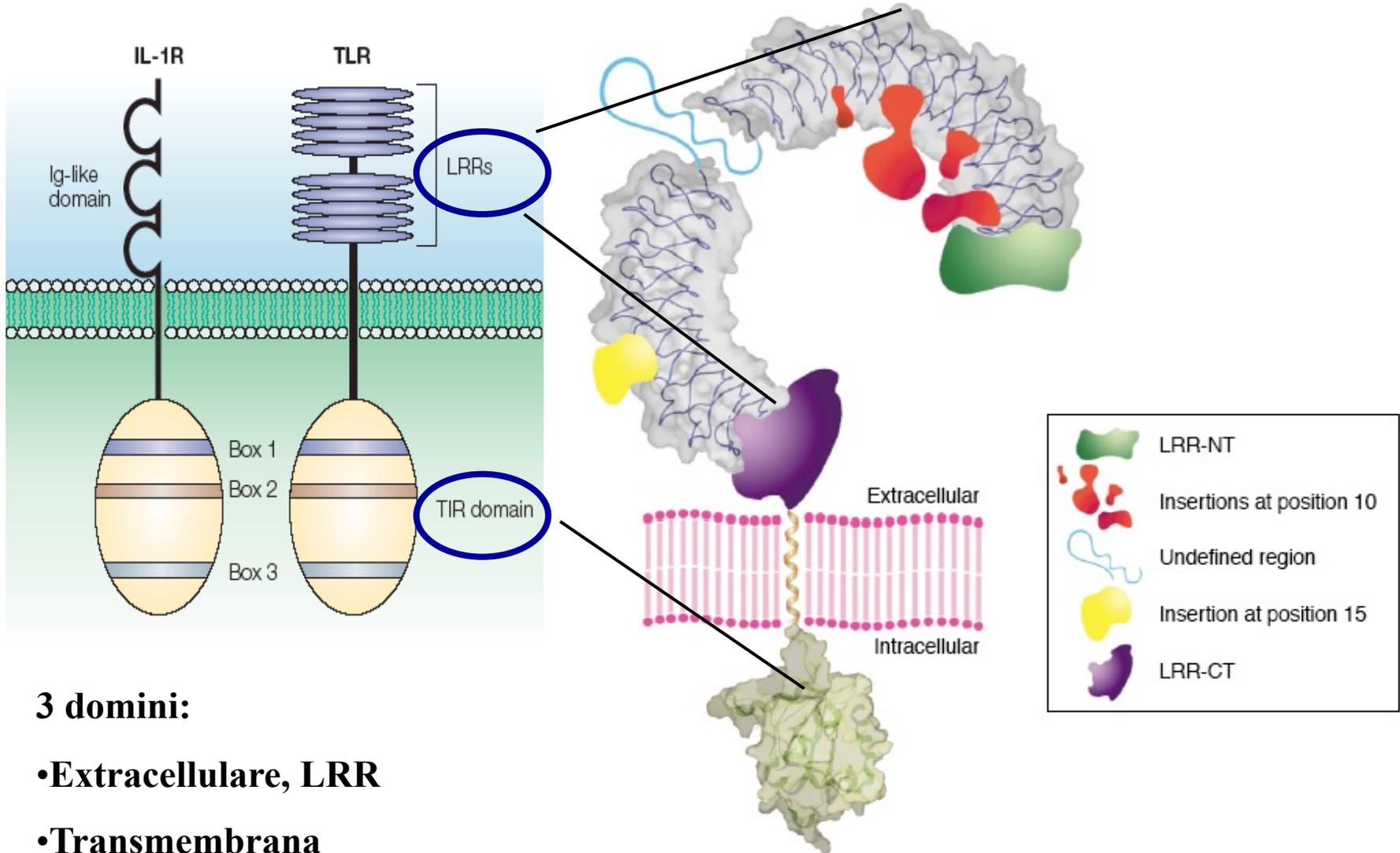


Il compartimento naturale dell'immunità innata: I recettori Toll-like (TLRs) e i loro ligandi

Struttura dei TLRs



TIR: Toll interleukin-1 Receptor

- I TLR sono proteine transmembranari costituite da tre differenti motivi strutturali e funzionali.
- Una regione caratterizzata da un motivo con ripetizioni ricche di leucina (LRR) contenente un terminale amminico (N) responsabile del legame del ligando (piegato in una tipica struttura a ferro di cavallo).
- Una regione transmembrana e un terminale carbossilico (C) citoplasmatico.
- Il dominio citoplasmatico è relazionabile alla regione citoplasmatica del recettore globulare dell'interleuchina-1 (IL-1) (TIR).

Toll-like receptors (TLRs)

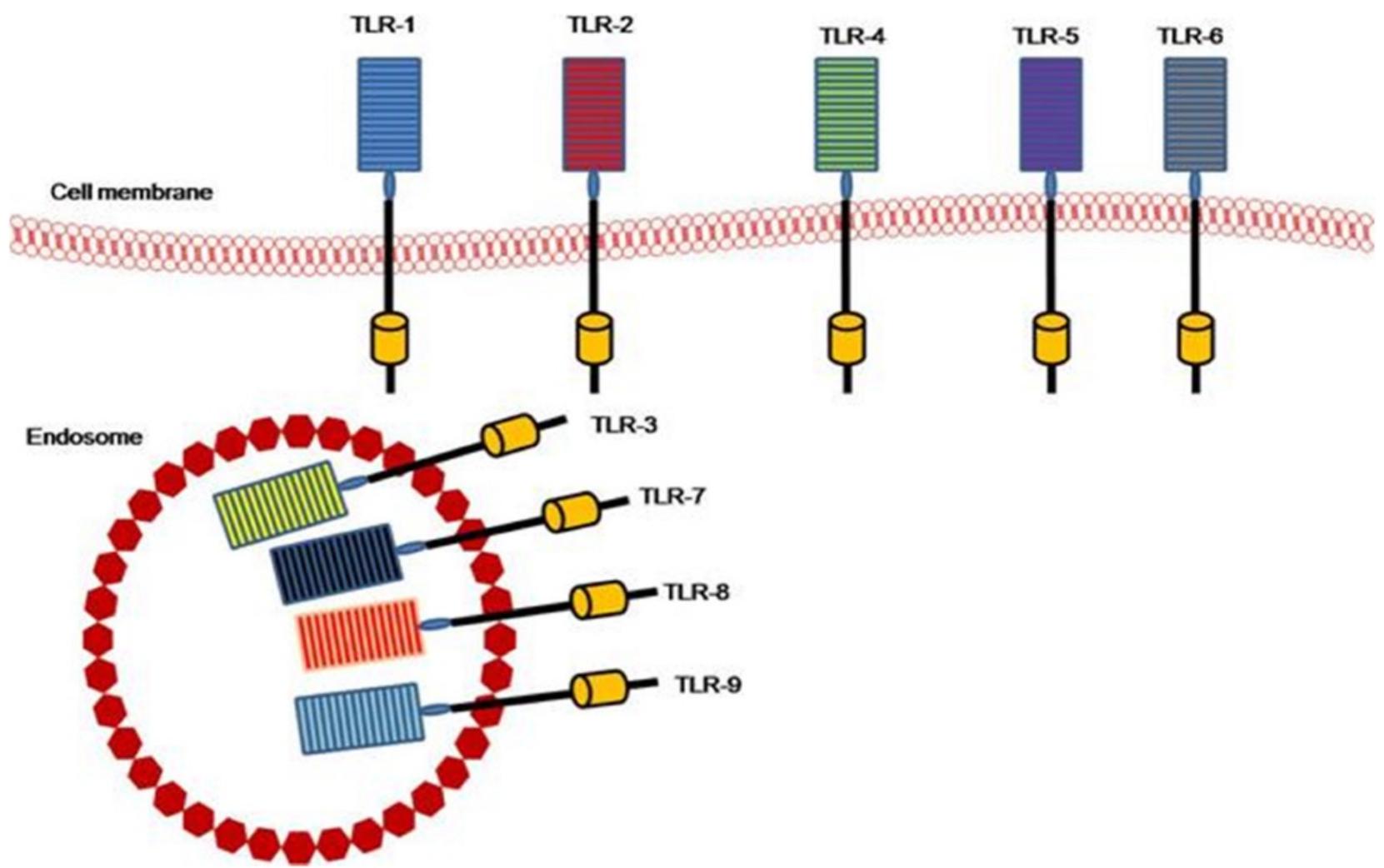
- Ad oggi sono noti 13 TLRs: 10 nell'uomo (hTLRs), 13 nel topo (mTLRs)
- I primi nove TLRs (TLR1-TLR9) mostrano un elevato grado di conservazione strutturale e funzionale tra topo e uomo
- Con eccezione del TLR8 il cui ligando nel topo è ancora incerto (mir-21)
- mTLR10 non è funzionale come conseguenza di un'inserzione retrovirale
- hTLR11 non funzionale a causa di un prematuro codon di stop nella sequenza codificante
- mTLR11/12 profilina (*Toxoplasma gondii*)
- mTLR13 RNA ribosomiale 23s

I **TLRs** vengono categorizzati sulla base della loro localizzazione:

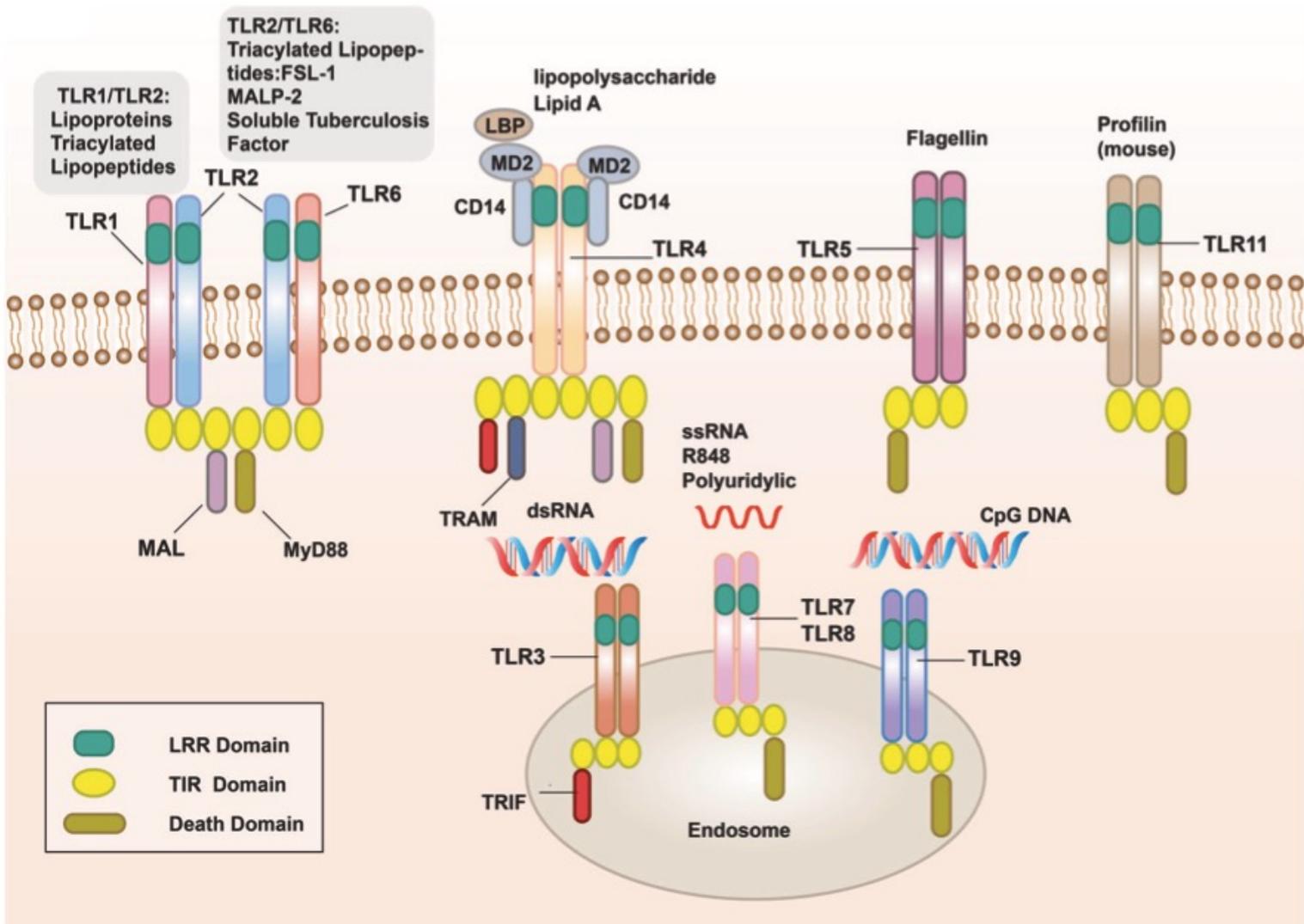
Alcuni TLRs come **TLR1, TLR2, TLR5, TLR6** e **TLR10** sono espressi esclusivamente sulla membrana plasmatica e appartengono al gruppo degli **extracellulari**;

TLR3, TLR7, TLR8 e **TLR9** rientrano nel gruppo degli **intracellulari** e sono espressi sull'endosoma e sul reticolo endoplasmatico.

