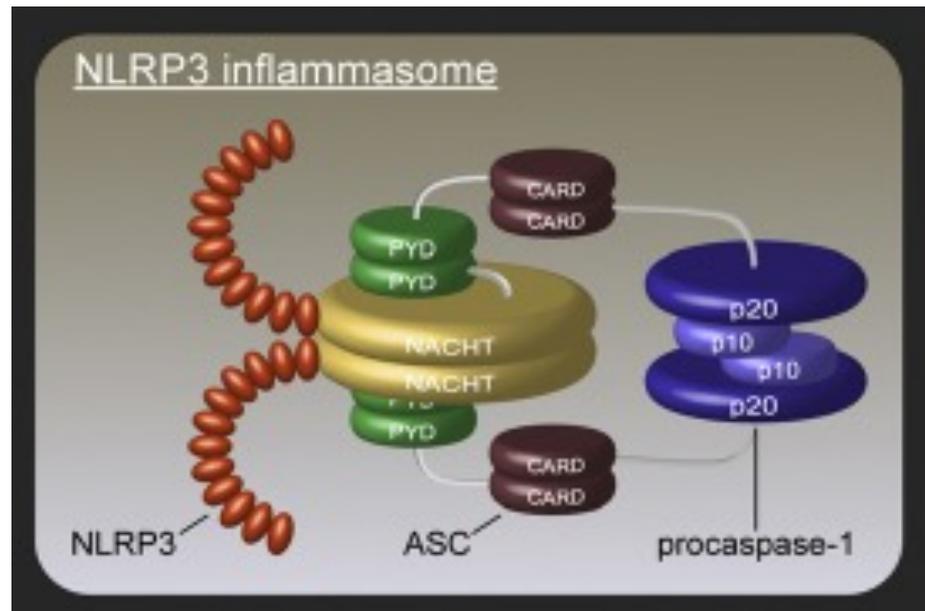
SNP8: Arg702Trp

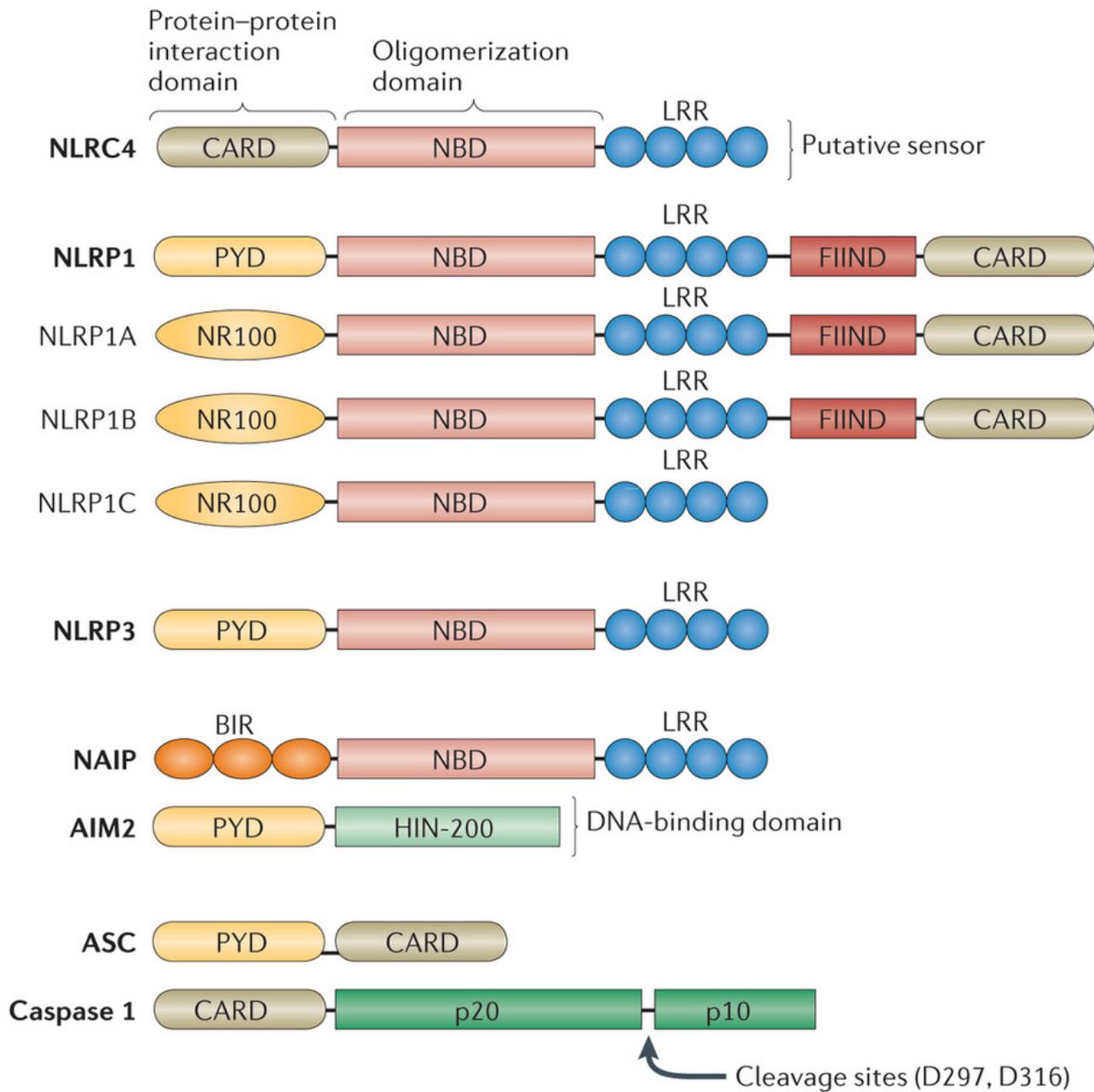
SNP12: Gly908Arg

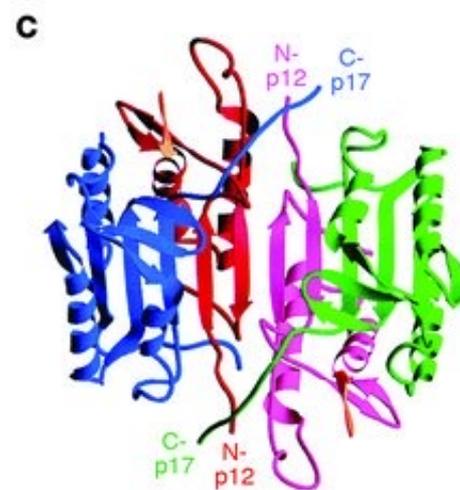
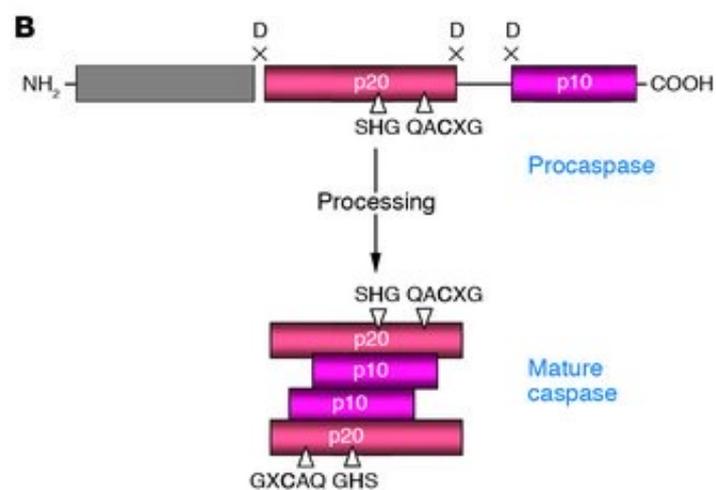
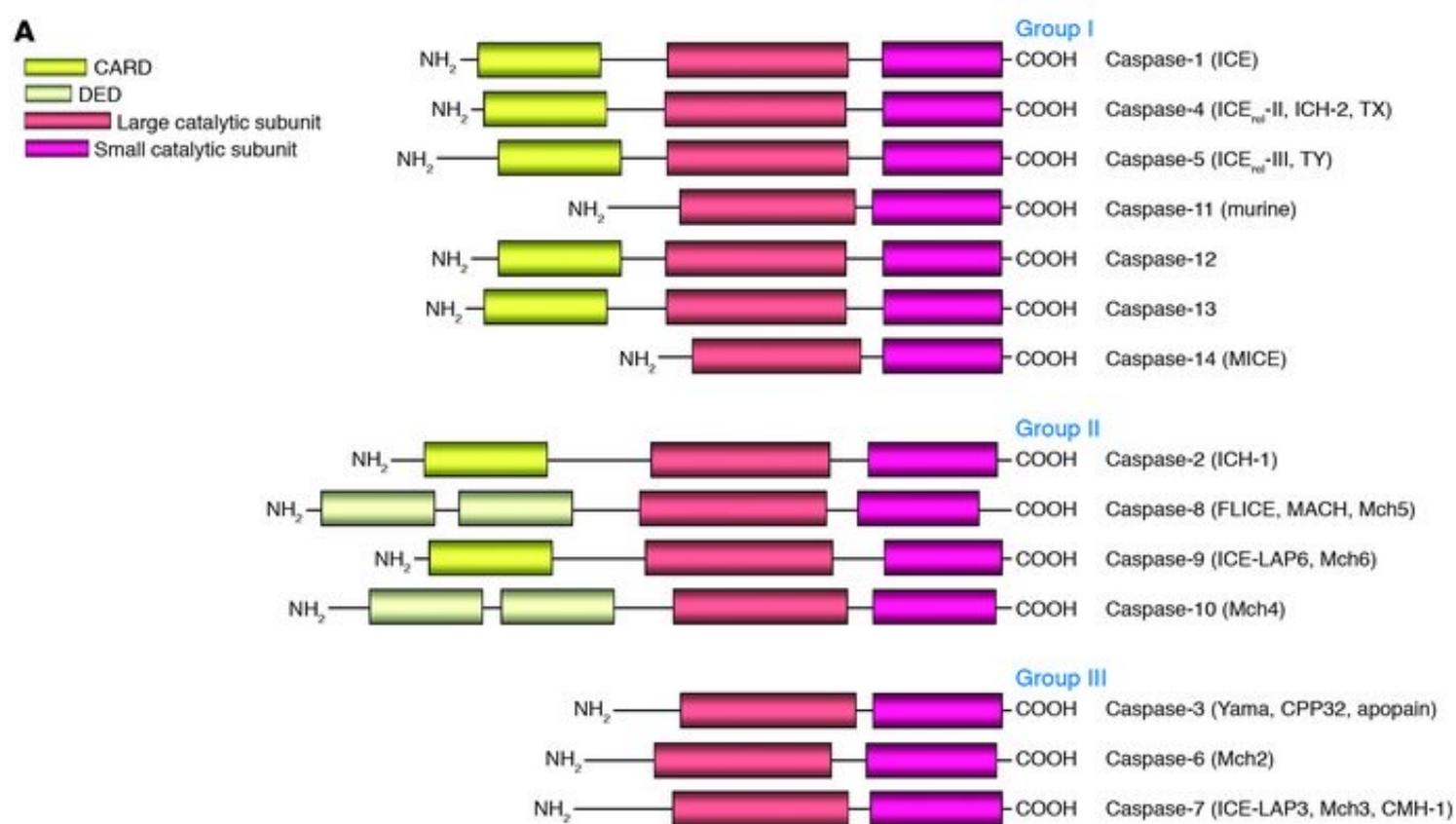
SNP13: Leu1007fsinsC

# Gli inflammasome canonici: una panoramica [1]

- Gli *inflammasomes* sono complessi molecolari (700 kDa) che riconoscono un ampio spettro di PAMPs e DAMPs.
- L'assemblaggio di queste piattaforme molecolari avviene in seguito al riconoscimento di specifici segnali/ligandi ad opera dei membri della famiglia delle proteine **NLRs/HIN200**.
- Nella sua forma più semplice un inflammasome si compone:
  - **un recettore**
  - **proteina adattatrice (ASC)**
  - **pro-caspasi-1**



