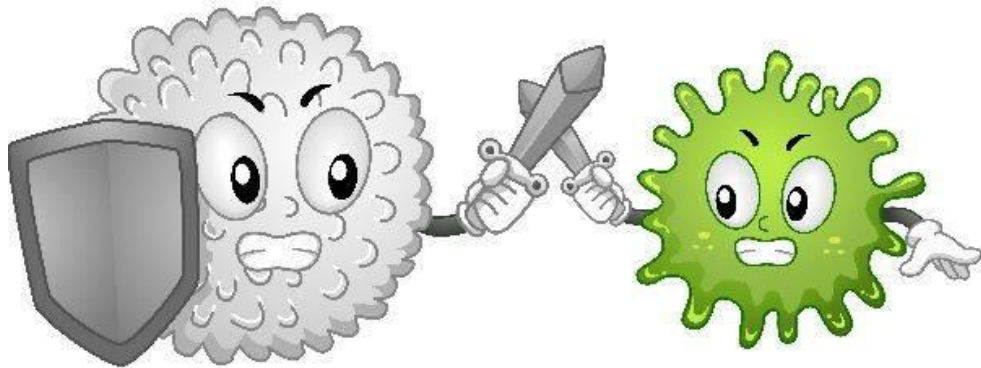


IMMUNITA'

- dal latino *immunitas* ovvero protezione dalle azioni legali offerta ai senatori romani durante il loro mandato
- protezione dalle malattie e, più specificamente, dalle malattie infettive.
- Le cellule e le molecole responsabili dell'immunità costituiscono il sistema immunitario
- la loro risposta collettiva e coordinata all'introduzione di sostanze estranee è chiamata risposta immunitaria → reazione ai microbi così come alle molecole riconosciute come estranee, indipendentemente dalle conseguenze fisiologiche o patologiche di tale reazione
- Immunologia → studio delle risposte immunitarie degli eventi cellulari e molecolari che si verificano in un organismo quando incontra microbi e altre macromolecole estranee



Difesa contro:

- Microbi infettivi (funzione fisiologica)
- Sostanze estranee non infettive e prodotti di cellule danneggiate

DIFESE FISICHE CONTRO I PATOGENI

Tessuti epiteliali forniscono le prime ed efficaci barriere di protezione chimiche e fisiche per impedire ai microrganismi l'ingresso nei tessuti sottostanti.

Quali epiteli:

- Pelle
- Epitelio dell'apparato respiratorio
- Epitelio dell'apparato gastrointestinale
- Epitelio dell'apparato urogenitale

DIFESE FISICHE CONTRO I PATOGENI

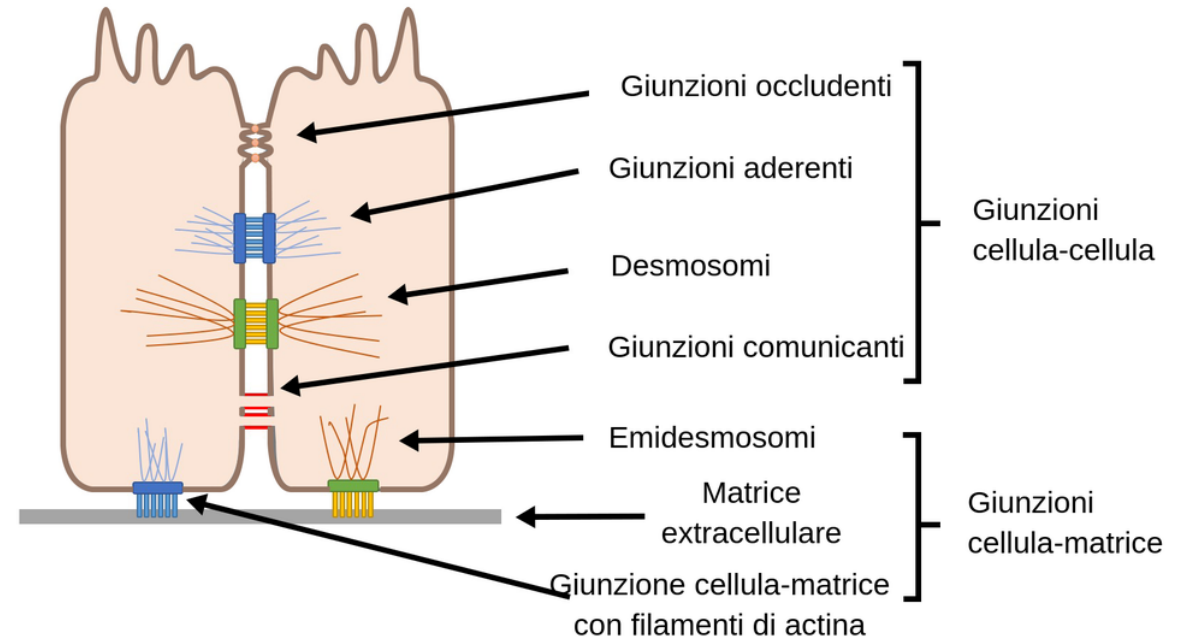
Tessuti epiteliali forniscono le prime ed efficaci barriere di protezione chimiche e fisiche per impedire ai microrganismi l'ingresso nei tessuti sottostanti.

Quali epiteli:

- Pelle
- Epitelio dell'apparato respiratorio
- Epitelio dell'apparato gastrointestinale
- Epitelio dell'apparato urogenitale

Caratteristiche comuni:

- Cellule tenute insieme da strutture proteiche di adesione: **tight junctions** e **desmosomi** → muro di protezione che impedisce ai patogeni di penetrare le mucose. Alcuni patogeni riescono comunque ad attraversare la superficie epiteliale!



- Presenza di una lamina basale (matrice di glicoproteine) alla quale le cellule epiteliali sono ancorate che fa sì che gli epiteli siano **polarizzati** (versante apicale e basale) → ostacolo (non sempre...es. Cellule M nell'epitelio gastrointestinale) per l'invasione dei batteri

DIFESE FISICHE CONTRO I PATOGENI

Tessuti epiteliali forniscono le prime ed efficaci barriere di protezione chimiche e fisiche per impedire ai microrganismi l'ingresso nei tessuti sottostanti.

Differenze:

- Funzione
- Localizzazione
- Meccanismi di difesa
- Composizione:

Quali epiteli:

- Pelle
- Epitelio dell'apparato respiratorio
- Epitelio dell'apparato gastrointestinale
- Epitelio dell'apparato urogenitale

} Epitelio stratificato con molti sistemi di difesa

} Epiteli semplici (singolo strato di cellule) e più vulnerabili

DIFESE FISICHE CONTRO I PATOGENI

Quali epiteli:

- Pelle



Epitelio stratificato con molti sistemi di difesa

Difese	Funzioni
Ambiente secco e acido	Previene la crescita di molti batteri
Cheratina	Difficile da degradare
Desquamazione dell'epitelio	Rimuove i batteri che aderiscono
Microbiota residente	Compete con i patogeni per siti e nutrienti
Cellule di Langerhans	Combattono i batteri che hanno accesso al derma

DIFESE FISICHE CONTRO I PATOGENI

Quali epiteli:

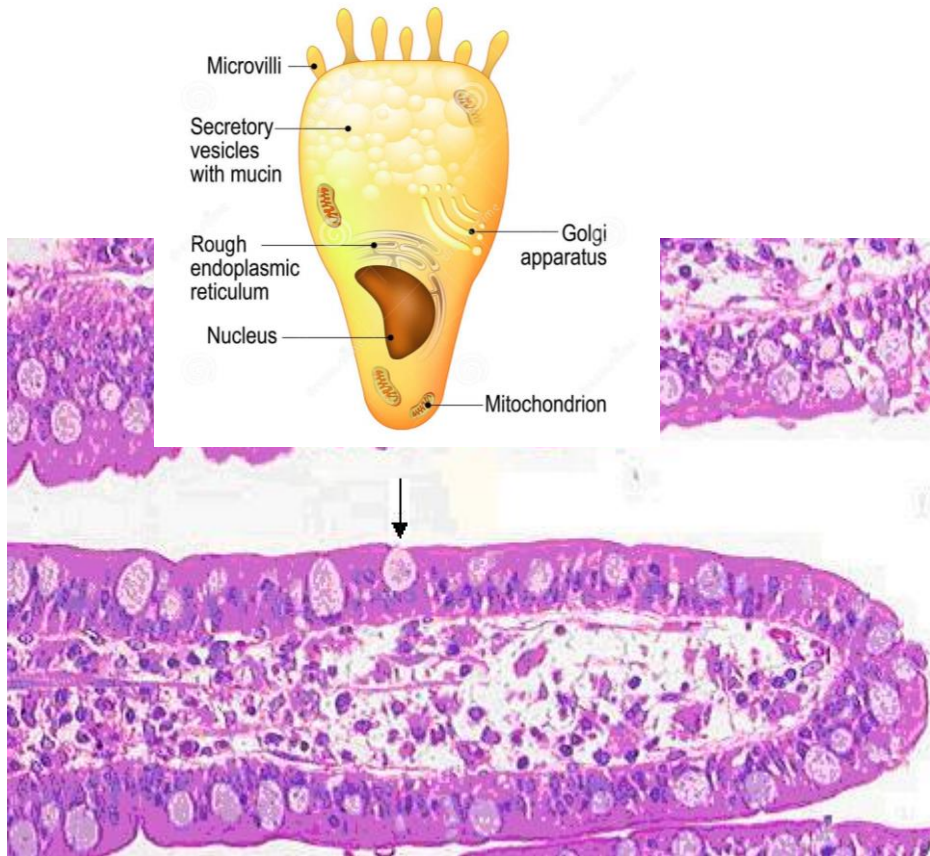
- Epitelio dell'apparato respiratorio
- Epitelio dell'apparato gastrointestinale
- Epitelio dell'apparato urogenitale

} Epiteli semplici (singolo strato di cellule) e più vulnerabili

Difese	Funzioni
Presenza di muco	Secreto dalle cellule a calice (goblet cells) impedisce ai microrganismi di prendere contatto con le cellule epiteliali
Mucina	Glicoproteina che interagisce con component polisaccaridiche della parete cellulare batterica e con i flagelli
Peristalsi	Movimenti che consentono rapida eliminazione dei batteri
Ciglia	Appendici cellulari inserite alla sommità dei microvilli accompagnano l'attività del muco e della peristalsi

DIFESE FISICHE CONTRO I PATOGENI

Goblet cell



L'ambiente luminale delle vie respiratorie e digerenti è protetto ulteriormente dall'invasione microbica dalla secrezione esocrina del **muco**, ad opera delle cellule mucipare (**goblet cells**)

È un serbatoio di proteine ad attività antibatterica:

- **Lisozima** → introduce tagli nel legame glicosidico β -1-4 che tiene unite le unità monosaccaridiche dello scheletro del peptidoglicano
- **Lattoferrina** → sequestra il ferro ai batteri
- **Defensine** → peptidi con attività battericida; si inseriscono nella membrana batterica disgregando la forza proton-motrice
 - α -defensine prodotte da cellule del Paneth localizzate a livello delle cripte nell'intestine tenue.
 - β -defensine sono espresse in tutti gli epiteli (BD1 costitutive; BD2 in risposta ad un'infezione)

Anche dette cellule caliciformi per la morfologia a calice che assumono. Nucleo e organuli citoplasmatici sono confinati nella regione basale; la componente più abbondante del citoplasma è rappresentata dal muco

RISPOSTA IMMUNITARIA

Meccanismi di difesa fisica contro patogeni non sempre riescono a limitare la colonizzazione e diffusione dei microrganismi. Quando questi riescono a evadere e superare le prime barriere la difesa contro i microbi è mediata da risposte sequenziali e coordinate che sono chiamate immunità innata e adattativa

INNATA

detta anche
immunità naturale o
immunità nativa

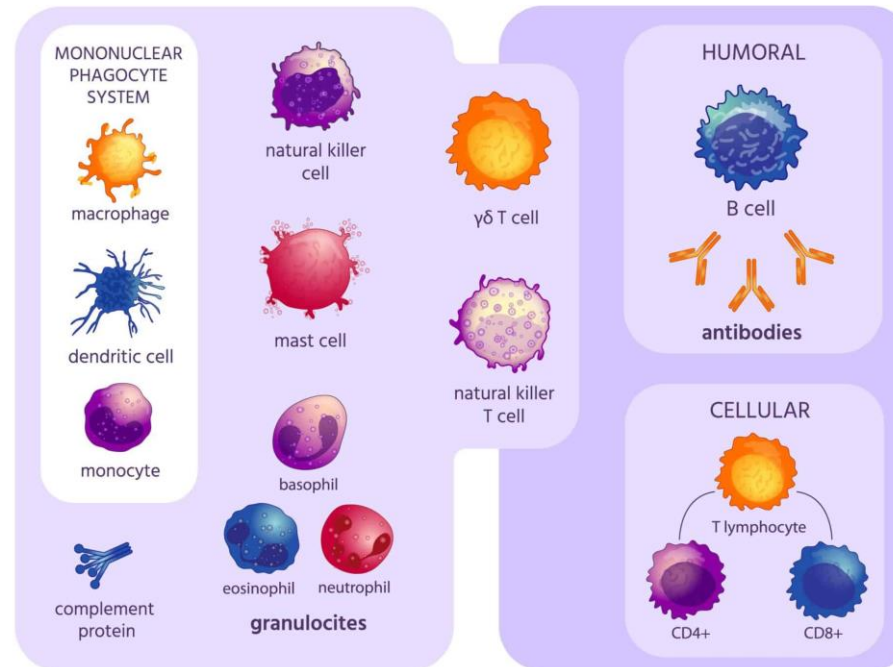


Reazione di difesa
generale che può
coinvolgere tutti i
tipi cellulari di un
organismo

IMMUNITY

INNATE

NONSPECIFIC
fast response (0-4 hours)



ADATTATIVA

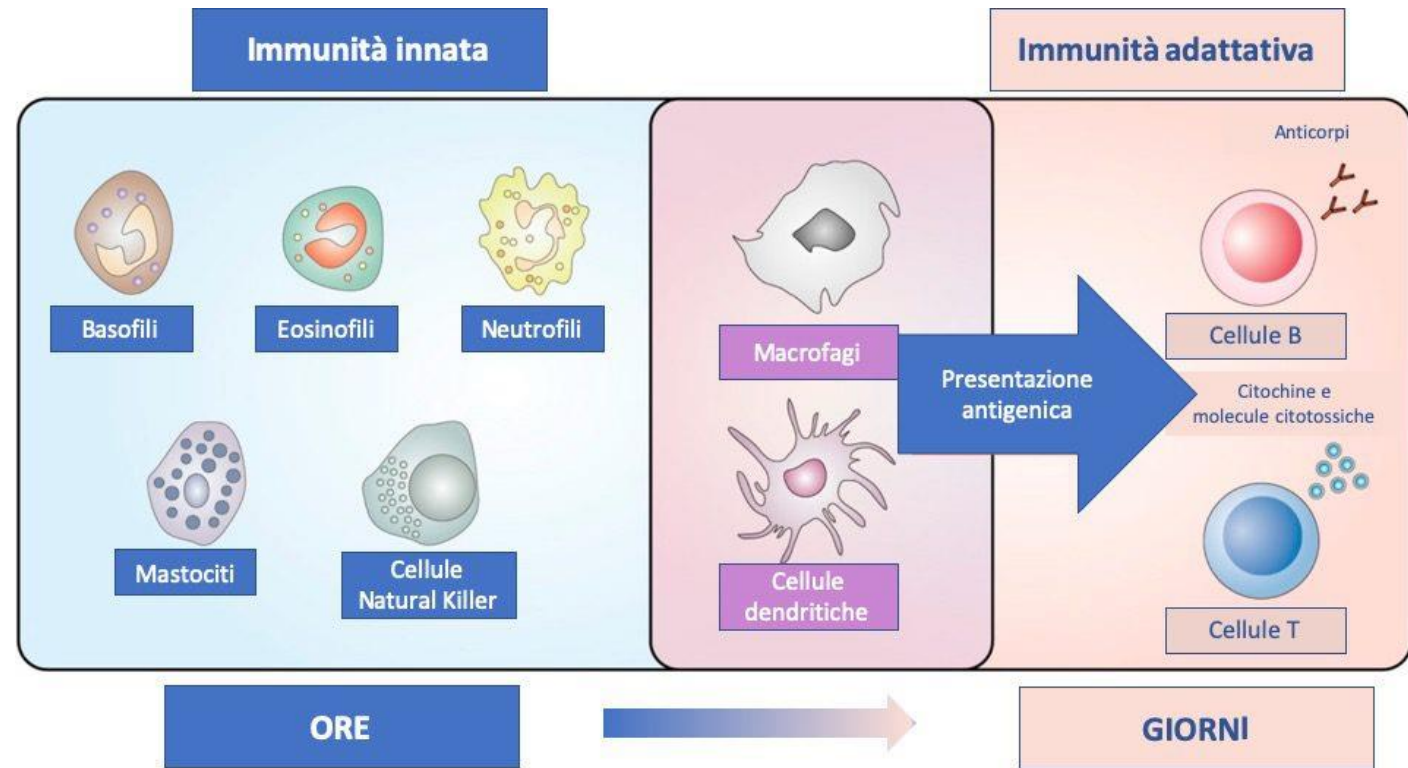
detta anche
immunità specifica o
immunità acquisita



Risposte altamente specifiche
per il particolare agente
patogeno che le ha innescate
e dipendono da una
particolare classe di globuli
bianchi del sangue, linfociti.

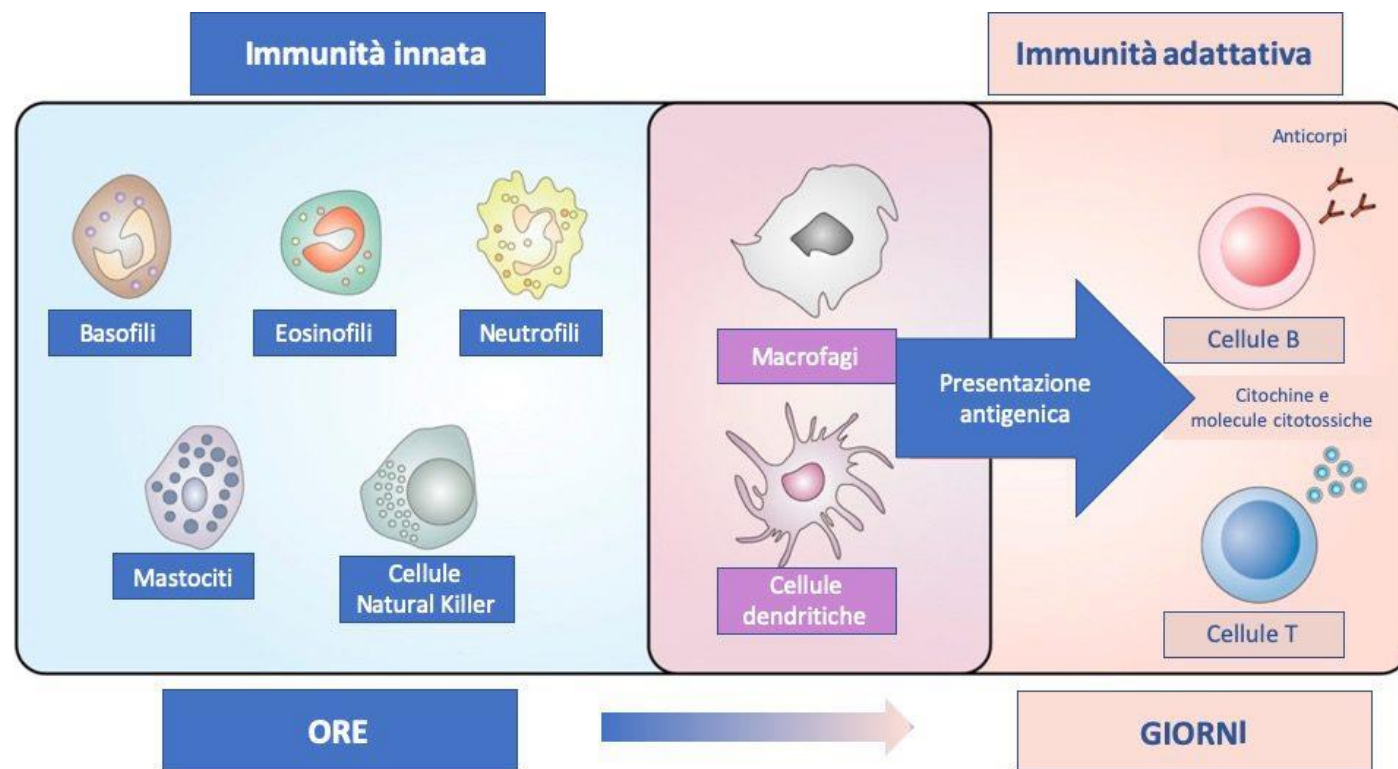
RISPOSTA IMMUNITARIA INNATA

- Essenziale per difendersi dai microbi nelle prime ore o giorni dopo l'infezione
- Mediata da meccanismi che sono in atto anche prima che si verifichi un'infezione (da qui innata) e che facilitano risposte rapide ai microbi invasori.



RISPOSTA IMMUNITARIA ADATTATIVA

- Fornisce una protezione di lunga durata
- Risposte stimulate dall'esposizione ad agenti infettivi e aumentano di entità e capacità difensive a ogni successiva esposizione a un particolare microbo
- Forma di immunità che si sviluppa come risposta ad un'infezione e si adatta all'infezione (da qui adattativa)
- Riconosce e reagisce a un gran numero di sostanze microbiche e non microbiche, chiamate antigeni.



I DUE TIPI DI IMMUNITA'

Immunità innata o naturale
pronta risposta (fase precoce)

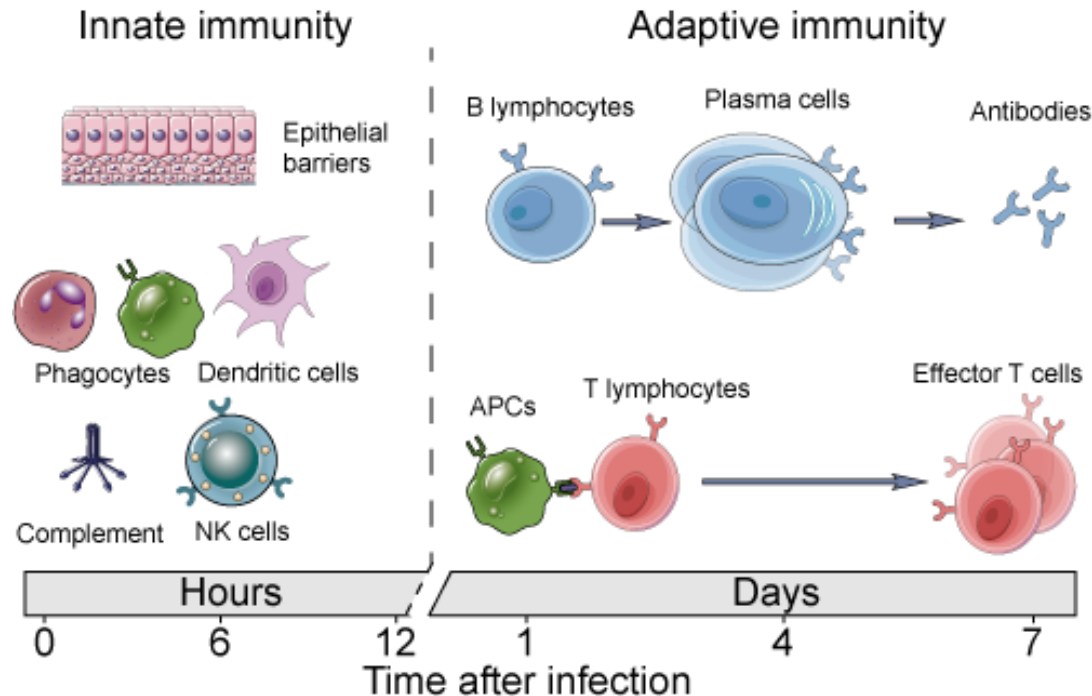


controllo/ limitazione dell'infezione

Immunità adattativa o acquisita
Immunità di lunga durata (fase tardiva)



eradicazione più lenta dell'infezione e
generazione di una memoria immunologica



I DUE TIPI DI IMMUNITA'

Immunità innata o naturale
pronta risposta (fase precoce)

Immunità adattativa o acquisita
Immunità di lunga durata (fase tardiva)



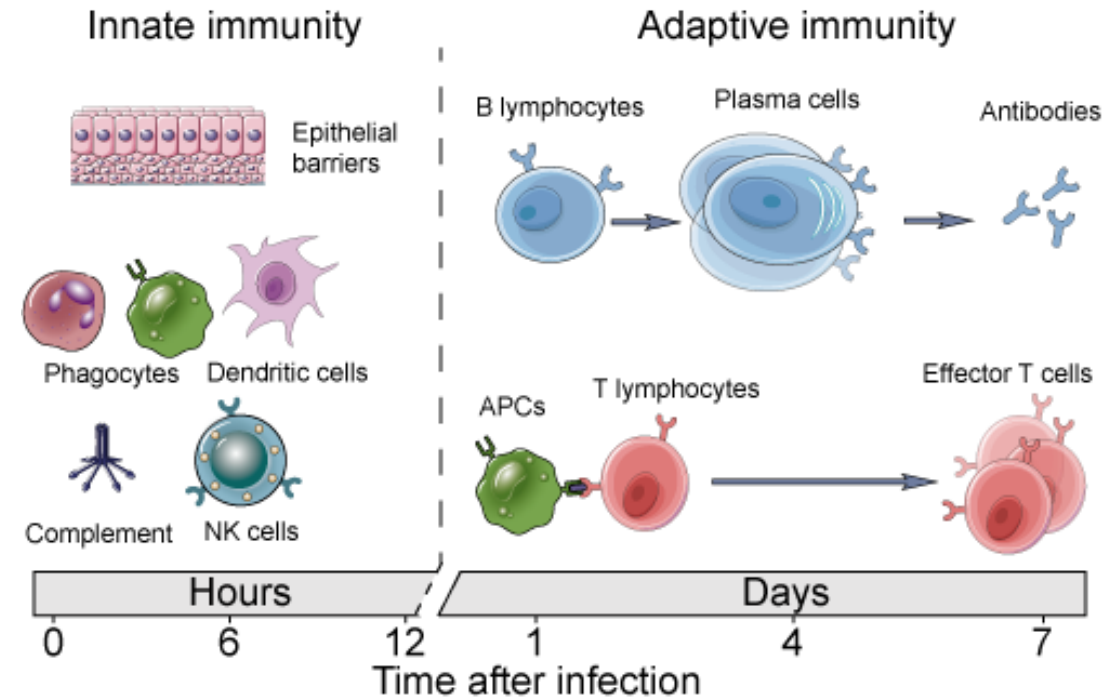
La combinazione dei due sistemi difende l'organismo dall'attacco di microrganismi patogeni o, più in generale, da qualsiasi agente che venga riconosciuto come *non-self* (estraneo)



Saper distinguere il *self* dal *non-self* è di fondamentale importanza al fine di instaurare processi infiammatori, tesi a proteggere l'ospite dall'invasione di agenti estranei, prevenendo, al tempo stesso, reazione autolesive a danno dell'ospite

I DUE TIPI DI IMMUNITA'

- Esistono connessioni tra le risposte immunitarie innate e adattative: la risposta immunitaria innata ai microbi fornisce segnali di pericolo precoci che stimolano le risposte immunitarie adattative; le risposte immunitarie adattative spesso funzionano potenziando i meccanismi protettivi dell'immunità innata, rendendoli più capaci di combattere efficacemente i microbi.
- Il sistema immunitario di ogni individuo è in grado di riconoscere, rispondere ed eliminare molti antigeni estranei (non self) ma di solito non reagisce contro antigeni e tessuti propri (self).
- Il sistema immunitario innato e quello adattativo utilizzano meccanismi diversi per prevenire le reazioni contro le cellule sane.
- l'immunità è sistemica grazie alla capacità dei linfociti e di altre cellule immunitarie di circolare tra i tessuti, il che significa che anche se una risposta immunitaria viene avviata in un sito, può fornire protezione in siti distanti.