Solo **TLR4** è presente sia nei componenti intracellulari che nella membrana plasmatica



i recettori TLRs e i loro ligandi



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

I ligandi dei TLRs



FIGURE 1

TLR	Species	Localization	Microbial ligands	Microbes expressing TLR ligands	Endogenous ligands	Synthetic agonists	Ref.
TLR3	Human and mouse	Endosome	Viral dsRNA	Reovirus	mRNA	Poly(I:C), poly-ICLC, poly(I:C ₁₂ U) poly(A:U)	(20, 21, 33)
TLR4	Human and mouse	Plasma membrane and Endosome	LPS	<i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Oxidized low-density lipoprotein, Amyloid-beta protein	Monophosphoryl lipid-A (MPL) derivatives	(20, 21, 33, 34)
TLR5	Human and mouse	Plasma membrane	Flagellin	<i>Salmonella</i> sp.	Unknown	Recombinant flagellin derivatives	(20, 21, 33)
TLR6	Human and mouse	Plasma membrane	Diacyl lipopeptides, lipoteichoic acid, zymosan	<i>Mycoplasma</i> , Hepatitis C virus (HCV), Cytomegalovirus	Oxidized low-density lipoprotein, Amyloid-beta protein, versican	Macrophage-activating lipopeptide 2, synthetic diacylated lipoproteins, Pam2CSK4	(20, 21, 29)
TLR7	Human and mouse	Endosome	Viral and bacterial ssRNA	Human immunodeficiency virus (HIV), HCV	Immune complexes, self-RNA	Thiazoquinoline and imidazoquinoline derivatives (e.g., resiquimod, imiquimod)	(20, 21, 33) (35, 36),
TLR8	Human and mouse	Endosome	Viral and bacterial ssRNA	Human immunodeficiency virus (HIV), HCV	Immune complexes, self-RNA	Thiazoquinoline and imidazoquinoline derivatives (e.g., resiquimod, imiquimod)	(20, 21, 33) (35, 36),
TLR9	Human and mouse	Endosome	Viral and bacterial CpG DNA, DNA: RNA hybrids	Human papilloma virus (HPV), Hepatitis B virus (HBV), Epstein-Barr virus (EBV), Polyomavirus	Chromatin-IgG-immune complexes, self-DNA	CpG Oligodeoxynucleotides (CpG ODNs)	(20, 33, 37)
TLR10	Human	Plasma membrane	Unknown		Unknown	Unknown	(20)
TLR11	Mouse	Endosome	Profilin and flagellin	<i>Toxoplasma gondii</i>	Unknown	Unknown	(38)
TLR12	Mouse	Endosome	Profilin		Unknown	Unknown	(20)
TLR13	Mouse	Endosome	Bacterial 23S ribosomal RNA (rRNA)		Unknown	23S rRNA-derived oligoribonucleotide	(20)

Vie di segnalazione attivate dai TLRs

In seguito a dimerizzazione si hanno DUE vie di segnalazione

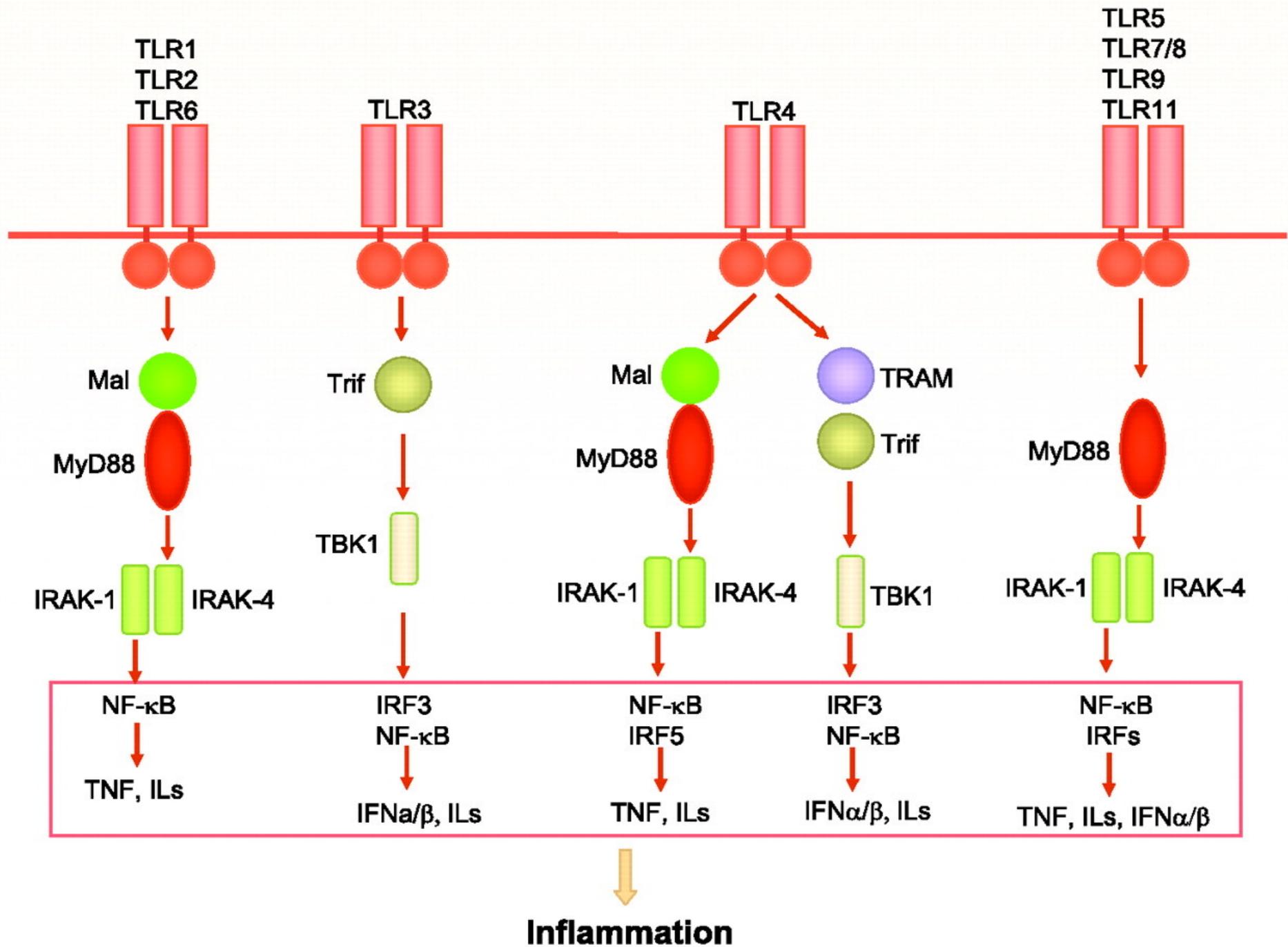
Via MyD88 dipendente (tutti i TLRs ad eccezione del TLR3):

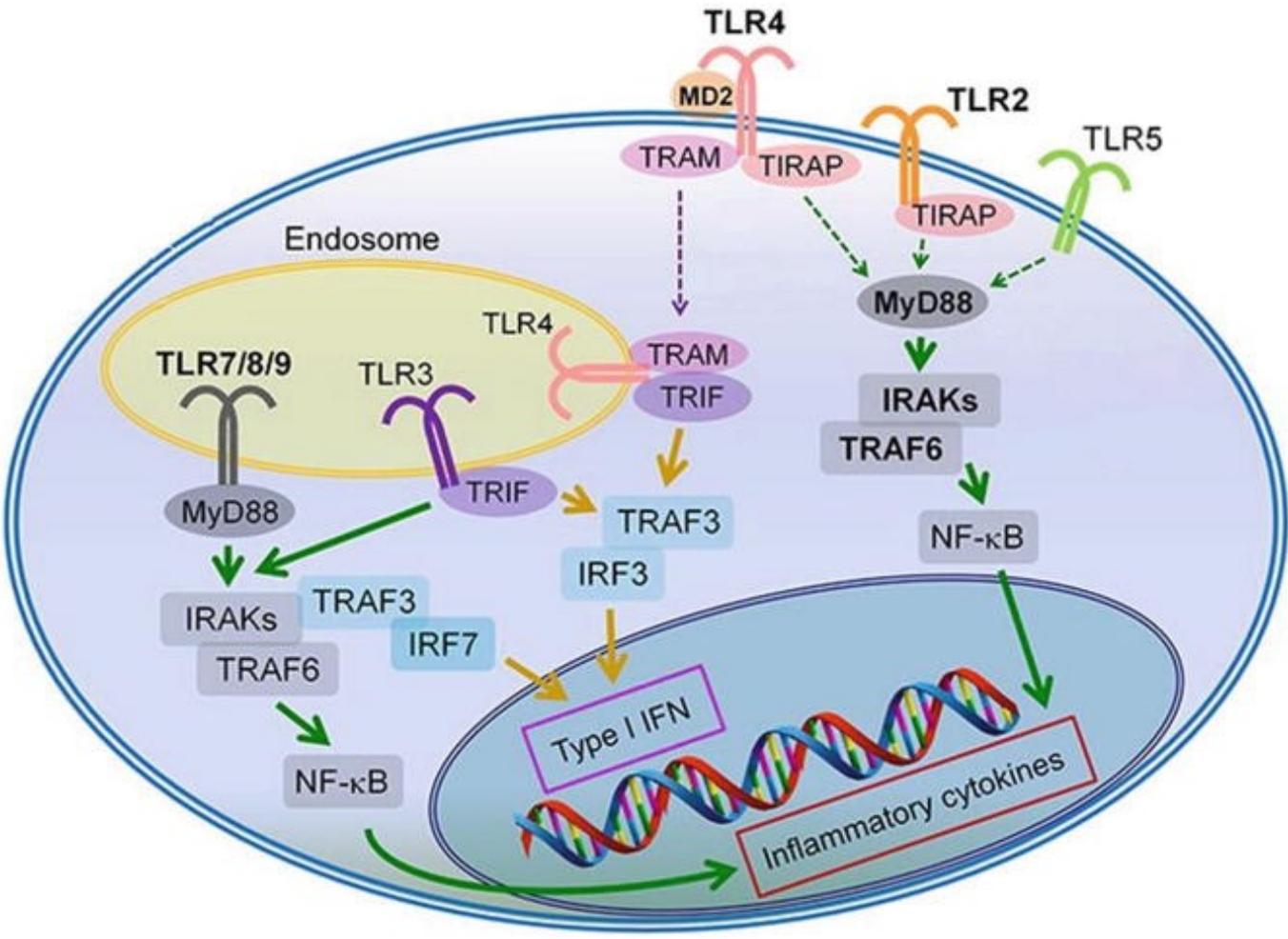
- Attivata dalla maggior parte dei TLRs in risposta al legame con un agonista
- Induce l'attivazione delle MAP chinasi e di NF- κ B
- Attivazione di geni interferonici IRF5 mediati
- Determina una up-regolazione delle molecole co-stimolatorie e MHC sulla superficie cellulare

Via MyD88 indipendente (TLR3 e TLR4):