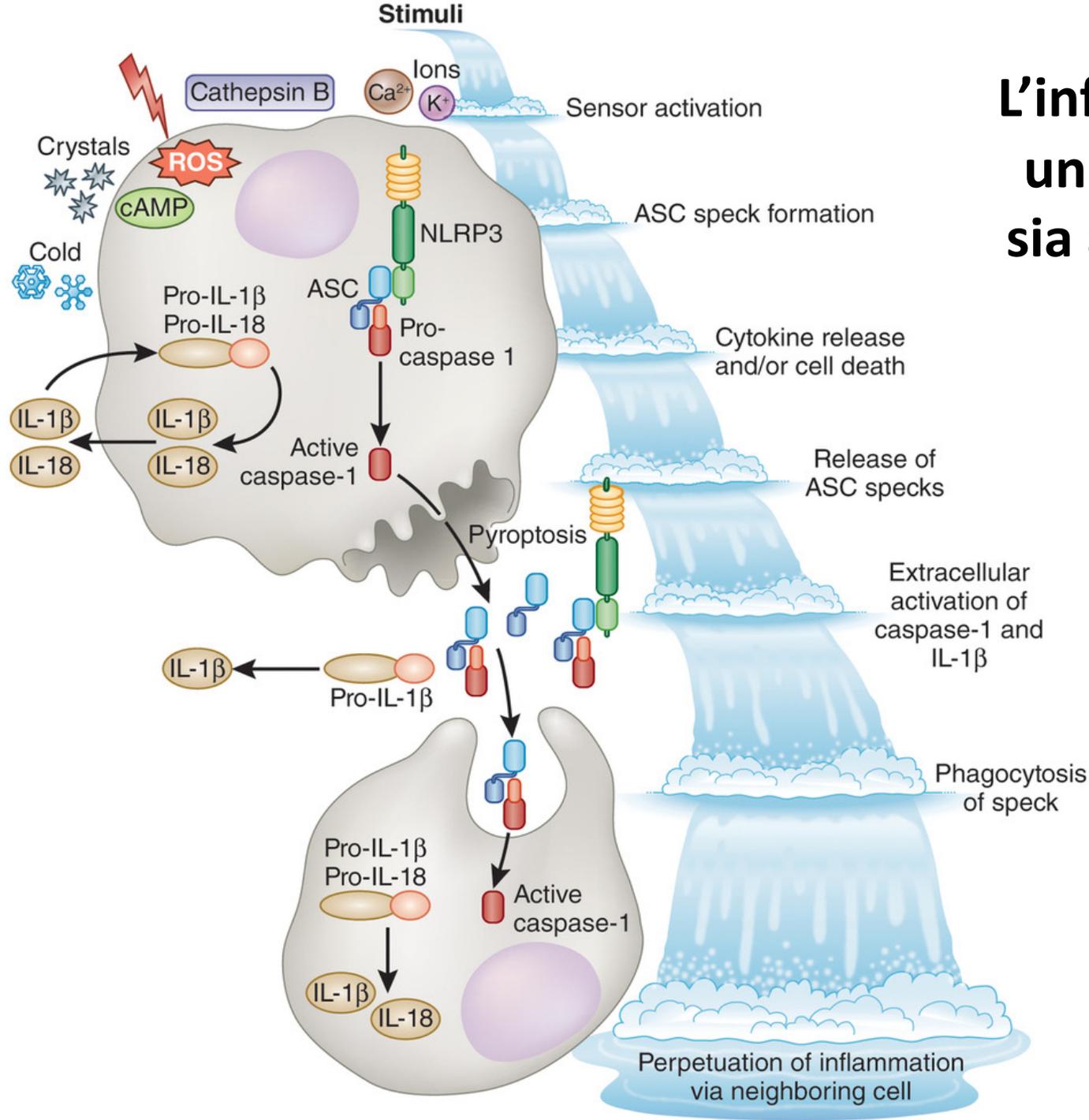




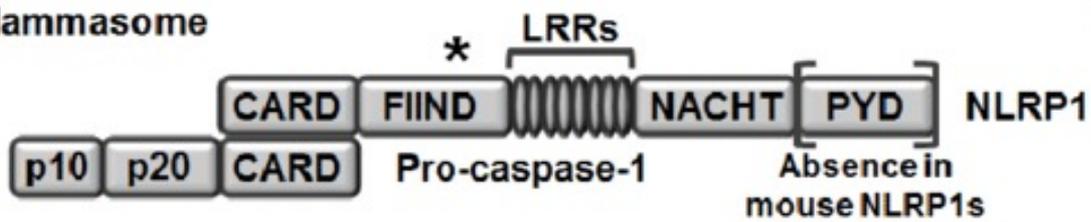
## Proteine NLRs che partecipano allo sviluppo dell'inflammasoma

NLR subgroup	Inflammasome (human)	Other names	Structure (domain)
NLR family	NLRP1	NALP1	PYD-NACHT-LRR-FIIND-CARD
	NLRP2	NALP2	PYD-NACHT-LRR
	NLRP3	Cryopyrin, NALP3	PYD-NACHT-LRR
	NLRC4	IPAF,NALP4,NLRP4	CARD-NACHT-LRR
	NLRP6	NALP6,PYPAF5	PYD-NACHT-LRR
	NLRP7	NALP7	PYD-NACHT-LRR
	NLRP12	NALP12	PYD-NACHT-LRR
PYHIN family	AIM2	Absent in melanoma 2	PYD-HIN200
	IFI 16	Interferon- inducible protein 16	PYD-HIN200

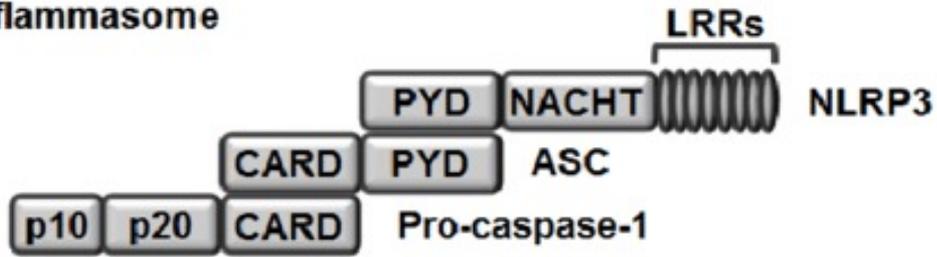
# L'inflammasoma è un processo che sia auto-alimenta



