

I RECETTORI  
DELLE CELLULE  
DELL'IMMUNITA'  
INNATA CHE  
RICONOSCONO  
I PATOGENI

# Identificazione dei patogeni

Le cellule dell'immunità innata  
riconoscono alcune molecole espresse e/o  
prodotte dai patogeni dette

**PAMP**

(pathogen-associated molecular patterns,  
tramite alcuni recettori, detti

**PRR**

(Pattern recognition receptor)

# Identificazione dei patogeni

- I PRR sono dei recettori cellulari che riconoscono alcuni profili molecolari espressi dai patogeni chiamati (PAMPs), che non sono presenti nell'ospite, quali LPS, flagellina, peptidoglicano, dsRNA, mannano,  $\beta$ -glucano, DNA ecc.

# Esempi di PRR e di PAMP

Cell-associated pattern recognition receptors <b>PRR</b>	Location	Specific examples and their PAMP ligands
Toll-like receptors	Plasma membrane and endosomal membranes of dendritic cells, phagocytes, endothelial cells, and many other cell types	TLRs 1-9: Various bacterial and viral molecules (see Fig. 2-2)
C-type lectins	Plasma membranes of phagocytes	Mannose receptor: Microbial surface carbohydrates with terminal mannose and fructose
		Dectin: Glucans present in fungal cell walls
Scavenger receptors	Plasma membranes of phagocytes	CD36: microbial diacylglycerides
NLRs	Cytoplasm of phagocytes and other cells	Nod1, Nod2 and NALP3: bacterial peptidoglycans
N-formyl Met-Leu-Phe receptors	Plasma membranes of phagocytes	FPR and FPRL1: peptides containing N-formylmethionyl residues
Soluble recognition molecules	Location	Specific examples and their PAMP ligands
Pentraxins	Plasma	C reactive protein (CRP): Microbial phosphorylcholine and phosphatidylethanolamine
Collectins	Plasma	Mannose-binding lectin (MBL): Carbohydrates with terminal mannose and fructose
	Alveoli	Surfactant proteins SP-A and SP-D: Various microbial structures
Ficolins	Plasma	Ficolin: N-acetylglucosamine and lipoteichoic acid components of the cell walls of gram-positive bacteria

Abbreviations: TLR, Toll-like receptor; PAMP, pathogen-associated molecular pattern; NLR, Nod-like receptor

# Pattern Recognition Receptors (PRR)

I PRR possono essere suddivisi in base alla diversa espressione, localizzazione e funzione:

- **PRR che segnalano un'infezione**
  - Espresi sulla superficie o all'interno della cellula
- **PRR che inducono la fagocitosi o l'endocitosi**
  - Espresi sulla membrana delle cellule fagocitiche
  - Solubili

# Pattern Recognition Receptors (PRRs) che segnalano un'infezione

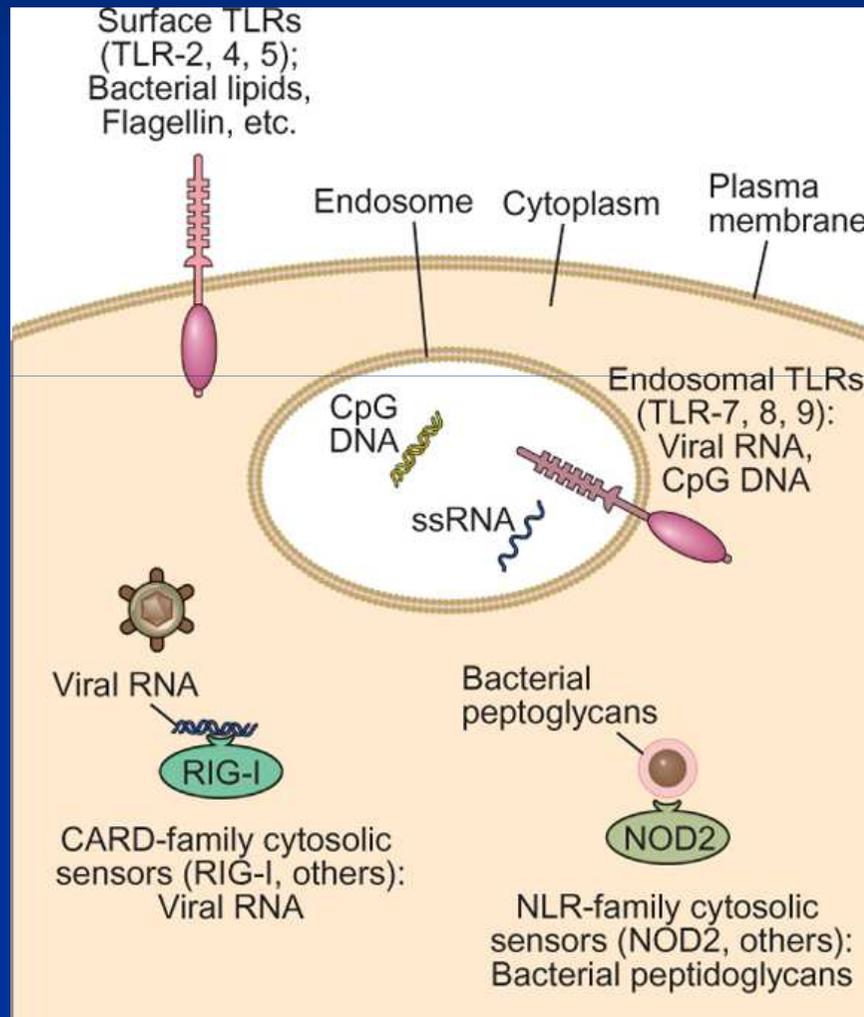
- Toll-like receptor (TLRs)
- NOD-like receptor (NLRs)
- RIG-I-like receptor (RLR, CARD family)

NOD: dominio di oligomerizzazione legante il nucleotide

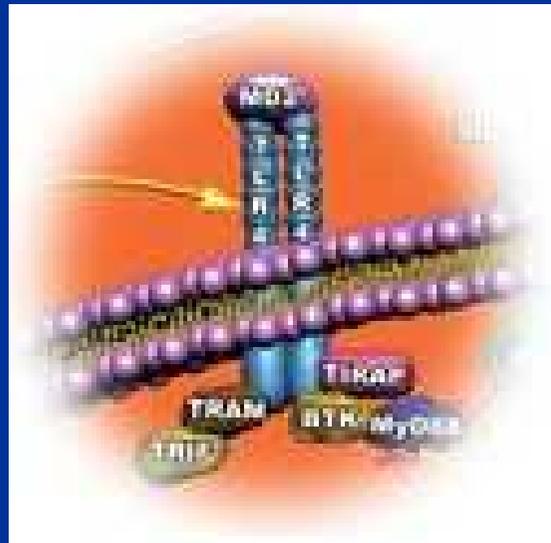
RIG:retinoic-acid-inducible gene I (RNA helicase)

# TLR NLR RLR :

Sono i sensori cellulari del pericolo e sono  
posizionati in maniera strategica



# TOLL-LIKE RECEPTORS



# Toll-like Receptors (TLRs)

I TLRs sono una famiglia di PRR conservatasi nell'evoluzione e sono espressi da diverse cellule importanti per le risposte innate contro i patogeni

Scoperti nella Drosophila

Presenti nel topo e nell'uomo (11)

## PAMPs riconosciuti

- lipopolisaccaride (LPS) della parete dei batteri Gram-negativi
- peptidoglicano della parete dei batteri Gram-positivi e Gram-negativi
- zymosan, flagellina
- RNA virale a doppio filamento
- DNA batterico e virale ricco di motivi CpG non metilati