I DUE TIPI DI IMMUNITA'

Feature	Innate Immunity	Adaptive Immunity
Characteristics		
Specificity for microorganisms	Relatively low (PAMPs) ^b	High (specific antigens)
Diversity	Limited	Large
Specialization	Relatively stereotypic	Highly specialized
Memory	No	Yes
Components		
Physical and chemical barriers	Skin, mucosal epithelia; anti-microbial chemicals e.g. defensins	Cutaneous and mucosal immune systems; secreted antibodies
Blood proteins	Complement	Antibodies
Cells	Phagocytes (macrophages, neutrophils), Natural killer cells	Lymphocytes (B cells that produce antibodies; T cells that carry out cell-mediated reactions)

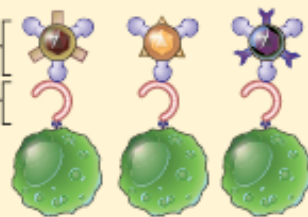
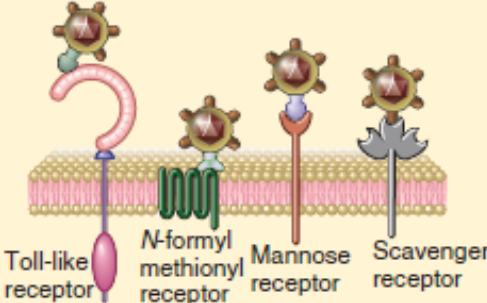
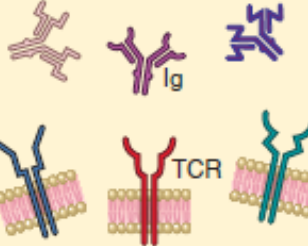
- **Linfociti B** secernono anticorpi che legano il patogeno
- **Linfociti T** sia uccidono direttamente le cellule infettate sia producono molecole di segnalazione

^a From A.K. Abbas, A.H. Lichtman, and J.S. Pober, Cellular and Molecular Immunology, 3rd Edition, (Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1997)

^b PAMPs: pathogen-associated molecular patterns

I DUE TIPI DI IMMUNITA'

TABLE 4.1 Specificity of Innate and Adaptive Immunity

	Innate Immunity	Adaptive Immunity
Specificity	For structures shared by classes of microbes (pathogen-associated molecular patterns) Different microbes Identical mannose receptors 	For structural detail of microbial molecules (antigens); may recognize nonmicrobial antigens Different microbes Distinct antibody molecules 
Number of microbial molecules recognized	About 1000 molecular patterns (estimated)	>10 ⁷ antigens
Receptors	Encoded in germline; limited diversity (pattern recognition receptors)  Toll-like receptor N-formyl methionyl receptor Mannose receptor Scavenger receptor	Encoded by genes produced by somatic recombination of gene segments; greater diversity  Ig TCR
Number and types of receptors	<100 different types of invariant receptors	Only 2 types of receptors (Ig and TCR), with millions of variations of each
Distribution of receptors	Nonclonal: Identical receptors on all cells of the same lineage	Clonal: clones of lymphocytes with distinct specificities express different receptors
Genes encoding receptors	Germline encoded, in all cells	Formed by somatic recombination of gene segments only in B and T cells
Discrimination of self and nonself	Yes; healthy host cells are not recognized or they may express molecules that prevent innate immune reactions	Yes; based on elimination or inactivation of self-reactive lymphocytes; may be imperfect (giving rise to autoimmunity)

Ig, Immunoglobulin; TCR, T cell antigen receptor.

IMMUNITA' INNATA



IMMUNITA' INNATA

- Comprende meccanismi di difesa sempre presenti, pronti a combattere i microbi e altri agenti offensivi es. cellule danneggiate.
- Esposizioni ripetute provocano risposte immunitarie innate praticamente identiche.
- è costituito da molti tipi di cellule e molecole solubili nei tessuti e nel sangue che impediscono costantemente ai microbi di invadere e di stabilire infezioni → se i microbi si insediano, le risposte immunitarie innate forniscono una difesa precoce, prima che le risposte immunitarie adattive possano svilupparsi.
- I recettori dell'immunità innata sono specifici per le strutture comuni a gruppi di microbi affini e non distinguono le sottili differenze tra i microbi.
- combatte i microbi con due reazioni principali: il reclutamento di fagociti e altri leucociti che distruggono i microbi, nel processo chiamato infiammazione, e bloccando la replicazione virale o uccidendo le cellule infettate da virus senza bisogno di una reazione infiammatoria.

IMMUNITA' INNATA

Le componenti principali sono:

1. barriere fisiche e chimiche, come gli epitelii e le sostanze chimiche antimicrobiche prodotte sulle superfici epiteliali.
2. cellule fagocitiche (neutrofili, macrofagi), le cellule dendritiche (DC), i mastociti, le cellule natural killer (NK) e altre cellule linfoidi innate, e mastociti → molte cellule immunitarie innate (es. macrofagi, DC e mastociti) sono sempre presenti nella maggior parte dei tessuti, dove funzionano come sentinelle per tenere d'occhio i microbi invasori.
3. le proteine del sangue, componenti del sistema del complemento e altri mediatori dell'infiammazione.

IMMUNITA' INNATA

evoluzione

L'immunità innata è filogeneticamente la parte più antica del sistema immunitario, comparsa circa 750 milioni di anni fa



Si è co-evoluta con i microbi per proteggere dalle infezioni tutti gli organismi multicellulari



Alcuni componenti del sistema immunitario innato dei mammiferi sono notevolmente simili a quelli delle piante e degli insetti, il che suggerisce che questi siano apparsi in antenati comuni molto tempo fa nell'evoluzione. Esempi:

- Peptidi tossici per i batteri e i funghi, chiamati defensine, sono presenti nelle piante e nei mammiferi e hanno la stessa struttura terziaria
- Una famiglia di recettori, chiamati Toll-like receptors, riconoscono i microbi patogeni e si attivano in tutte le forme di vita dell'albero evolutivo, dagli insetti ai mammiferi. La principale via di trasduzione del segnale che i recettori Toll-like innestano per attivare le cellule, chiamata via NF-κB nei mammiferi, mostra anch'essa una notevole conservazione evolutiva.

IMMUNITA' INNATA

cosa riconosce

Il sistema immunitario innato riconosce patogeni e cellule danneggiate attraverso:

- **PAMPs** pathogen-associated molecular patterns → strutture molecolari prodotte da agenti patogeni microbici e spesso condivise da diverse classi di microbi. Sono spesso essenziali per la sopravvivenza microbica e questo fa sì che i microbi non possano eludere l'immunità innata attraverso mutazioni delle molecole riconosciute dall'ospite. Es. LPS nei batteri Gram- e acido lipoteicoico nei Gram+, componenti essenziali della parete batterica.
- **DAMPs** damage associated molecular patterns → molecole endogene prodotte o rilasciate da cellule danneggiate o morenti. Possono essere prodotte a seguito di infezioni o lesioni di varia natura come ad es. tossine chimiche, ustioni, traumi. Non sono generalmente rilasciate da cellule in apoptosi. Una particolare classe di DAMPs sono le allarmine prodotte da cellule sane e rilasciate quando le cellule sono danneggiate e stimolano le risposte innate.

Microbe Type		
Pathogen-Associated Molecular Patterns		
Nucleic acids	ssRNA	Virus
	dsRNA	Virus
	CpG	Virus, bacteria
Proteins	Pilin	Bacteria
	Flagellin	Bacteria
Cell wall lipids	LPS	Gram-negative bacteria
	Lipoteichoic acid	Gram-positive bacteria
Carbohydrates	Mannan	Fungi, bacteria
	Glucans	Fungi
Damage-Associated Molecular Patterns		
Stress-induced proteins	HSPs	—
Crystals	Monosodium urate	—
Proteolytically cleaved extracellular matrix	Proteoglycan peptides	—
Mitochondria and mitochondrial components	Formylated peptides and ATP	—
Nuclear proteins	HMGB1, histones	—

IMMUNITA' INNATA

cosa riconosce

PAMPs → 3 caratteristiche che li rendono siti ideali di riconoscimento del sistema immunitario innato:

1. Sono prodotti unicamente dai microrganismi e non dalle cellule eucariotiche;
2. Sono motivi molecolari invarianti dei microrganismi di una data classe e questo permette al sistema immunitario innato di individuare i possibili patogeni attraverso un numero ristretto di molecole recettoriali;
3. Non sono suscettibili al fenomeno dell'escape poiché sono spesso strutture essenziali per la vita microbica

IMMUNITA' INNATA

cosa riconosce

Il sistema immunitario innato riconosce patogeni e cellule danneggiate attraverso:

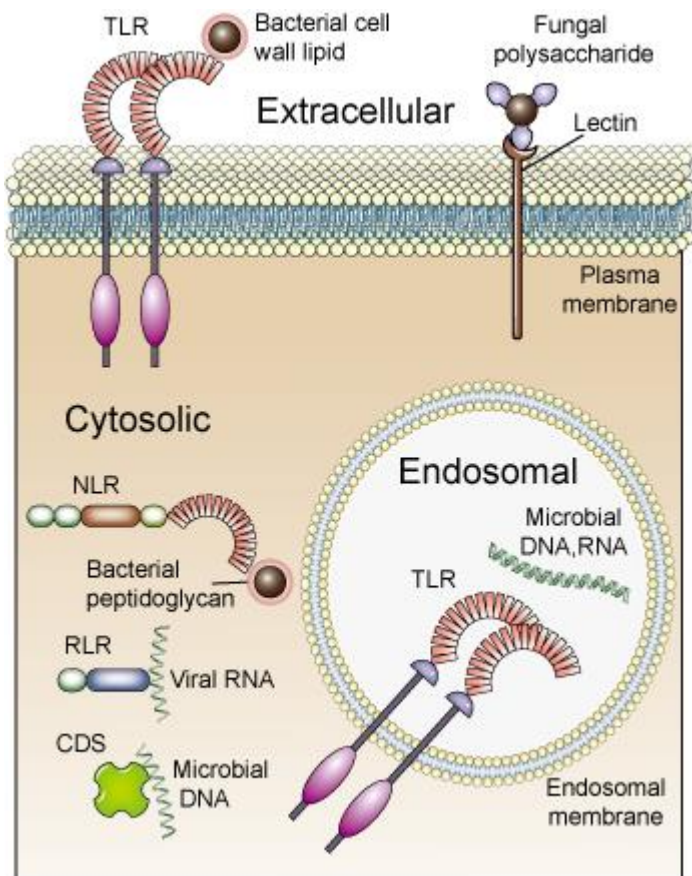
- **PAMPs** pathogen-associated molecular patterns:
 - Componenti della parete cellulare batterica: lipopolisaccaride (LPS), lipoproteine batteriche (BLPs), acido lipoteicoico (LTA), peptidoglicano (PGN), sequenze DNA ricco in guanina e citosina ipo-metilato (CpG)
 - DNA e RNA virale
 - Componenti della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

Microbe Type		
Pathogen-Associated Molecular Patterns		
Nucleic acids	ssRNA	Virus
	dsRNA	Virus
	CpG	Virus, bacteria
Proteins	Pilin	Bacteria
	Flagellin	Bacteria
Cell wall lipids	LPS	Gram-negative bacteria
	Lipoteichoic acid	Gram-positive bacteria
Carbohydrates	Mannan	Fungi, bacteria
	Glucans	Fungi
Damage-Associated Molecular Patterns		
Stress-induced proteins	HSPs	—
Crystals	Monosodium urate	—
Proteolytically cleaved extracellular matrix	Proteoglycan peptides	—
Mitochondria and mitochondrial components	Formylated peptides and ATP	—
Nuclear proteins	HMGB1, histones	—

IMMUNITA' INNATA

come avviene il riconoscimento

Il sistema immunitario innato utilizza specifici recettori proteici chiamati recettori di riconoscimento di schemi (*pattern recognition receptors*) **PRR** per riconoscere i PAMP e i DAMP



recettori cellulari

presenti in diverse posizioni nelle cellule

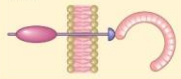
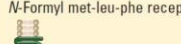
- Proteine transmembrana presenti sulla superficie cellulare;
- Nelle vescicole fagocitiche di cellule fagocitiche;
- Nel citoplasma

molecole solubili

presenti nel sangue e nelle secrezioni mucose

IMMUNITA' INNATA

come avviene il riconoscimento

Pattern Recognition Receptors	Location	Specific Examples	Ligands (PAMPs or DAMPs)
Cell-Associated			
TLRs 	Plasma membrane and endosomal membranes of DCs, phagocytes, B cells, endothelial cells, and many other cell types	TLRs 1–9	Various microbial molecules including bacterial LPS and peptidoglycans; viral nucleic acids
NLRs 	Cytosol of phagocytes, epithelial cells, and other cells	NOD1/2 NLRP family (inflammasomes)	Bacterial cell wall peptidoglycans Intracellular crystals (urate, silica); changes in cytosolic ATP and ion concentrations; lysosomal damage
RLRs 	Cytosol of phagocytes and other cells	RIG-1, MDA-5	Viral RNA
CDSs 	Cytosol of many cell types	AIM2; STING-associated CDSs	Bacterial and viral DNA
CLRs 	Plasma membranes of phagocytes	Mannose receptor DC-sign Dectin-1, Dectin-2	Microbial surface carbohydrates with terminal mannose and fructose Glucans present in fungal and bacterial cell walls
Scavenger receptors 	Plasma membranes of phagocytes	CD36	Microbial diacylglycerides
<i>N</i> -Formyl met-leu-phe receptors 	Plasma membranes of phagocytes	FPR and FPRL1	Peptides containing <i>N</i> -formylmethionyl residues
Soluble			
Pentraxins 	Plasma	C-reactive protein	Microbial phosphorylcholine and phosphatidylethanolamine
Collectins 	Plasma Alveoli	Mannose-binding lectin Surfactant proteins SP-A and SP-D	Carbohydrates with terminal mannose and fructose Various microbial structures
Ficolins 	Plasma	Ficolin	<i>N</i> -acetylglucosamine and lipoteichoic acid components of the cell walls of gram-positive bacteria
Complement 	Plasma	Various complement proteins	Microbial surfaces

recettori cellulari

presenti in diverse posizioni nelle cellule fagocitiche (principalmente macrofagi e neutrofili), cellule dendritiche (DC), cellule epiteliali che formano l'interfaccia di barriera tra organismo e ambiente esterno, mastociti e molti altri tipi di cellule che risiedono nei tessuti.

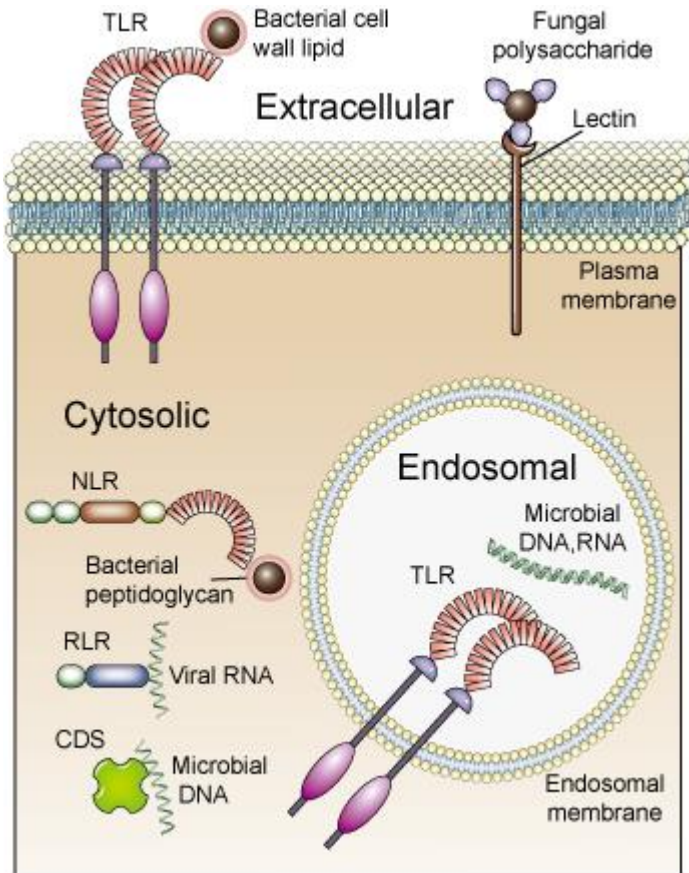
- Proteine transmembrana presenti sulla superficie cellulare;
- Nelle vescicole fagocitiche di cellule fagocitiche;
- Nel citoplasma

molecole solubili presenti nel sangue e nelle

secrezioni mucose responsabili di facilitare l'eliminazione dei microbi dal sangue e dai fluidi extracellulari, favorendo l'assorbimento da parte dei fagociti o attivando meccanismi di uccisione extracellulare.

IMMUNITA' INNATA

caratteristiche comuni dei PRR

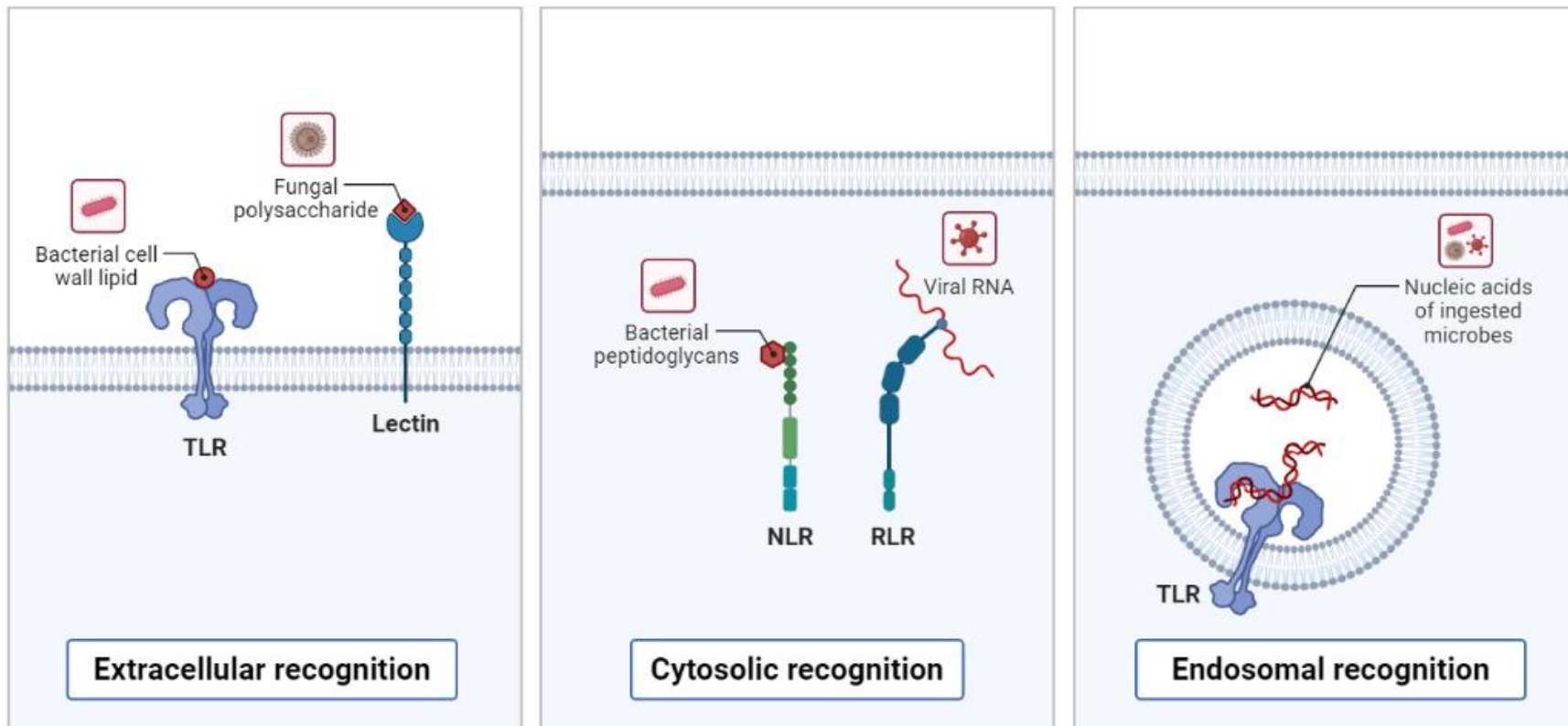


- Riconoscono i componenti microbici (PAMP) che sono essenziali per la sopravvivenza del microrganismo e quindi difficili da alterare;
- Sono espressi costitutivamente nell'ospite e rilevano gli agenti patogeni indipendentemente dalla fase del loro ciclo vitale;
- Sono codificati a livello germinale, non clonali, espressi su tutte le cellule di un determinato tipo e sono indipendenti dalla memoria immunologica;
- Questi recettori di riconoscimento cellulare si legano ai PAMP e ai DAMP e attivano vie di trasduzione del segnale che promuovono l'azione antimicrobica e proinfiammatoria delle cellule in cui sono espressi;
- Non reagiscono contro cellule e tessuti sani in quanto le cellule normali non producono ligandi per i recettori immunitari innati.

IMMUNITA' INNATA

recettori cellulari

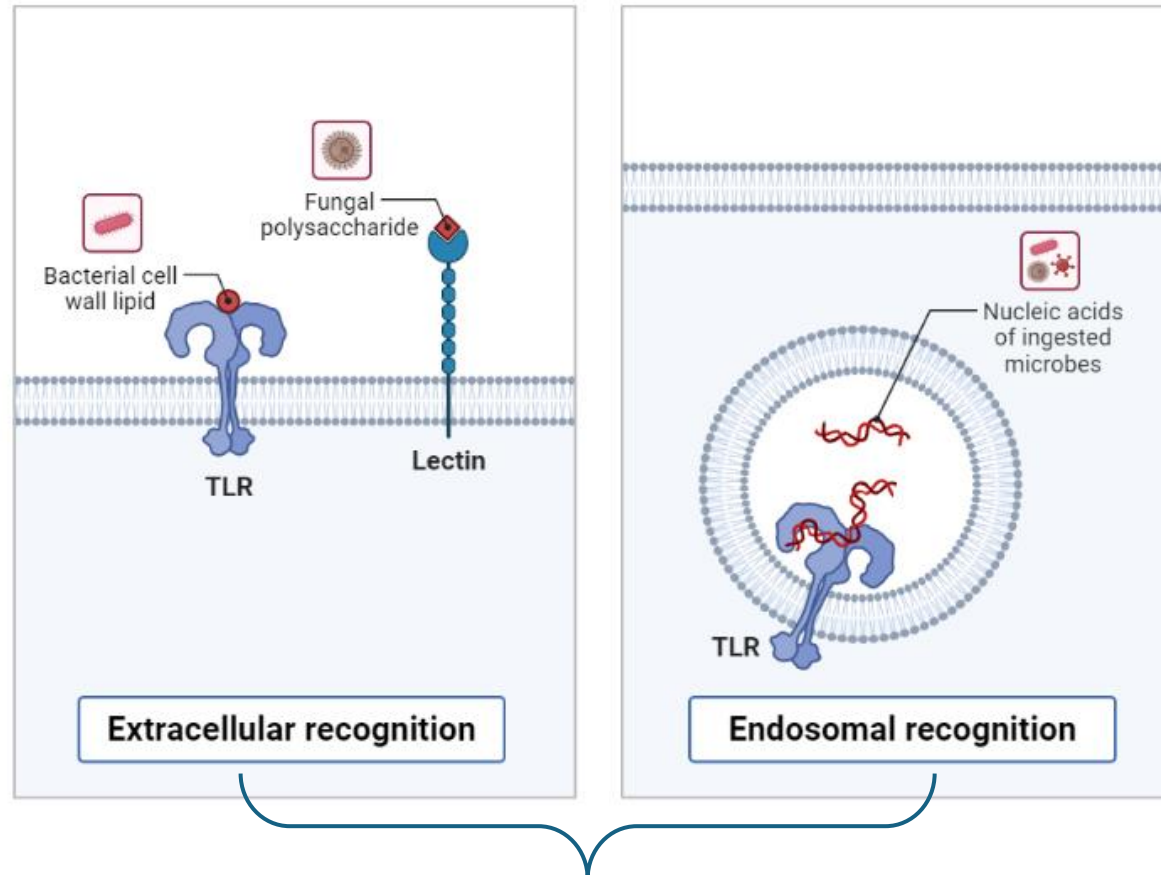
Innate Immune System: Cellular Locations of Pattern Recognition Receptors



IMMUNITA' INNATA

Toll-like receptors (TLRs)

Sono una famiglia evolutivamente conservata di recettori espressi in molti tipi di cellule e riconoscono i prodotti di un'ampia varietà di microbi, nonché le molecole espresse o rilasciate da cellule stressate e morenti.