(A) NLRP1 inflammasome



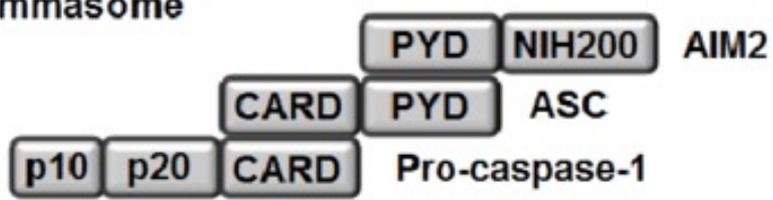
(B) NLRP3 inflammasome



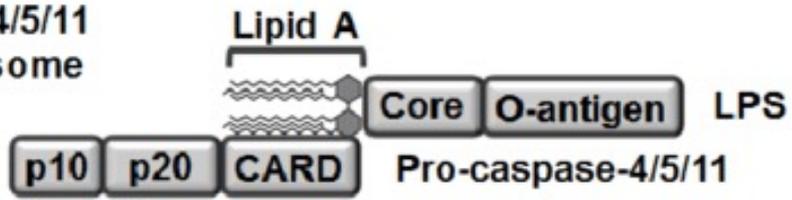
(C) NLRC4 inflammasome



(D) AIM2 inflammasome



(E) Caspase-4/5/11 inflammasome

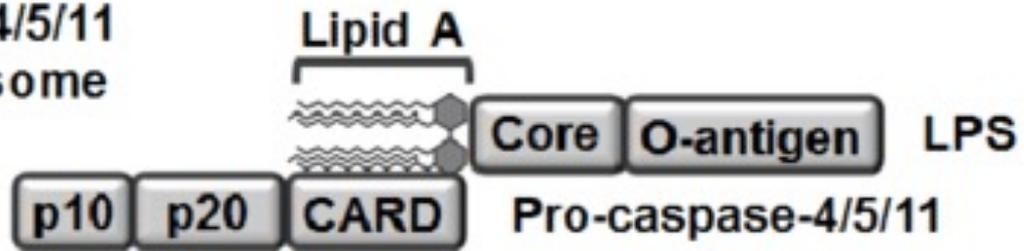


Canonical inflammasomes

Non-canonical inflammasomes

## INFLAMMASOMA NON CANONICO

(E) Caspase-4/5/11  
inflammasome

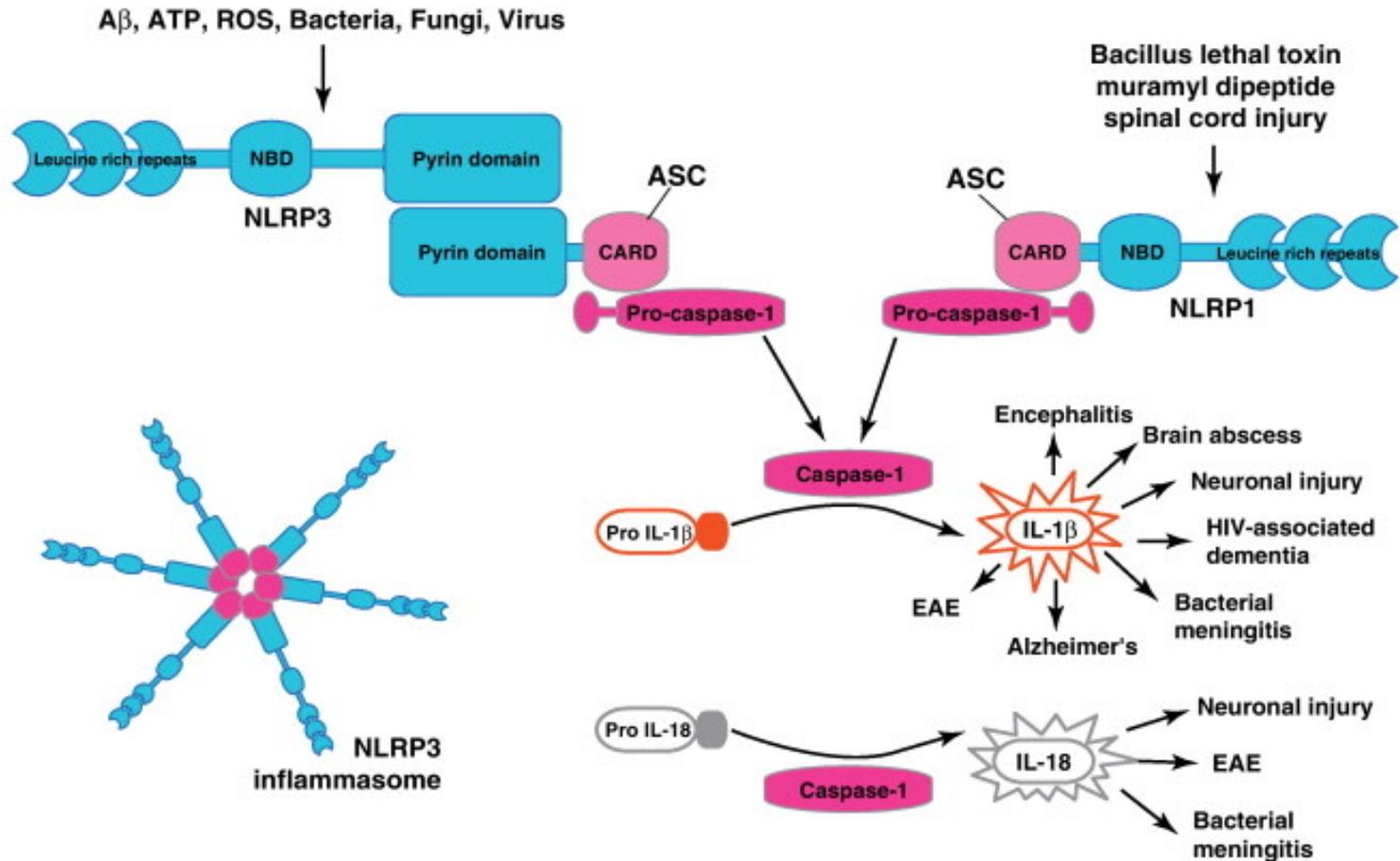


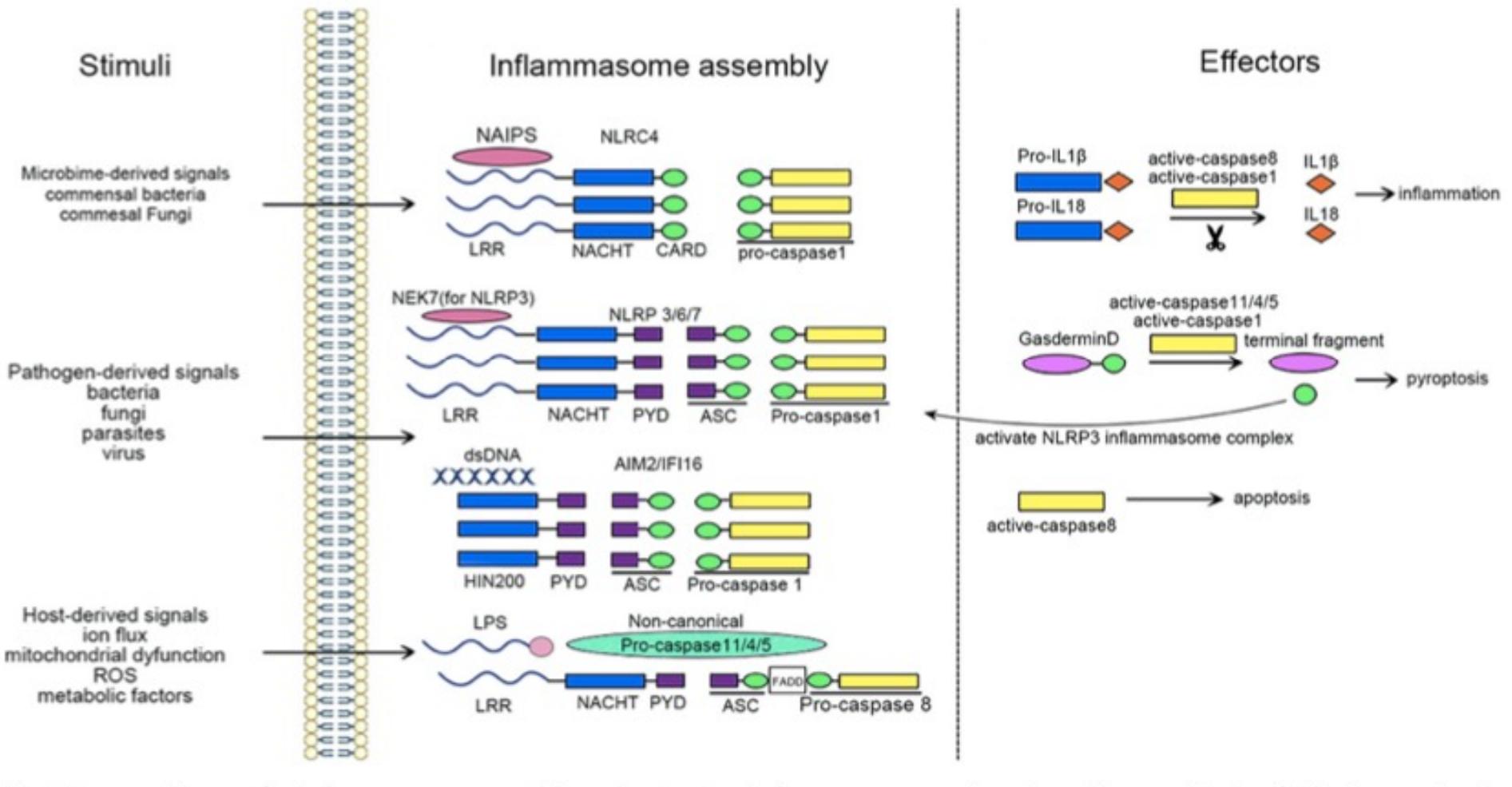
**Table 1** Inflammasome-related genes correlating with human diseases