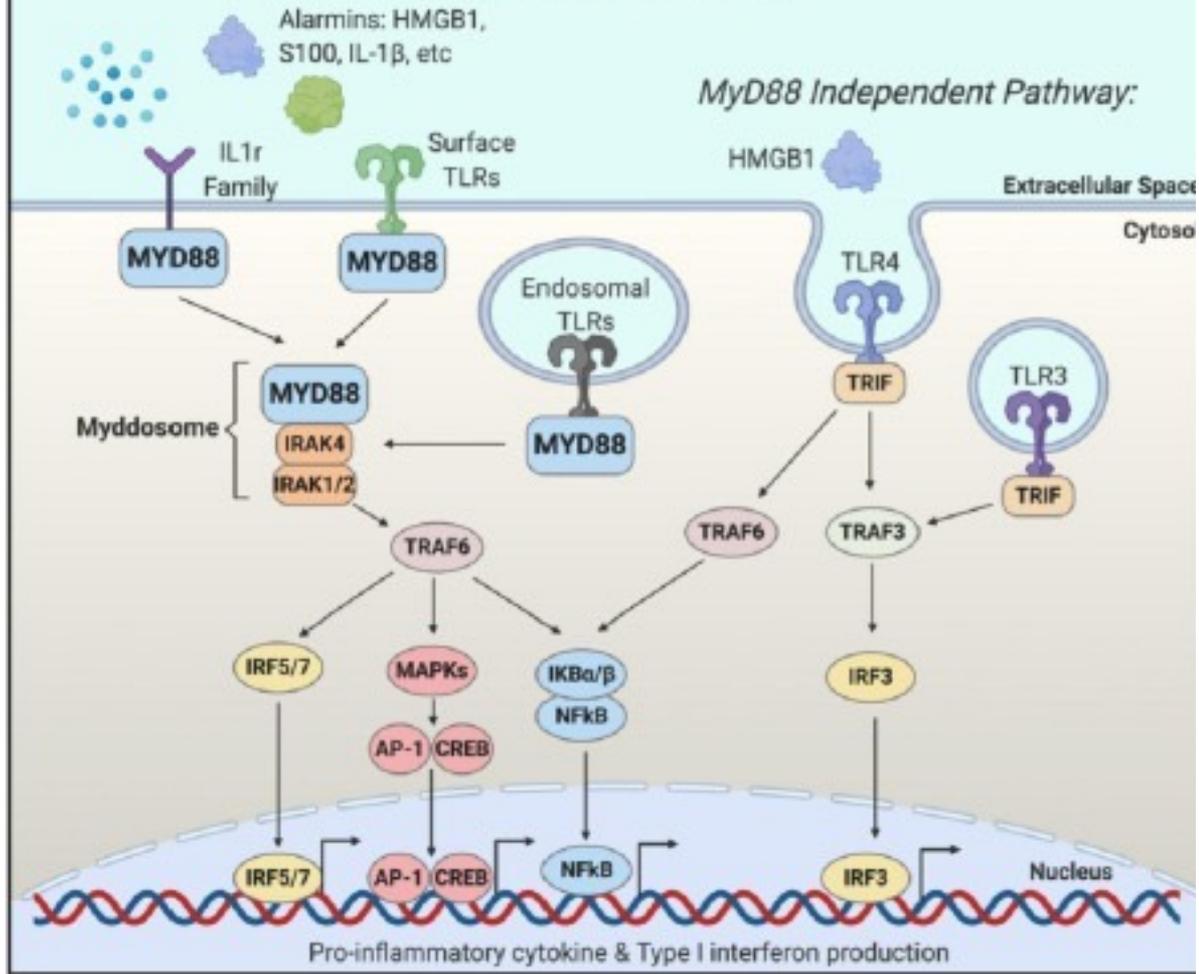
- Induce l'attivazione di IRF-3 e la produzione di interferon di tipo I
- Incrementa le molecole co-stimolatorie e MHC sulla superficie cellulare
- Induce l'espressione di citochine infiammatorie
- Induce la maturazione di cellule dendritiche

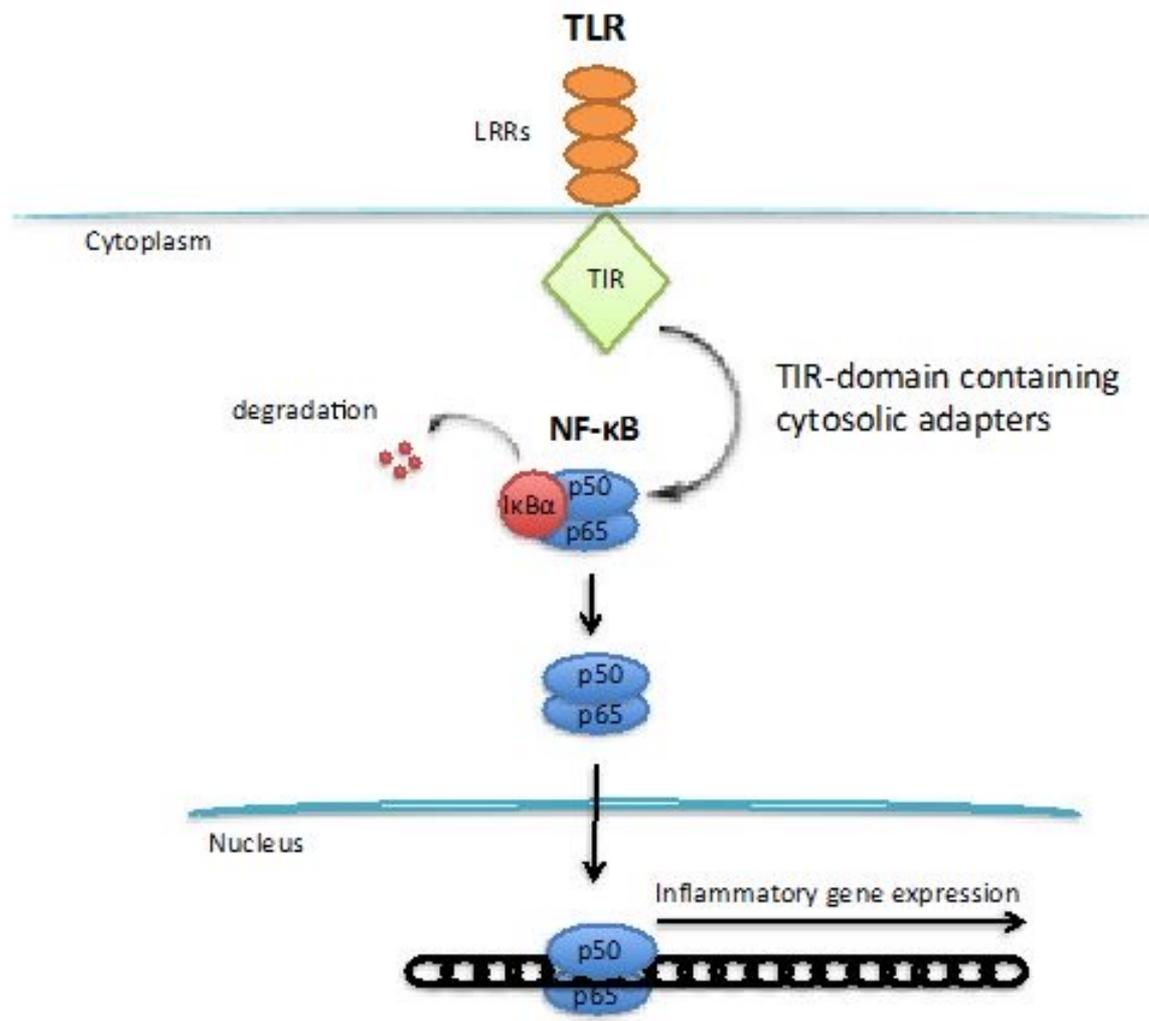
- Una volta attivati dall'interazione con i componenti microbici, i recettori Toll-like dimerizzano e vanno incontro ad una modificazione conformazionale che porta al reclutamento di adattatori ed effettori molecolari.
- Le proteine e gli effettori molecolari, meglio caratterizzati e studiati, tra le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



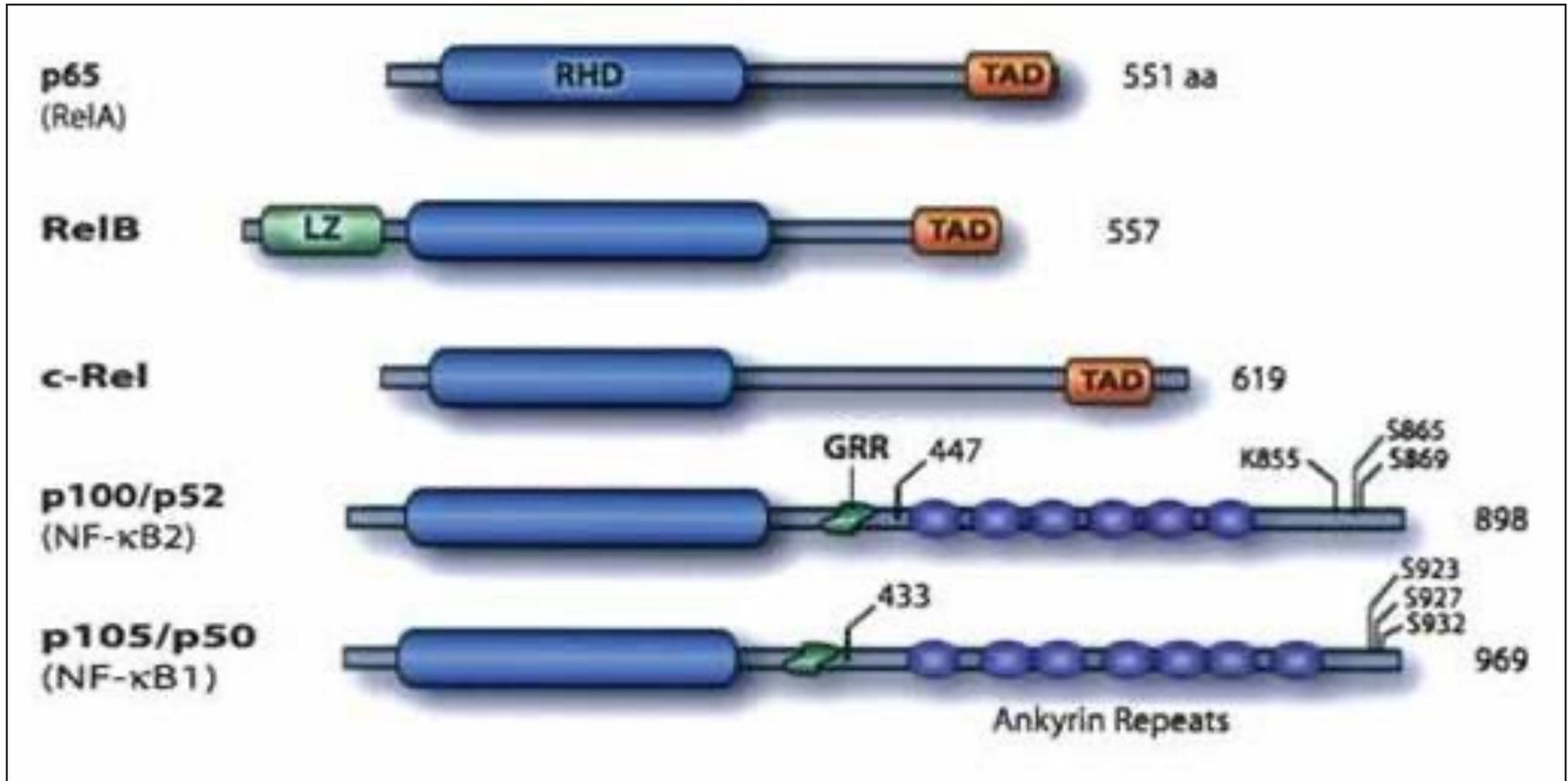


MyD88 Signaling:

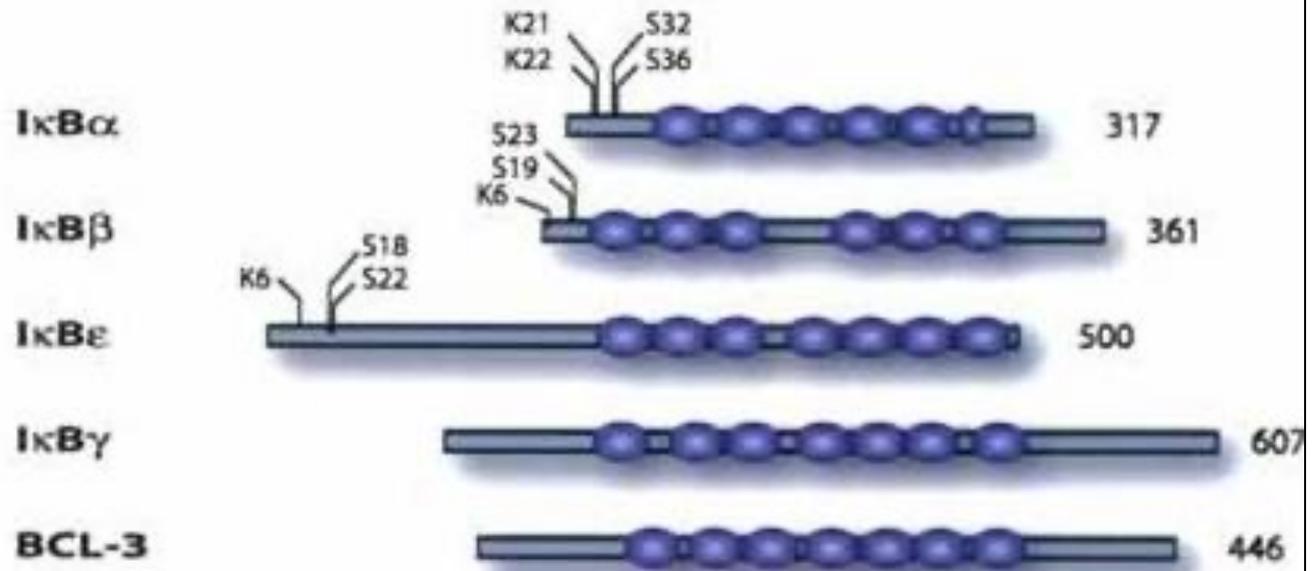




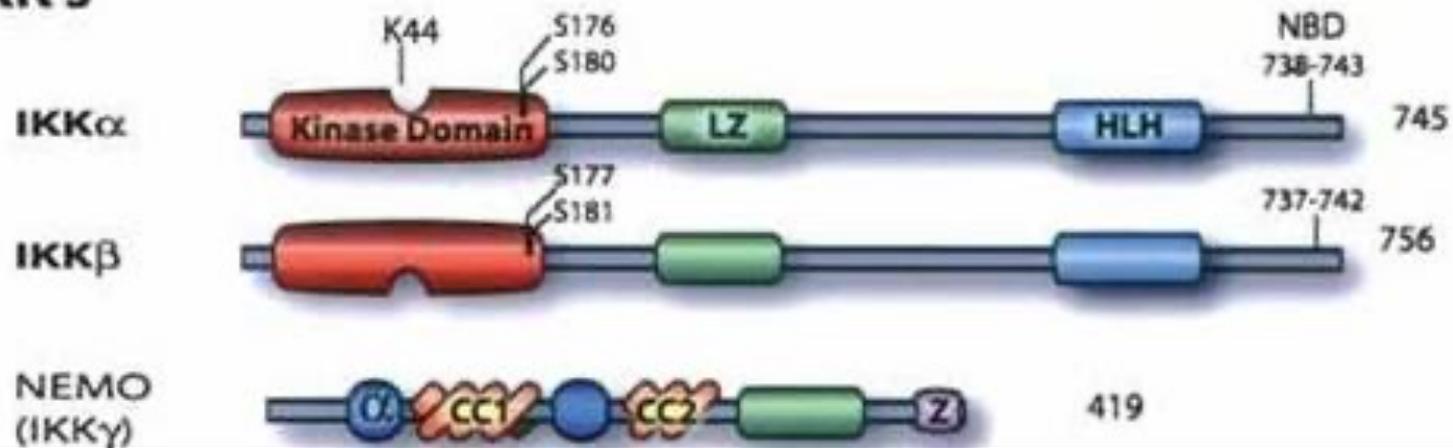
La famiglia NF-kappaB



I κ B Family

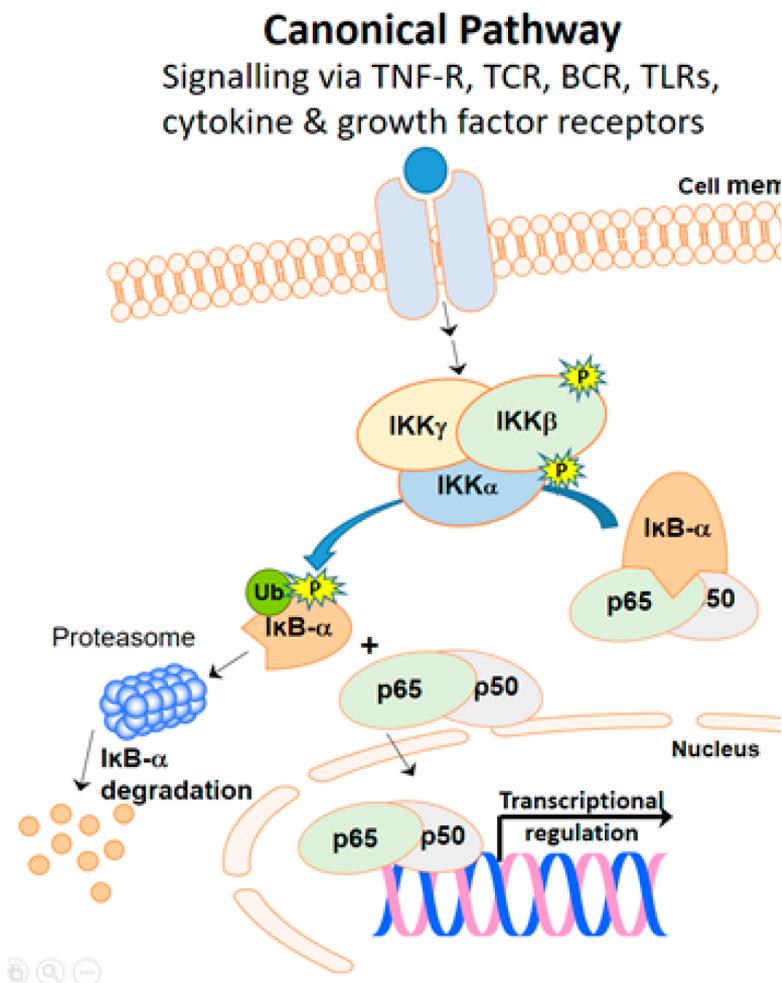


IKK's



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

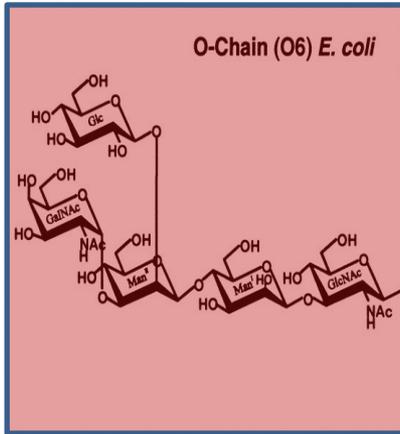
I κ B fosforilato è riconosciuto da una ligasi dell'ubiquitina SCF $^{\beta}$ -TrCp che ne induce l'ubiquitinizzazione (in corrispondenza delle lisine 21 e 22) e la conseguente degradazione al proteasoma 26S. L'esposizione della sequenza NLS sul complesso p50/p65 rende NF- κ B capace di traslocare al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



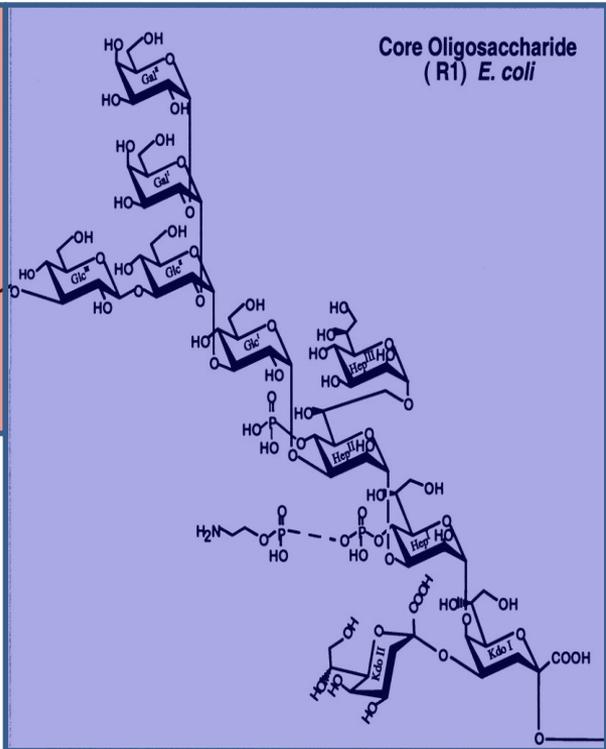
TLRs implicati nel riconoscimento di strutture batteriche

TLR4

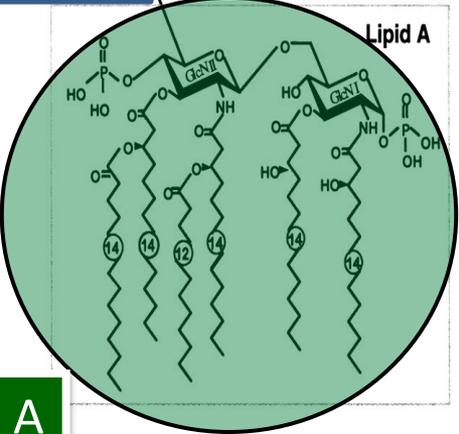
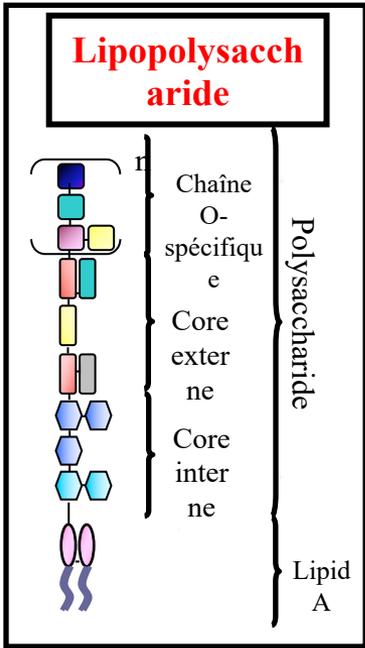
- Il primo TLR ad essere stato individuato mediante omologia di sequenza
- Topi C3H/HeJ che presentano una mutazione puntiforme nel dominio TIR di TLR4 sono non-responsivi agli LPS
 - Cosa riconosce?
 - **LPS**
 - Ligandi endogeni, Heat shock protein, oligosaccaridi di acido ialuronico, fibrinogeno
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



O-chain



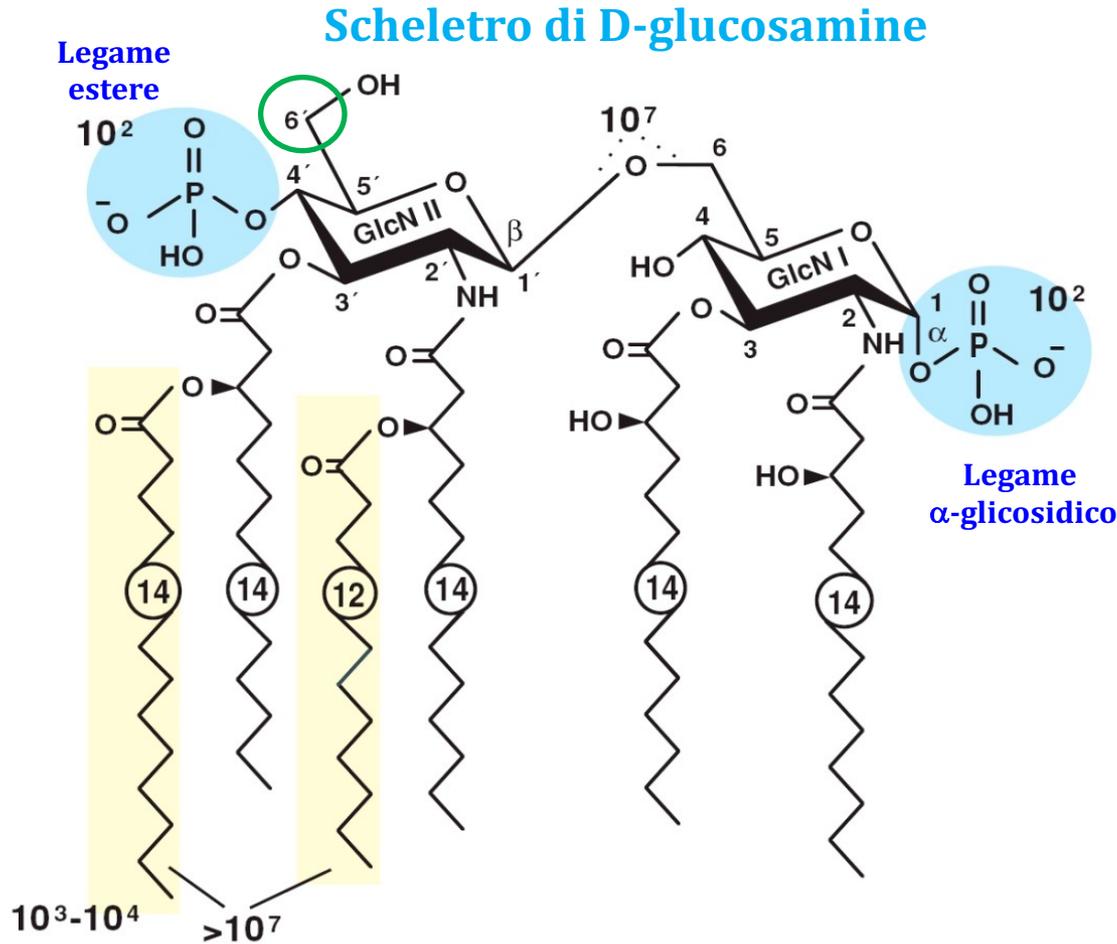
Core oligosaccharide



Lipid A

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

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)