Perchè Toll-like?

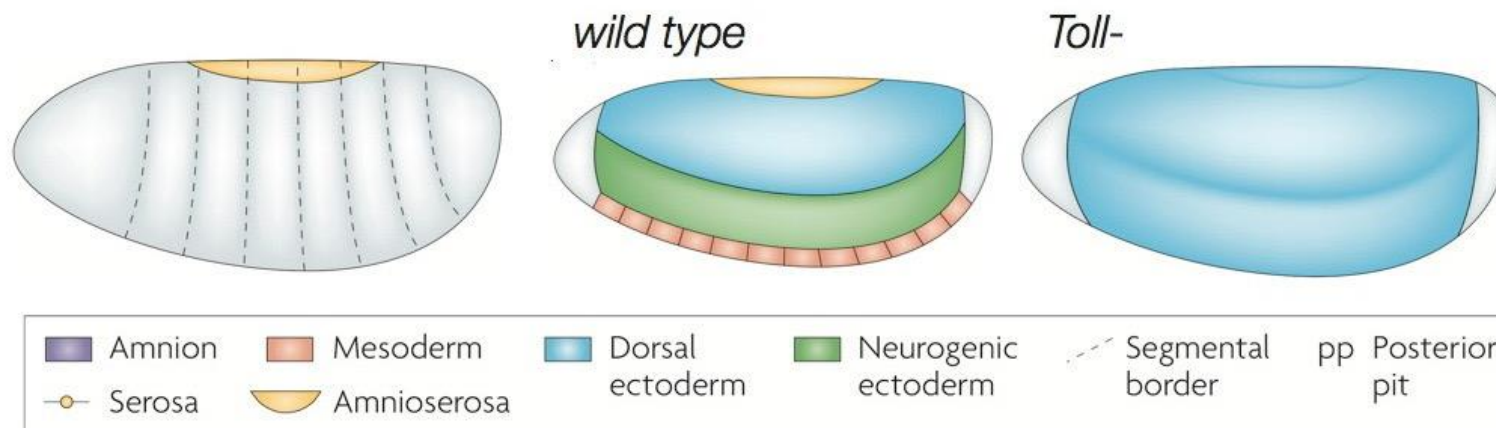
si trovano sulla superficie cellulare e sulle membrane intracellulari e sono quindi in grado di riconoscere i microbi in diverse sedi cellulari

IMMUNITA' INNATA

Recettore Toll di *Drosophila*

Il primo PRR identificato è stato il recettore **Toll** di *Drosophila* → identificato 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*.

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



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

Premio Nobel per la Medicina nel 1995



IMMUNITA' INNATA

Toll-like receptors (TLRs)



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

Toll, il membro fondatore della famiglia dei TLR, inizialmente identificato come un prodotto genico essenziale per lo sviluppo della polarità embrionale dorsoventrale nella *Drosophila*, è stato dimostrato nel 1995 dal gruppo di Hoffman svolgere un ruolo critico nella risposta immunitaria innata contro infezioni fungine

Cell, Vol. 86, 973-983, September 20, 1996, Copyright ©1996 by Cell Press

The Dorsoventral Regulatory Gene Cassette *spätzle/Toll/cactus* Controls the Potent Antifungal Response in *Drosophila* Adults

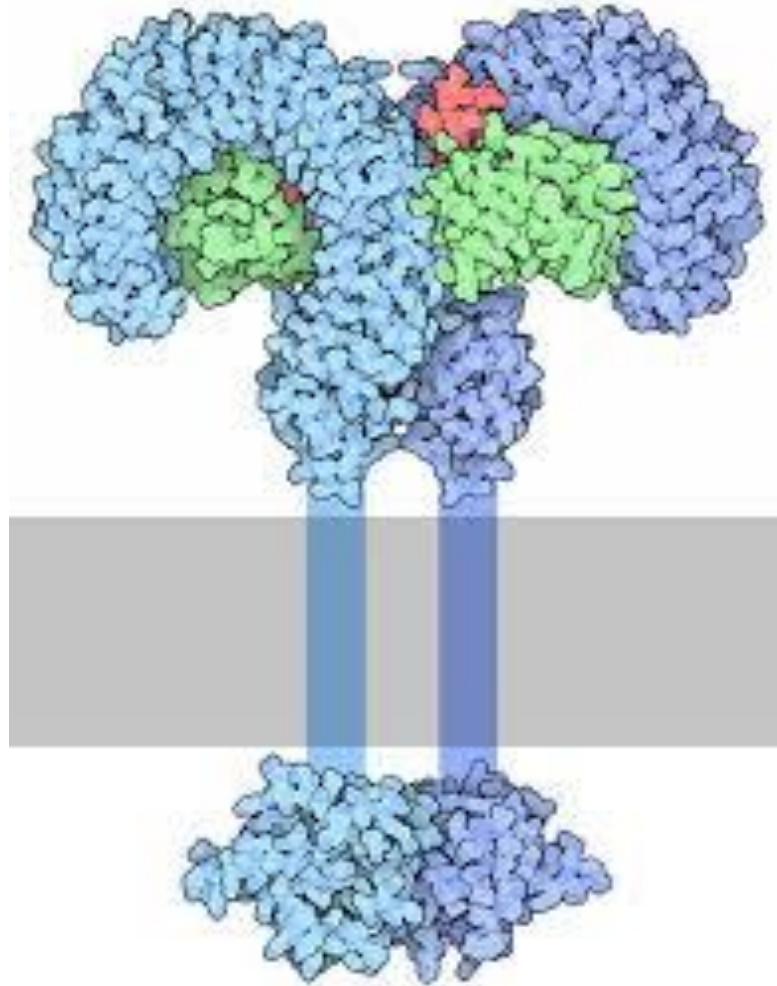
**Bruno Lemaitre, Emmanuelle Nicolas, Lydia Michaut,
Jean-Marc Reichhart, and Jules A. Hoffmann**
Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire
UPR 9022 du Centre National de la Recherche
Scientifique
15 rue René Descartes
67084 Strasbourg Cedex
France

mutants, a result which points to the existence of different pathways leading to expression of the antifungal and antibacterial peptide genes (Lemaitre et al., 1995a).

We have undertaken the characterization of these pathways. For this, we were guided by the parallels that exist between the cytokine-induced activation cascade of NF- κ B during the inflammatory response in mammals (reviewed by Siebenlist et al., 1994; Baeuerle and Henkel, 1994) and the activation of the morphogen dor-

IMMUNITA' INNATA

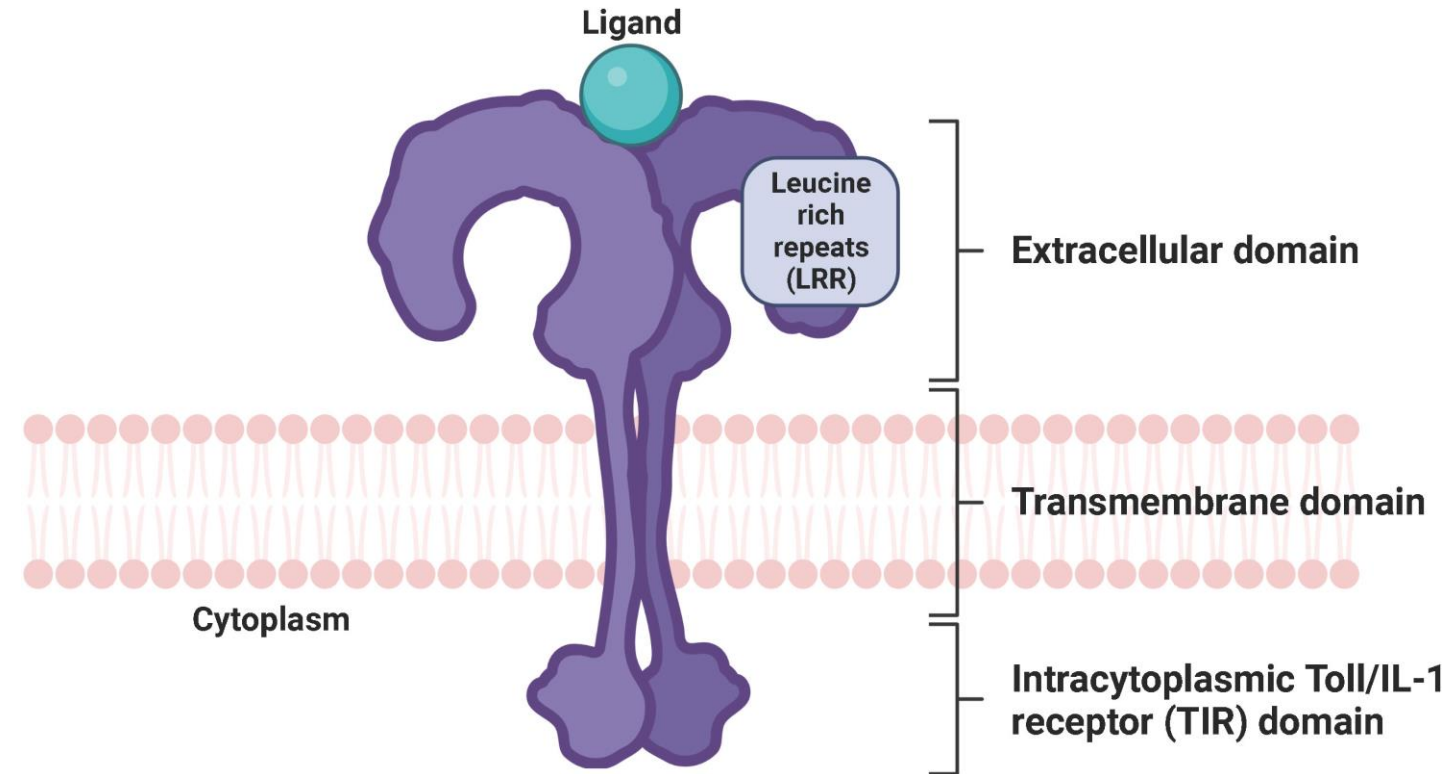
Toll-like receptors (TLRs)



Sono espressi su diverse cellule immunitarie, tra cui macrofagi, cellule dendritiche (DC), cellule B, tipi specifici di cellule T e anche su cellule non immunitarie come fibroblasti e cellule epiteliali. L'espressione dei TLR non è statica, ma viene modulata rapidamente in risposta agli agenti patogeni, a una serie di citochine e agli stress ambientali.

IMMUNITA' INNATA

Toll-like receptors (TLRs)



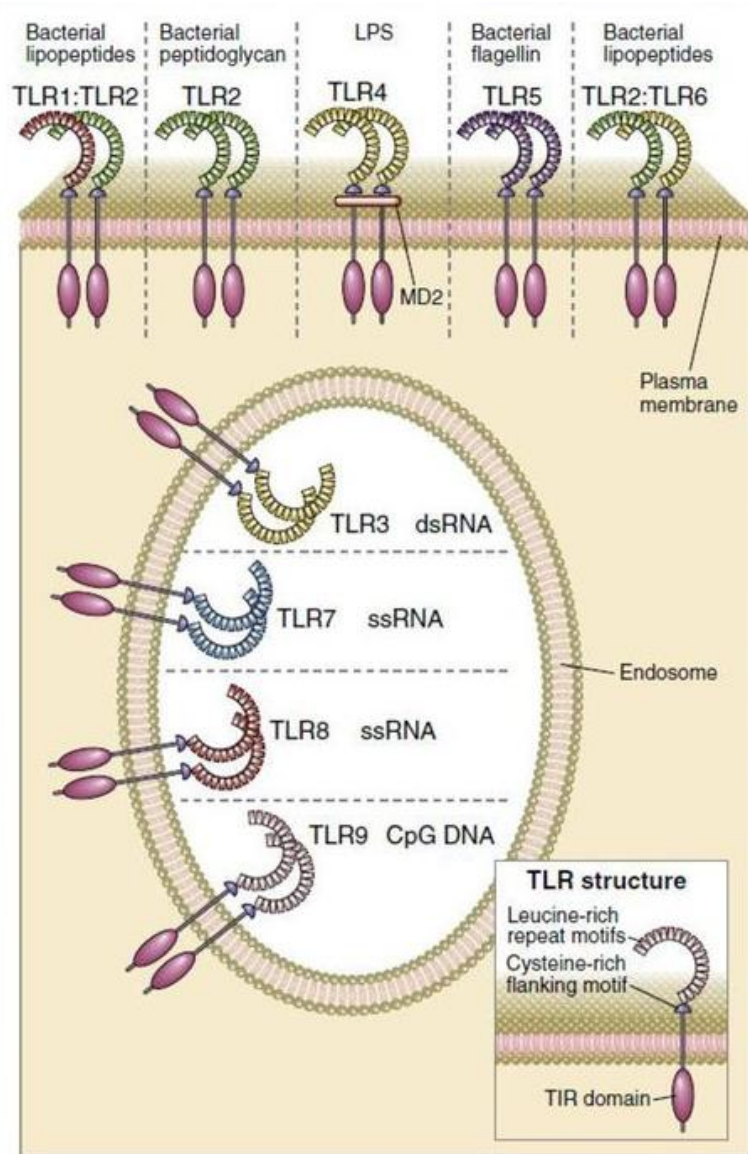
Stierschneider and Wiesner, 2023

Sono glicoproteine integrali di membrana di tipo I formate da:

- un ampio dominio extracellulare composto da una serie di ripetizioni ricche in leucina (LRR) coinvolte nel legame con il ligando (PAMP)
- un dominio Toll/IL-1 receptor (TIR) nelle loro code citoplasmatiche, che è essenziale per la segnalazione. I domini TIR si trovano anche nelle code citoplasmatiche dei recettori per le citochine IL-1 e IL-18.

IMMUNITA' INNATA

TLRs...quanti?



Ad oggi sono stati identificati 10 e 12 TLR funzionali rispettivamente nell'uomo e nel topo, con TLR1-TLR9 che sono conservati in entrambe le specie.

Sono suddivisi in due sottogruppi a seconda della loro localizzazione cellulare e dei rispettivi ligandi PAMP:

- 1. TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 e TLR11**, espressi sulla superficie cellulare e riconoscono principalmente componenti microbici di membrana come lipidi, lipoproteine e proteine;
- 2. TLR3, TLR7, TLR8 e TLR9**, espressi esclusivamente in vescicole intracellulari come il reticolo endoplasmatico (ER), gli endosomi, i lisosomi e gli endolisosomi, dove riconoscono acidi nucleici microbici.

IMMUNITA' INNATA

Riconoscimento batterico da parte dei TLR

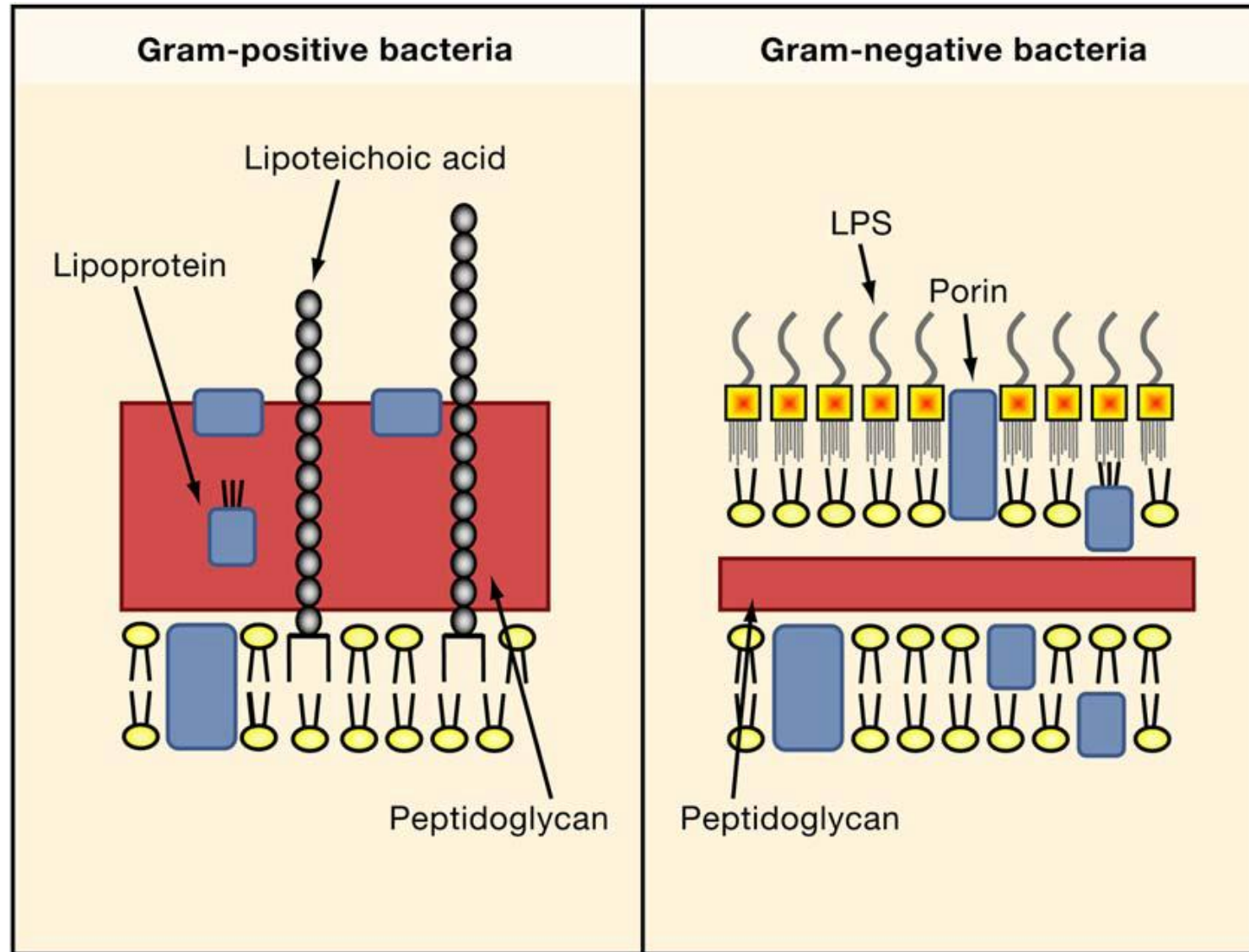
Table 1. TLR Recognition of Microbial Components

Microbial Components	Species	TLR Usage
Bacteria		
LPS	Gram-negative bacteria	TLR4
Diacyl lipopeptides	<i>Mycoplasma</i>	TLR6/TLR2
Triacyl lipopeptides	Bacteria and mycobacteria	TLR1/TLR2
LTA	Group B <i>Streptococcus</i>	TLR6/TLR2
PG	Gram-positive bacteria	TLR2
Porins	<i>Neisseria</i>	TLR2
Lipoarabinomannan	Mycobacteria	TLR2
Flagellin	Flagellated bacteria	TLR5
CpG-DNA	Bacteria and mycobacteria	TLR9
ND	Uropathogenic bacteria	TLR11

Akira et al., 2006

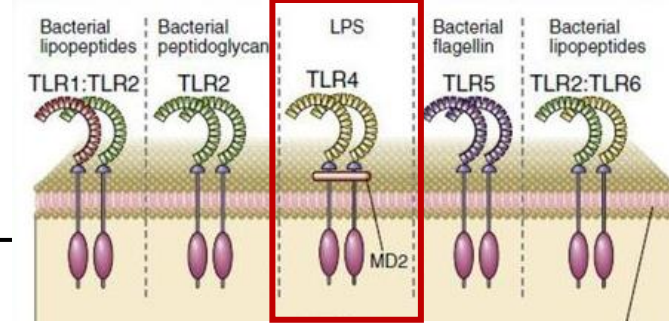
IMMUNITA' INNATA

Parete cellulare dei batteri Gram-Negativi e Positivi



IMMUNITA' INNATA

LPS e TLR4



L'**LPS**, noto anche come endotossina, è uno dei più potenti stimolanti del sistema immunitario tra i componenti della parete cellulare dei batteri Gram-negativi. La sua porzione lipidica, chiamata lipide A, è responsabile degli effetti patologici principali, come lo shock settico.



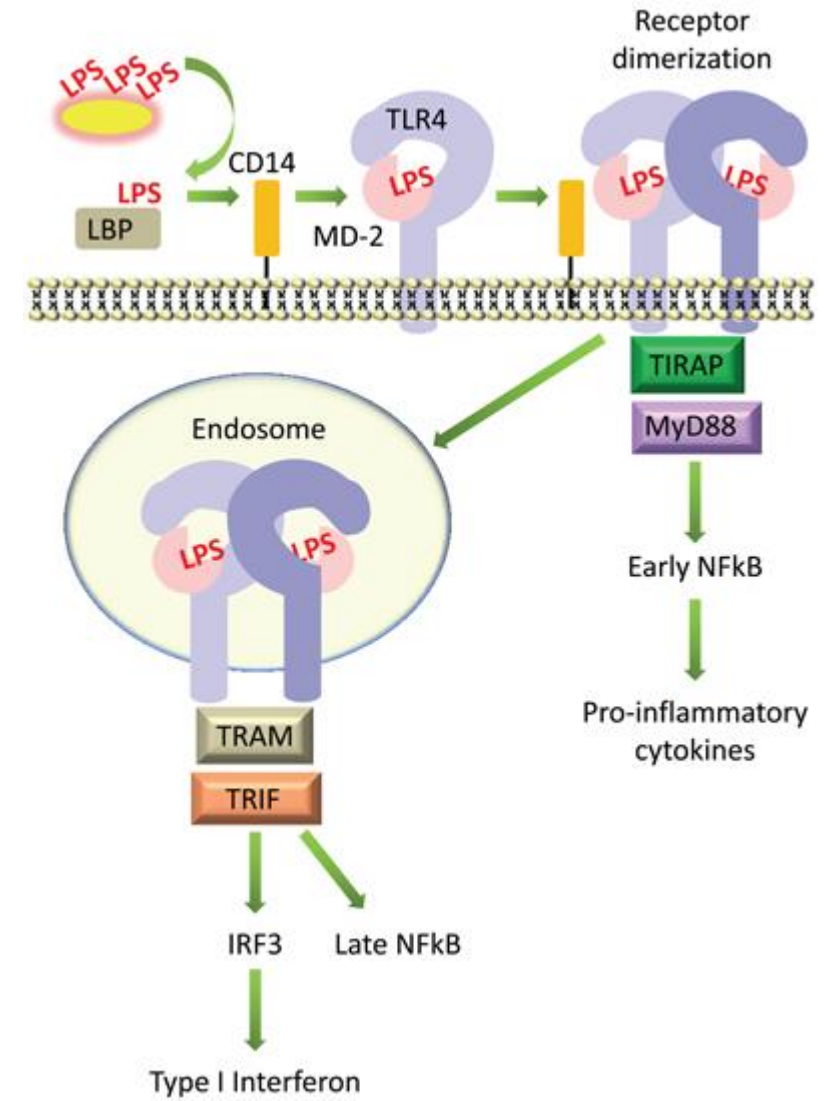
Dopo il rilascio dai batteri, l'LPS si lega alla **LBP** (LPS-binding protein), una proteina plasmatica della fase acuta, e viene trasferito al recettore **CD14**, presente sulla superficie dei fagociti.



Successivamente, l'LPS viene consegnato alla proteina **MD-2**, che forma un complesso con il recettore **TLR4** (Toll-like receptor 4).



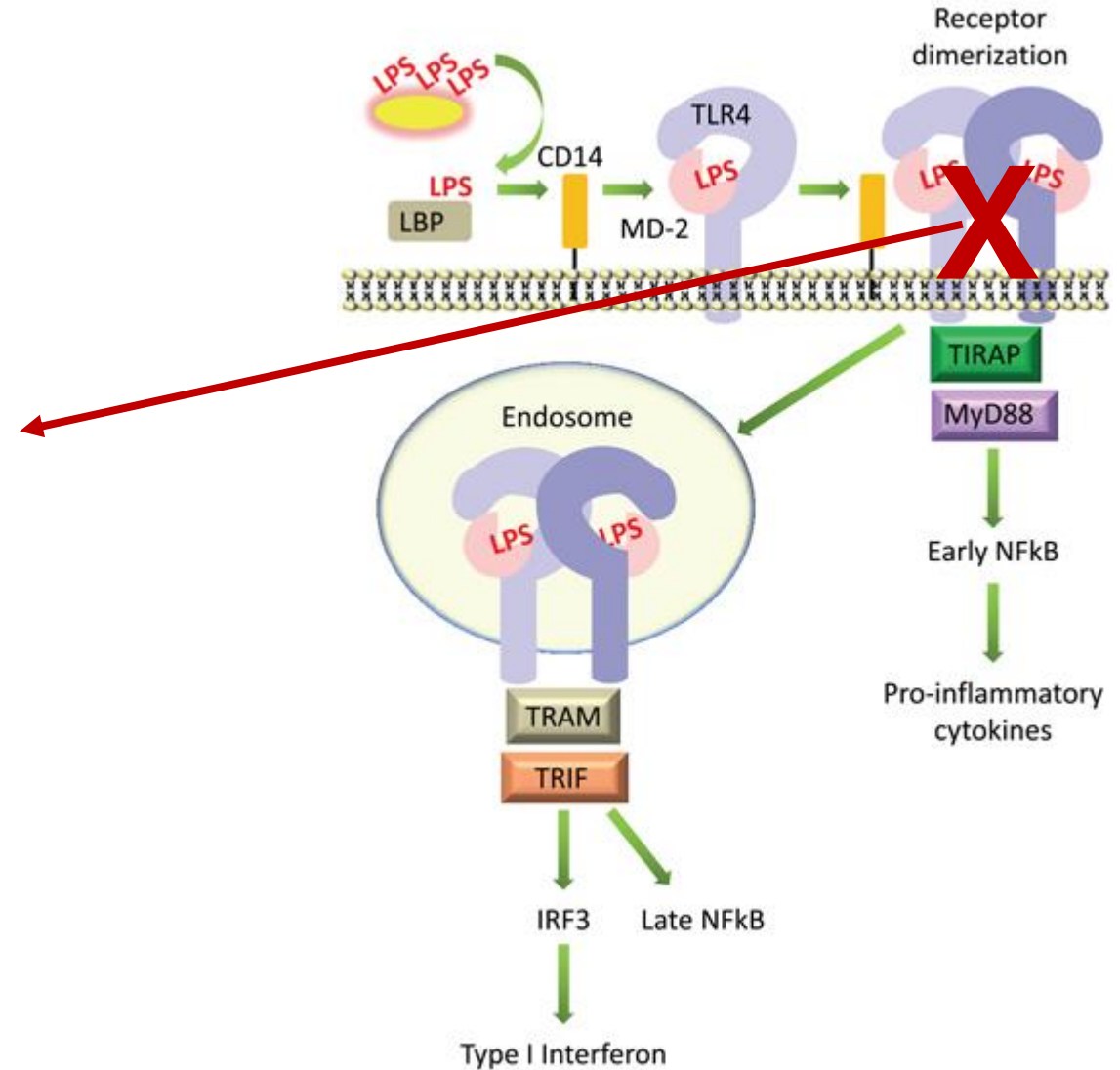
Questa interazione porta alla dimerizzazione del complesso **TLR4-MD-2-LPS**, che avvia la trasduzione del segnale immunitario attraverso il reclutamento di proteine adattatrici intracellulari.