Disease	Gene	Allele	Mechanism	Ref.
MWS	NLRP3	<i>V198M, R260L, R260W, V262G, L264V, D303N, E311K, H312P, T348M, A352V, A439T, I480F, A495V, F523C(t&gt;g), E567K, G569R, S710C</i>	Spontaneous inflammasome assembly, IL-1 $\beta$ hyperproduction	69, 71, 72, 74, 75
FCAS	NLRP3	<i>V198M, C259W, G301D, L353P, T436A, A439V, R488K, E525K, Y563N, E627G, M659K</i>	Spontaneous inflammasome assembly, IL-1 $\beta$ hyperproduction	71, 72, 74, 75
CINCA syndrome	NLRP3	<i>C148Y, R168Q, I172T, V198M, R260P, R260W, V262A, V262G, L264H,R,F, D303N, D303H, D303G, E304K, Q306L, G307V, F309S, P315L, G326E, S331R, V351M,L, E354D, H358R, A374D, T405P, M406I, T436I,P,N, T436del, A439P, F443L, N477K, I480F, F523L(c&gt;a), F523L(c&gt;g), G569A, Y570C,F, L571F, I572F, F573S, T587I, L632F, M662T, E688K, E690K, G755A, G755R, Y859C</i>	Spontaneous inflammasome assembly, IL-1 $\beta$ hyperproduction, necrosis-like cell death?	69, 74, 75, 76, 81, 83
FCAS-like diseases	NLRP12	<i>R284X</i>	Non-canonical NF- $\kappa$ B activation	90, 91
Familial Mediterranean fever-like syndrome	PYPAF1	<i>R554X</i>	Non-canonical NF- $\kappa$ B activation	97
HIV infection	NLRP3	<i>SNP 3' UTR rs10754558 G</i>	Unknown	99
<i>C. albicans</i> infection (vulvar vestibulitis)	NLRP3	<i>Intron 4, alternative splicing site</i>	Reduced inflammasome activity? Impaired IL-1 $\beta$ production?	103
Mycoplasma infection (infertility)	NLRP3	<i>Intron 4, alternative splicing site</i>	Reduced inflammasome activity? Impaired IL-1 $\beta$ production?	104
<i>C. trachomatis</i> infection (tubal pathology)	NLRP3	<i>rs12065526 G&gt;A</i>	Unknown	105
Crohn's disease	NLRP3	<i>Q705K (+ C10X CARD8 gene) SNP 5' UTR rs4925648 C/T SNP rs10925019 C/T</i>	IL-1-mediated?	85, 86, 87, 88
Psoriatic juvenile idiopathic arthritis	NLRP3	<i>SNP rs3806265</i>	IL-1-mediated?	117
Rheumatoid arthritis	NLRP3	<i>Q705K (+ C10X CARD8 gene)</i>	IL-1-mediated?	120
Food-induced anaphylaxis	NLRP3	<i>SNP rs4612666 SNP rs10754558</i>	IL-1-mediated?	123
Aspirin-induced asthma	NLRP3	<i>SNP rs4612666</i>	IL-1-mediated?	123
Urticaria	NLRP3	<i>?</i>	IL-1 $\beta$ hyperproduction in the skin?	125
Vitiligo	NLRP1	<i>5' UTR ? 3' UTR rs6502867</i>	IL-1-mediated autoimmunity? Aberrant apoptosome formation?	126, 127
Autoimmune Addison's disease	NLRP1	<i>rs12150220</i>	IL-1-mediated autoimmunity?	128
Type 1 diabetes	NLRP1	<i>rs12150220</i>	IL-1-mediated autoimmunity?	128
Type 2 diabetes	NLRP3	<i>?</i>	Activation of NLRP3 by glucose?	133
Hypertension	NLRP3	<i>Intronic mutation</i>	Activation of NLRP3 by cholesterol?	131
Alzheimer's disease	IL-1 $\beta$	<i>?</i>	Activation of NLRP3 by amyloid $\beta$ ?	136, 138
Cancer	NLRP3	<i>?</i>	IL-1 $\beta$ -mediated inflammation?	8

Abbreviations: CINCA, chronic infantile neurological, cutaneous and articular; FCAS, familial cold autoinflammatory syndrome; MWS, Muckle–Wells syndrome.

**Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE)  
pneumococcal meningitis**

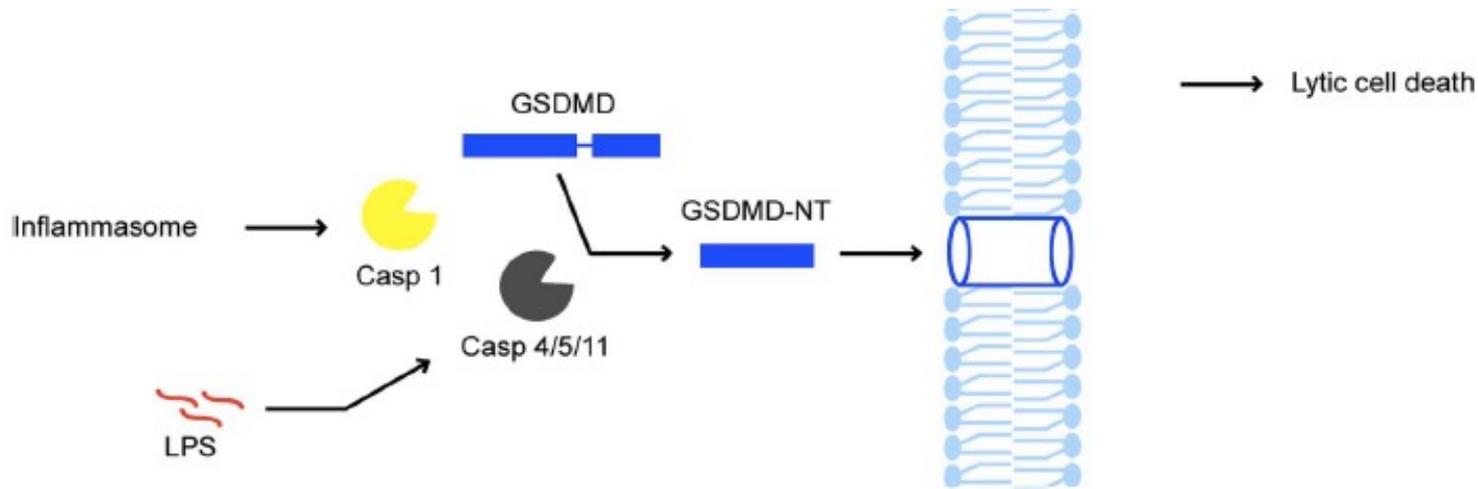




Inflammasome	Activator
NLRP1 (NALP1)	<i>Bacillus anthracis</i> lethal toxin [8-11] MDP [10,11]
NLRP3 (NALP3, cryoporin)	<p><b>Large particles via phagocytosis</b>  Monosodium urate crystals (MSU) [12]  CPPD (calcium pyrophosphate dehydrate) [12]  Alum [13]  Silica [14]  Asbestos [15]  Amyloid beta [16]  Hyaluronan [17]  Hemozoin [18]  Vaccine adjuvants (poly lactide-co-glycolide and polystyrene microparticles) [19]  Cholesterol crystals [20]</p> <p><b>Bacterial toxins (pore-forming)</b>  <i>Listeria monocytogenes</i> Lysteriolysin O [21,22]  <i>Staphylococcus aureus</i> alpha-toxin [21-23]  <i>Aeromonas hydrophila</i> aerolysin [21,22]  Streptolysin [24]  Nigericin [21]  Maitoxin (Dinoflagellates) [22]</p> <p><b>Ion channels and activators</b>  ATP(P2X7) [21]  Influenza virus M2 channel protein [25]</p> <p>PAMPs (only if transferred to the cytoplasm by e.g. Streptolysin O pore-forming toxin)  LPS, lipid A, PGN, MDP, LTA, Pam3, ssRNA, dsRNA, CpG DNA [26,27]</p>
NLRC4 (IPAF)	<p><b>Gram - negative bacteria (flagellin-dependent and independent)</b>  <i>Salmonella typhimurium</i> [28]  <i>Shigella flexneri</i> [28,29]  <i>Legionella pneumophila</i> [30]  <i>Pseudomonas aeruginosa</i> [28]</p>
AIM2	<p><b>dsDNA</b>  bacterial [31,32]  viral [31,32]  mitochondrial [33]  host [31]</p>

# La Piroptosi

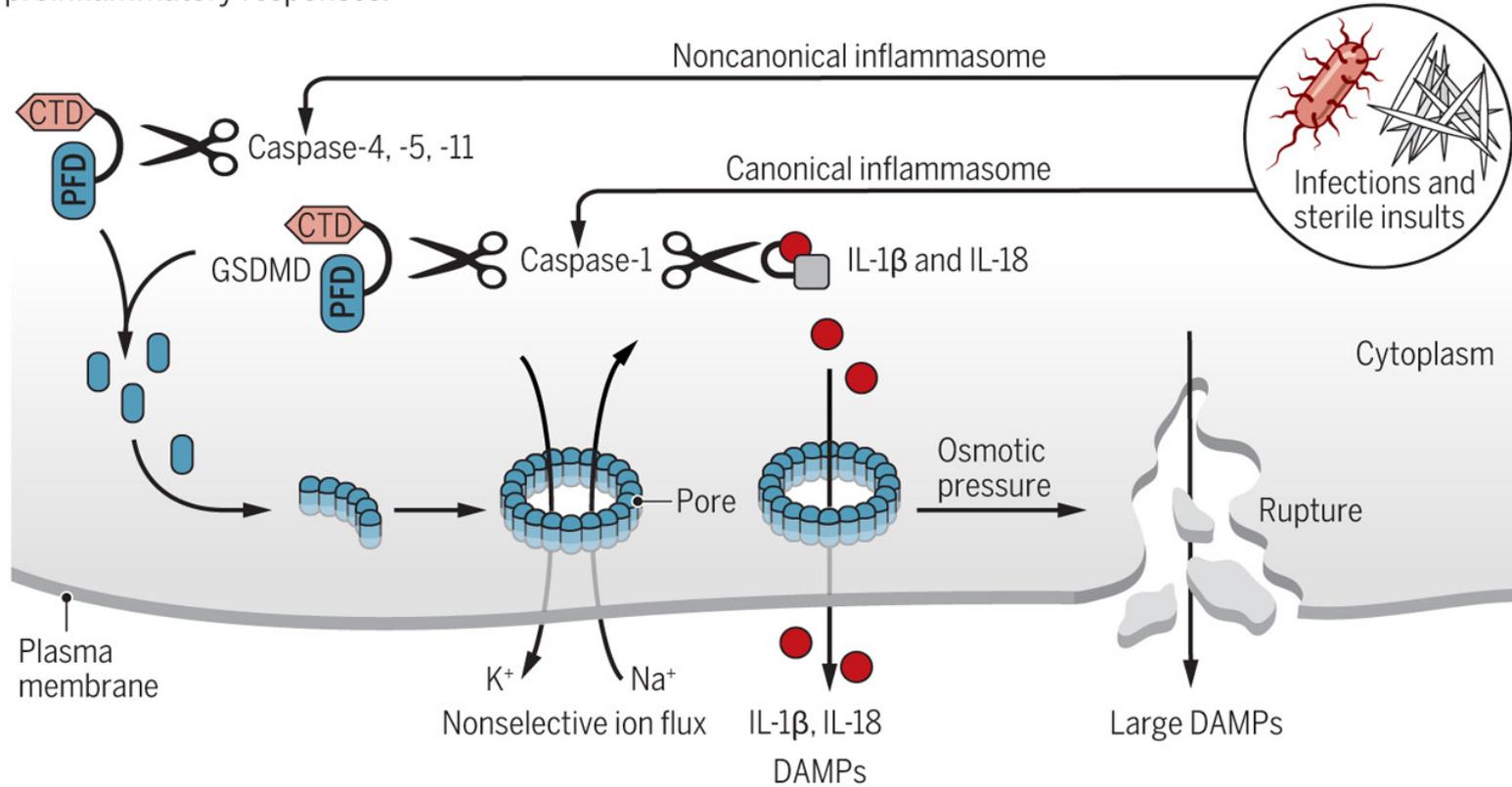
- Morte cellulare **caspasi-1 mediata (inflammasoma canonico)**
- Presenta caratteristiche in comune con la necrosi e l'apoptosi
- Maturazione e rilascio di citochine pro-infiammatorie (IL-1 $\beta$  e IL-18)
- Lisi osmotica, rilascio di contenuti intracellulare nel *milieu* extracellulare
- Condensazione della cromatina
- Frammentazione del DNA
- *Maturazione delle caspasi effettrici 3 e 7.*
- Ruolo della gasdermina D