# Christiane Nüsslein-Volhard: Drosophila Toll

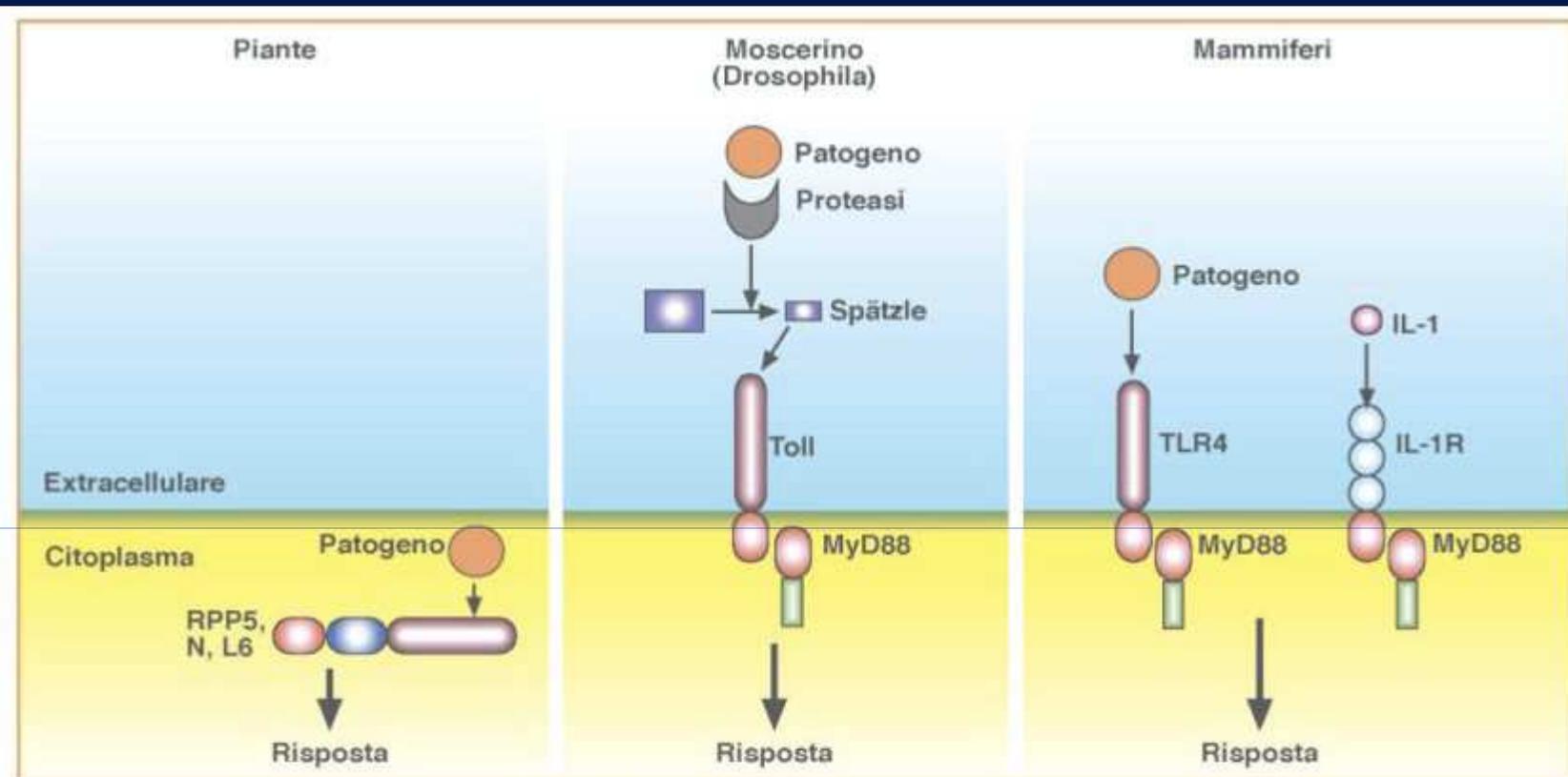


Premio Nobel 1995



Identificò nell'embrione della *Drosophila*  
una proteina che chiamò "Toll" (1985)

## EVOLUZIONE DEI TOLL-LIKE RECEPTOR

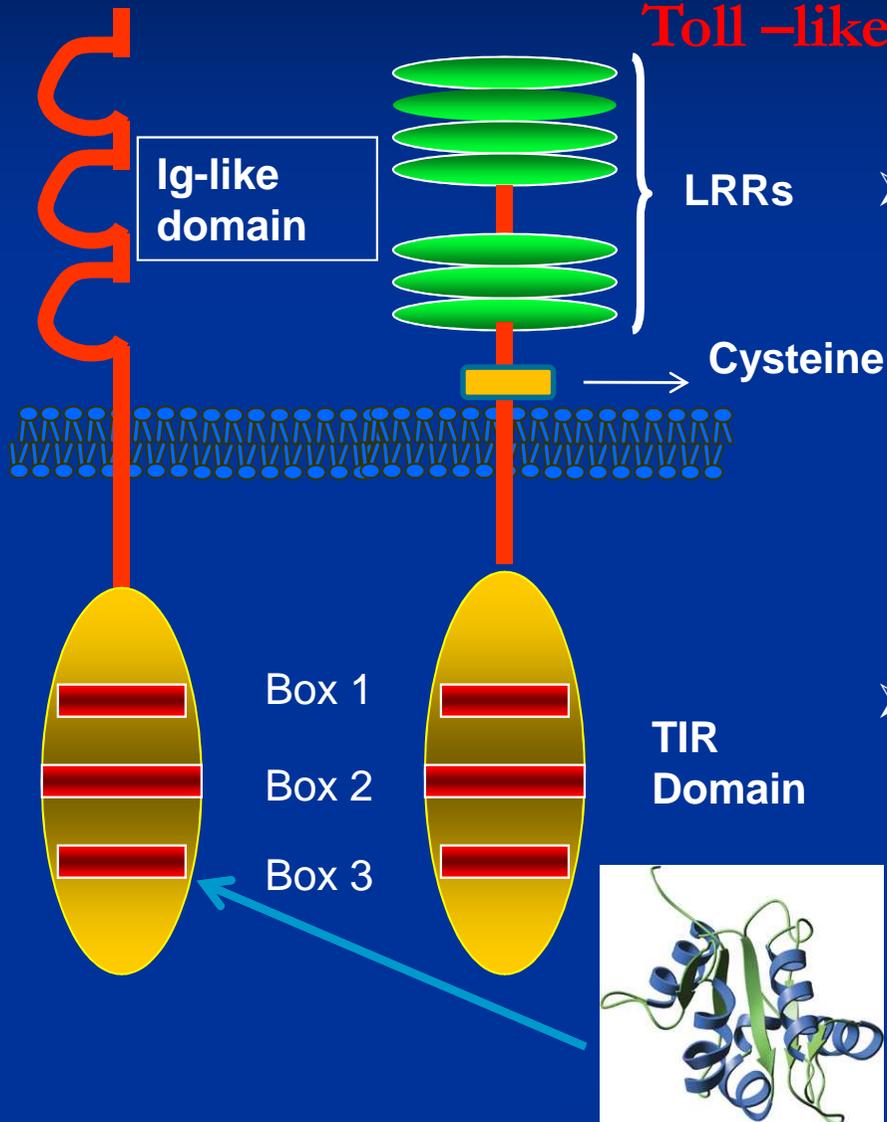


■ **Figura 13.6 - Evoluzione dei recettori "Toll-like" (TLR).**

I recettori TLR sono conservati nell'evoluzione dalle piante all'uomo nella porzione corrispondente al dominio TIR (Toll/IL-1 receptors). Questo dominio, in tutte le specie, attiva una cascata di eventi che porta all'attivazione dei meccanismi di resistenza innata. La cascata di trasduzione del segnale attivata dai membri della famiglia TLR/IL-1 è innescata da una molecola adattatrice chiamata MyD88. Il recettore Toll è stato scoperto nel moscerino della frutta (*Drosophila melanogaster*) come gene importante nella specificazione dell'orientamento dorso-ventrale dell'insetto, e soprattutto, come molecola fondamentale per la resistenza nei confronti di funghi. Il dominio TIR è condiviso dai recettori della famiglia del recettore di IL-1, in cui è stato originariamente scoperto. IL-1 e molecole relate sono citochine infiammatorie primarie di importanza fondamentale in una varietà di processi fisiopatologici.