IMMUNITA' INNATA

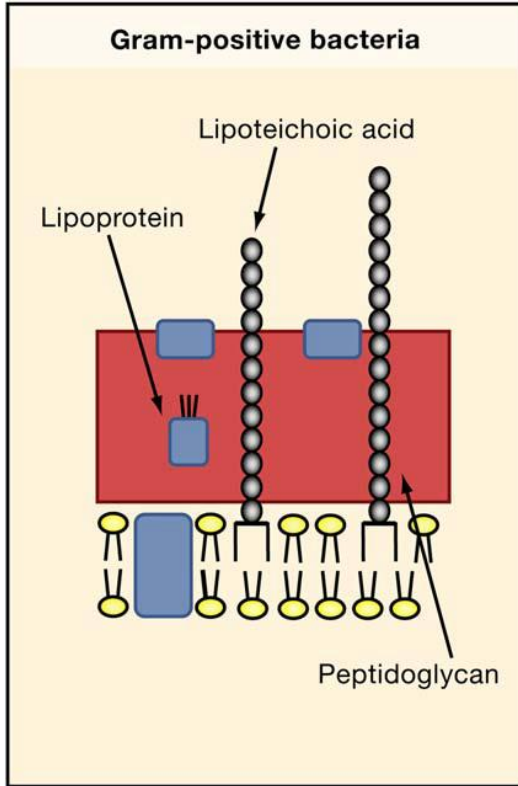
LPS e TLR4

I topi C3H/HeJ mutati in TLR4 sono altamente suscettibili all'infezione da *Salmonella typhimurium* o da *Neisseria meningitis*.



IMMUNITA' INNATA

Parete cellulare dei batteri Gram-Positivi

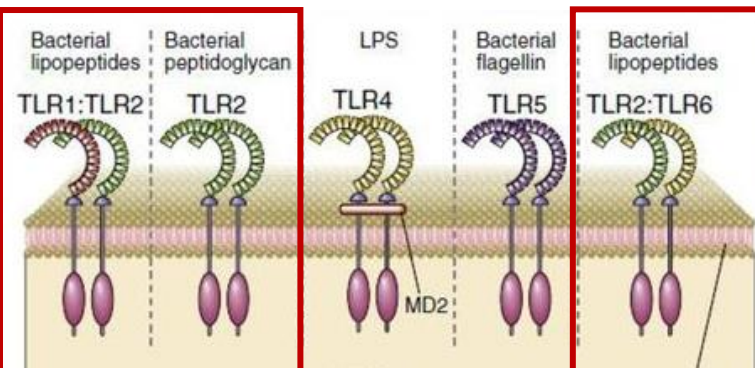


Anche i componenti della parete cellulare dei batteri Gram-positivi possono attivare l'immunità innata, pur non contenendo LPS.

- L'acido lipoteicoico (**LTA**) agisce in modo simile come attivatore immunitario.
- Lipoproteine e peptidoglicano (**PG**), presenti sia nei Gram-positivi che nei Gram-negativi, sono anch'essi potenti stimolatori.



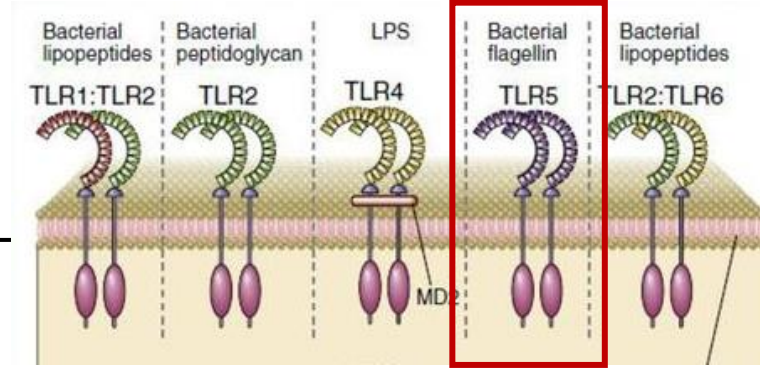
Il recettore **TLR2** è fondamentale nel riconoscimento dei batteri Gram-positivi, interagendo con TLR1 e TLR6, per distinguere sottili variazioni nella parte lipidica delle lipoproteine.



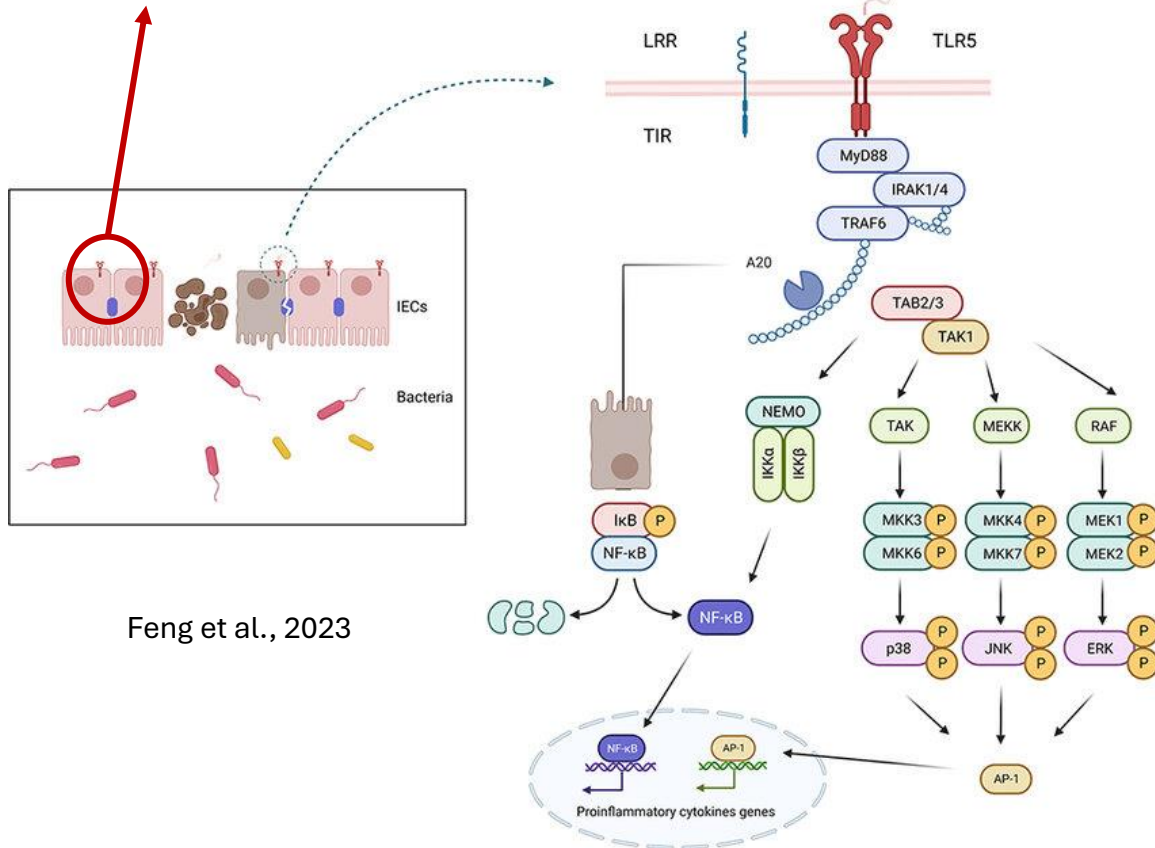
L'importanza del TLR2 nella difesa dell'ospite contro i batteri Gram-positivi è stata dimostrata utilizzando topi TLR2-deficienti (TLR2^{-/-}), che sono risultati altamente suscettibili a infezioni da *Staphylococcus aureus* o *Streptococcus pneumoniae*

IMMUNITA' INNATA

flagellina e TLR5



Il **TLR5** è espresso su cellule epiteliali, monociti e cellule dendritiche immature, ed è localizzato sulla superficie basolaterale dell'epitelio intestinale e nei polmoni, dove svolge un ruolo chiave nella difesa contro patogeni respiratori.



Feng et al., 2023

La **flagellina** è la principale proteina dei flagelli batterici, strutture responsabili della motilità, ed è un potente attivatore dell'immunità innata.

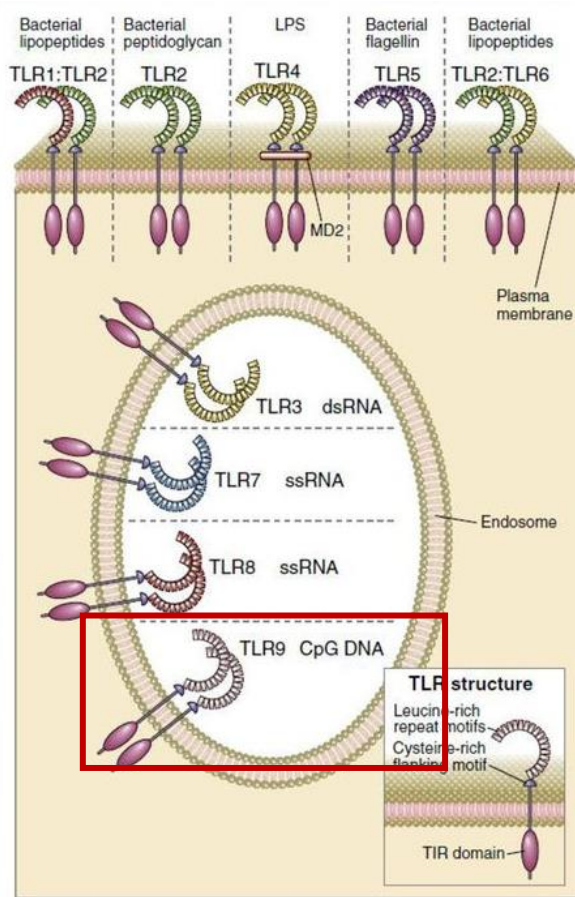


È riconosciuta dal recettore **TLR5**, che individua in particolare il dominio D1, conservato tra le specie.

Alcuni batteri, come *Helicobacter pylori* e *Campylobacter jejuni*, producono flagelline prive di proprietà pro-infiammatorie, eludendo così la risposta immunitaria.

IMMUNITA' INNATA

DNA batterico e TLR9



Il DNA genomico batterico è un potente stimolatore del sistema immunitario grazie alla presenza di dinucleotidi CpG non metilati (**CpG-DNA**), abbondanti nei batteri ma rari e metilati nei mammiferi.



Il DNA batterico, una volta internalizzato, viene degradato in frammenti a singolo filamento contenenti motivi CpG



Il **TLR9**, situato negli **endosomi**, riconosce i motivi CpG in condizioni acide e attiva la produzione di citochine infiammatorie e risposte Th1.



Composti che bloccano l'acidificazione endosomiale (es. bafilomicina, cloroquina) inibiscono l'attivazione di TLR9.

IMMUNITA' INNATA

TLR Signaling Pathway

Il legame dei **TLR** con **PAMPs** attiva cascate di segnalazione che inducono l'espressione di geni per la difesa antimicrobica



Dopo il legame con il ligando, i **TLR** dimerizzano e subiscono cambiamenti conformazionali, che permettono il reclutamento di **adattatori** (es. MyD88, TRIF) contenenti il dominio TIR portando all'attivazione di diversi fattori di trascrizione.

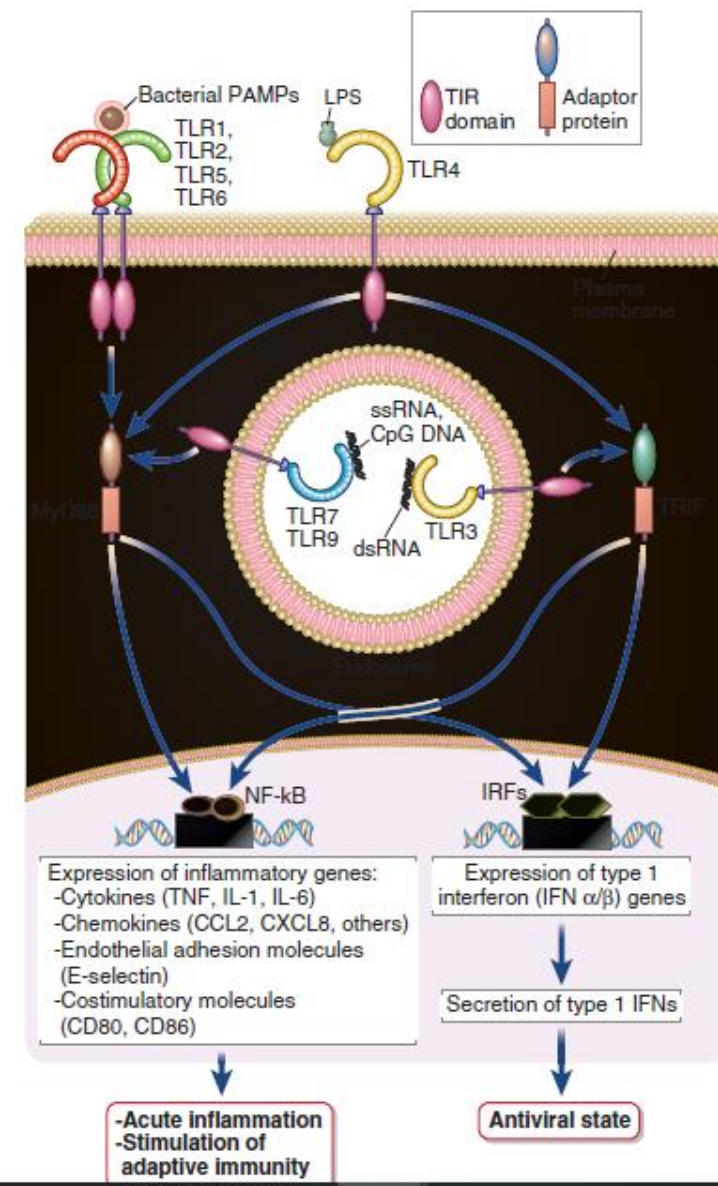


Questi adattatori attivano vie diverse:

- MyD88 → NFκB produzione di citochine proinfiammatorie
- TRIF → induzione di interferoni di tipo I (IFN-I)

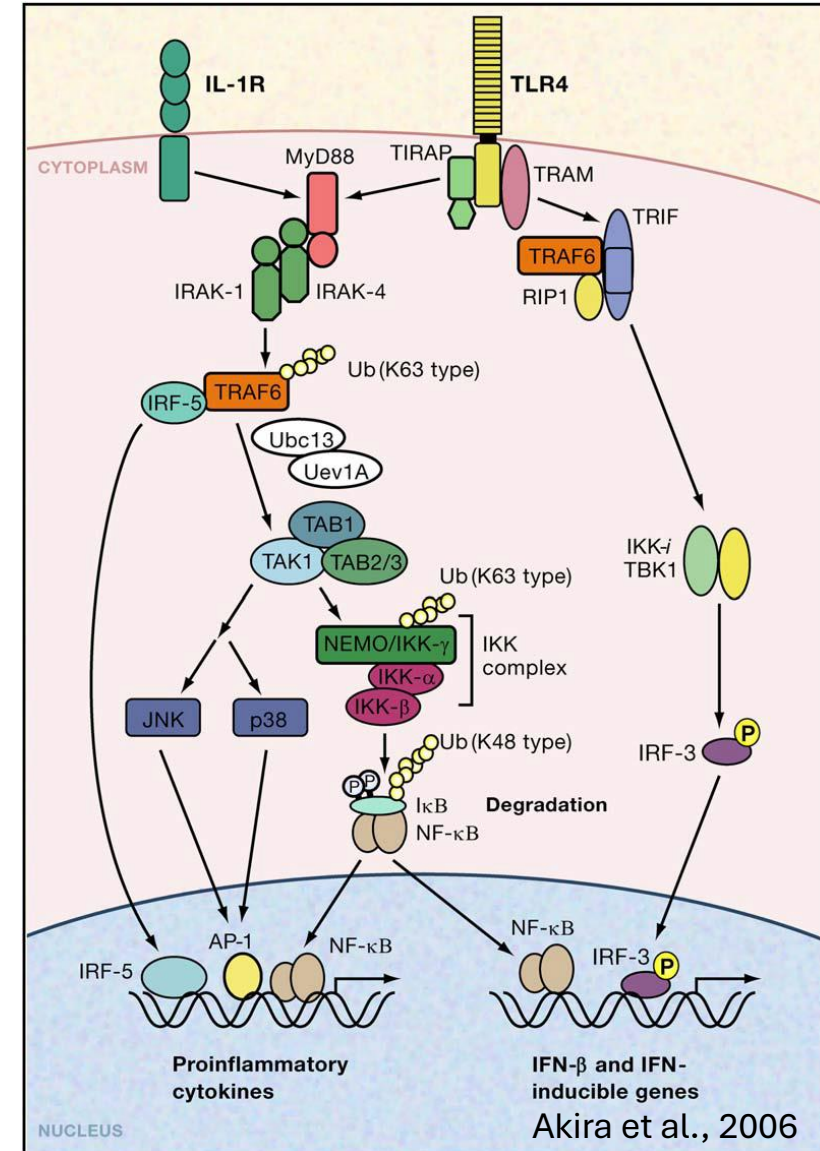
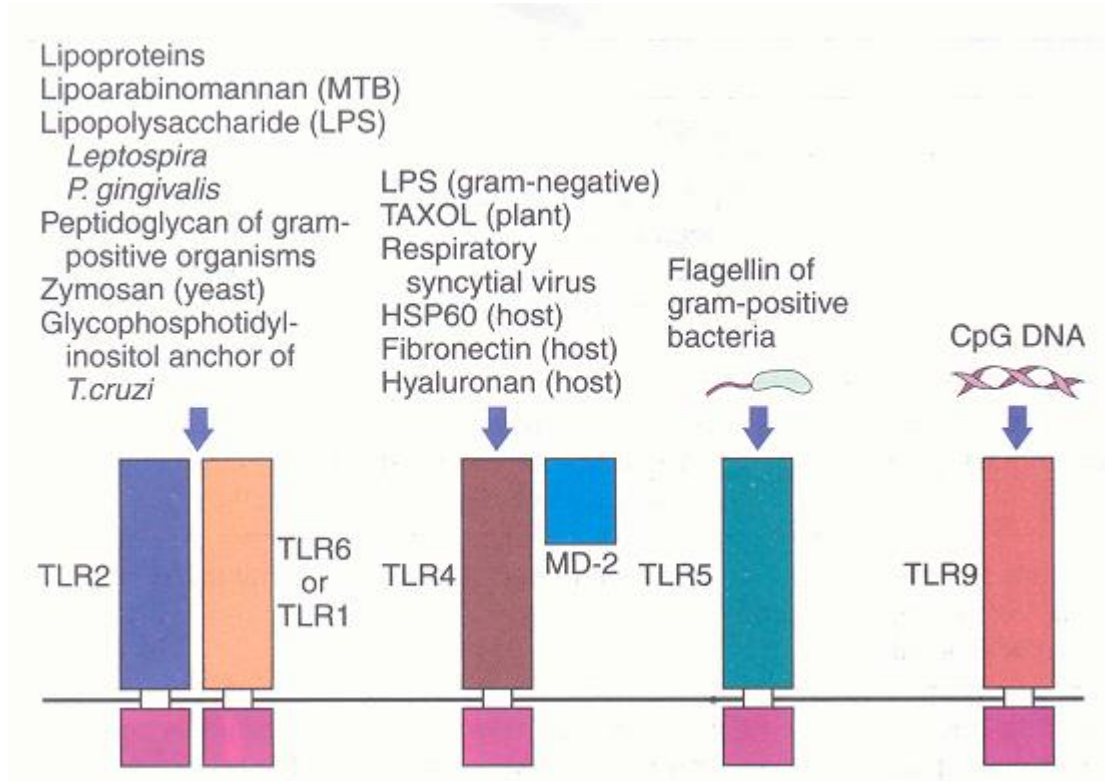


La specificità della risposta immunitaria dipende dalla combinazione di adattatori utilizzati da ciascun TLR.



IMMUNITA' INNATA

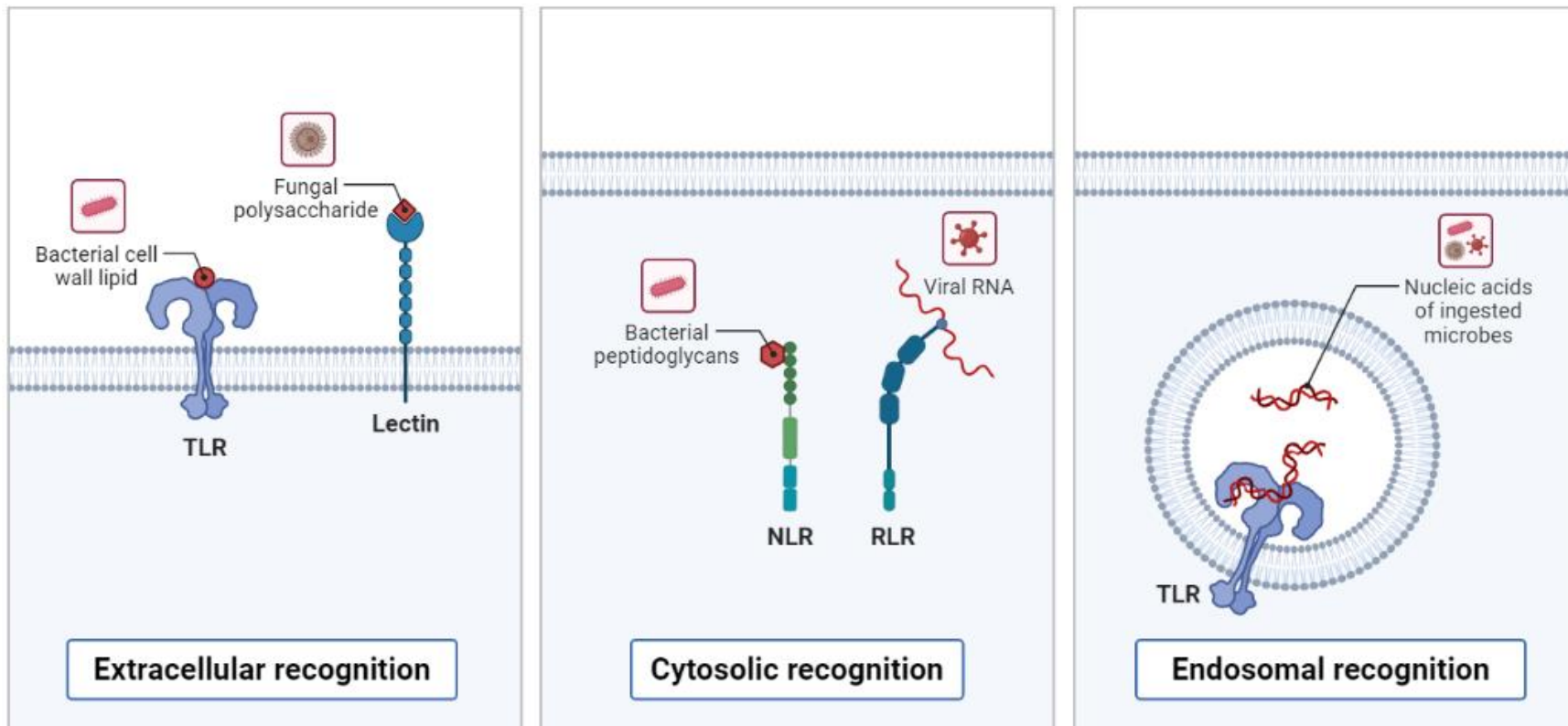
Riconoscimento batterico da parte dei TLR



IMMUNITA' INNATA

recettori cellulari

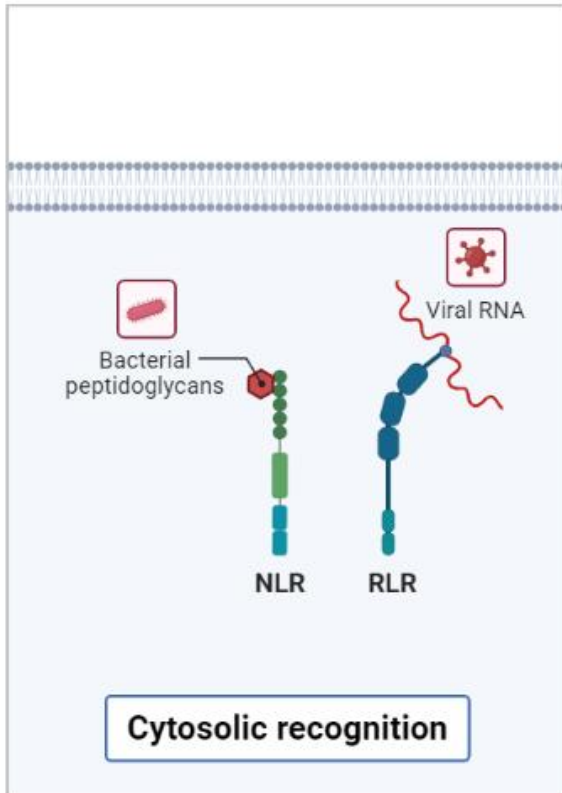
Innate Immune System: Cellular Locations of Pattern Recognition Receptors



IMMUNITA' INNATA

recettori cellulari citosolici

Oltre ai TLR di membrana, il sistema immunitario innato utilizza **recettori citosolici** per rilevare infezioni o danni all'interno della cellula.