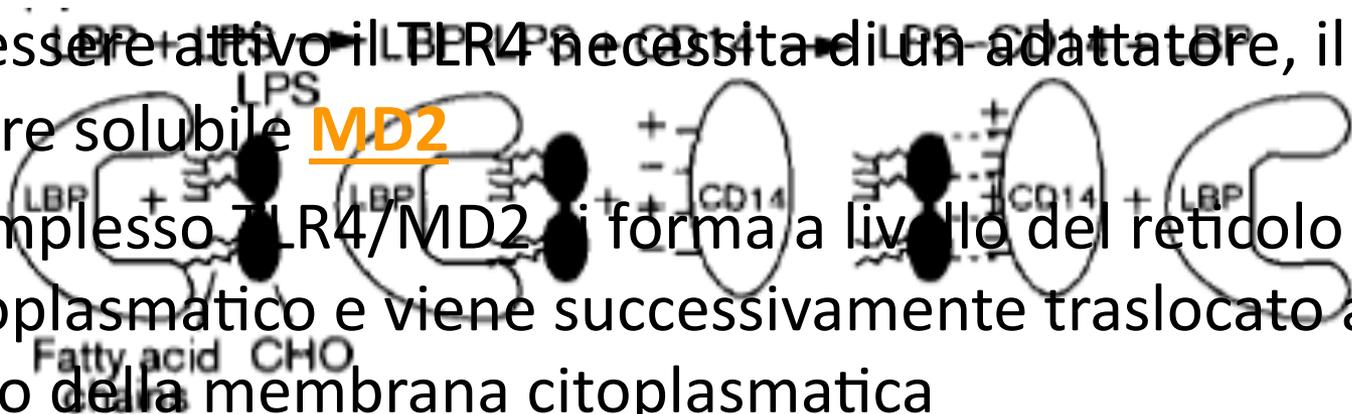
- sono presenti fino a 4 catene aciliche che a loro volta possono essere sostituite da ulteriori acidi grassi \rightarrow fino a 7 sostituenti acidi

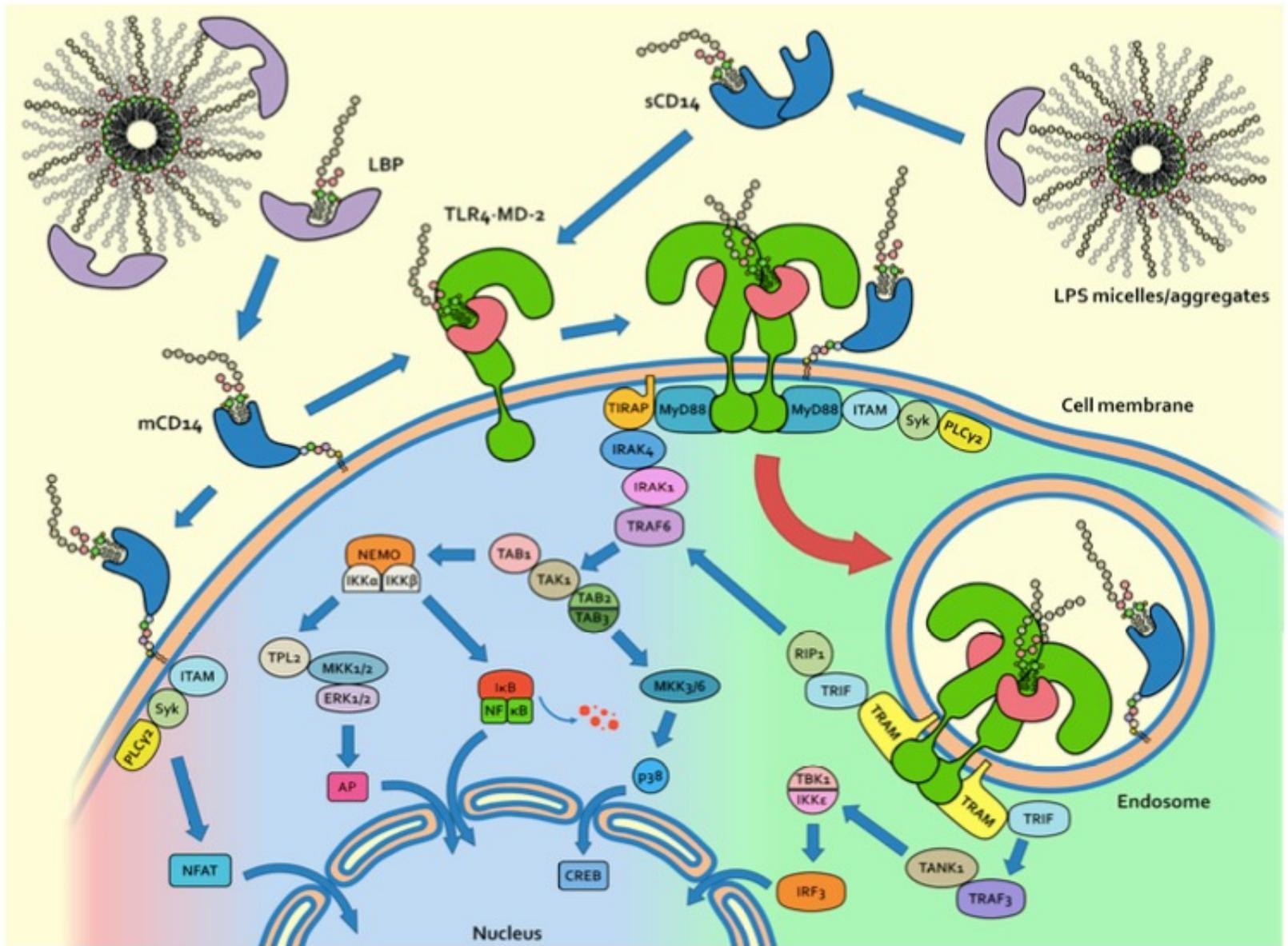
○ Posizione di attacco della regione polisaccaridica

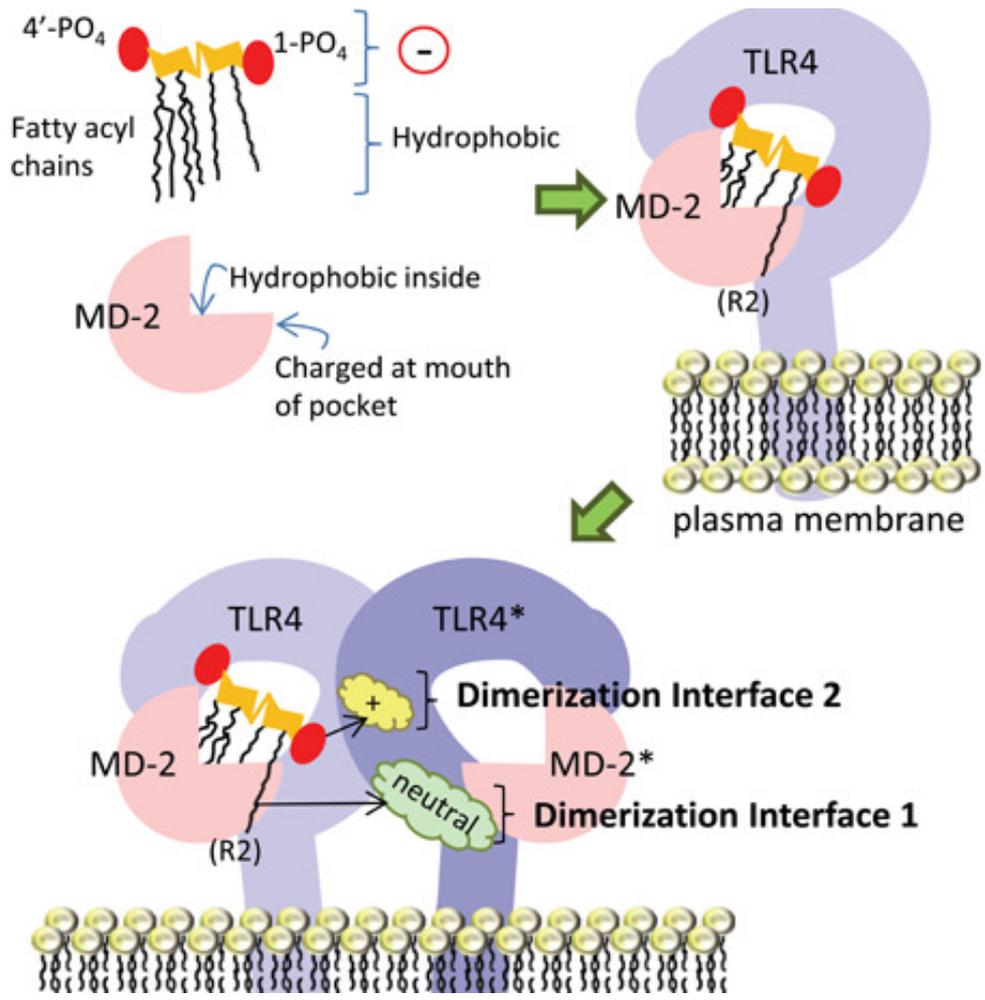
Adattatori molecolari del TLR4

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

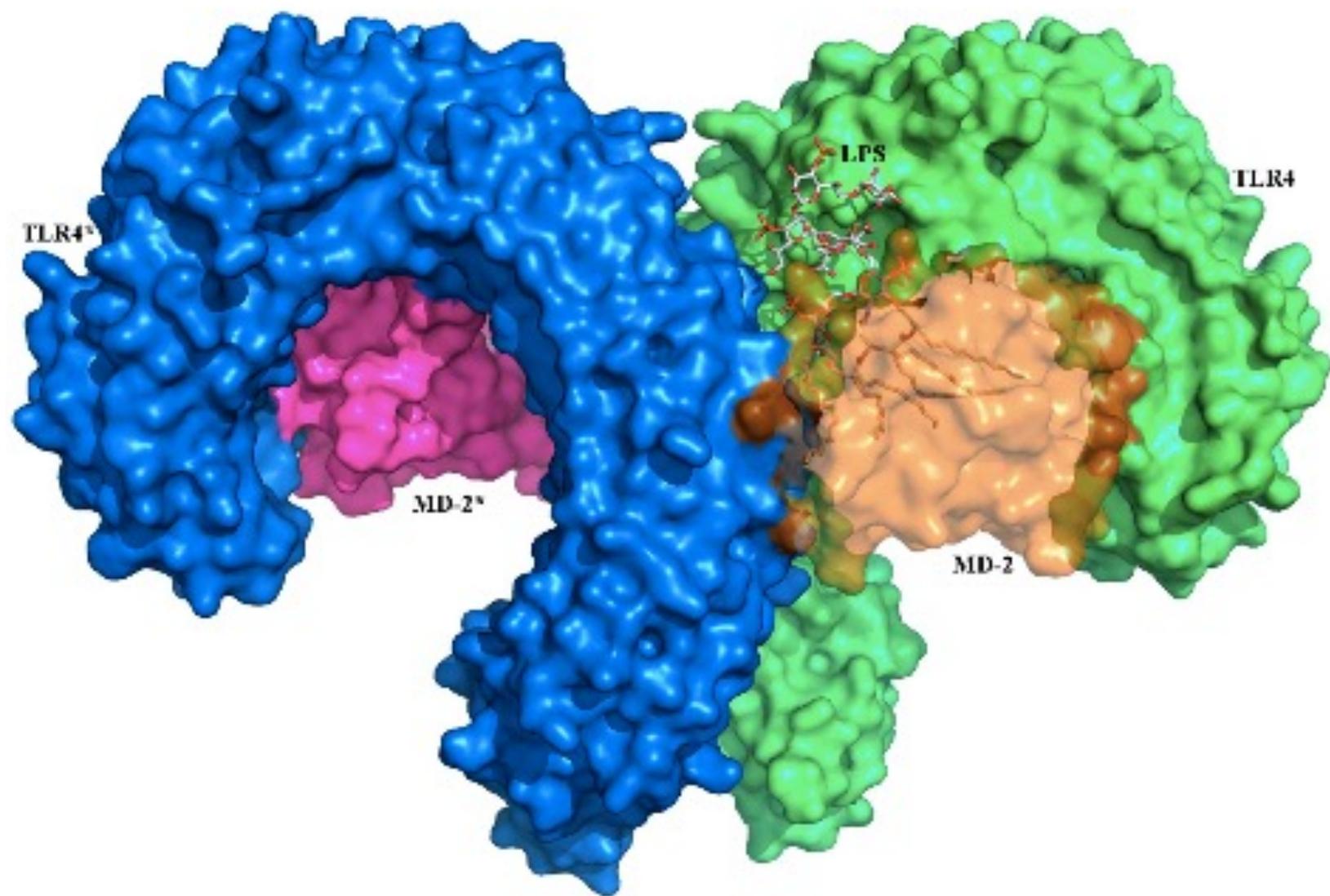
- Per essere attivo il TLR4 necessita di un adattatore, il fattore solubile **MD2**
- Il complesso TLR4/MD2 si forma a livello del reticolo endoplasmatico e viene successivamente traslocato a livello della membrana citoplasmatica