# Toll-like receptor: Molecular Structure

## IL-1 receptor family

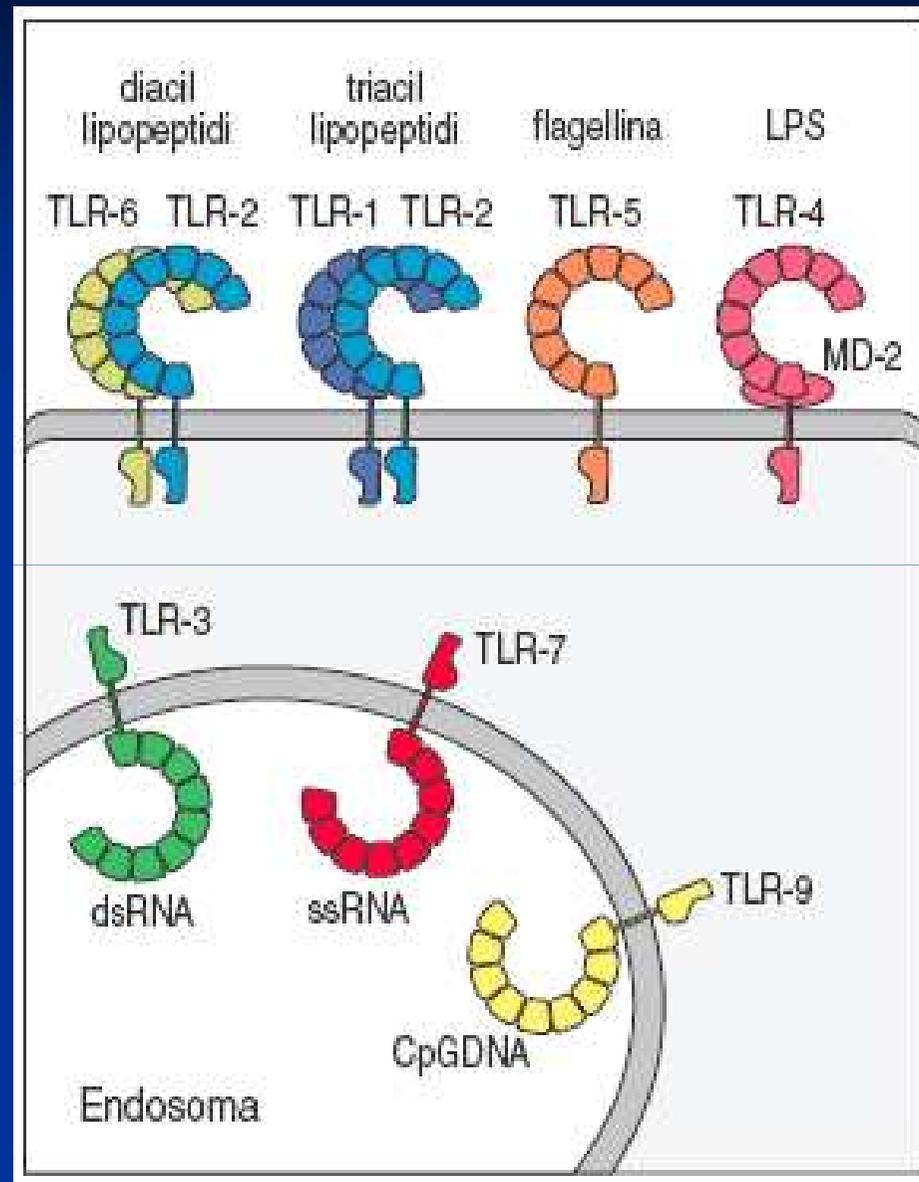


## Toll-like receptor family

➤ Toll-like receptor has an extracellular region which contains leucine rich repeats motifs (LRRs) and region rich in cysteine

➤ Toll-like receptor has a cytoplasmic tail which contains a Toll Interleukin-1 (IL-1) Recceptor (TIR) domain

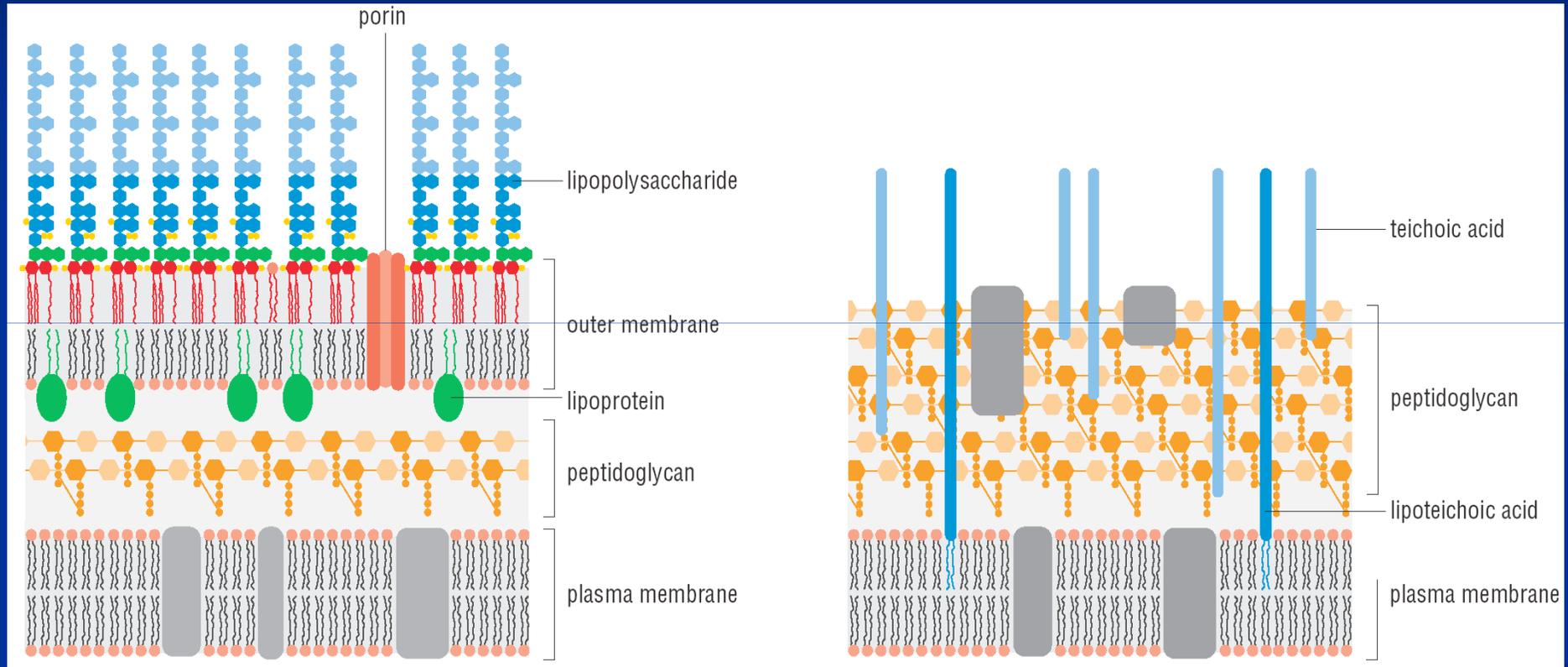
# Localizzazione dei Toll-like Receptors (TLRs)



# Toll-Like Receptors e i loro ligandi

Receptor	Ligand (PAMPs)	Origin of Ligand
TLR1	Triacyl lipopeptides Soluble factors	Bacteria and Mycobacteria <i>Neisseria meningitidis</i>
TLR2	Heat Shock protein 70 Peptidoglycan Lipoprotein/lipopeptides HCV core and nonstructural 3 protein	Host Gram-positive bacteria Various pathogens Hepatitis C Virus
TLR3	Double-stranded RNA	Viruses
TLR4	Lipopolysaccharides (LPS) Envelope protein Taxol	Gram-negative bacteria Mouse mammary-tumor virus Plants
TLR5	Flagellin	Bacteria
TLR6	Zymosan Lipoteichoic acid Diacyl lipopeptides	Fungi Gram-positive bacteria Mycoplasma
TLR7	Single-stranded RNA (ssRNA) Imidazoquinoline	Viruses Synthetic compounds
TLR8	Single-stranded RNA (ssRNA) Imidazoquinoline	Viruses Synthetic compounds
TLR9	CpG-containing DNA	Bacteria, Malaria and Viruses
TLR10	Not determined	Not Determined
TLR11	Profilin-like molecule	<i>Toxoplasma gondii</i>

# Componenti della parete batterica



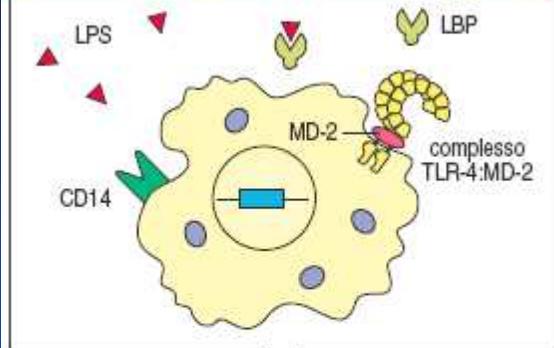
Batteri gram-negativi

Batteri gram-positivi

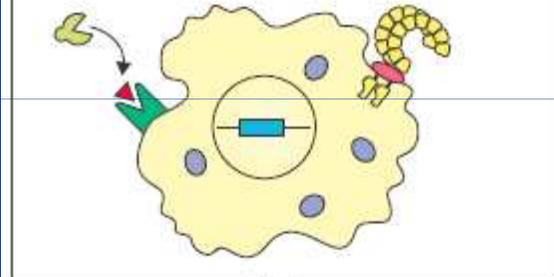
# Proteine accessorie per il TLR-4

Il legame del  
LPS al TLR-4  
espresso  
dai macrofagi è  
mediato dal CD14 e  
da MD-2  
ed è potenziato  
dal LBP

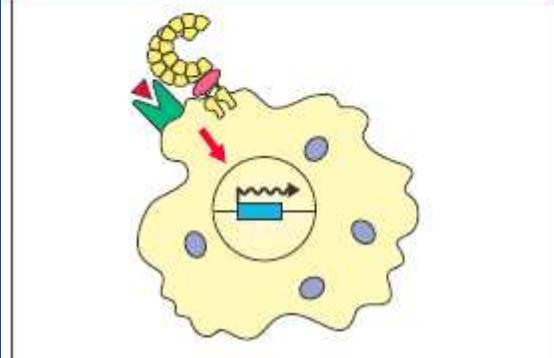
LPS nei fluidi corporei è legato da una proteina di fase acuta, la proteina che lega LPS (LBP)



Il complesso LPS:LBP trasferisce LPS a CD14 sulla superficie del fagocita



Avendo legato LPS, CD14 interagisce con il recettore Toll-like 4 (TLR-4:MD-2) dando luogo all'attivazione di  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  del nucleo