- La morte della cellula avviene per la maturazione da parte della caspasi-11 e caspasi-1 della gasdermina- D, il cui frammento N terminale ha grande affinità per il fosfoinositol fosfato, e altri fosfolipidi abbondanti nel foglietto interno della membrana citoplasmatica. Non c'è nessuna affinità per la fostidiletanolamina o la fosfatidilcolina che si trovano sul foglietto esterno della membrana
- I frammenti N-terminali della gasdermina D (30 kD) si accumulano in questo foglietto e oligomerizzano formando pori di circa 10-20 nm.
- A causa di questo meccanismo la gasdermina D può agire solo dall'interno e non dall'esterno.

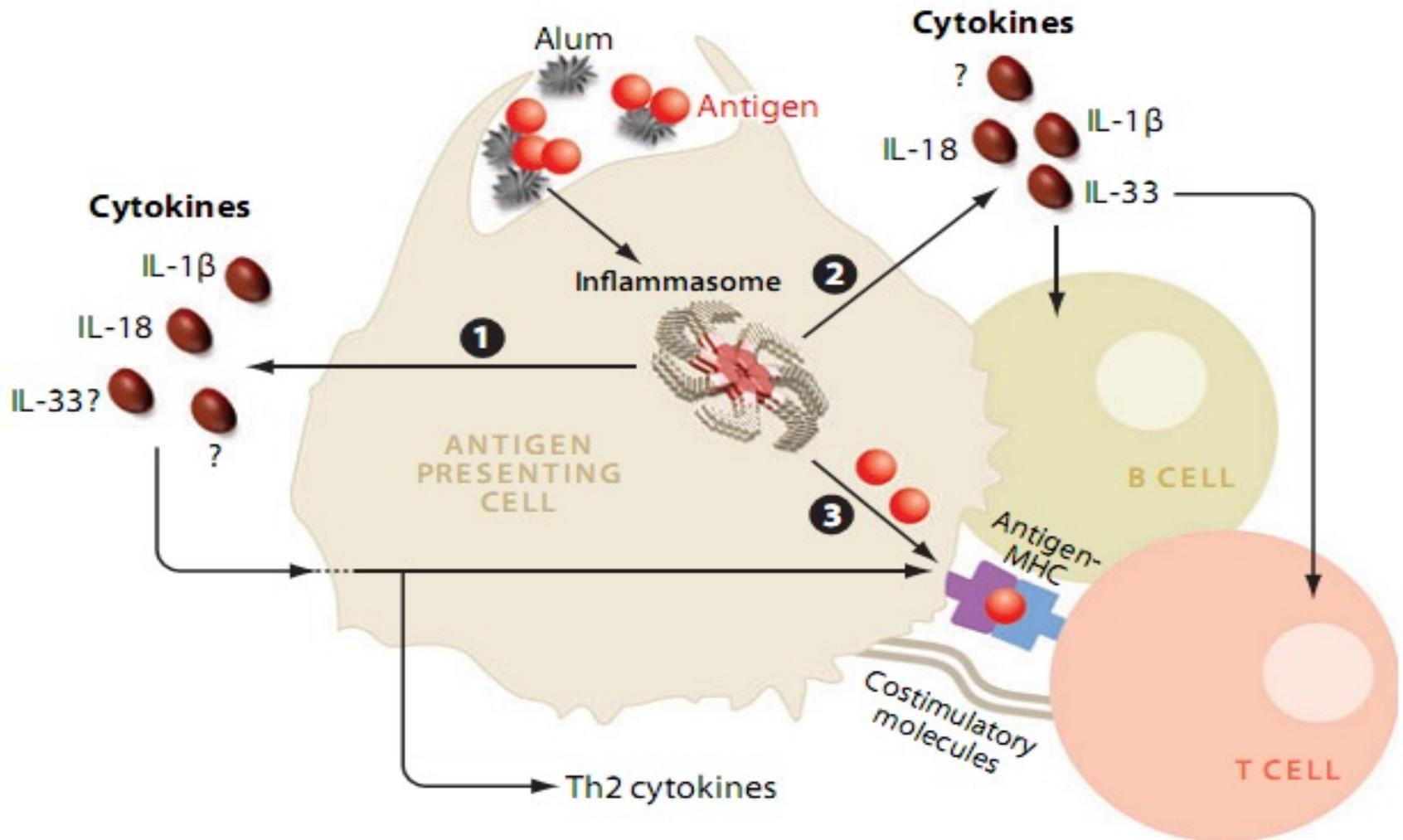
## Gasdermin D–centric view of pyroptosis

Disparate infections and sterile insults trigger canonical and noncanonical inflammasome signaling and cleavage of GSDMD to generate a pore-forming fragment. On binding plasma membrane lipids, the fragment assembles into an oligomeric pore leading to nonselective ion flux, osmotic swelling, and membrane rupture. The GSDMD pore also releases IL-1 $\beta$  and IL-18, as well as other inflammatory DAMPs to propagate proinflammatory responses.