Le tre principali famiglie di recettori citosolici sono:

- NOD-like receptors (NLR)
- RIG-I-like receptors (RLR)
- Sensori citosolici del DNA

attivano vie di segnalazione simili ai TLR, inducendo **infiammazione** o produzione di interferoni di tipo I (**IFN-I**).

Il riconoscimento intracitoplasmatico è essenziale perché:

- Alcuni virus completano parte del loro ciclo vitale nel citosol.
- Alcuni batteri e parassiti sfuggono ai fagosomi ed entrano nel citosol.
- Tossine microbiche formano pori nelle membrane cellulari, alterando concentrazioni di ioni e altre molecole, segnali chiave di infezione.

IMMUNITA' INNATA

NOD-like receptors (NLR)

I recettori NOD-like (**NLR**) sono una famiglia di oltre 20 diverse **proteine citosoliche**, presenti in un'ampia varietà di tipi di cellule (cellule immunitarie e infiammatorie e nelle cellule epiteliali di barriera), riconoscono PAMP e DAMP e reclutano altre proteine per formare complessi di segnalazione che promuovono l'infiammazione.

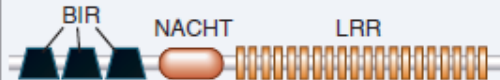
Le proteine NLR tipiche sono formate da:

- un **dominio C-terminale** ricco di ripetizioni di leucina (LRR) che percepisce la presenza del ligando → **LRD** [Ligand-Recognition Domain]
- un **dominio centrale NOD** (dominio di oligomerizzazione nucleotidica, detto anche NACHT) necessario alle proteine NLR per legarsi l'una all'altra e formare oligomeri
- un **dominio effettore N-terminale**, che recluta altre proteine per formare complessi di segnalazione → **EBD** [Effector-Binding Domain]

Esistono tre sottofamiglie di NLR che fungono da recettori immunitari innati, ognuna delle quali utilizza un diverso dominio effettore per avviare la segnalazione.

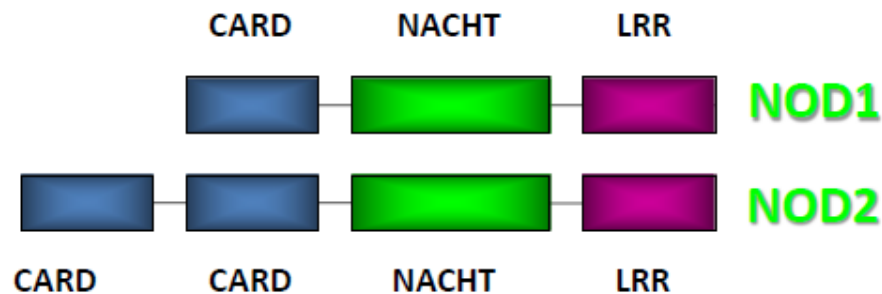
IMMUNITA' INNATA

NOD-like receptors (NLR)

	Subfamily	Examples	Typical domain structure	Activating stimuli	Function
	NLRA	CIITA		IFN- γ	Class II MHC expression
	NLRB	NAIP		Flagellin	Control of <i>Legionella pneumophila</i> infection
NLRC	NLRC	NOD1, NOD2, NLRC3-5		DAP (NOD1)	NF- κ B activation
				MDP (NOD2)	NF- κ B activation, autophagy, type 1 interferon production
				Flagellin (NLRC4)	Caspase 1 activation, cell death
	NLRP	NLRPs, 1-10		Extracellular ATP, alum, asbestos, bacterial toxins, silica, sodium urate, ROS, reduced cytosolic K ⁺ (NLRP3)	Caspase 1 activation
				Lipopeptides (NLRP7)	Caspase 1 activation

IMMUNITA' INNATA

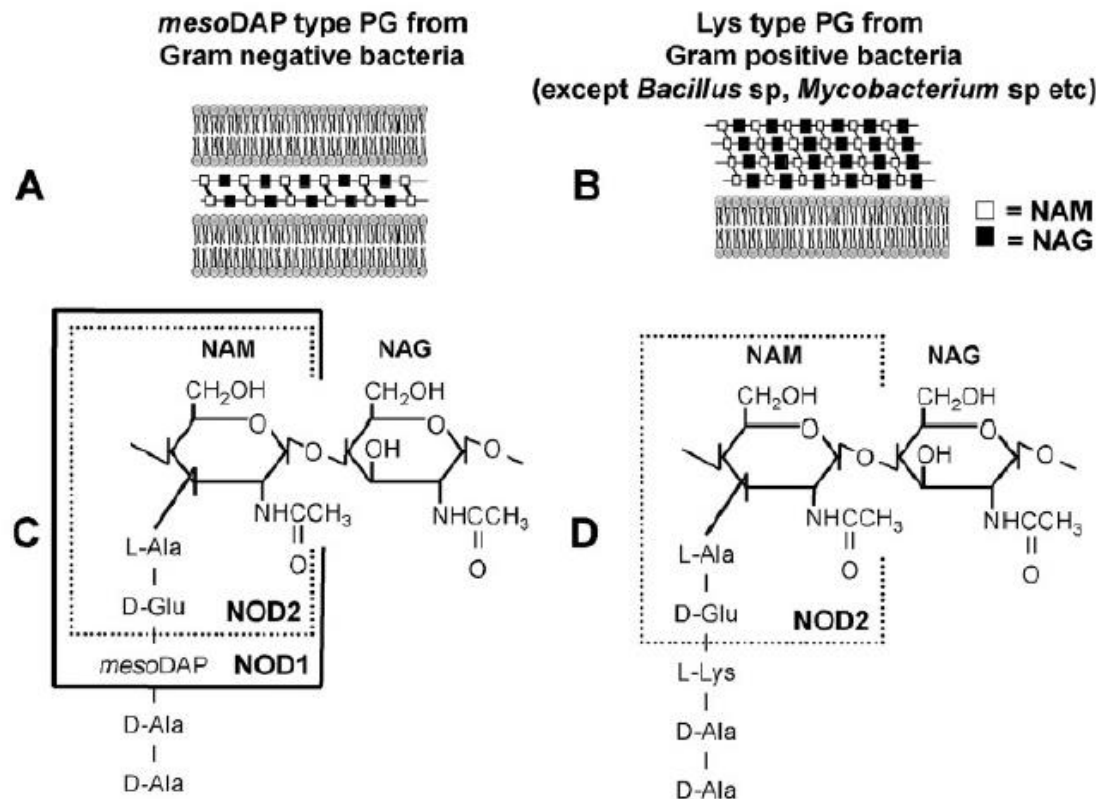
NOD1 e NOD2



NOD1 e NOD2, recettori citosolici della famiglia NLRC, sono espressi in cellule epiteliali mucosali e fagociti, dove rilevano peptidoglicani batterici

Specificità di riconoscimento:

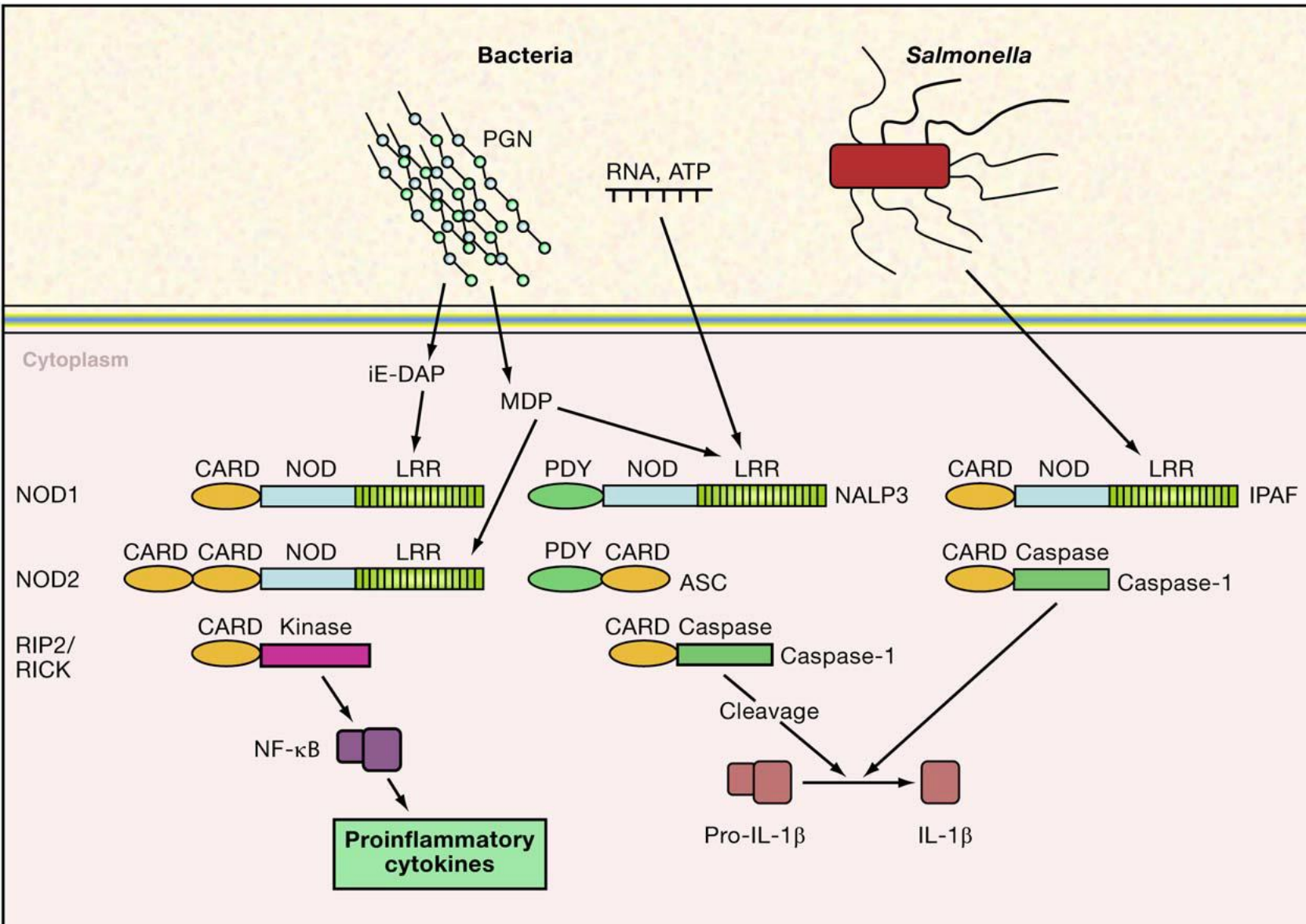
- **NOD1** → rileva g-D-glutamyl-meso-diaminopimelic acid (iE-**DAP**) da batteri Gram-negativi
- **NOD2** → rileva muramyl dipeptide (**MDP**) da batteri Gram-positivi e negativi; è altamente espresso nelle cellule di Paneth dell'intestino e stimola la produzione di defensine



Il legame del ligando a NOD1 e NOD2 provoca la loro oligomerizzazione e l'attivazione di **NF-κB**

IMMUNITA' INNATA

recettori cellulari citosolici



Le proteine **NOD-LRR** riconoscono le proteine batteriche nel citoplasma e attivano le vie di segnalazione.

NOD1 e **NOD2** riconoscono **iE-DAP** e **MDP**, rispettivamente, e attivano **NF-κB** tramite RIP2/RICK. MDP viene riconosciuto anche da **NALP3**, che forma un inflammosoma composto da ASC, CARDINAL, e caspasi-1.

La **caspasi-1** attivata taglia la pro-IL-1b per la maturazione dell'**IL-1b**.

Un'altra proteina NOD-LRR, **IPAF**, viene attivata da *Salmonella* e induce la maturazione di IL-1b associandosi con la caspasi-1.

EVASIONE IMMUNE

Laddove gli organismi eucarioti hanno sviluppato meccanismi sofisticati di difesa, quelli procarioti hanno selezionato meccanismi altrettanto sofisticati per «evaderli»



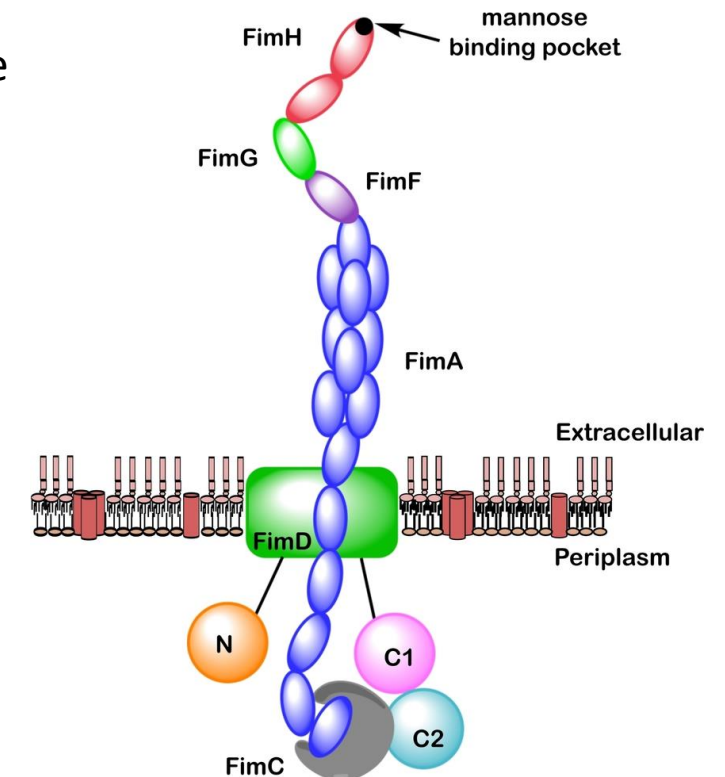
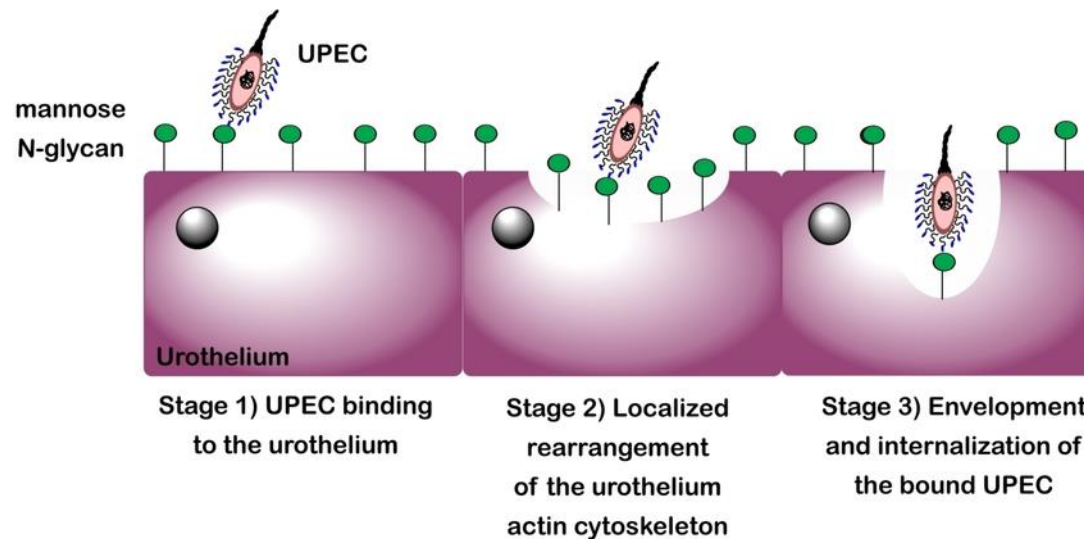
L'insieme dei processi evoluti dai microrganismi che permettono loro di sfuggire alle difese dell'ospite viene definita «**evasione immune**»

Quali sono le contromosse dei batteri patogeni per fuorviare e contrastare i meccanismi di difesa immunitari degli organismi ospiti?

Evazione dalla difesa delle barriere della cellula ospite

Meccanismi di **adesione** e **invasione** batterica delle mucose rappresentano una «contromossa» dei patogeni per contrastare alcune delle barriere fisiche che proteggono l'ospite.

- Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) → colonizza le basse e le alte vie urinarie. Sono dotati di sistemi di adesione che gli permettono di aderire alle superfici dell'**epitelio urinario** e sostenere la pressione del flusso di urina.



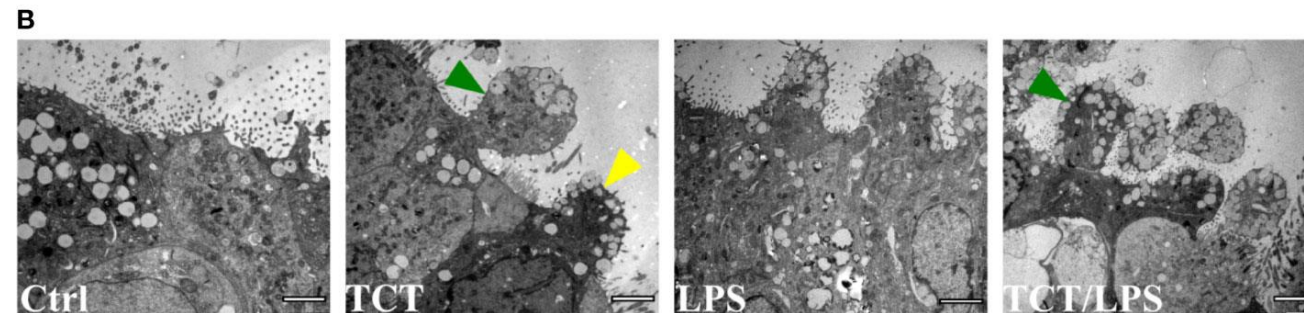
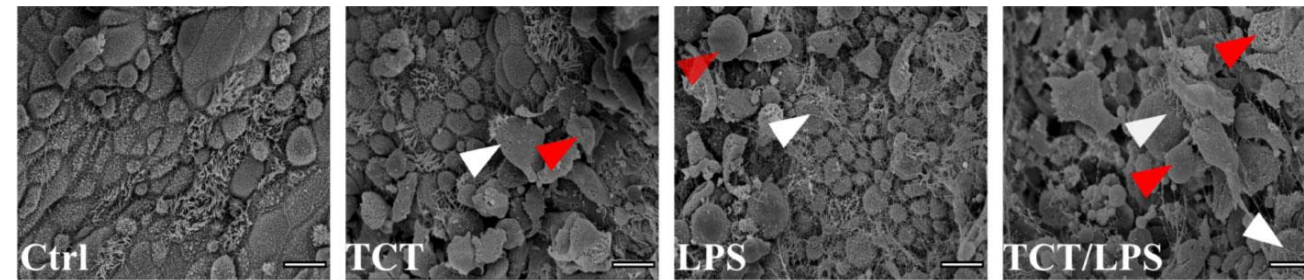
Hatton et al., 2020

Evasione dalla difesa delle barriere della cellula ospite

Meccanismi di **adesione** e **invasione** batterica delle mucose rappresentano una «contromossa» dei patogeni per contrastare alcune delle barriere fisiche che proteggono l'ospite.

- ***Bordetella pertussis*** → contrasta il meccanismo di difesa dell'ospite del **movimento ciliare** producendo la citotossina tracheale (**TCT**, tracheal cytotoxin), basata su frammenti di peptidoglicano, che, grazie alle sue proprietà immunostimolanti, determina la produzione di IL-1 e di ossido nitrico (NO). Entrambe le molecole provocano la morte delle cellule epiteliali delle alte vie respiratorie e conseguente vantaggio per la colonizzazione batterica.

Modello di mucosa tracheobronchiale umana trattato con TCT e/o LPS

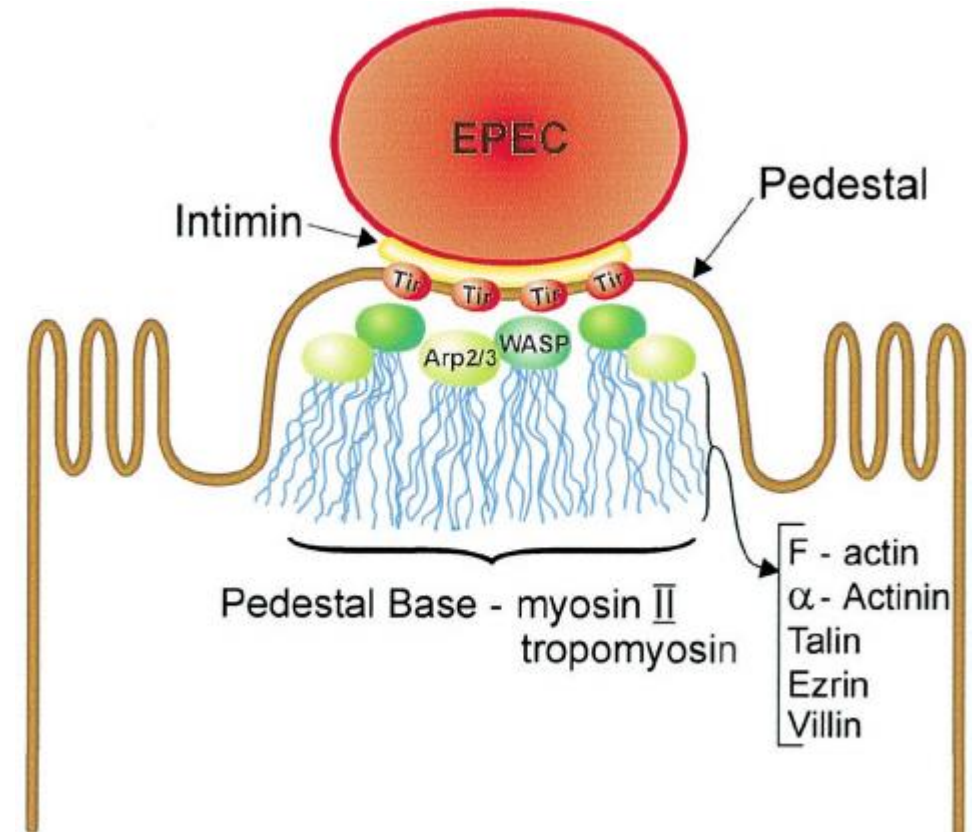


Kessie et al., 2020

Evasione dalla difesa delle barriere della cellula ospite

Meccanismi di **adesione** e **invasione** batterica delle mucose rappresentano una «contromossa» dei patogeni per contrastare alcune delle barriere fisiche che proteggono l'ospite.

- Enteropathogenic *E. coli* (**EPEC**) → sono in grado di manipolare il citoscheletro degli **enterociti** mediante l'iniezione, attraverso il T3SS, della molecola **Tir**, che viene spinta sulla membrana dell'ospite, e l'**intimina**, sulla superficie batterica. L'interazione tra le 2 molecole risulta nella polimerizzazione dell'actina e la formazione di una struttura a «piedistallo» che permette al batterio di allontanarsi dalla mucosa intestinale, difesa sia dal punto di vista umorale che da popolazioni immunocompetenti

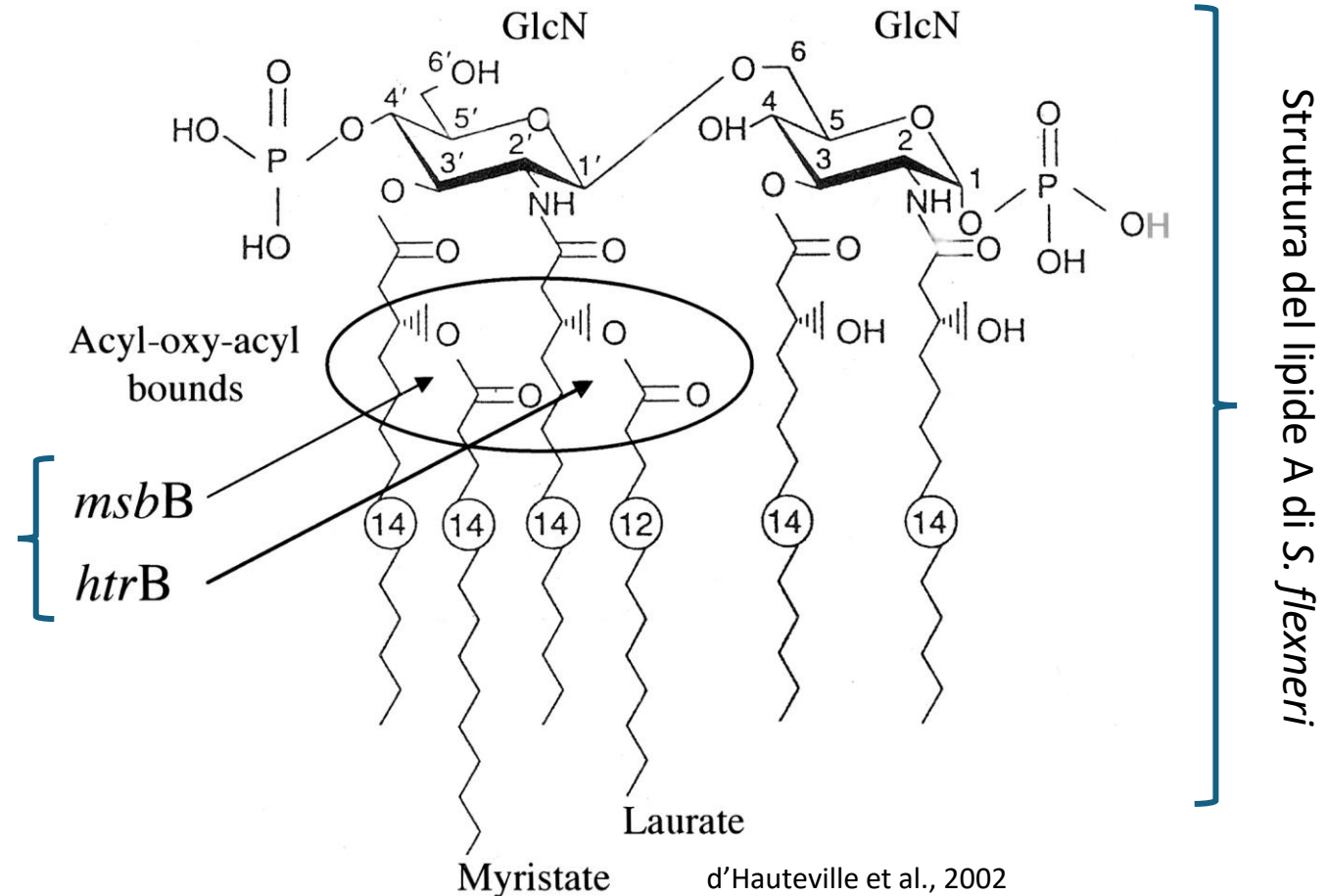


Evasione dalla difesa delle barriere della cellula ospite

Esempio in cui l'infiammazione nelle fasi iniziali dell'infezione potrebbe, in certe condizioni, risultare vantaggiosa per il patogeno stesso.