# Funzione dei Toll-like Receptors (TLRs)

Il legame dei recettori TLRs con i vari PAMPs innesca:

□ L'attivazione del fattore di trascrizione NF $\kappa$ B che porta alla:

➤ produzione di chemochine e citochine infiammatorie (TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, IL-18)

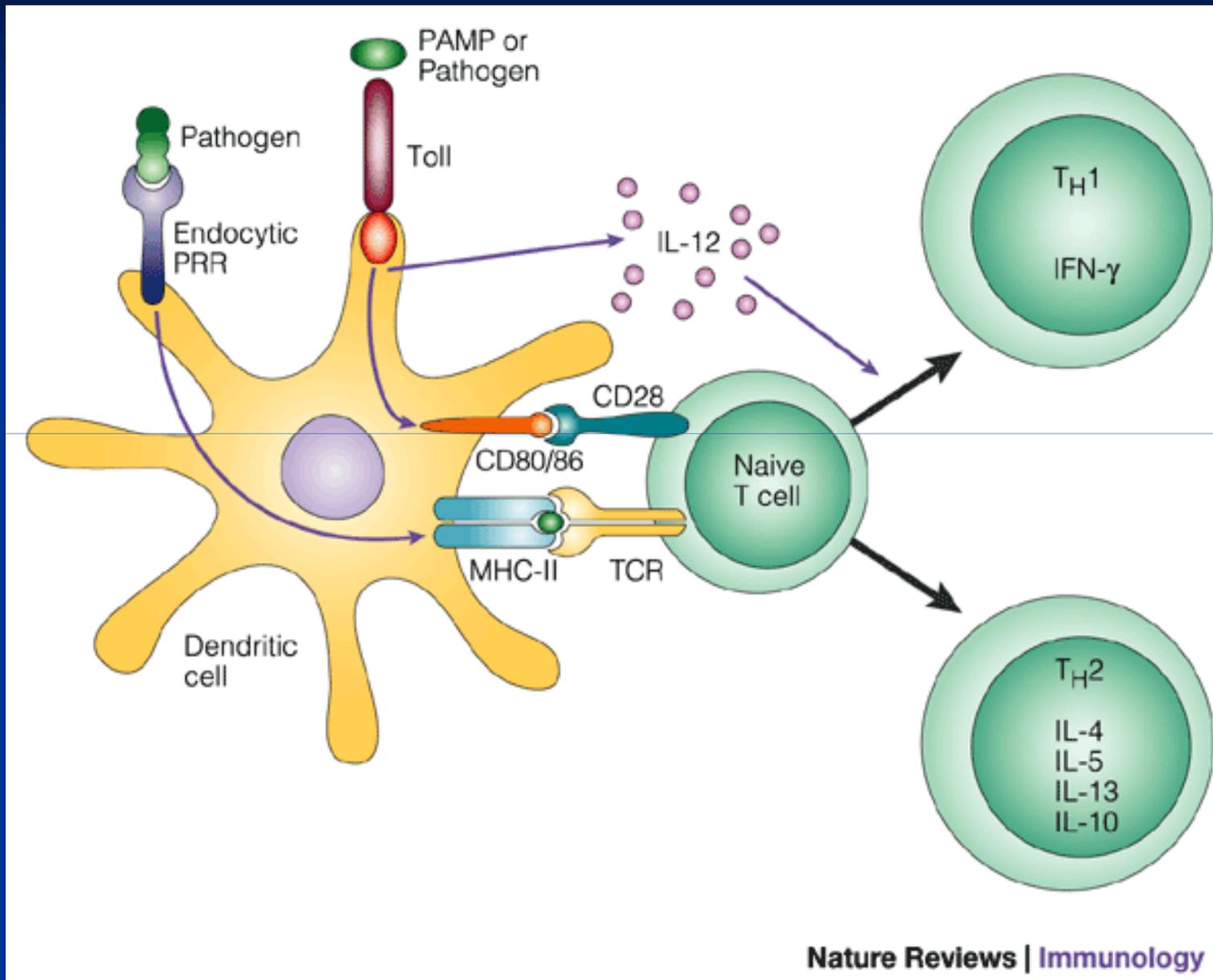
➤ espressione di molecole co-stimolatorie nelle cellule APC (CD80, CD86) con conseguente attivazione dell'immunità acquisita

➤ Molecole d'adesione (E-selectina)

□ L'attivazione del fattore di trascrizione IRF-3/7 che porta alla:

➤ produzione di INF  $\alpha/\beta$

# Toll-like receptors ed immunità acquisita

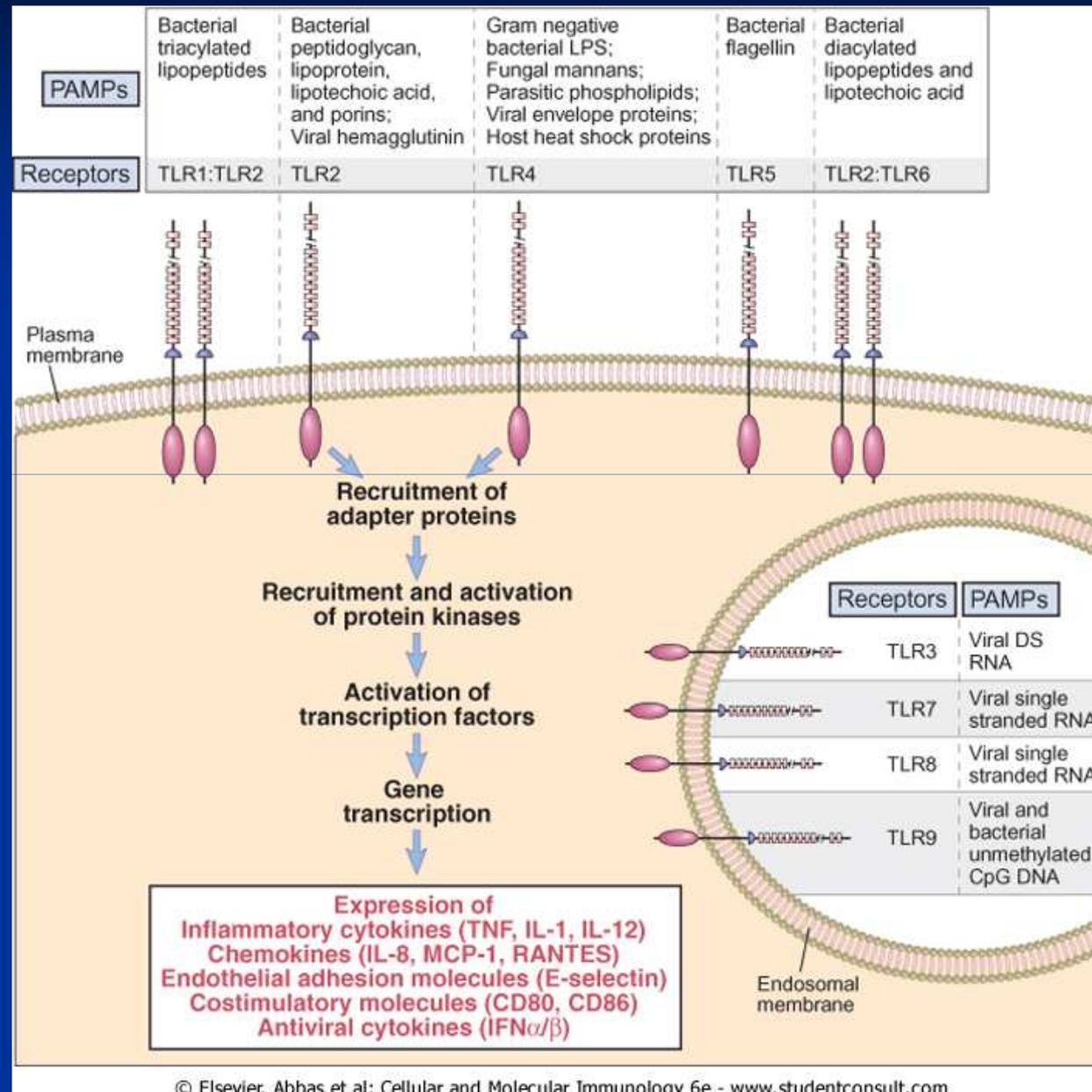


# CITOCHINE INFIAMMATORIE

Cytokines secreted by macrophages and dendritic cells			
Cytokine	Main producer	Acts upon	Effect
IL-1	Macrophages Keratinocytes	Lymphocytes	Enhances responses
		Liver	Induces acute-phase protein secretion
IL-6	Macrophages Dendritic cells	Lymphocytes	Enhances responses
		Liver	Induces acute-phase protein secretion
CXCL8 (IL-8)	Macrophages Dendritic cells	Phagocytes	Chemoattractant for neutrophils
IL-12	Macrophages Dendritic cells	Naive T cells	Diverts immune response to type 1, proinflammatory, cytokine secretion
TNF- $\alpha$	Macrophages Dendritic cells	Vascular endothelium	Induces changes in vascular endothelium (expression of cell-adhesion molecules (E- and P-selectin), changes in cell-cell junctions with increased fluid loss,

Figure 2-15 Immunobiology, 6/e. (© Garland Science 2005)

# TLR: Meccanismi essenziali della trasduzione del segnale



# Proteine adattatrici

MyD88 (myeloid differentiation factor-88).