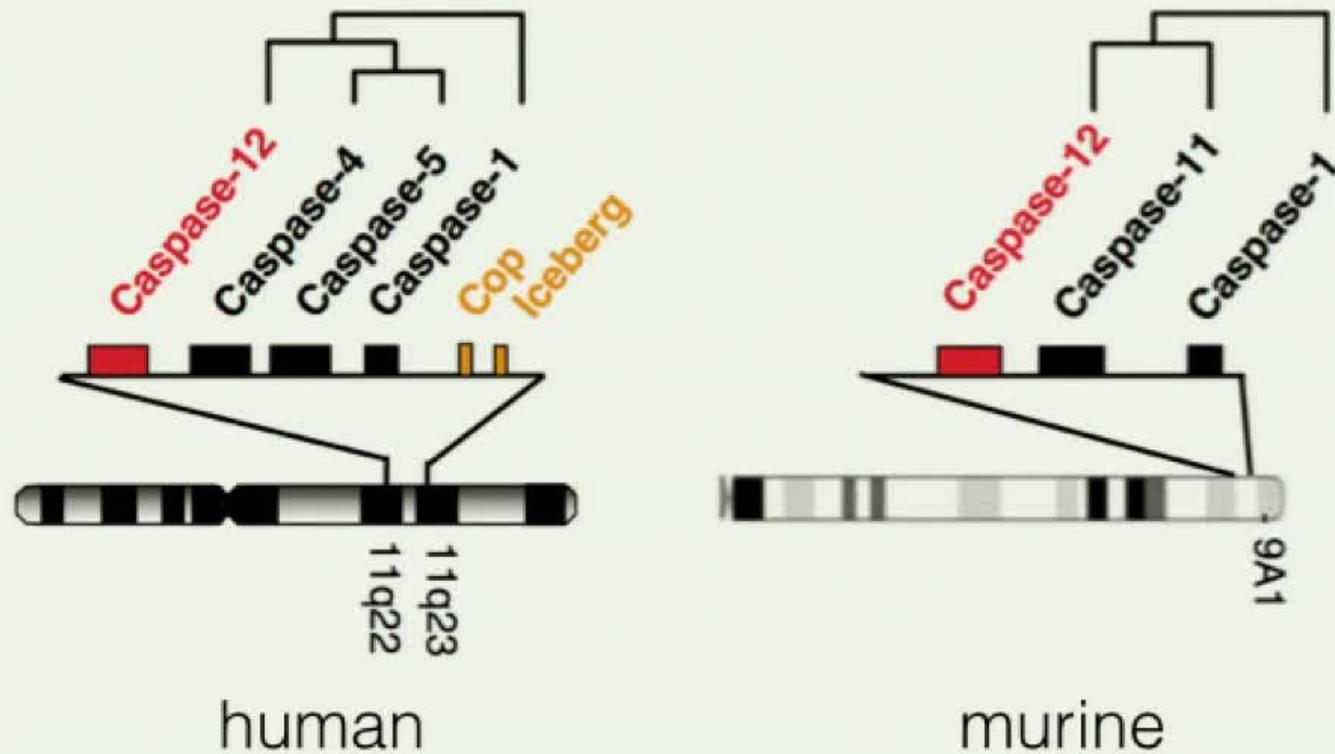


CTD, C-terminal domain; DAMPs, damage-associated molecular patterns; GSDMD, gasdermin D; IL-1 $\beta$ , interleukin-1 $\beta$ ; PFD, pore-forming domain.

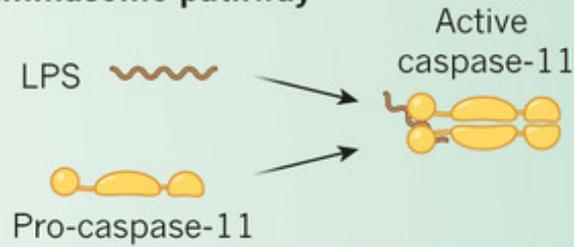
# Inflammasomes & Adjuvanticity



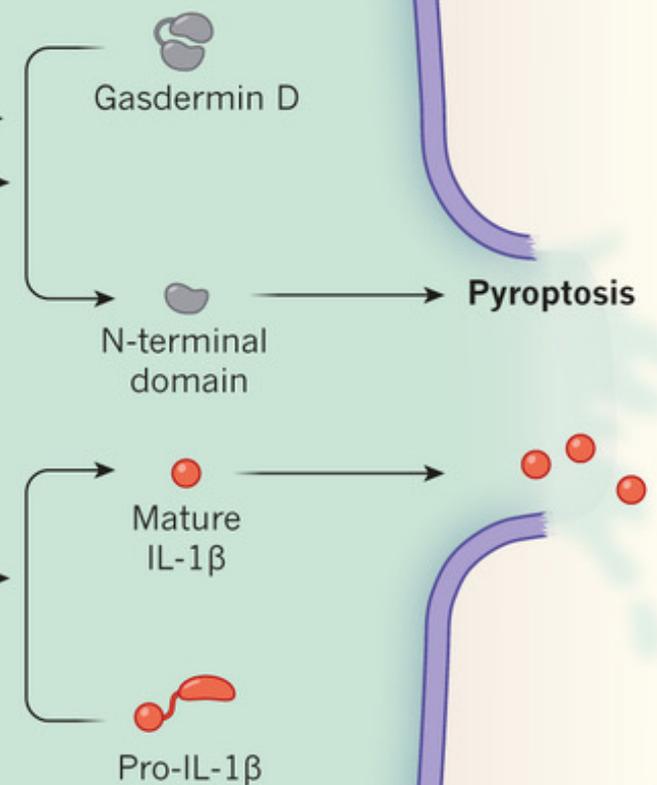
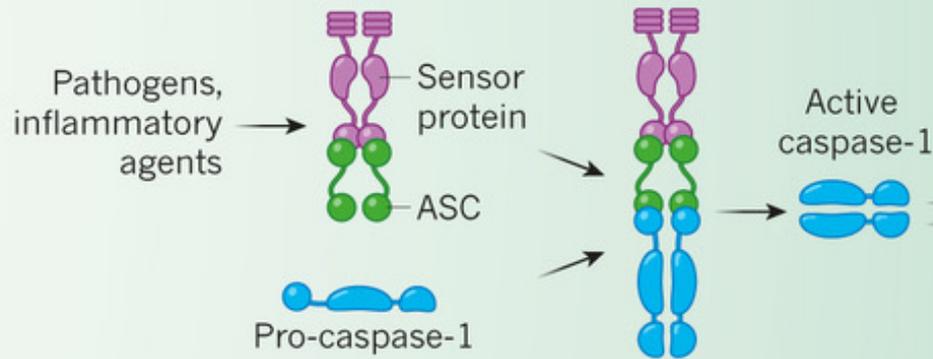
Caspase 4 and 5 are human orthologues of murine Caspase 11



**a Non-canonical inflammasome pathway**



**b Canonical inflammasome pathway**



# IL ruolo delle vescicole

- Vescicole purificate sono sufficienti per attivare la caspasi-11.