➤ *Shigella flexneri*

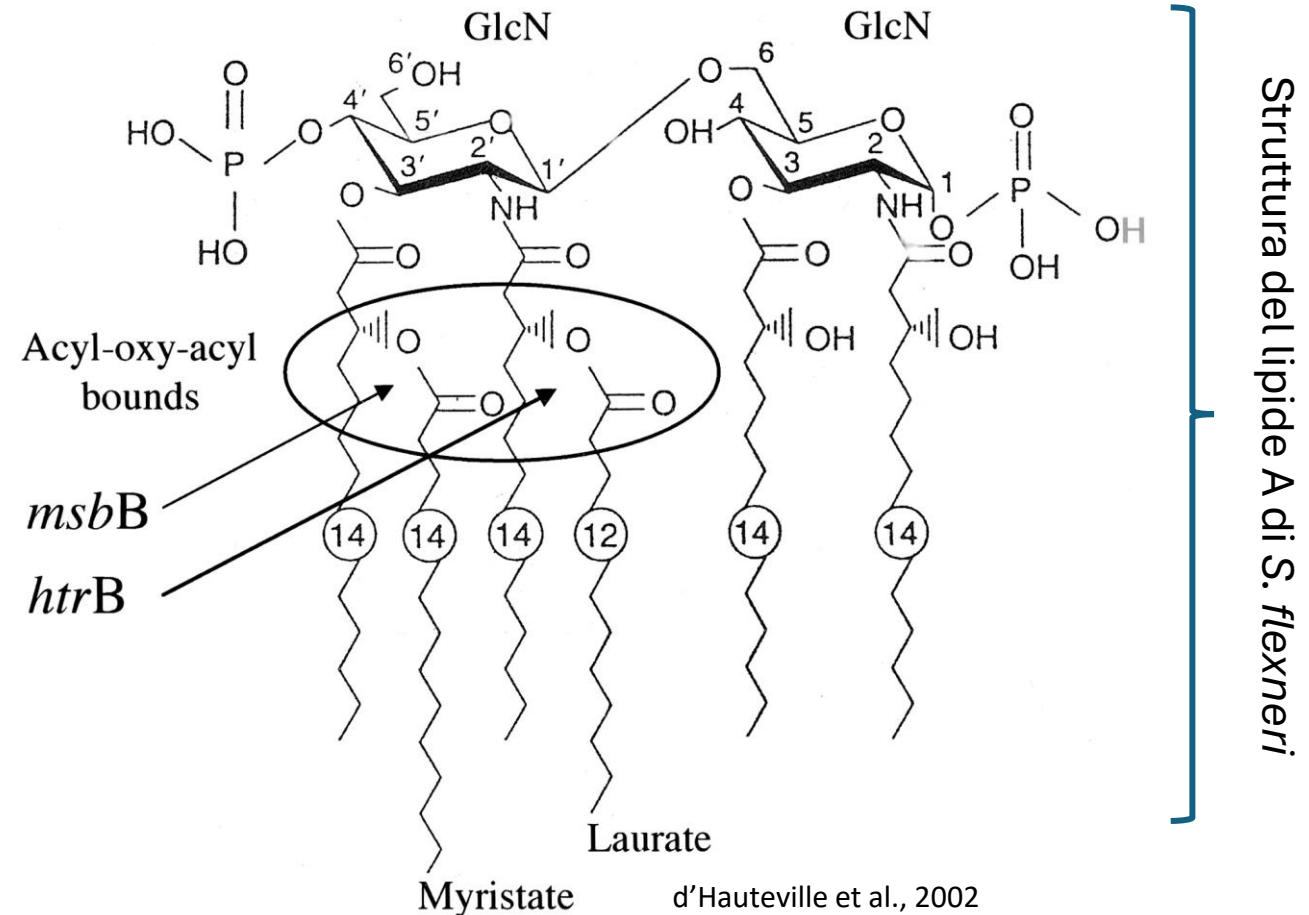
htrB e **msbB** sono responsabili degli ultimi due passaggi della biosintesi del **lipide A**, durante i quali vengono aggiunti gli acidi grassi laurico (C12) e miristico (C14) a due degli acidi 3-OH-miristici presenti.



Evasione dalla difesa delle barriere della cellula ospite

Esempio in cui l'infiammazione nelle fasi iniziali dell'infezione potrebbe, in certe condizioni, risultare vantaggiosa per il patogeno stesso.

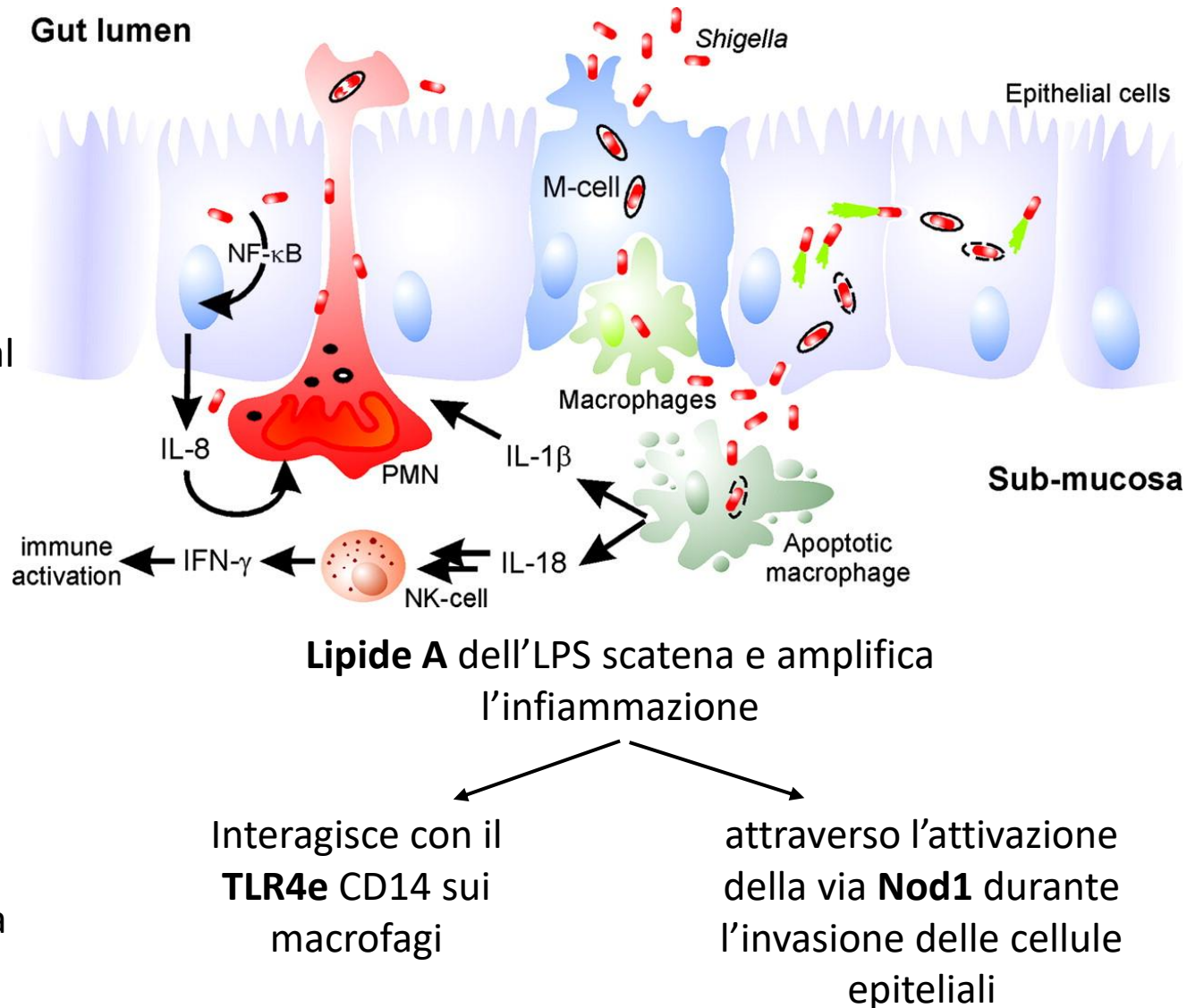
- ***Shigella flexneri*** → Possiede due geni msbB: **msbB1**, situato sul cromosoma, e **msbB2**, localizzato sul plasmide di virulenza. Agiscono in modo complementare per completare l'acilossiacilazione del miristato nella posizione 3' del disaccaride di glucosamina del lipide A.



d'Hauteville et al., 2002

Processo invasivo di *Shigella*

- Ingresso del batterio → I batteri attraversano la barriera epiteliale intestinale, soprattutto tramite le cellule M dell'epitelio associato ai follicoli.
- Invasione dei **macrofagi** → I batteri invadono i macrofagi residenti, che vanno incontro ad apoptosi mediata da IpaB tramite attivazione di caspasi-1.
- **Infiammazione** precoce → L'apoptosi dei macrofagi porta al rilascio di IL-1 β che provoca una forte risposta infiammatoria → aumento della permeabilità epiteliale → facilitazione della traslocazione batterica.
- Invasione epiteliale profonda → I batteri sopravvissuti invadono le **cellule epiteliali** dalla parte basolaterale e si diffondono da cellula a cellula.
- **Attivazione immunitaria** intracellulare → Il LPS batterico all'interno delle cellule epiteliali attiva NF- κ B tramite la via Nod1-dipendente. Le cellule producono citochine e chemochine proinfiammatorie es. IL-8 → induce un massiccio afflusso di neutrofili (PMN), che contribuisce alla distruzione della mucosa.

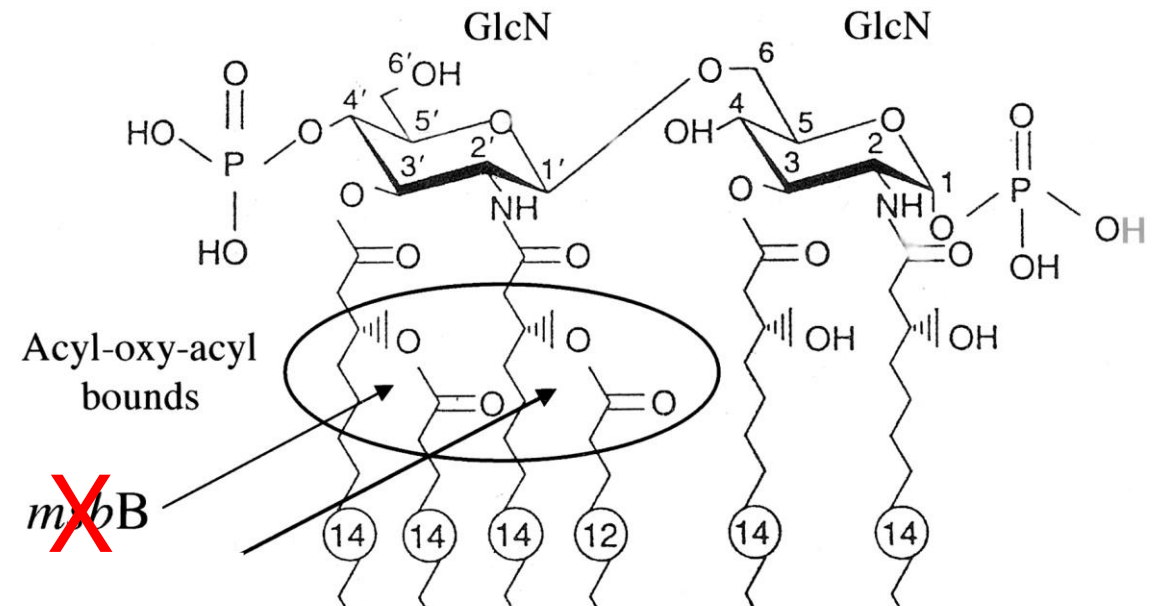


Evasione dalla difesa delle barriere della cellula ospite

Esempio in cui l'infiammazione nelle fasi iniziali dell'infezione potrebbe, in certe condizioni, risultare vantaggiosa per il patogeno stesso.

Un mutante privo di entrambi i geni **msbB1** e **msbB2** mostra una ridotta capacità di indurre la produzione di **TNF- α** da parte dei monociti umani e di causare la rottura e distruzione infiammatoria della barriera epiteliale nel modello intestinale di coniglio per la shigellosi.

importanza dell'acilazione del **lipide A** nella patogenicità, in quanto l'aumento dell'endotossicità correla con la capacità proinfiammatoria e distruttiva di *Shigella*



TNF- α è un mediatore chiave della distruzione epiteliale causata da *Shigella* → neutralizzazione del TNF- α durante l'infezione con il wt riduce drasticamente la capacità del batterio di danneggiare l'epitelio

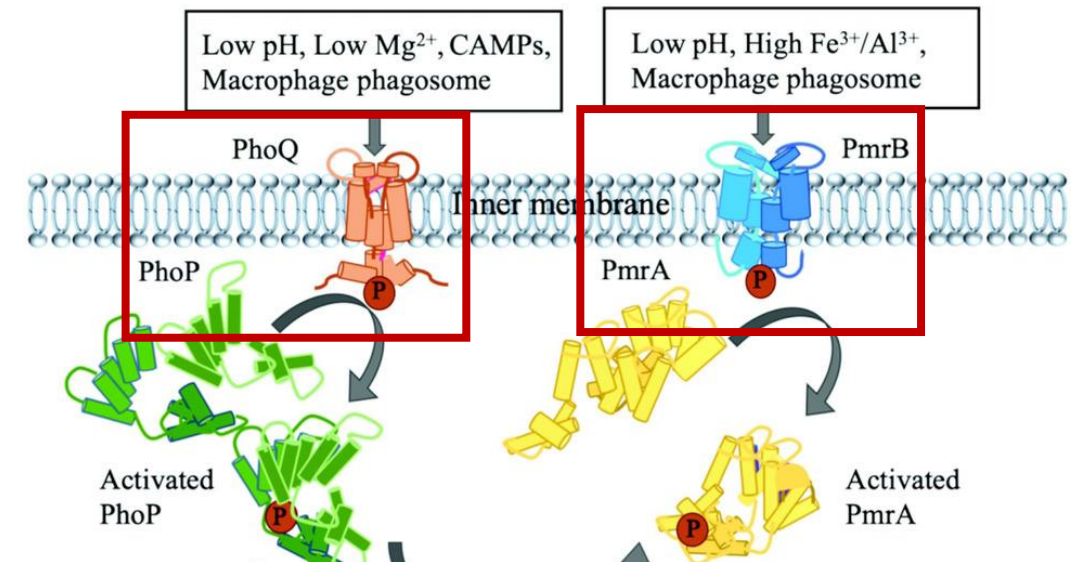
«Camuffamento»

In risposta al riconoscimento da parte del sistema immunitario innato di strutture/complessi molecolari batterici (PAMPs) mediante i PRRs, i microrganismi hanno evoluto varie strategie per «rendersi meno riconoscibili» dal sistema immunitario

➤ *Salmonella enterica* Typhimurium

I sistemi di segnalazione a due componenti **PhoP-PhoQ** e **PmrA-PmrB** sono regolatori centrali della virulenza batterica.

La loro capacità di monitorare l'ambiente e modificare di conseguenza la struttura della parete cellulare consente ai batteri di adattarsi alle condizioni specifiche durante l'infezione



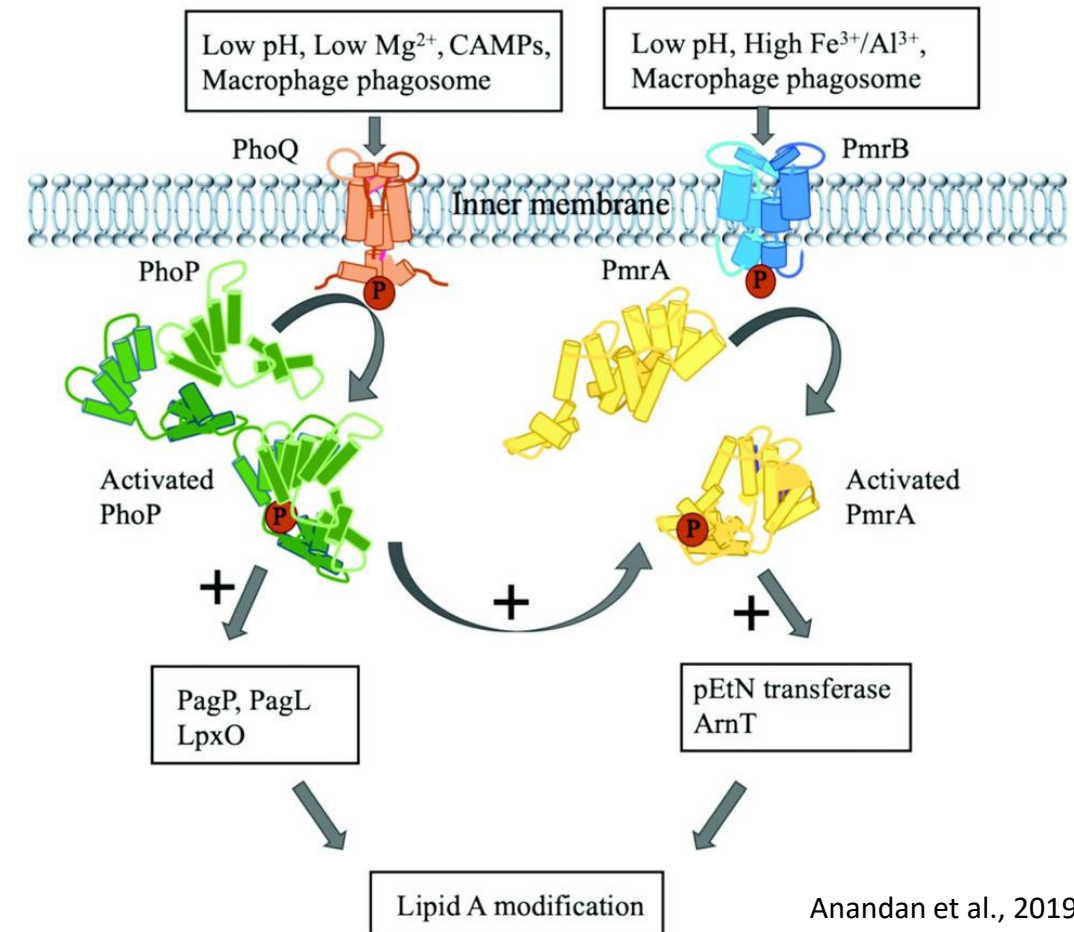
«Camuffamento»

In risposta al riconoscimento da parte del sistema immunitario innato di strutture/complessi molecolari batterici (PAMPs) mediante i PRRs, i microrganismi hanno evoluto varie strategie per «rendersi meno riconoscibili» dal sistema immunitario

- ***Salmonella enterica* Typhimurium** → è in grado di modificare il grado di acilazione del lipide A contenuto negli LPS modulando il riconoscimento da parte dell'ospite.

PagL → 3-O-deacetilasi
PagP → palmitoleil transferasi

Enzimi che mediano modificazioni del lipide A, cambiandone la struttura e riducendone il potenziale immunogenico ovvero ridotta attivazione del TLR4

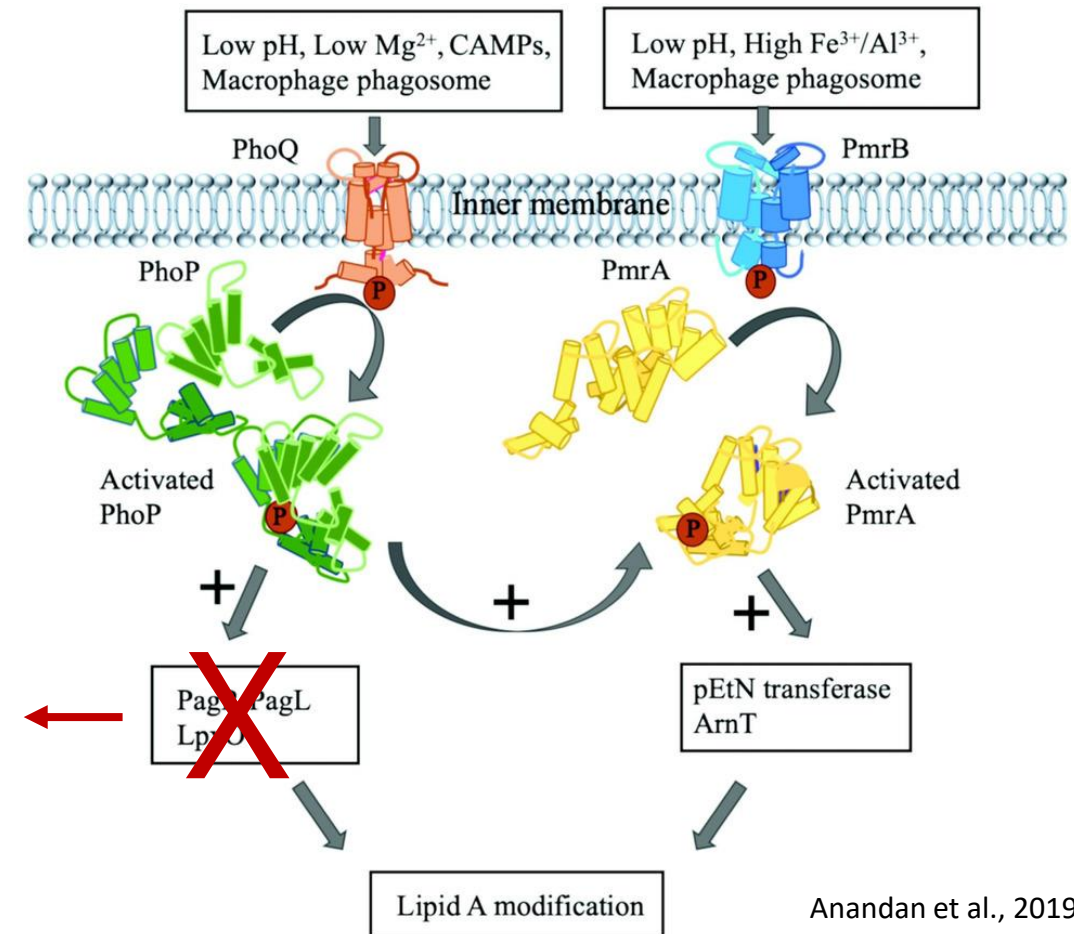


«Camuffamento»

In risposta al riconoscimento da parte del sistema immunitario innato di strutture/complessi molecolari batterici (PAMPs) mediante i PRRs, i microrganismi hanno evoluto varie strategie per «rendersi meno riconoscibili» dal sistema immunitario

- ***Salmonella enterica* Typhimurium** → è in grado di modificare il grado di acilazione del lipide A contenuto negli LPS modulando il riconoscimento da parte dell'ospite.

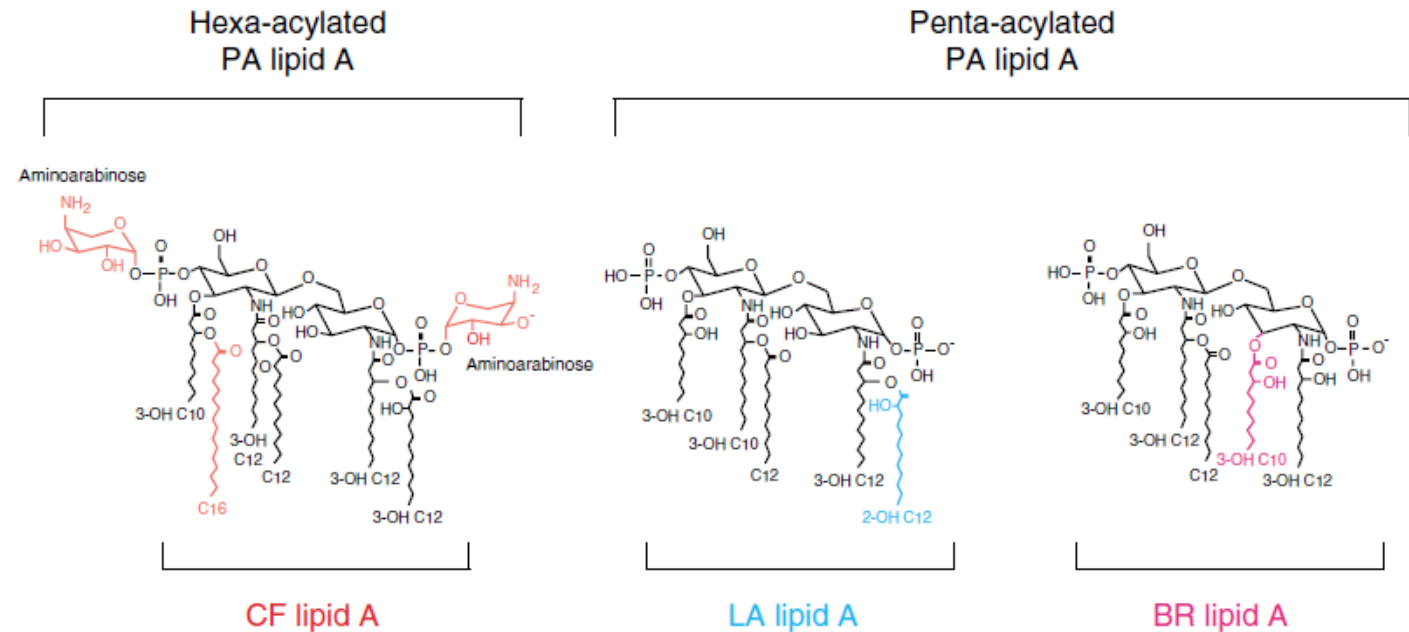
$\Delta pagP \Delta pagL$ maggiormente soggetti all'azione di peptidi antimicrobici prodotti dall'ospite



«Camuffamento»

In risposta al riconoscimento da parte del sistema immunitario innato di strutture/complessi molecolari batterici (PAMPs) mediante i PRRs, i microrganismi hanno evoluto varie strategie per «rendersi meno riconoscibili» dal sistema immunitario

- *Pseudomonas aeruginosa* → modifica la struttura dell'**LPS** durante l'invasione dei tessuti dell'ospite per resistere all'uccisione da parte del sistema immunitario innato e mantenere l'integrità della membrana esterna



«Camuffamento»

In risposta al riconoscimento da parte del sistema immunitario innato di strutture/complessi molecolari batterici (PAMPs) mediante i PRRs, i microrganismi hanno evoluto varie strategie per «rendersi meno riconoscibili» dal sistema immunitario

➤ *Pseudomonas aeruginosa*

- Ceppi che sostengono infezione cronica dei polmoni di pazienti di fibrosi cistica mostrano spesso una struttura del lipide A epta-acilata con scarso potere infiammatorio → questo favorisce la permanenza del batterio nelle vie aeree del malato
- Ceppi isolati da infezioni acute mostrano una miscela di lipide A penta-acilata e esa-acilata, altamente infiammatorio.