TIRAP (TIR domain-containing adapter protein) anche chiamata MAL (da MyD88-adapter-like).

TRIF (Toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor inducing IFN-alpha/beta).

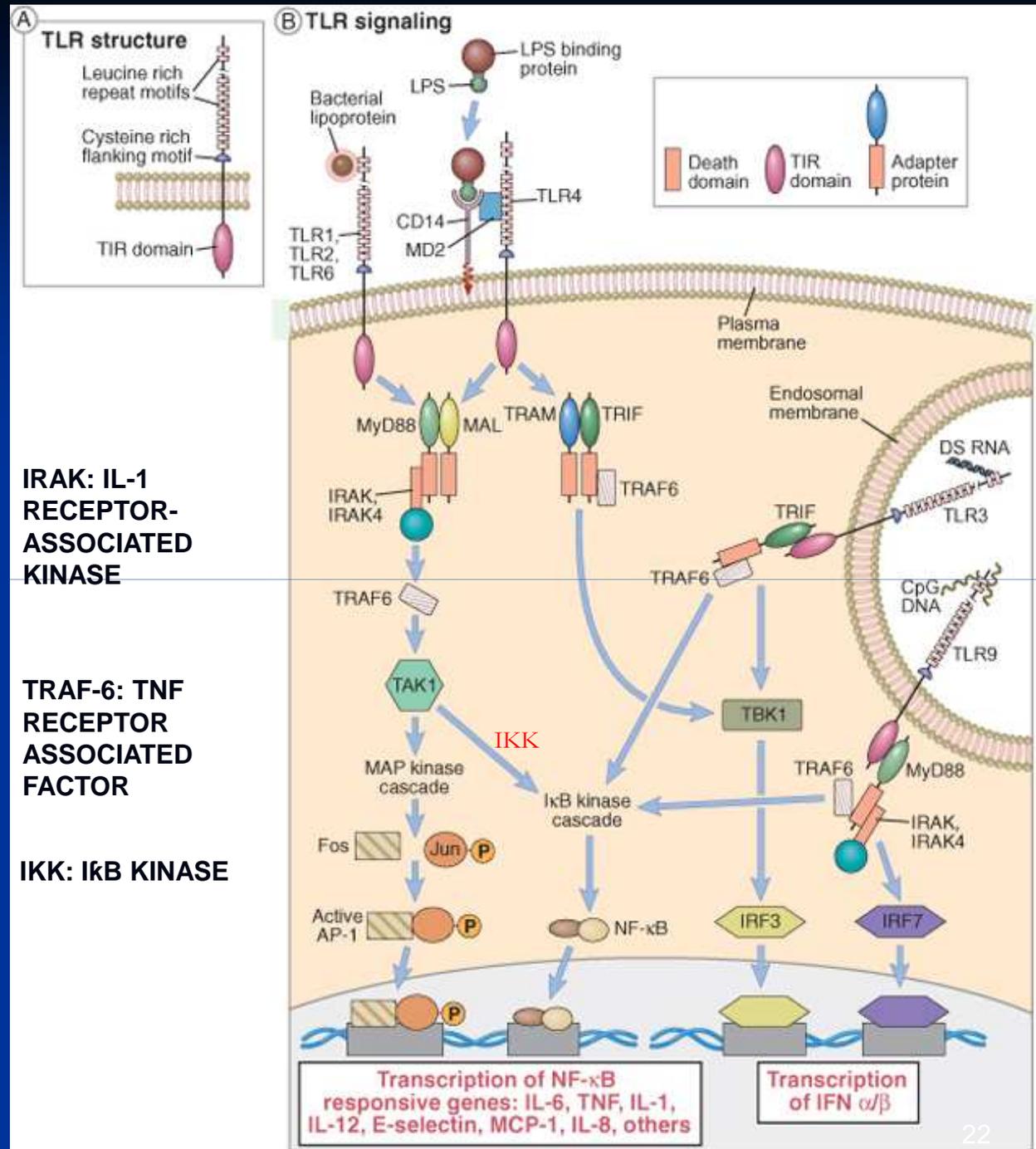
TRAM (Toll-receptor-associated molecule).

I vari TLRs usano differenti molecole adattatrici:

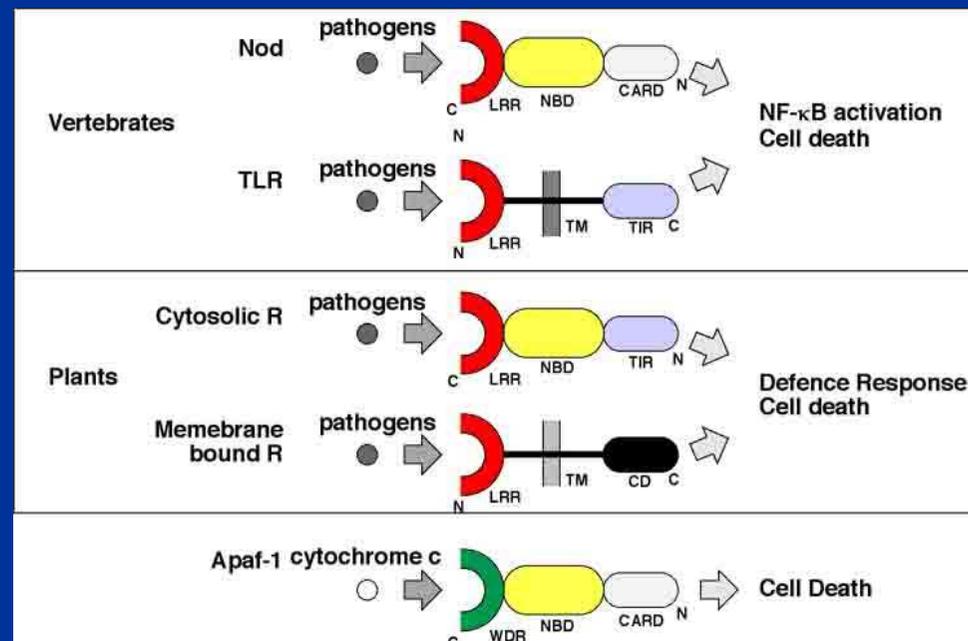
- MyD88: myeloid differentiation factor
- TIRAP/MAL: TIR-domain-containing adaptor protein/MyD88-adaptor-like
- TRIF: TIR-domain-containing adaptor protein inducing IFN- $\beta$
- TRAM: TIR-related adaptor molecule