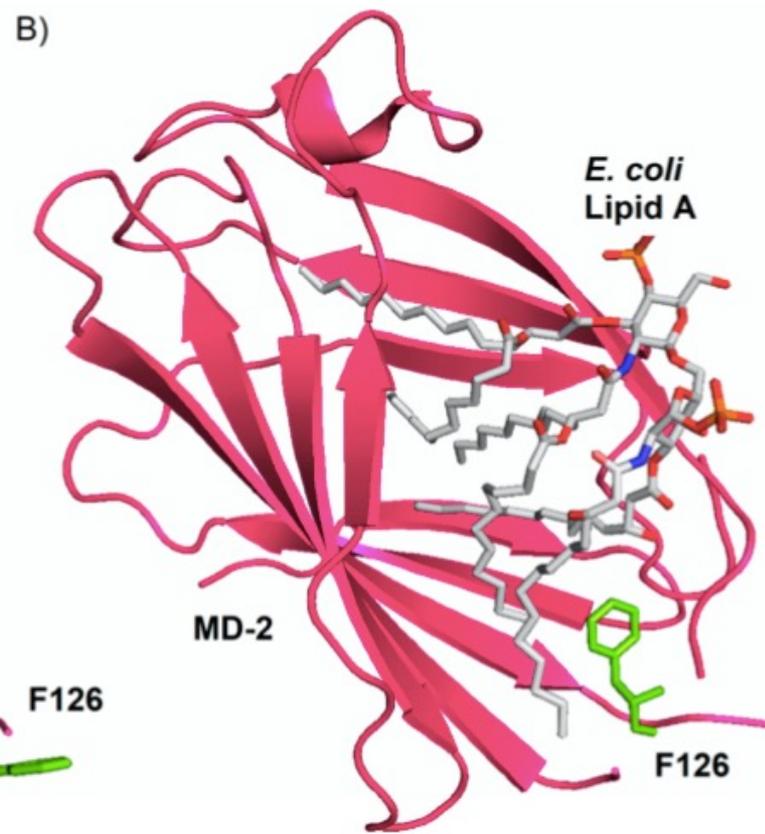
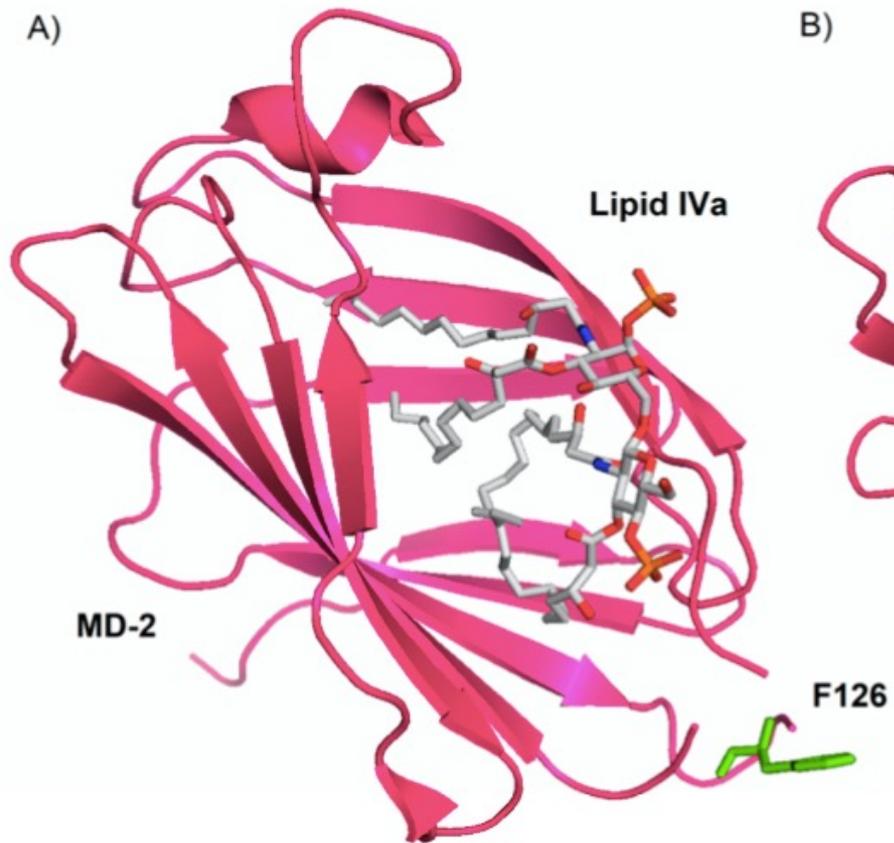


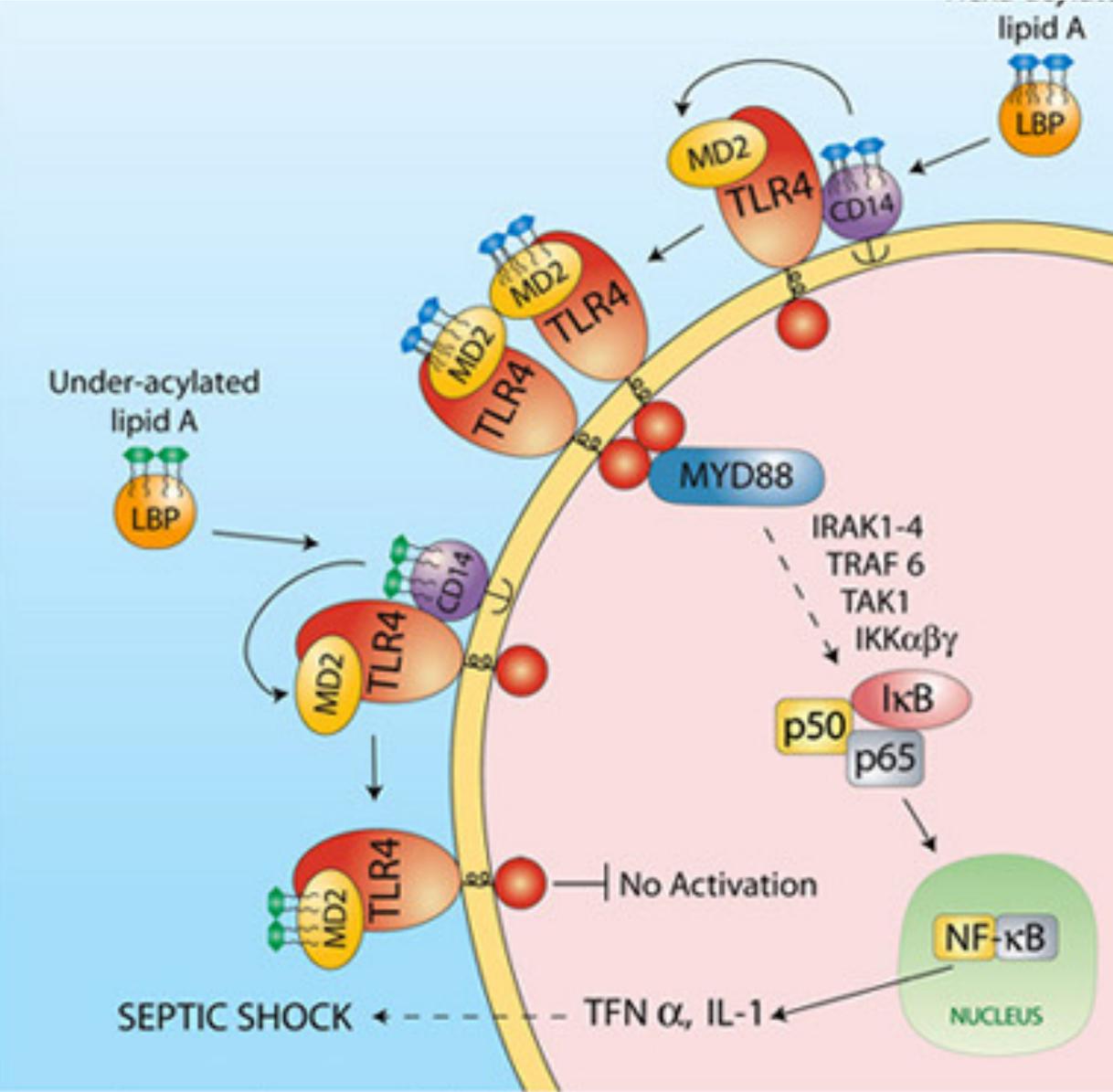




Il numero delle catene aciliche influenza il riconoscimento del TLR4





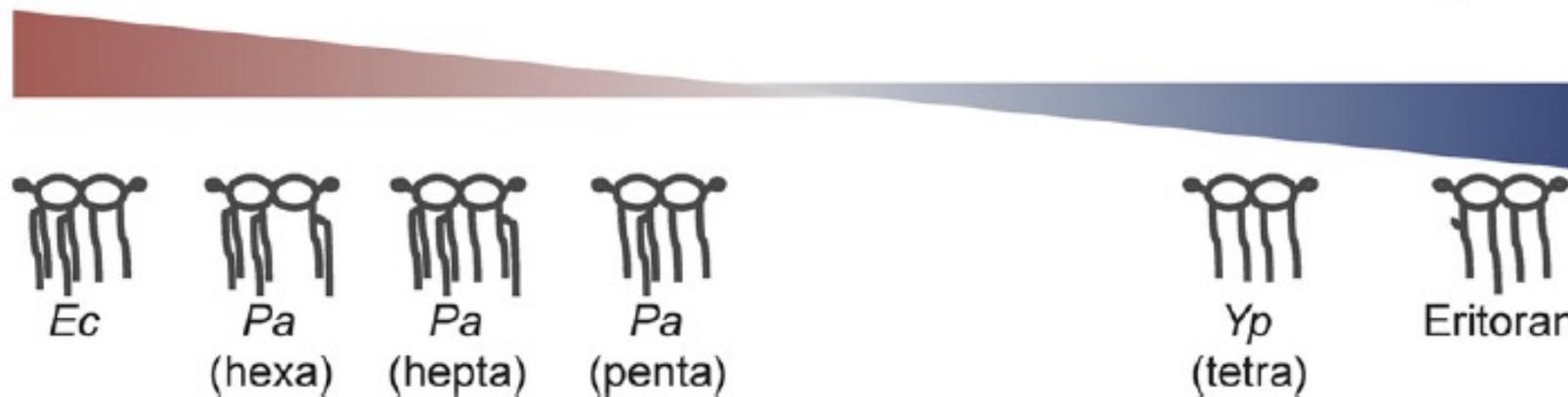


B.