Cambiamento delle strutture di superficie

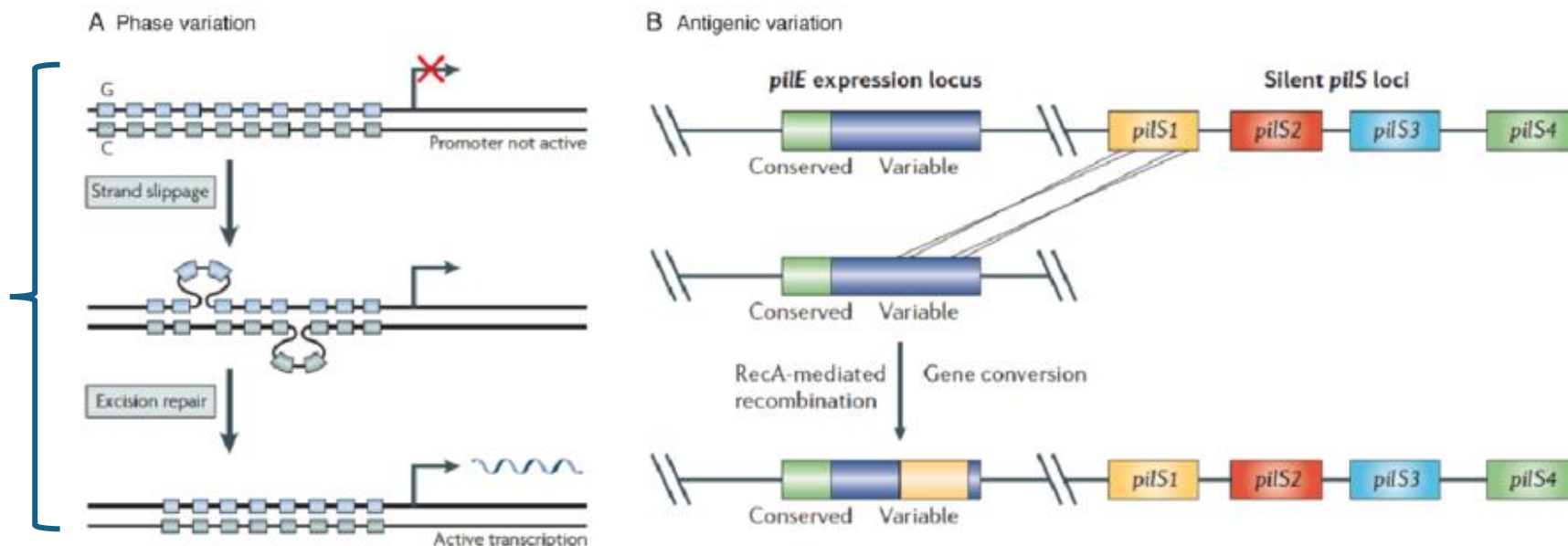
Molte delle componenti proteiche e non-proteiche presenti sulla superficie agiscono come antigeni stimolando una risposta anticorpale nell'ospite. Molti patogeni che vivendo sulle superficie delle mucose sono maggiormente visibili al sistema immunitario, hanno sviluppato meccanismi per:

- Spegner l'espressione di alcune di queste componenti → **variazione di fase**
- Cambiare la struttura di questi elementi → **variazione antigenica**

Esempio di controllo trascrizionale dell'espressione genica tramite variazione di fase.

La regione del promotore contiene ripetizioni corte che possono essere eliminate durante la replicazione o la riparazione del DNA provocando il passaggio del gene da una fase "off" a una fase "on".

Adattato da Deitsch et al., 2009



Variazione antigenica

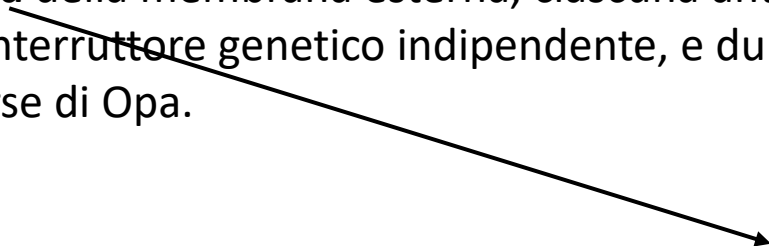
- Meccanismo genetico per eludere la risposta immunitaria umorale e cellulare.
- Consiste in variazioni casuali a livello del DNA di un batterio, che sono stabilmente ereditati dalla progenie e spesso reversibili.
- Si riferisce a un singolo ceppo che modifica specificamente una parte dei propri antigeni, sia per mantenere un'infezione in corso, sia per reinfectare l'ospite anche se la prima infezione è stata efficacemente eliminata.
- Come conseguenza genera popolazioni eterogenee di un determinato ceppo microbico.
- I meccanismi molecolari utilizzati dai patogeni batterici per causare variazione antigenica si basano su una delle tre strategie:
 1. Possedere più copie diverse di una molecola, ciascuna controllata da un interruttore on/off indipendente;
 2. Avere un singolo locus di espressione e molte copie silenti del gene, cambiando continuamente quale gene viene espresso;
 3. Avere una regione altamente variabile all'interno di una molecola, che cambia costantemente.

Variazione antigenica in *Neisseria*

Le specie di *Neisseria* (che causano meningite e gonorrea) sono forse i migliori modelli batterici di variazione antigenica, poiché utilizzano tutti e tre i meccanismi, il che spiega anche perché lo sviluppo di un vaccino contro questi organismi non ha avuto successo.

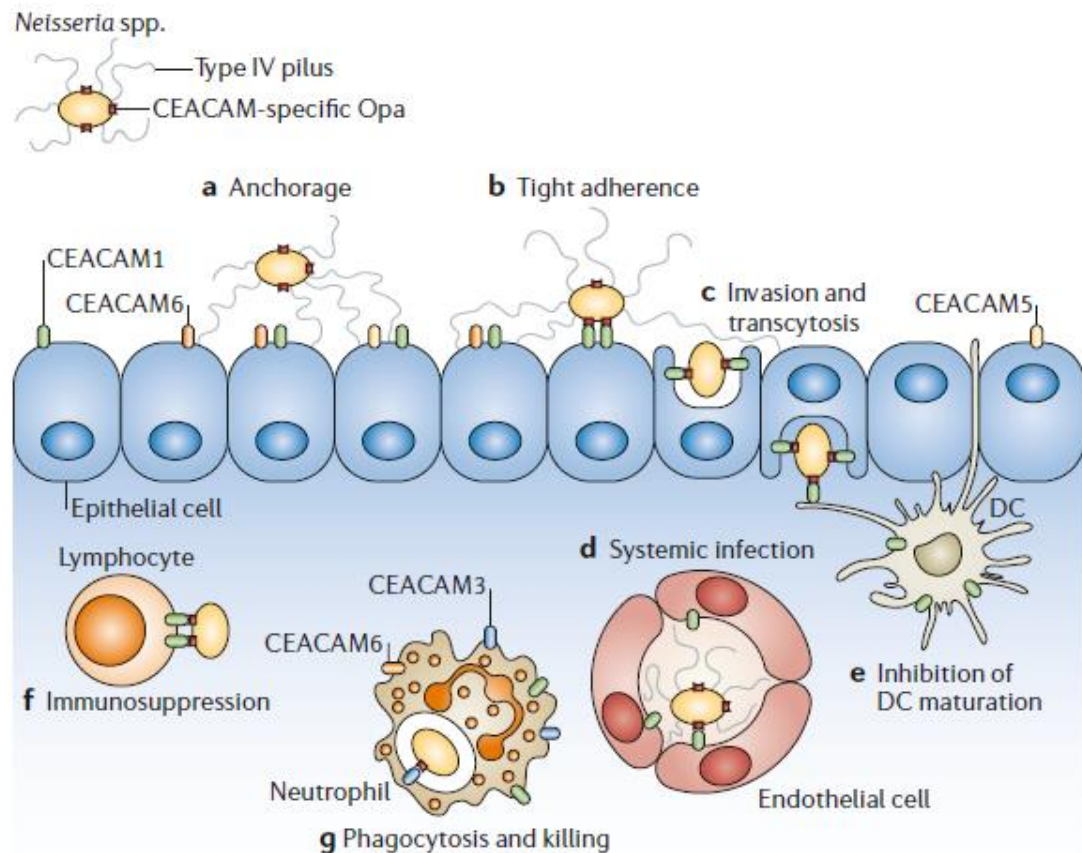
1. *più copie di una molecola, ciascuna controllata da un interruttore on/off indipendente*

Neisseria gonorrhoeae, patogeno a trasmissione sessuale che causa infezioni urogenitali, possiede 10–11 proteine **Opa** della membrana esterna, ciascuna antigenicamente diversa. Ogni gene Opa è controllato da un interruttore genetico indipendente, e durante l'infezione possono essere espresse combinazioni diverse di Opa.



proteine Opa si legano ai recettori della famiglia CD66, noti anche come CEACAM (carcinoembryonic antigen–related cellular adhesion molecules). L'interazione Opa-CEACAM dà inizio all'engulfment del patogeno.

Variazione antigenica in *Neisseria*



Gray-Owen and Blumberg, 2006

Neisseria gonorrhoeae sfrutta la capacità immunosoppressiva di **CEACAM1**.

Nonostante la gonorrea sintomatica sia caratterizzata da una forte infiammazione con neutrofili, la risposta immunitaria specifica (anticorpi e citochine) è molto debole e non si sviluppa memoria immunologica. Questa scarsa risposta immunitaria è dovuta all'espressione di varianti Opa specifiche per CEACAM da parte dei gonococchi.

Queste varianti si legano a CEACAM1

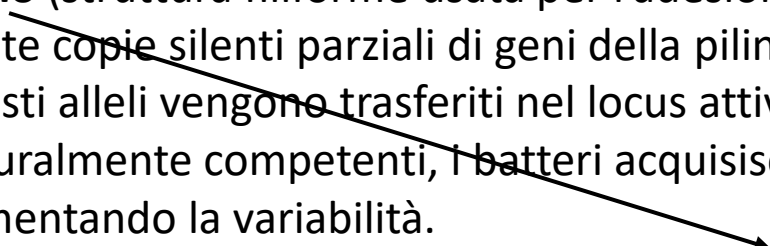
- sui **linfociti T** CD4+ umani e sopprimono la loro attivazione e proliferazione;
- sui **linfociti B** portando alla morte cellulare e alla riduzione della produzione di immunoglobuline;
- Sulle **cellule dendritiche** (DC) inibendo la capacità delle DC di presentare antigeni e stimolare la proliferazione linfocitaria.

Variazione antigenica in *Neisseria*

Le specie di *Neisseria* (che causano meningite e gonorrea) sono forse i migliori modelli batterici di variazione antigenica, poiché utilizzano tutti e tre i meccanismi, il che spiega anche perché lo sviluppo di un vaccino contro questi organismi non ha avuto successo.

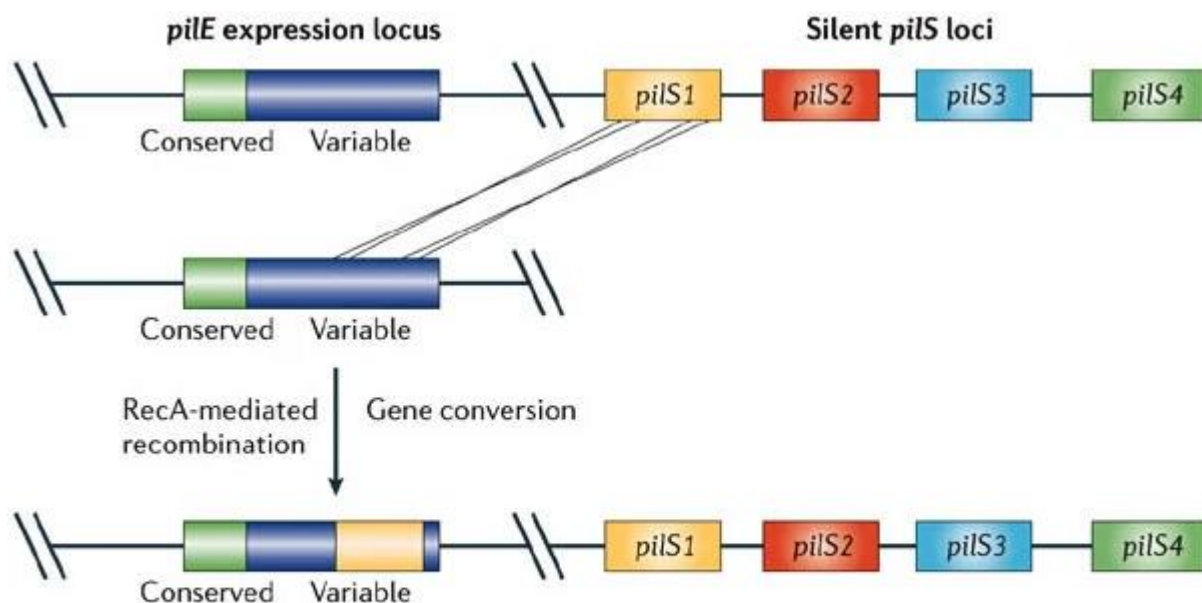
2. *Avere un singolo locus di espressione e molte copie silenti del gene, cambiando continuamente quale gene viene espresso;*

Il **pilo** (struttura filiforme usata per l'adesione) è espresso nel locus ***pilE***, ma il batterio possiede molte copie silenti parziali di geni della pilina nei loci ***pilS***. Attraverso ricombinazione genetica, questi alleli vengono trasferiti nel locus attivo, generando pili antigenicamente variabili. Essendo naturalmente competenti, i batteri acquisiscono nuove sequenze geniche e le integrano nei loci ***pilS***, aumentando la variabilità.



Pilo di tipo IV media diverse funzioni cellulari, tra cui la motilità di superficie, la formazione di microcolonie e biofilm, l'adesione alla cellula ospite e la segnalazione cellulare, formazione di biofilm, uptake di DNA per trasformazione naturale e attacco dei fagi.

Variazione antigenica in *Neisseria*



Copyright © 2006 Nature Publishing Group
Nature Reviews | Microbiology

I pili dei meningococchi sono formati da migliaia di subunità di pilina (**PilE**) assemblate in lunghe fibre. La proteina PilE ha una regione N-terminale conservata e una regione C-terminale variabile, quest'ultima responsabile della antigenicità dei pili. La regione variabile deriva da un trasferimento non reciproco di DNA da uno dei molti loci silenti *pilS* al locus di espressione *pilE*. Questi loci *pilS* si trovano anche a centinaia di basi di distanza da *pilE*, e donano brevi tratti di sequenza tramite omologia parziale. Il meccanismo genetico avviene attraverso una conversione genica che richiede la proteina RecA e diversi eventi di ricombinazione (crossover).

Variazione antigenica in *Neisseria*

Le specie di *Neisseria* (che causano meningite e gonorrea) sono forse i migliori modelli batterici di variazione antigenica, poiché utilizzano tutti e tre i meccanismi, il che spiega anche perché lo sviluppo di un vaccino contro questi organismi non ha avuto successo.

3. *Avere una regione altamente variabile all'interno di una molecola, che cambia costantemente;*

Neisseria meningitidis mostra variazione di fase nella struttura del lipooligosaccaride (**LOS**), simile al LPS, tramite modifica delle strutture zuccherine terminali. Può esprimere fino a 13 immunotipi diversi, variando l'espressione di geni della biosintesi dei carboidrati. Ad esempio, l'attività della glicosiltransferasi è regolata da slipped-strand mispairing, portando all'incorporazione di zuccheri diversi nel LOS (Kahler e Stephens, 1998).



A differenza dei lipopolisaccaridi (LPS) dei batteri enterici, *Neisseria* esprime un lipooligosaccaride (**LOS**), che non possiede la catena laterale O-antigenica tipica degli LPS. Il LOS agisce come fattore di virulenza, poiché lipide A è riconosciuta dal complesso recettoriale TLR-4/MD2 delle cellule dell'ospite, attivando così la risposta immunitaria innata.

Meccanismo antimicrobico della fagocitosi

I **fagociti** professionali, come macrofagi, neutrofili e cellule dendritiche, sono specializzati nell'inglobare particelle di grandi dimensioni ($\geq 0,5 \mu\text{m}$), tra cui i microrganismi.

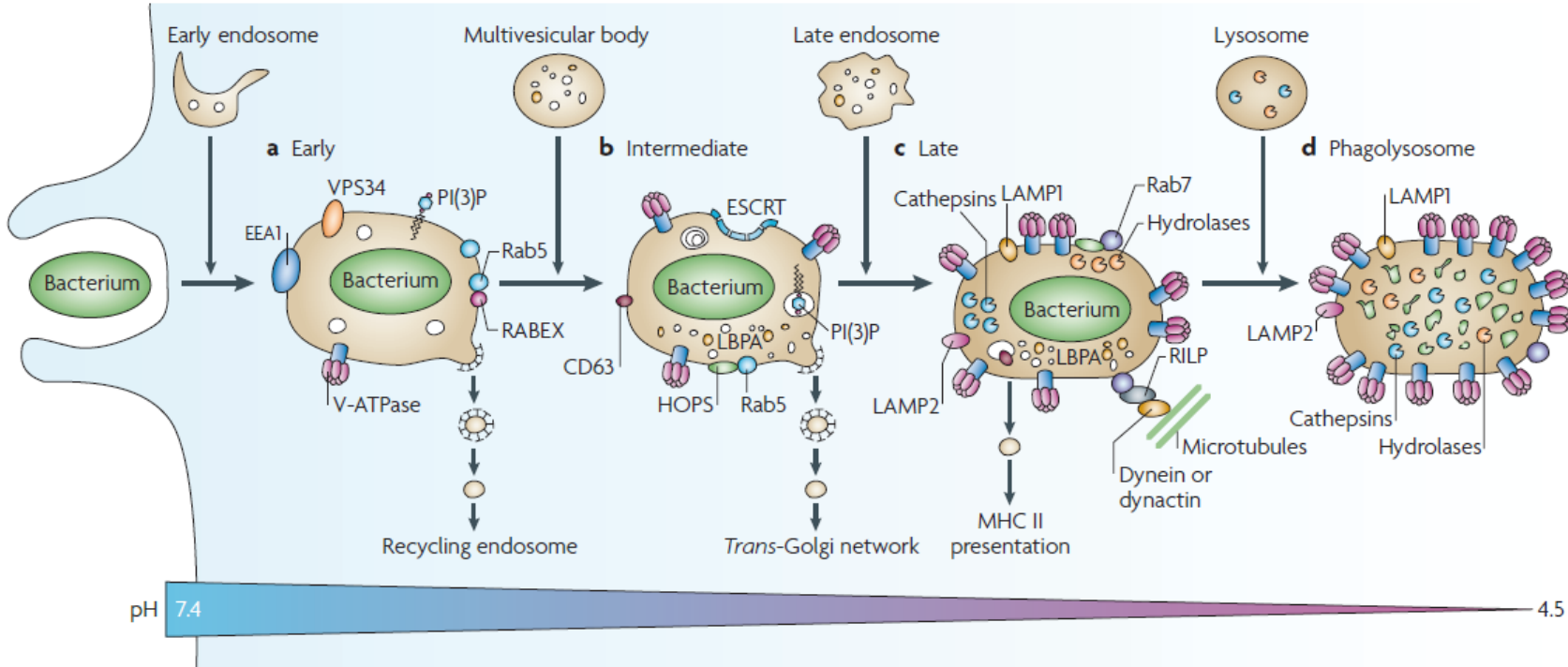
Questa capacità è fondamentale per la **risposta immunitaria** innata e per stimolare la risposta adattativa tramite la presentazione dell'antigene.

Dopo la fagocitosi, i microrganismi vengono intrappolati in un vacuolo chiamato **fagosoma**, che deriva dalla membrana plasmatica. Tuttavia, affinché il fagosoma acquisisca capacità microbicide e degradative, deve subire una trasformazione nota come maturazione fagosomiale, attraverso una serie coordinata di eventi di fusione con compartimenti dell'apparato endocitico.

Quindi, una **fagocitosi** efficace richiede due fasi essenziali:

1. Internalizzazione del patogeno
2. Maturazione del fagosoma

Formazione e maturazione del fagosoma



Flannagan et al., 2009

La maturazione del fagosoma inizia immediatamente dopo la sua chiusura.

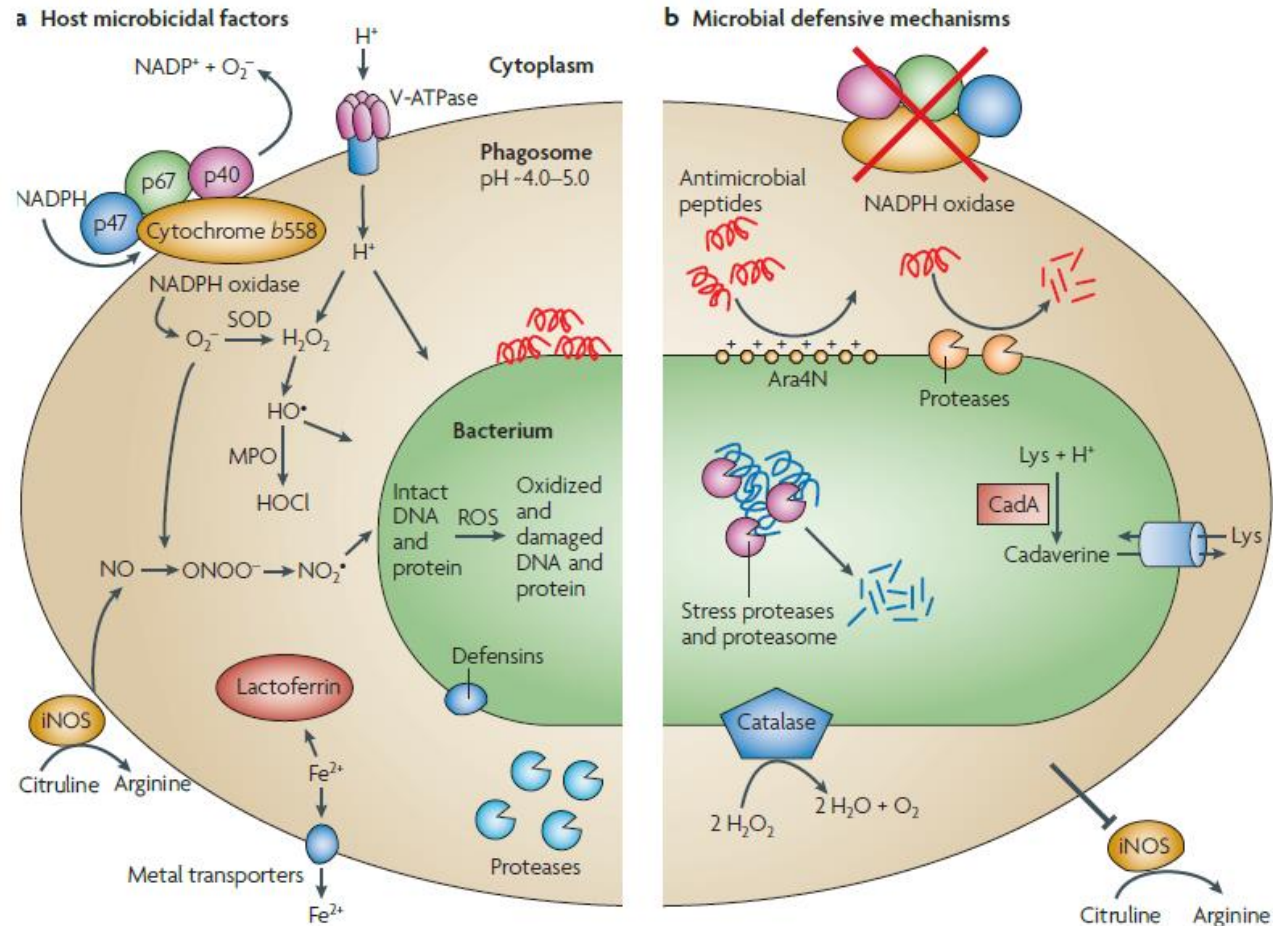
Dopo essere stato separato dalla superficie cellulare, il fagosoma si fonde con endosomi precoci, endosomi tardivi e lisosomi.

La membrana del fagosoma viene rimodellata, e il contenuto interno subisce profondi cambiamenti, diventando acido, ossidativo e degradativo.

Questi processi portano alla formazione del **fagolisosoma**, che rappresenta lo stadio finale della maturazione del fagosoma.