**NF- $\kappa$ B:** regulatory transcription factor

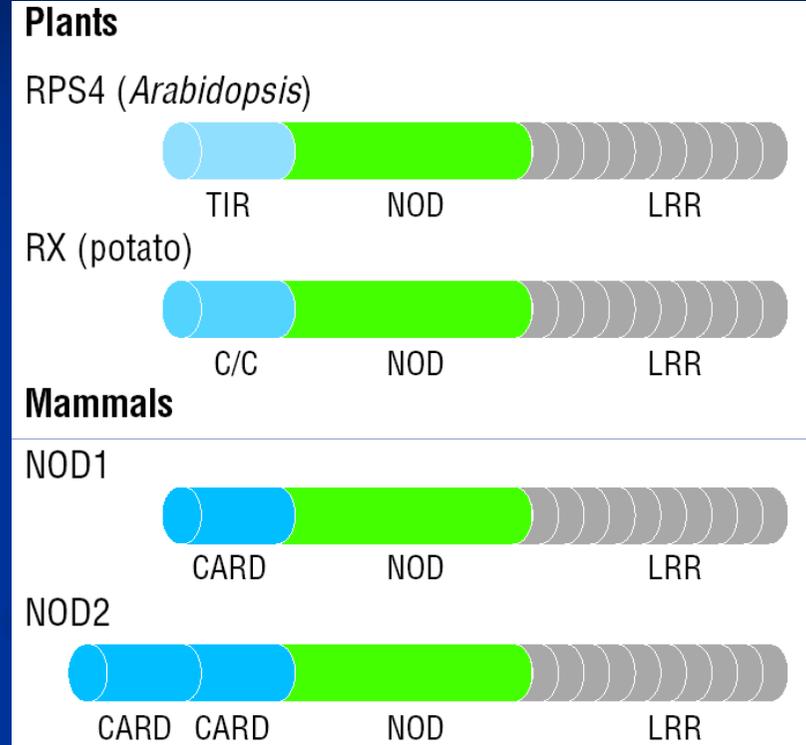
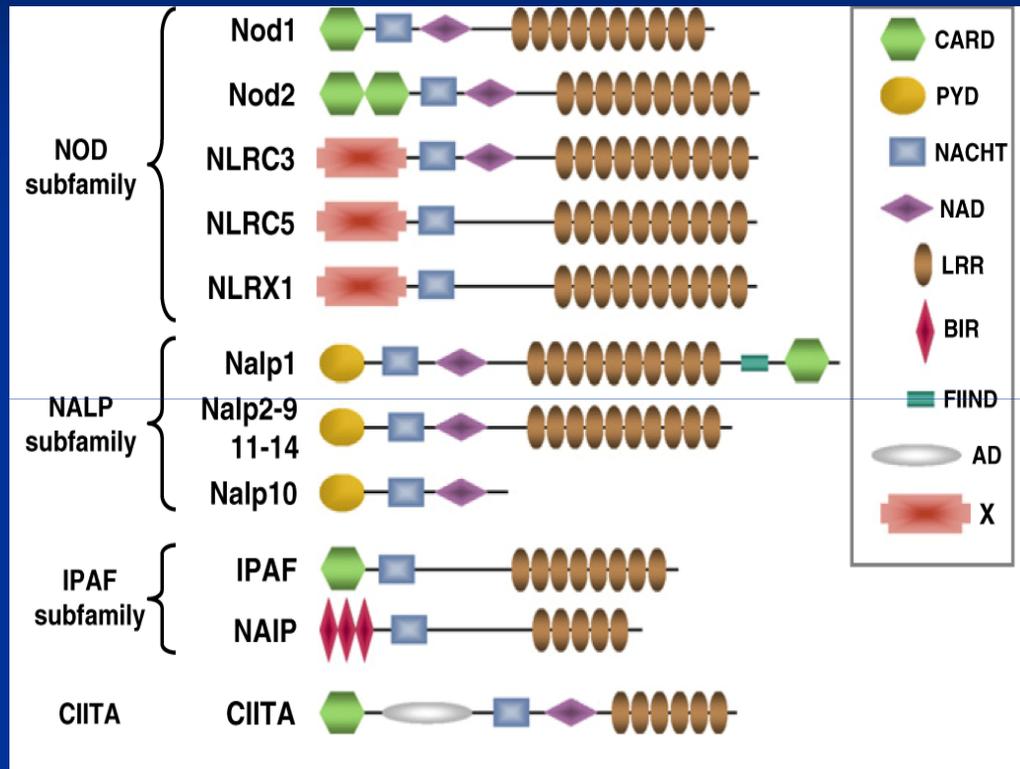
**IRF3:** IFN regulatory transcription factor



# NOD-like receptor (NLRs)



# NOD1 & NOD2 recognize peptidoglycan substructures and promote innate immune responses



©2004 New Science Press Ltd

NOD1 and NOD2 are intracellular molecules and resemble some plant disease resistance proteins; best understood of the “NOD-like receptors” or NLRs

# Struttura dei NODs



**CARD** (Caspase-activating and recruitment domain)

**NBD** (Nucleotide binding Domain)

**LRRs** (Leucine-Rich Repeats)

**3 DOMINI:**

**LRR** --> riconoscimento ligando

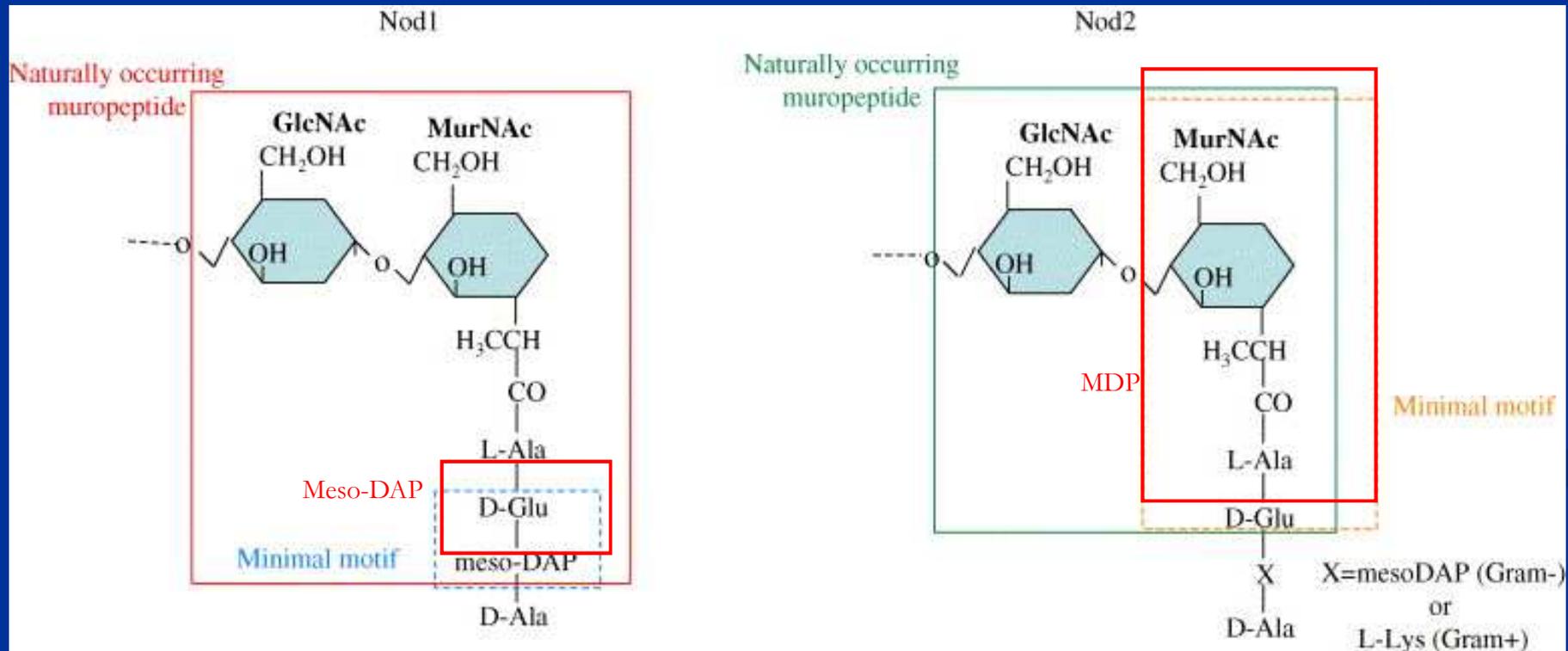
**NBD**--> oligomerizzazione

**CARD**--> reclutamento e attivazione

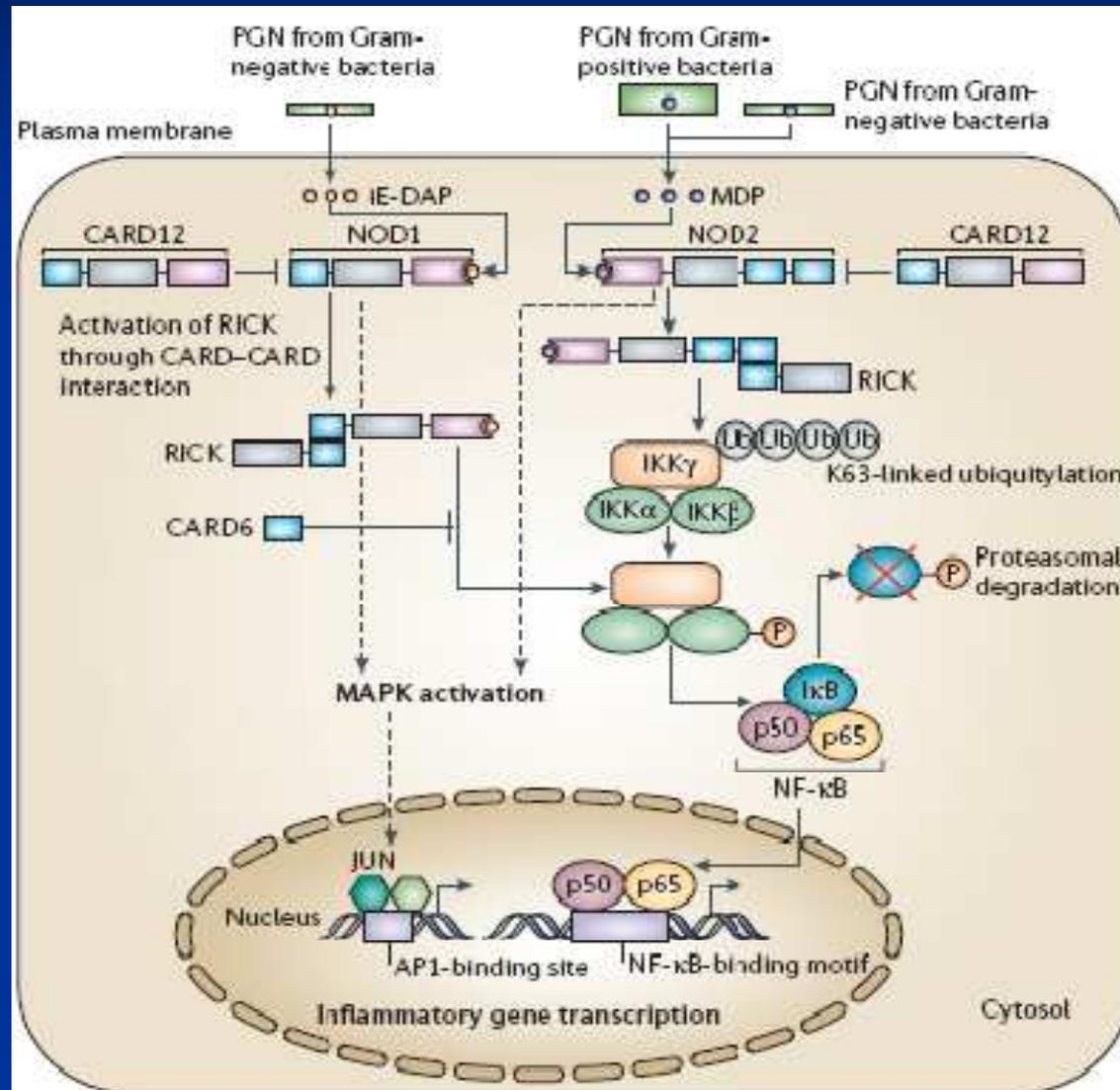
NOD ligands: molecules produced during synthesis and/or degradation of peptidoglycan