MD2-TLR4/Lipid A SAR Spectrum

Agonists

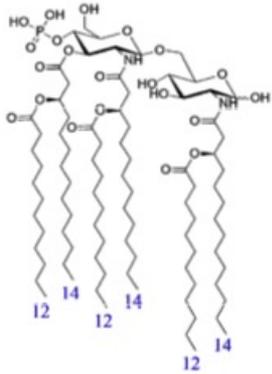
Antagonists



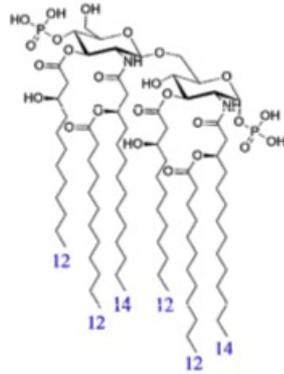
**Lipid A variants
(Agonist)**

**Synthetic variants
(Antagonist)**

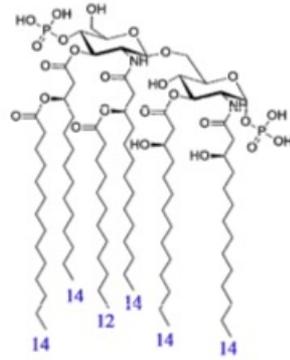
Salmonella minnesota



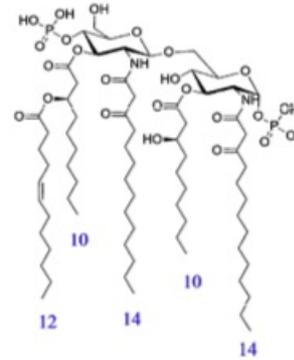
Neisseria meningitidis



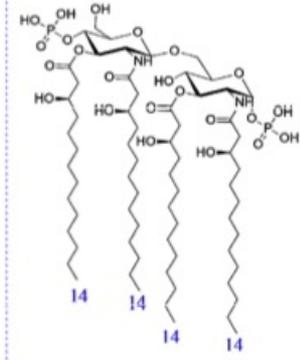
Escherichia coli



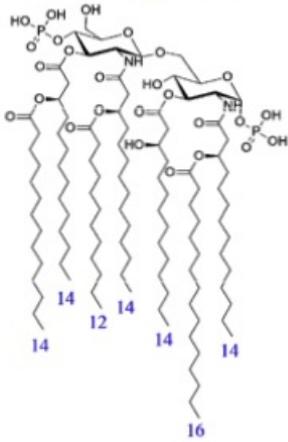
Rhodobacter Capsulatus



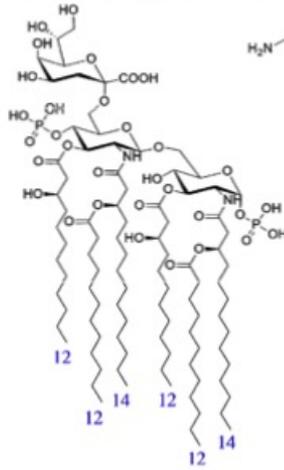
Lipid IVa



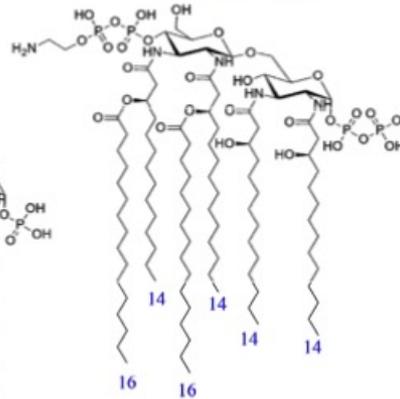
Salmonella typhimurium



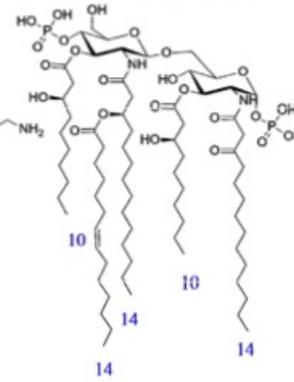
Neisseria meningitidis with Kdo



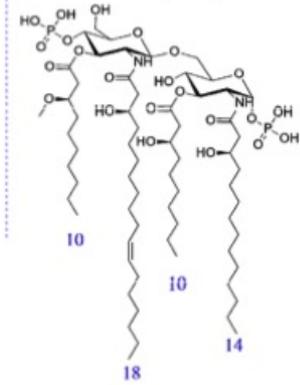
Campylobacter jejuni



Rhodobacter Sphaeroides



Eritoran (E5564)



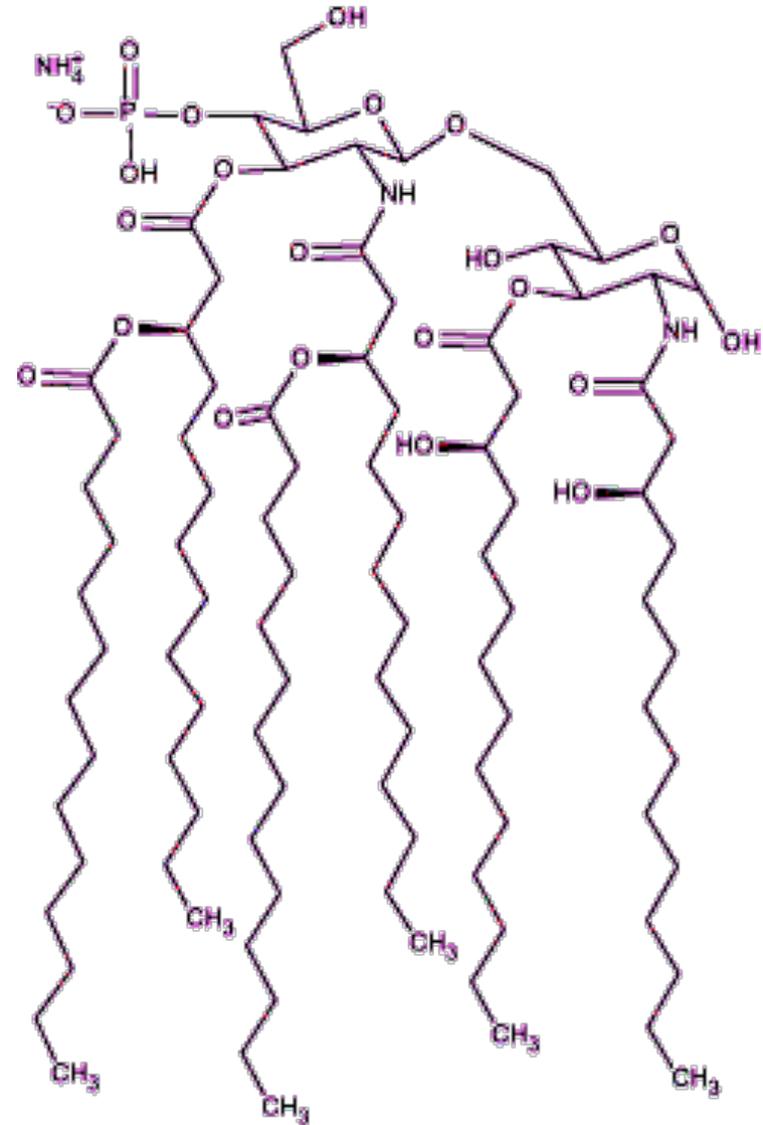
Do you know what **MPLA** means?

monophosphoryl lipid A
adjuvant



By AcronymsAndSlang.com

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



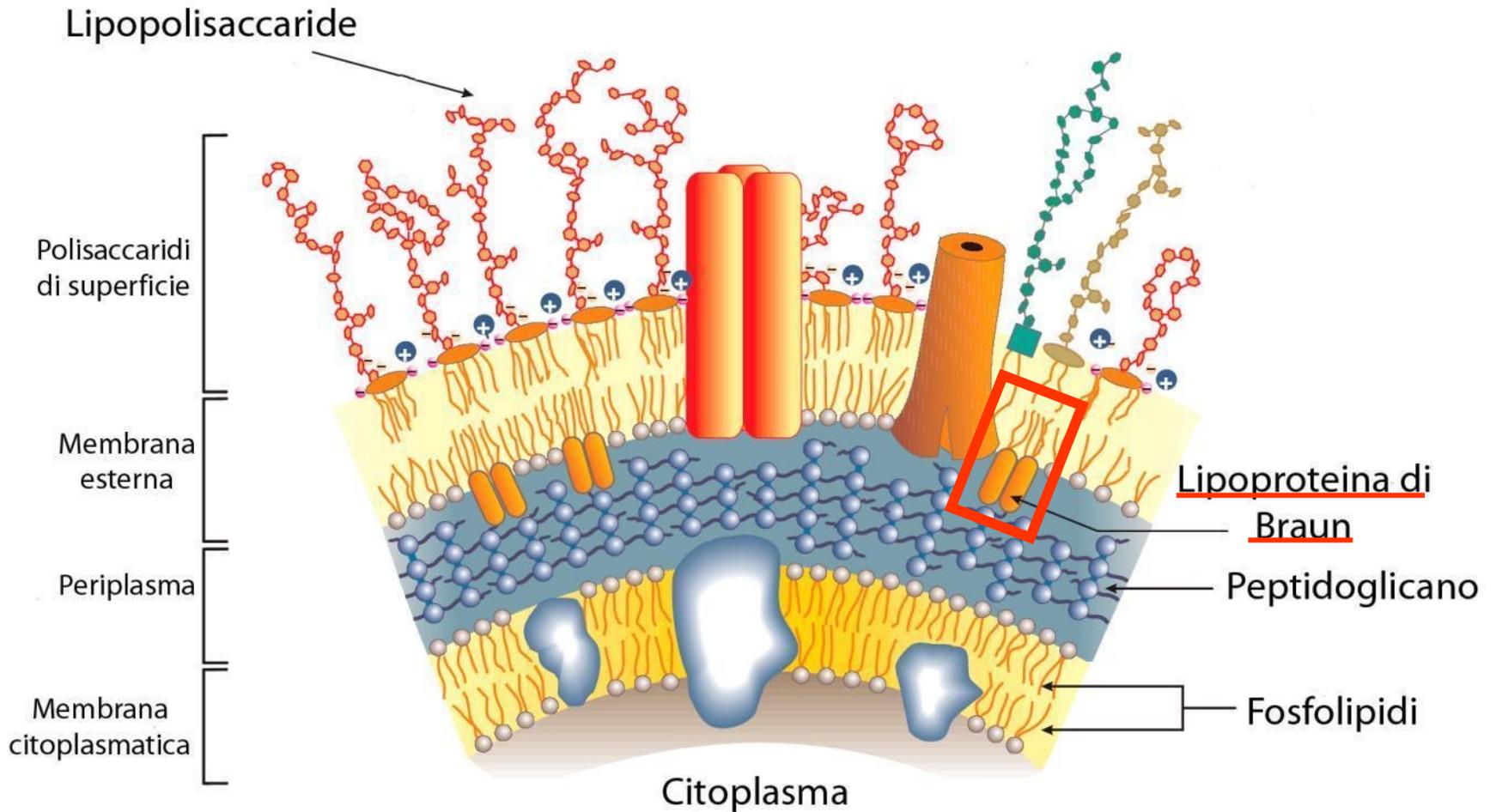
TLR2

- 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)

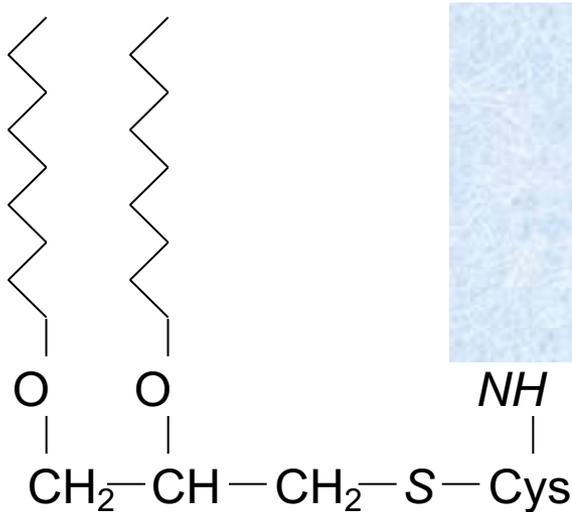
Come può riconoscere un così vasto spettro di componenti microbici?

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

Lys —NH₂

COOH

D-Ala

m-Dap —NH₂

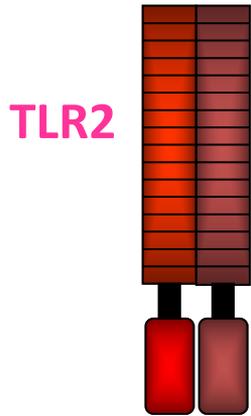
D-Glu

L-Ala

PEPTIDOGLICANO

XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX ————— GlcNAc — MurNAc ————— XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX

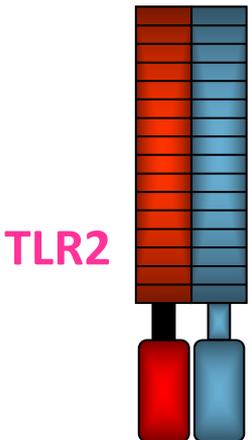
Gli eterodimeri di TLR2



TLR2

TLR1

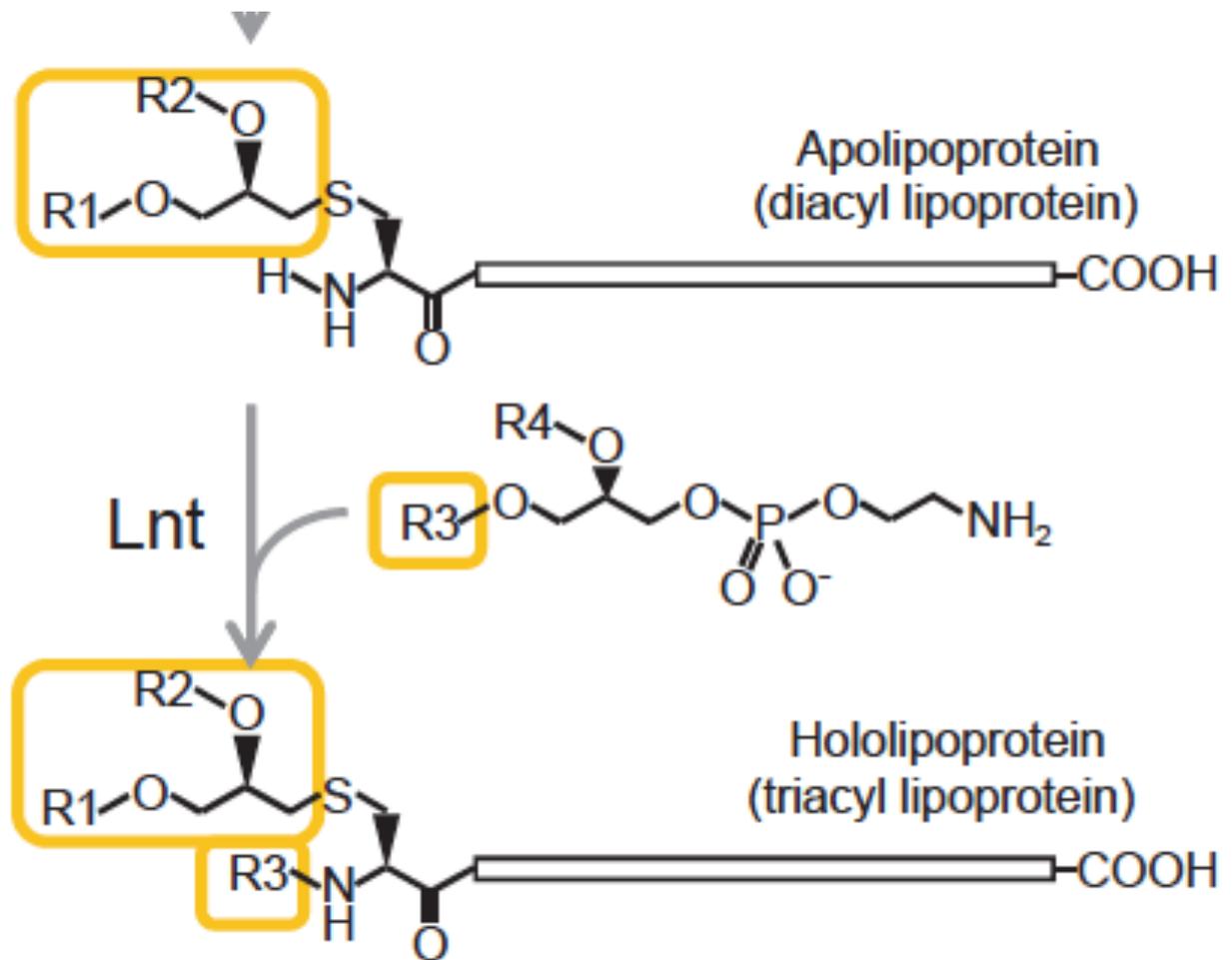
L'eterodimero **TLR2/1** riconosce le lipoproteine triacilate



TLR2

TLR6

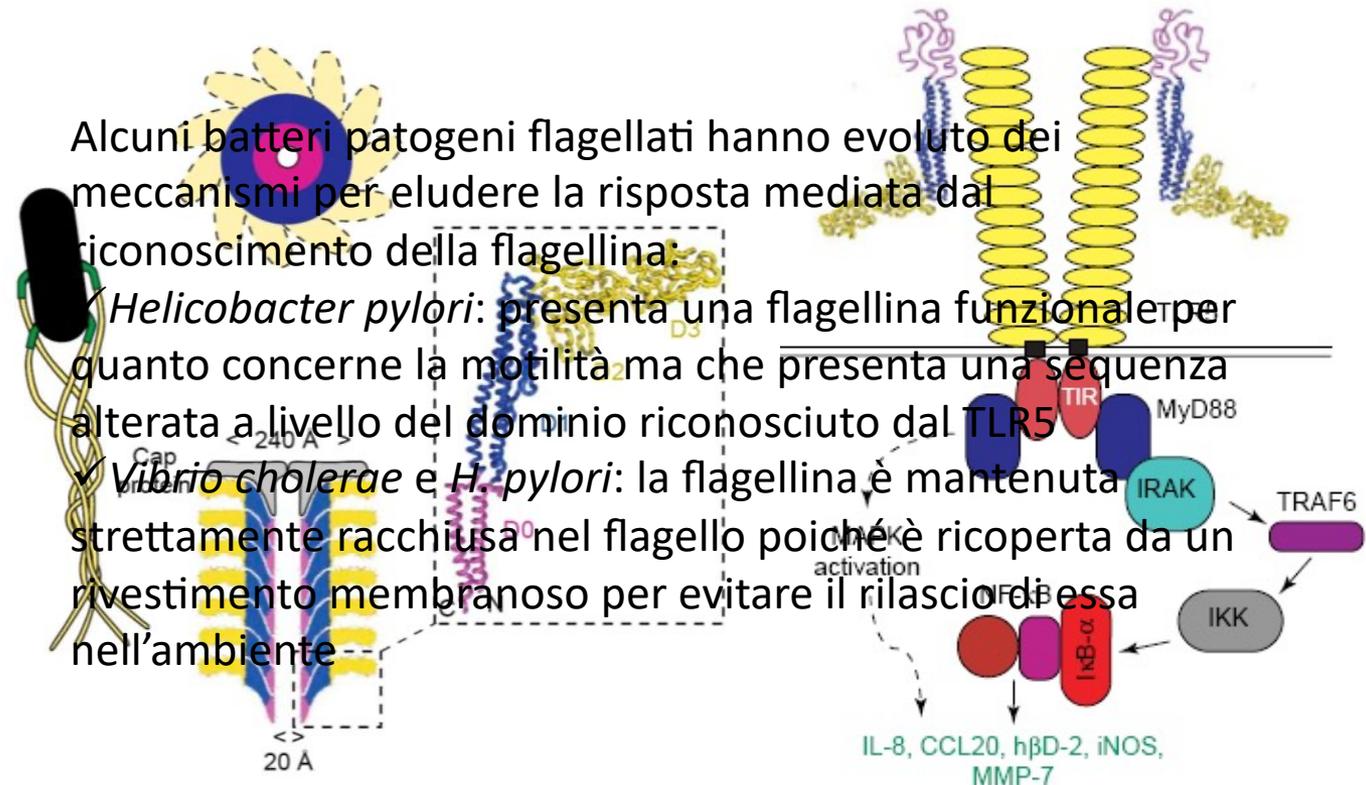
L'eterodimero **TLR2/6** riconosce le lipoproteine diacilate



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

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

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

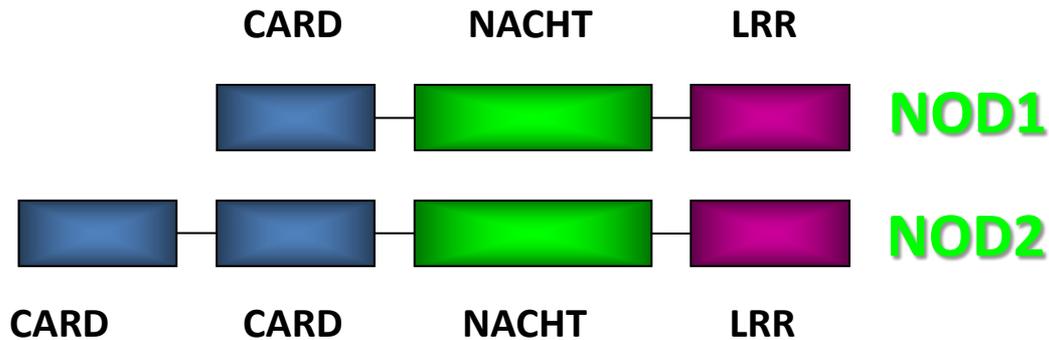
Struttura delle proteine NLRs

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]

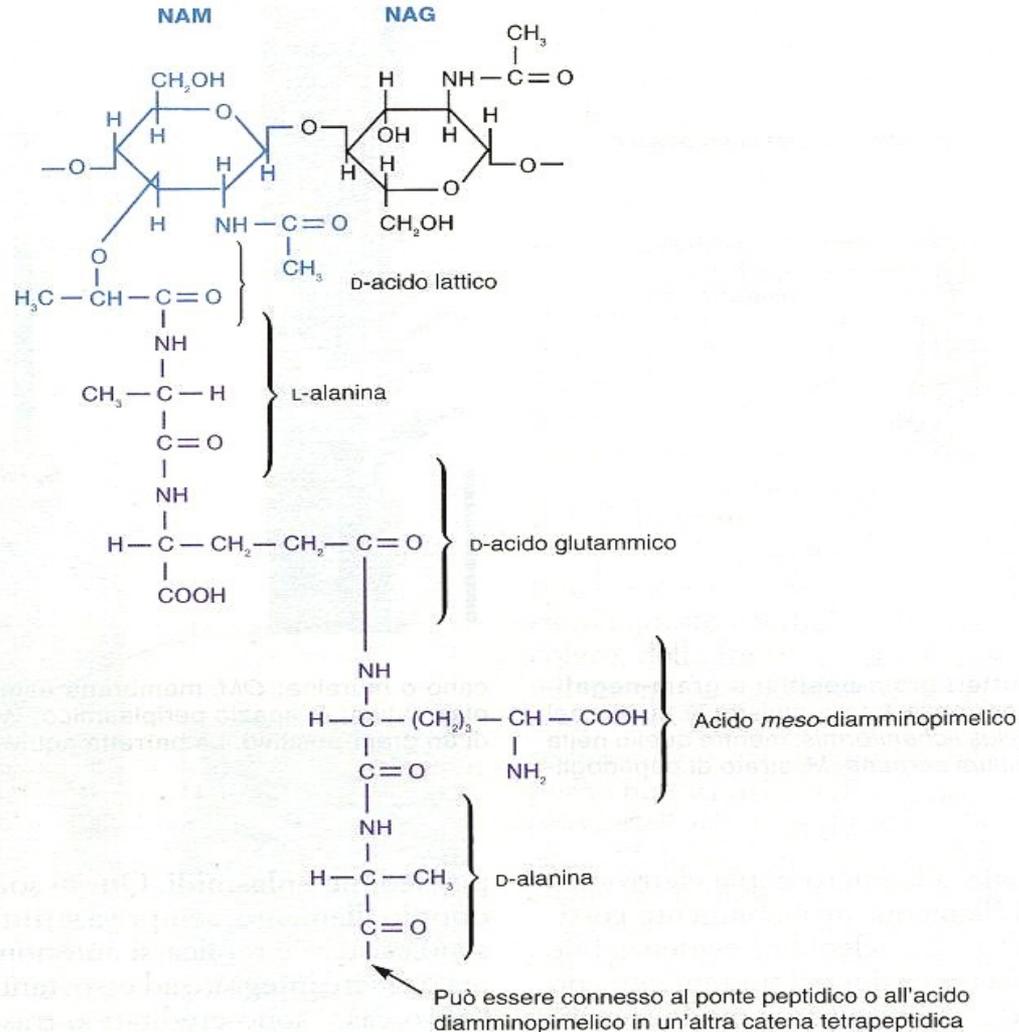
Le principali differenze tra le proteine NLRs si riscontrano a livello del modulo EBD, la cui funzione sembra essere quella di riconoscere specifici partners molecolari attraverso interazioni omo ed eterofiliche

Le proteine Nod1 e Nod2



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

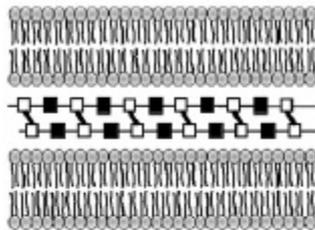
Il Peptidoglicano (PGN)



Quali sono i motivi riconosciuti da Nod1 e Nod2?

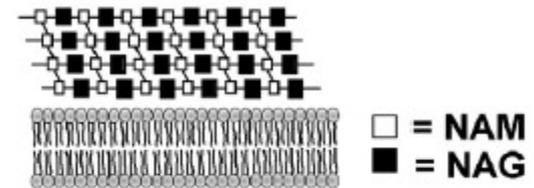
mesoDAP type PG from Gram negative bacteria

A

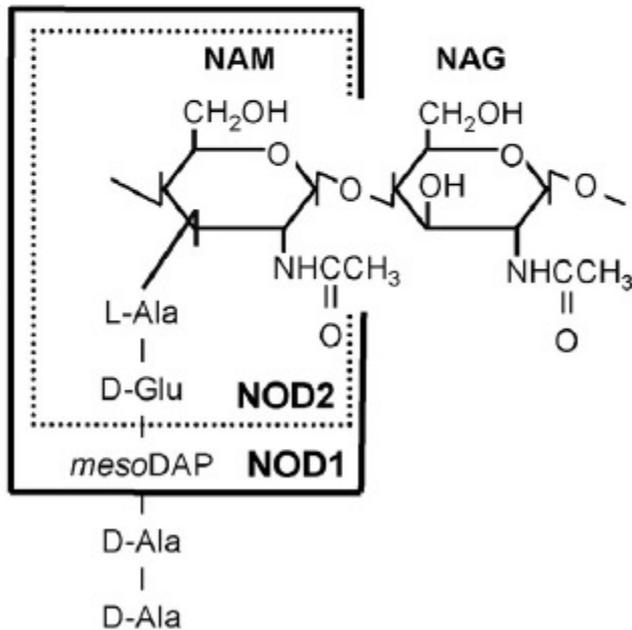


Lys type PG from Gram positive bacteria (except *Bacillus* sp, *Mycobacterium* sp etc)

B



C



D