Arsenale microbicide dei fagociti vs meccanismi difensivi dei microrganismi

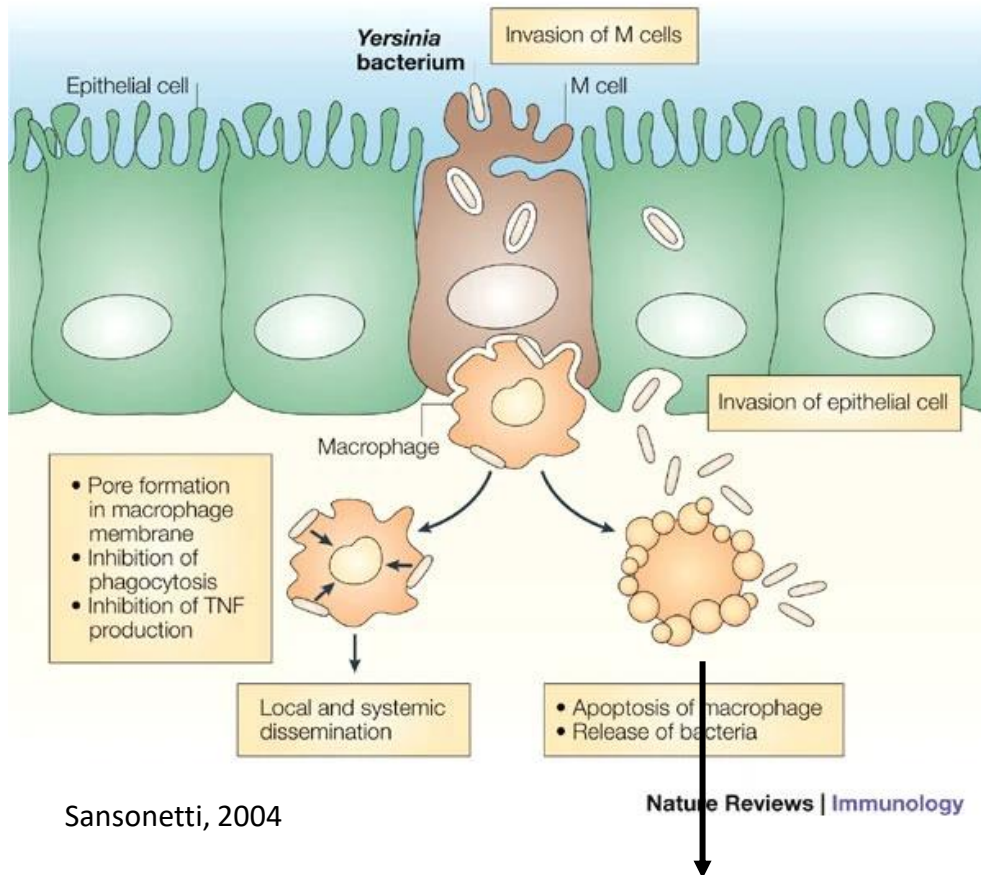
- **Acidificazione del fagosoma:** abbassa il pH per ostacolare la sopravvivenza microbica.
- Specie reattive dell'ossigeno (**ROS**) e dell'azoto (**RNS**): danneggiano proteine, lipidi e DNA dei patogeni.
- **Enzimi litici:** come proteasi e nucleasi che degradano le componenti batteriche.
- **Peptidi antimicrobici:** come le defensine, che alterano le membrane microbiche.
- **Privazione di nutrienti:** sottrazione di ferro o zinco essenziali per il metabolismo del patogeno.



- Inibizione della fusione fagosoma-lisosoma (es. *Mycobacterium tuberculosis*).
- Resistenza all'ambiente acido o ossidativo.
- Produzione di enzimi antiossidanti, come catalasi o superossido dismutasi.
- Evasione dal fagosoma verso il citoplasma (es. *Listeria monocytogenes*).
- Formazione di capsule o biofilm che impediscono il riconoscimento e la fagocitosi.

Strategie per prevenire la cattura dai fagociti o modificare gli endosomi

Yersinia

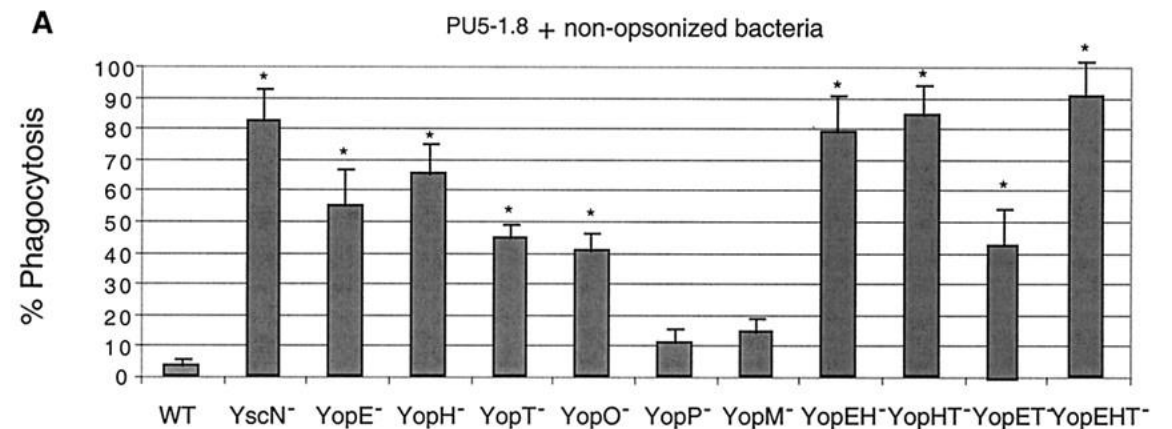


Se fagocitati inducono l'apoptosi delle cellule ospiti in modo dipendente da **YopP**

Yersinia enterocolitica e *Yersinia pseudotuberculosis* iniettano nei macrofagi, mediante il T3SS, effettori che disorganizzano il citoscheletro ostacolando l'internalizzazione dei batteri da parte di questa popolazione cellulare.

YopE → promuove la distruzione dei filamenti di actina

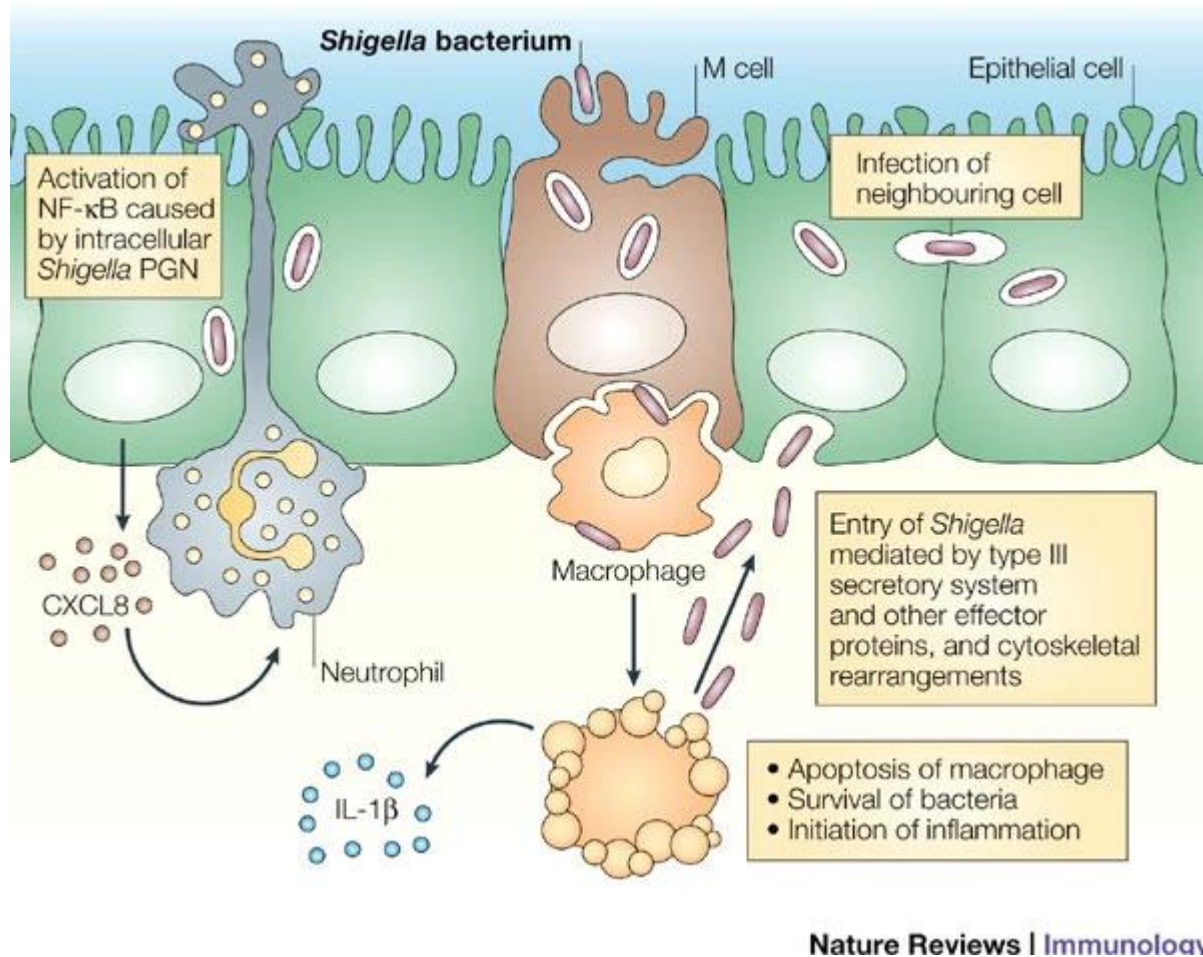
YopH → destabilizza le placche di adesione focale



Modified from Grosdent et al., 2002

Strategie per prevenire la cattura dai fagociti o modificare gli endosomi

Shigella



Shigella spp. garantisce la propria sopravvivenza inducendo apoptosi di macrofagi e monociti, tramite l'attivazione della caspasi-1 mediata da **IpaB**.
Infiammazione mucosale precoce in seguito al rilascio di:

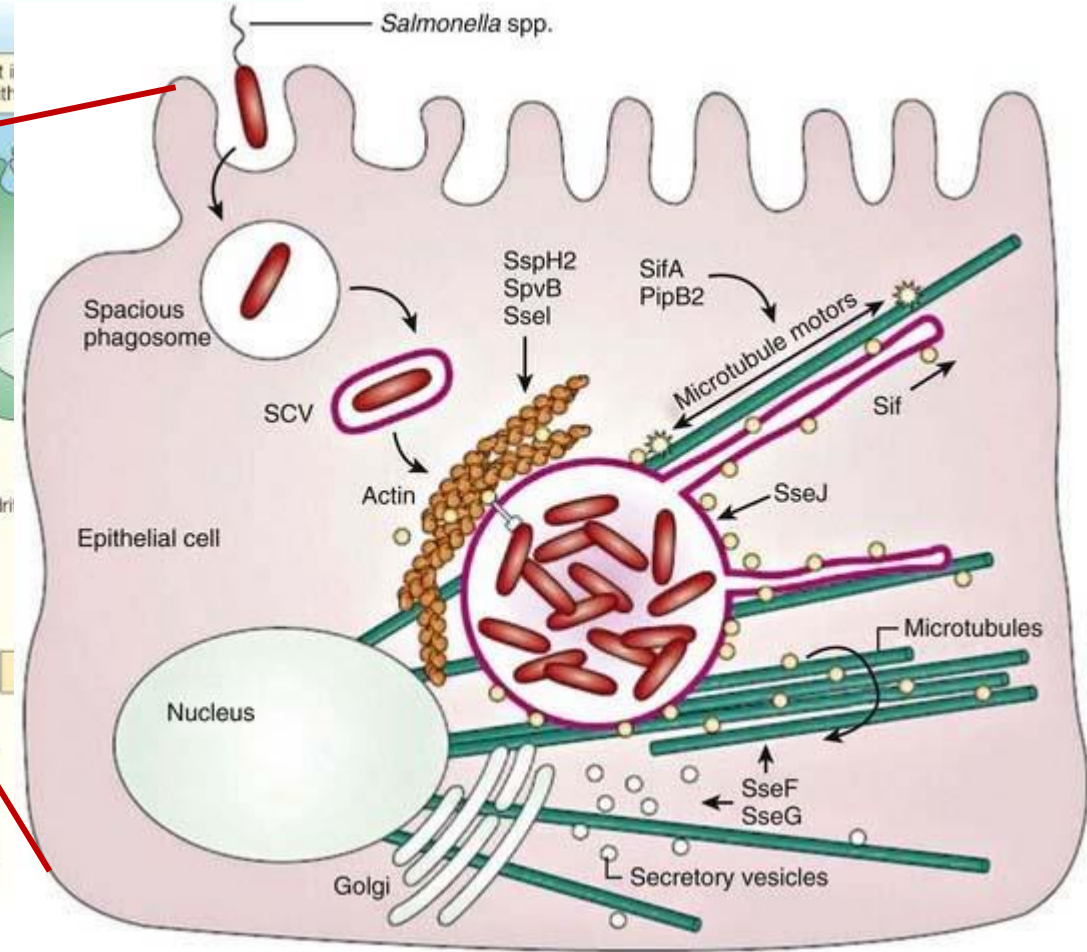
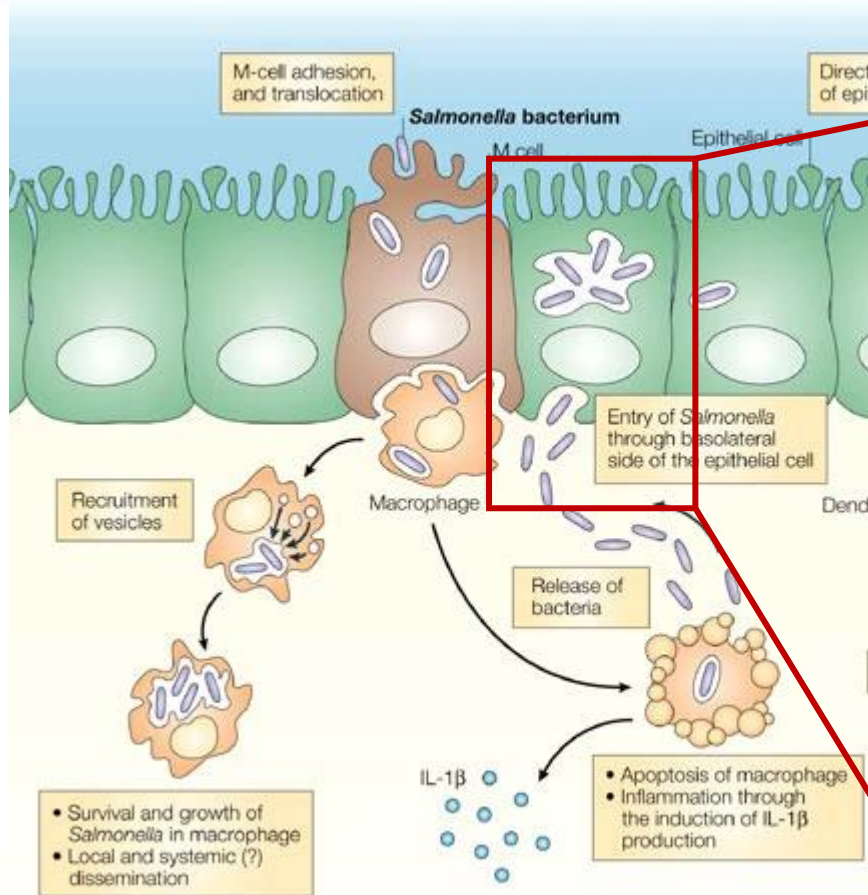
- **IL-1 β** $\rightarrow$ favorisce l'invasione batterica distruggendo la barriera epiteliale
- **IL-18** $\rightarrow$ aiuta il controllo dell'infezione in quanto stimola la produzione di interferone- γ e richiama i neutrofili che rispondono producendo elastasi (degrada le proteine di virulenza es. Ipa e IcsA), e intrappolando i batteri tramite NETs (trappole extracellulari formate da DNA e molecole antimicrobiche).

Per sopravvivere a queste difese, *Shigella* invade le cellule epiteliali e si diffonde da cellula a cellula, evitando così l'esposizione ai fagociti $\rightarrow$ distruzione epiteliale tipica della shigellosi.

Strategie per prevenire la cattura dai fagociti o modificare gli endosomi

Salmonella

Modifica il fagosoma a proprio vantaggio grazie al sistema Spi2 e dei suoi effettori → **SCV** (*Salmonella containing vacuole*)
SifA svolge un ruolo cruciale nel richiamare vescicole per espandere la membrana dello SCV, impedendo così che il vacuolo si rompa o venga convertito in un lisosoma. Questa strategia consente a *Salmonella* di sopravvivere, replicarsi e diffondersi nell'ospite, causando setticemia.



Strategie per prevenire la cattura dai fagociti o modificare gli endosomi

- ***Legionella pneumophila*** → usa il T4SS per modificare il vacuolo, impedendo la fusione fagolisosomale, e trasformando questo ambiente in una nicchia replicative.
- ***Mycobacterium tuberculosis*** → interferisce con l'acidificazione del fagosoma sia attraverso la produzione di ioni ammonio sia attraverso l'esclusione della pompa protonica vescicolare ATP-dipendente. Inoltre, nel fagosoma produce superossido-dismutasi e catalasi che agiscono da intermediari dei ROS. Inoltre blocca la maturazione del fagosoma e impedisce la fusione con il lisosoma.
- ***Pseudomonas aeruginosa*** → mediante le proteine ExoS e ExoT disorganizza il citoscheletro dei macrofagi e ne provoca la morte.
- **EPEC** → inibiscono la fagocitosi nei macrofagi provocando, attraverso del T3SS, una diminuzione dell'attività della fosfatidil(PI)chinasi, necessaria al processo di internalizzazione dei batteri.

IL CONTROLLO DELLE MALATTIE INFETTIVE

Come si effettua?



Misure di igiene ambientale e alimentare

- Potabilizzazione delle acque
- Trattamento delle acque reflue
- Miglioramento delle condizioni abitative
- Miglioramento dell'alimentazione
- Conservazione e trattamento degli alimenti

Interventi a livello di:

- Popolazione → **vaccinazione** contro specifici microrganismi patogeni
- Singolo individuo → **chemioterapia antimicrobica** per controllare l'infezione nel singolo individuo

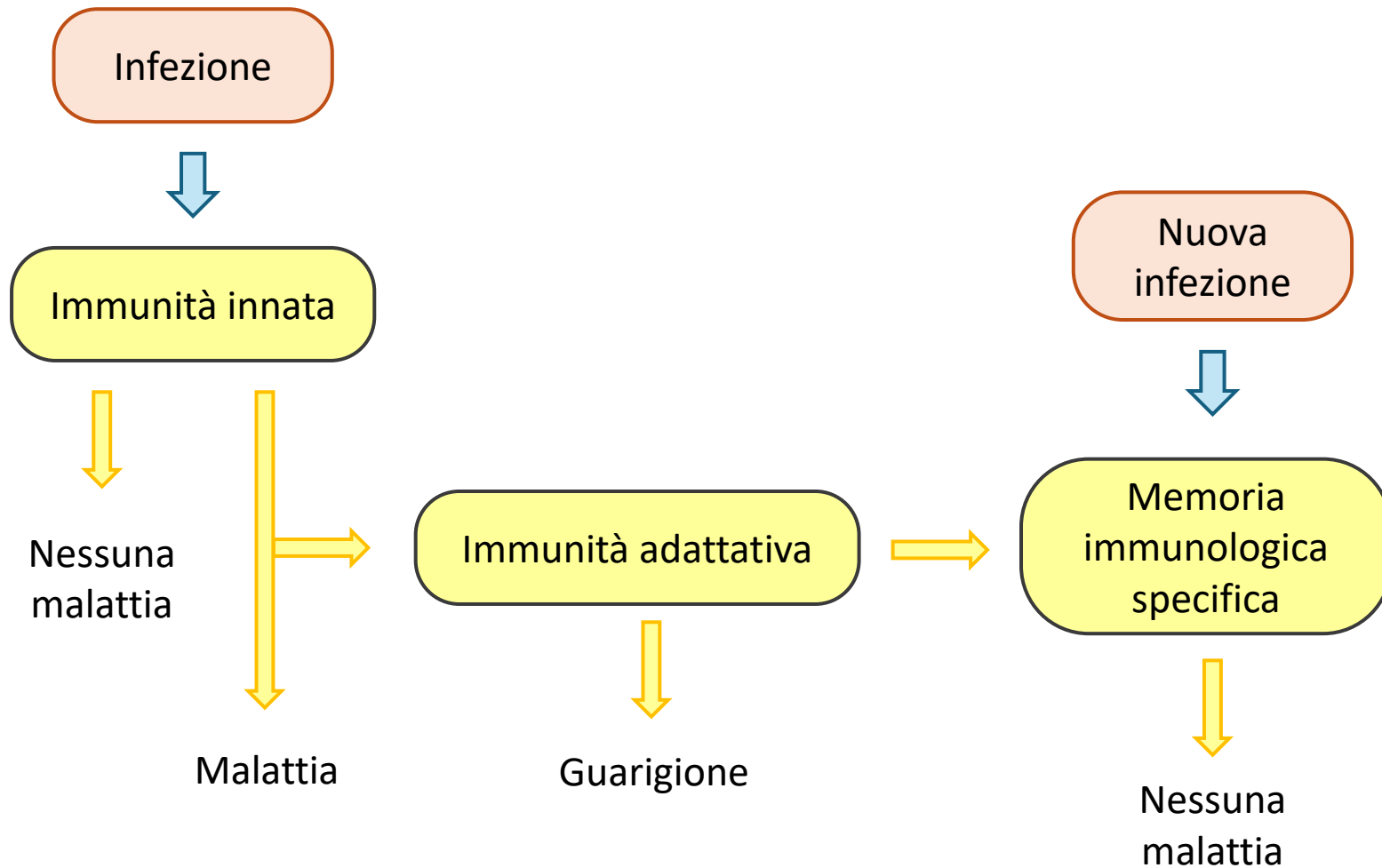
ACCENNI DI VACCINOLOGIA

Cos'è un **vaccino**?

Una sostanza che, attraverso un percorso di **immunizzazione attiva**, è in grado di stimolare il sistema immunitario e produrre una risposta che conferisce protezione (**Immunità**) contro una specifica malattia



ACCENNI DI VACCINOLOGIA



Lo scopo di un vaccino è generare una risposta immunitaria che protegga l'ospite da uno specifico patogeno, di ottenere quindi un'immunità analoga a quella che consegue all'infezione naturale

ACCENNI DI VACCINOLOGIA

Per innescare il processo di immunizzazione attiva che porta alla protezione dalla malattia causata da uno specifico microrganismo, un vaccino deve essere in grado di fornire un'adeguata stimolazione antigenica che si può ottenere inoculando l'ospite con 4 tipi diversi di preparazioni:

1. Microrganismi interi
2. Parti di microrganismi
3. Acidi nucleici (DNA) che codificano per antigeni di microrganismi
4. Vettori transgenici di antigeni ricombinanti

ACCENNI DI VACCINOLOGIA

Per innescare il processo di immunizzazione attiva che porta alla protezione dalla malattia causata da uno specifico microrganismo, un vaccino deve essere in grado di fornire un'adeguata stimolazione antigenica che si può ottenere inoculando l'ospite con 4 tipi diversi di preparazioni:

1. Microrganismi interi

2. Parti di microrganismi

3. Acidi nucleici (DNA) che codificano

Inattivati

Ovvero resi incapaci di riprodursi.
Il microrganismo viene coltivato e poi inattivato con agenti fisici o chimici come il calore o formaldeide.
Per essere efficaci questi vaccini richiedono di solito dosi alte e ripetute.

Vivi attenuati

- Mutanti attenuati dei microrganismi patogeni cioè ceppi con virulenza ridotta.
- Sono vaccini che possono essere usati a dosi basse
- Presentano problemi legati alla sicurezza soprattutto se usati in pazienti immunocompromessi
- Problemi di stabilità poiché si inattivano rapidamente a temperatura ambiente

ACCENNI DI VACCINOLOGIA

Per innescare il processo di immunizzazione attiva che porta alla protezione dalla malattia causata da uno specifico microrganismo, un vaccino deve essere in grado di fornire un'adeguata stimolazione antigenica che si può ottenere inoculando l'ospite con 4 tipi diversi di preparazioni:

1. Microrganismi interi
- 2. Parti di microrganismi**
3. Acidi nucleici (DNA) che codificano per antigeni di microrganismi
4. Vettori transgenici di antigeni ricombinanti



Anche detti **vaccini a subunità** perché costituiti da alcuni antigeni del microrganismo. Gli antigeni possono essere purificati o prodotti in ospiti eterologhi mediante tecniche di DNA ricombinante (vaccini ricombinanti) o mediante sintesi chimica (peptidi sintetici). Sono più sicuri ma meno immunogenici e quindi necessitano di adiuvanti per stimolare una risposta immunitaria efficace

ACCENNI DI VACCINOLOGIA

Per innescare il processo di immunizzazione attiva che porta alla protezione dalla malattia causata da uno specifico microrganismo, un vaccino deve essere in grado di fornire un'adeguata stimolazione antigenica che si può ottenere inoculando l'ospite con 4 tipi diversi di preparazioni:

1. Microrganismi interi
2. Parti di microrganismi
- 3. Acidi nucleici (DNA) che codificano per antigeni di microrganismi**
4. Vettori transgenici di antigeni ricombinanti



Tipicamente costituiti da un plasmide ricombinante purificato da colture di *Escherichia coli*.

ACCENNI DI VACCINOLOGIA

Per innescare il processo di immunizzazione attiva che porta alla protezione dalla malattia causata da uno specifico microrganismo, un vaccino deve essere in grado di fornire un'adeguata stimolazione antigenica che si può ottenere inoculando l'ospite con 4 tipi diversi di preparazioni:

1. Microrganismi interi
2. Parti di microrganismi
3. Acidi nucleici (DNA) che codificano per antigeni di microrganismi
4. **Vettori transgenici di antigeni ricombinanti**



Batteri e virus possono essere ingegnerizzati per produrre antigeni vaccinali.

OPIS

0KMYH7L7