**NOD1.** dipeptide- $\gamma$ -D-glutamyl-meso-diaminopimelic acid (DAP), gram-negative

**NOD2:** muramyl dipeptide (MDP); gram-negative e gram-positive



# NOD signalling

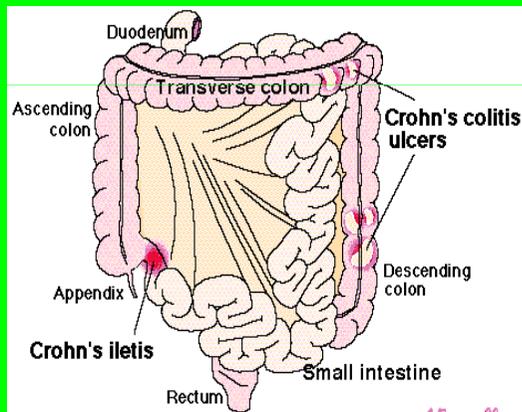


## Morbo di Crohn (NOD2)

una patologia multifattoriale grave a carico dell'intestino

- infiammazione transmurale a chiazze lungo tutto il tratto gastrointestinale
- sintomi extra-intestinali a carico di cute, articolazioni, occhi

Rischio di sviluppare tumore colonrettale.



Esistono 3 (+) varianti di NOD2 che conferiscono una maggior suscettibilità al morbo di Crohn sono localizzate nel LRR del gene NOD2 non è in grado di modulare l'attivazione del NF- $\kappa$ B



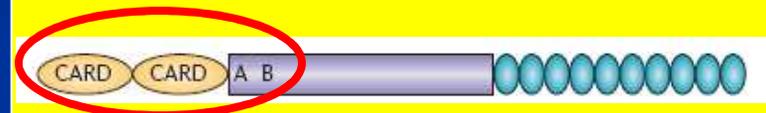
## Sindrome di Blau o sarcoidosi ad esordio precoce (NOD2)

rara patologia con

- eritema cutaneo
- uveite
- artrite
- formazione di granulomi

Le mutazioni di NOD2 associate alla BS sono localizzate nel gene CARD e rendono NOD2 sempre attivo anche in assenza di stimolo

Continua attivazione di NF- $\kappa$ B



## **NOD2 ha un duplice ruolo:**

- quando viene stimolato da solo attiva il fattore NF-kB
- quando viene stimolato insieme al TLR2 il NOD2, riduce l'attivazione di NF-kB da parte di TLR2

In un sistema fisiologico la situazione che si verifica è sempre la seconda, cioè **NOD2 è un modulatore negativo del segnale di TLR2**

*In un individuo sano l'attivazione di NF- $\kappa$ B da parte di TLR2 è limitata dall'azione di NOD2.*

*In un individuo affetto da morbo di Crohn, il NOD2 non esercita la sua funzione modulatrice, quindi TLR2 induce un'eccessiva attivazione di NF- $\kappa$ B che fa aumentare nell'APC la trascrizione di IL-12 e di IL-23 (un membro della famiglia di IL-12)*



L'IL-12 secreto dall'APC si lega all'IL-12R del linfocita Th1, il quale aumenta il rilascio di IFN- $\gamma$



L'IL-23 induce i linfociti Th a differenziare in Th17, cioè in una popolazione capace di rilasciare IL-17 ed è coinvolta nei processi infiammatori cronici e in alcune malattie autoimmuni

# RLR (RIG-I like helicases)

RIG-I

*retinoic acid inducible gene I*

MDA5

*melanoma differentiation associated gene 5*

LGP2

*laboratory of genetics and physiology*

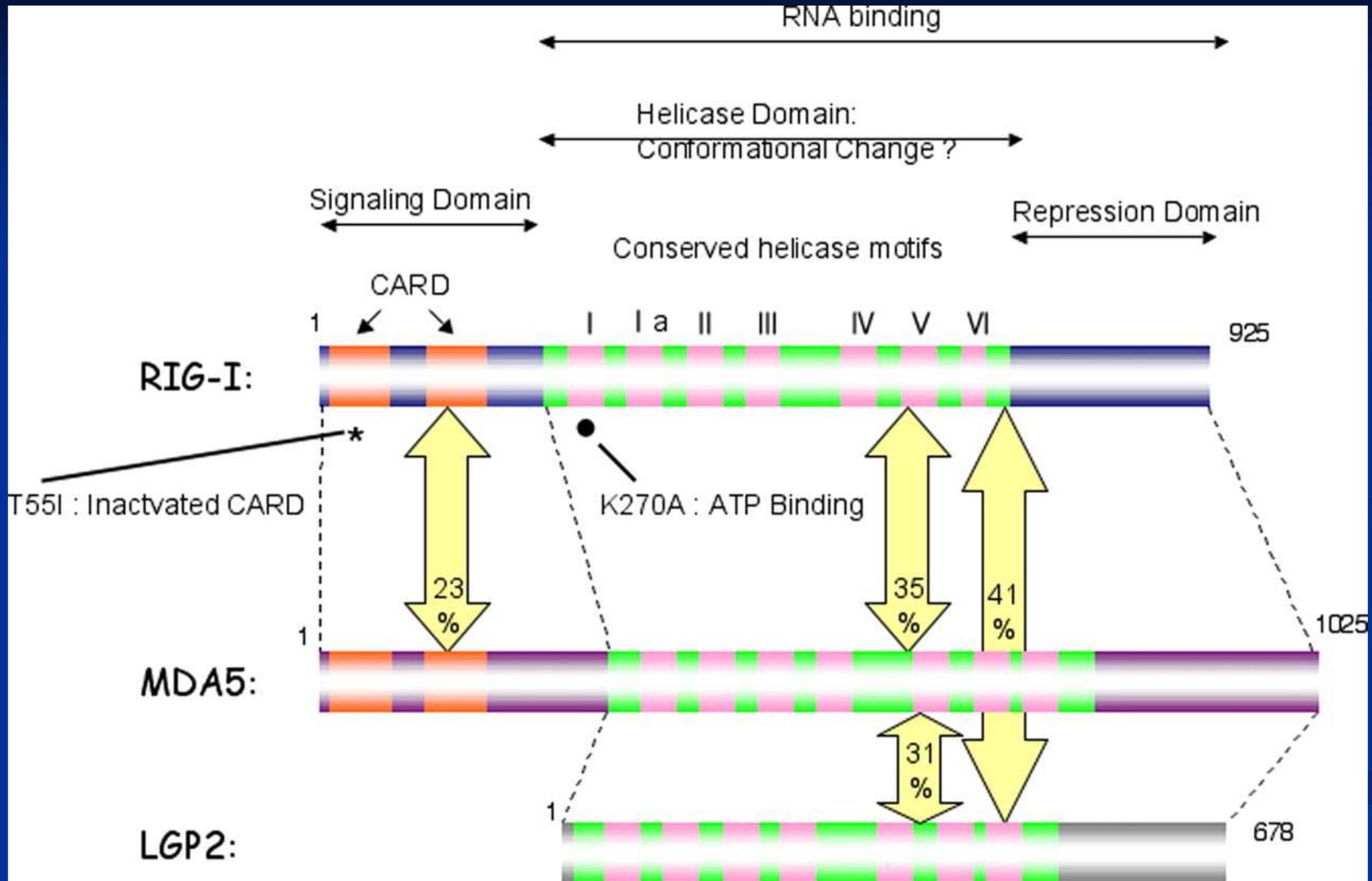
Riconoscimento di virus a RNA

Produzione di IFN di tipo I (alpha/beta)

Risposta immunitaria anti-virale

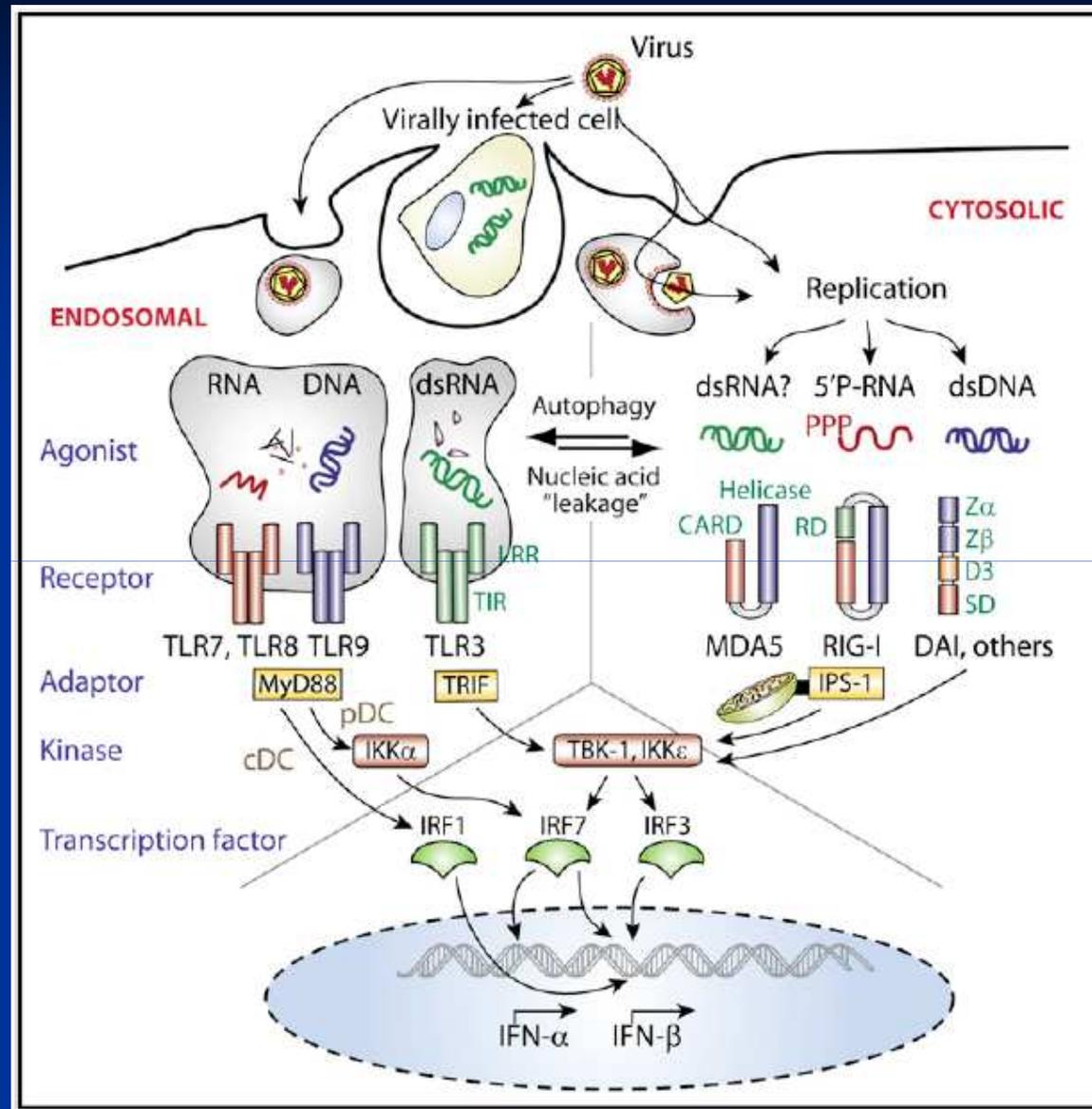
(apoptosi di cellule infettate, resistenza antivirale,  
attivazione NK & T cells)

# Rappresentazione schematica del RIG-I e degli altri RLRs



Yoneyama M, Fujita T J. Biol. Chem. 2007;282:15315-15318

# Innate response to viruses - nucleic acid recognition



# PRR espressi sulla superficie delle cellule

## Altri PRR espressi sulla membrana che legano i carboidrati batterici

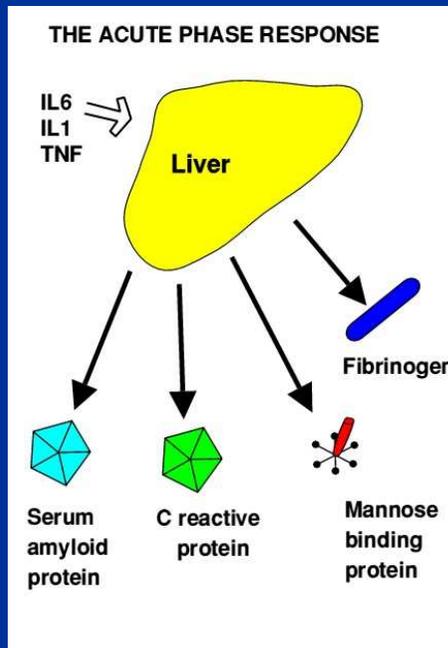
- **Il recettore per il Glucano**
  - Presente su tutti i fagociti

PRR espressi sulla membrana  
che legano alcuni componenti batterici

- **I recettori Scavenger**

- Riconoscono alcuni polimeri anioni e lipoproteine acetilate a bassa densità
- Si trovano su tutti fagociti

# PRR solubili



# PRR solubili

- **Proteine della fase acuta:** proteina C-reattiva; riconoscono la fosfolipina dei lipolisaccaridi
- **Collectine:** Lectina legante il mannosio (MBL);  
**Proteine surfactanti (SP-A / SP-D)** (polmone) riconoscono i carboidrati batterici (mannosio)

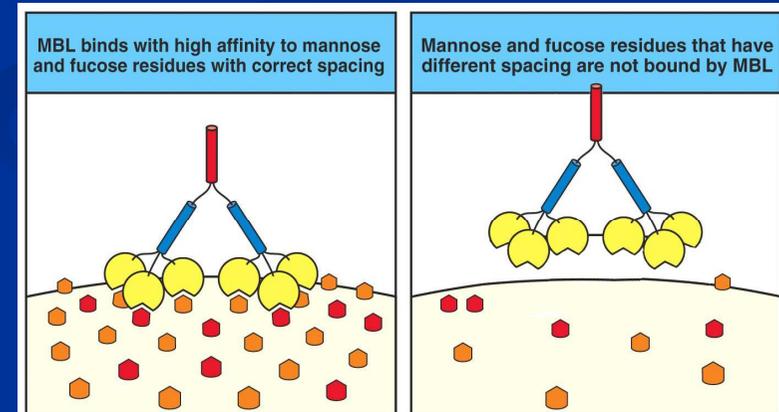
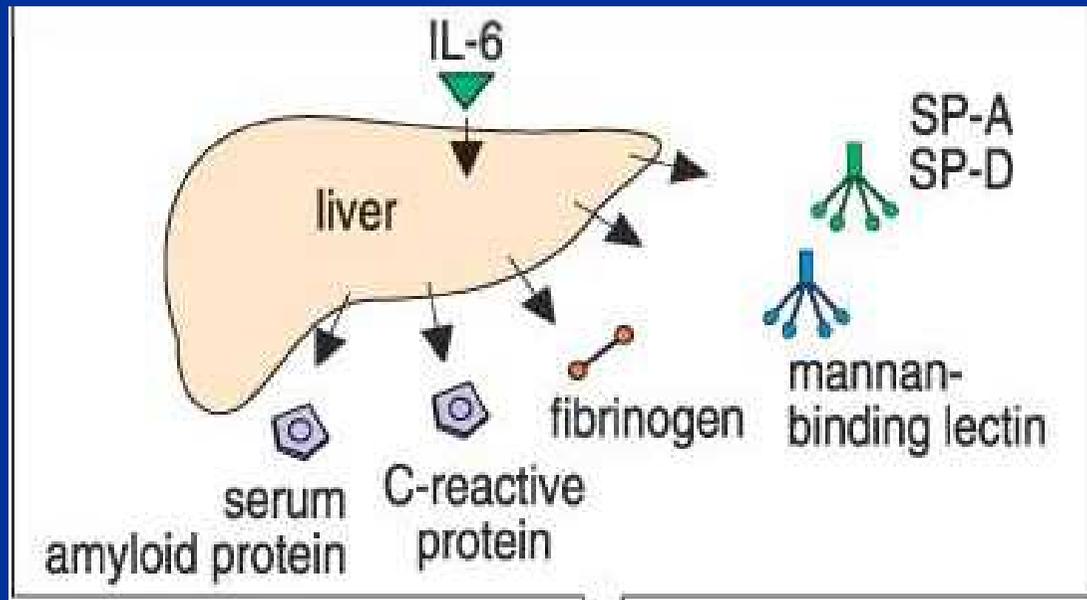


Figure 2-11 part 2 of 2 Immunobiology, 6/e. (© Garland Science 2005)

**I PRR di membrana e  
quelli solubili sono  
importanti per stimolare la  
fagocitosi e l'endocitosi**