

MeB – Pagine Elettroniche

Volume X

Gennaio 2007

numero 1

APPUNTI DI TERAPIA

La funzione dei toll-like receptor

Giorgio Bartolozzi

Membro della Commissione Nazionale Vaccini

Indirizzo per corrispondenza: bartolozzi@unifi.it

Esistono due sistemi, che contribuiscono all'**immunità negli umani**:

- il sistema innato (non specifico, non adattativo)
- il sistema adattativo (acquisito, specifico)

Ambedue sono essenziali per la sopravvivenza degli individui.

Il primo è costituito da un gran numero di cellule specializzate come i macrofagi, i neutrofili, le cellule natural killer (NK), le cellule dendritiche (DC), insieme a molte sostanze, come le citochine, gli interferoni α , β e γ (INF), le chemochine, la proteina C reattiva e le proteine che accompagnano la cascata del complemento. I componenti del sistema innato possono essere attivati entro pochi minuti od ore dall'inizio dell'infezione o dalla somministrazione del vaccino. Questa risposta rapida è indispensabile per la sopravvivenza degli individui, perché in generale ci vogliono molti giorni affinché i componenti del sistema adattativo entrino in funzione.

Una volta si pensava che il sistema innato e il sistema adattativo fossero nettamente distinti, ma ora si pensa che essi siano intimamente connessi e che il secondo non possa manifestarsi senza essere attivato dal primo.

Mentre l'induzione delle risposte adattative immuni specifiche richiede un numero di giorni relativamente alto (7-10

giorni), l'immunità innata fornisce difese entro pochi minuti od ore dall'inizio dell'infezione. L'**immunità innata non fornisce una risposta specifica**: essa si basa sulla digestione dei microrganismi e degli antigeni estranei da parte dei macrofagi. Un sofisticato sistema di recettori, i **recettori toll-like** fornisce considerevole attività nei confronti dei patogeni (un'ampia varietà di batteri, funghi, protozoi e virus) e delle sostanze estranee.

I toll-like recettori sono importanti per la clearance dei patogeni. A oggi una decina di differenti molecole toll-like è stata clonata, dimostrando una specificità generica per ampie categorie di patogeni, che si differenziano per relativamente piccole caratteristiche molecolari. Per esempio il toll-like 4 è responsabile del riconoscimento dell'endotossina batterica e di altre sostanze.

I toll-like recettori sono espressi sulle cellule mielomonocitiche, sulle cellule endoteliali ed epiteliali, come anche sulle cellule di vari organi. I recettori toll-like sono proteine transmembrana che hanno un comune dominio extracellulare, ricco di leucina e un dominio citoplasmatico comune. La protezione immediata, fornita da questi recettori, si basa sull'attività di molecole di ossigeno reattivo e di azoto-intermedio, peptidi antimicrobici, citochine, chemochine, molecole di adesione e proteine della fase acuta.

Tabella.XXX-Ruolo dei recettori toll-like (TLR) nel riconoscimento dei patogeni e nelle fisiopatologia delle malattie dell'uomo

(Abreu MT e Arditi M, 2004).

Recettore toll-like

Recettore toll-like	Ligandi	Patogeni o malattia
TLR1	Soltanto segnali, come un dimero, quando combinati con TLR2; riconosce la <i>Borrelia burgdorferi</i> OspA; richiesto per risposte adattive immuni Lipopeptidi triacilici (<i>Mycobacterium tuberculosis</i>) Fattori solubili	<i>Malattia di Lyme</i> <i>Neisseria meningitidis</i>

TLR2	Associato con CD11, CD18, CD14, MD-2, TLR1, TLR6, dectina I; lipoproteine, lipopeptidi Peptidoglicani dei batteri gram positivi Acido lipoteicoico Lipoarabinomannano (micobatteri) modulino fenolo-solubile (<i>Staphylococcus epidermidis</i>) Glicoinositolfosfolipidi (<i>Trypanosoma cruzi</i>) Glicolipidi (<i>Treponema maltophilum</i>) Porina (<i>Neisseria</i>) Zymosan (funghi) Lipopolisaccaridi atipici (<i>Leptospira interrogans</i>) Lipopolisaccaridi atipici (<i>Pseudomonas gingivalis</i>) HSP70 Virioni CMV Proteina emagglutinina del virus del morbillo selvaggio Fimbrie batteriche	<i>M. tuberculosis</i> Apoptosi delle cellule di Schwann nella lebbra Malattia di Chaga Leptospirosi Sepsis da funghi Malattia peridontale Viremia da CMV Morbillo
	RNA a doppia elica nei virus	La maggior parte dei virus
TLR4	Lipopolisaccaridi da germi intestinali gram-negativi Taxolo delle piante Virus respiratorio sinciziale Ligandine aggiuntive: proteina 60 dell'heath shock delle clamidie proteina F del RSV taxolo (piante) <i>M. tuberculosis</i> HSP 65 Proteine del capsido HSP 60 HSP70 Tipo III extra dominio di fibronectina Oligosaccaridi dell'acido ialuronico Frammenti polisaccaridici di heparan solfato Fibrinogeno Beta-defensina 2	Germi gram negativi <i>Chlamydia trachomatis</i> , <i>Chlamydia pneumoniae</i> Alcuni virus, come il RSV <i>M. tuberculosis</i> Vaccino del vaiolo
TLR5	Flagellina monomerica dei batteri gram positivi	Batteri flagellati, come le salmonelle
TLR6	Modulina fenolo-solubile Lipopeptidi diacilici (micoplasma)	
TLR7	Risponde all'imidazolchinolina, un agente antivirale Loxoribina Bropirimina Ligandina esogena ed endogena sconosciuta RNA a elica singola	Può essere utile come adiuvante nella terapia del cancro Infezioni virali
TLR8	Imidazolchinolina RNA a elica singola	Infezioni virali
TLR9	DNA batterico	Infezioni virali Infezioni batteriche e virali Può essere utile come adiuvante <i>Herpes simplex</i> tipo 2
TLR10	Sconosciuta	Sconosciuto

TLR10

Sconosciuta

Sconosciuto

Con la scoperta e la caratterizzazione dei recettori toll-like è divenuto evidente che la risposta immune innata è essenziale per innescare le risposte immuni adattative.

Il sistema immune innato può giocare un ruolo in molte malattie umane: sebbene la principale funzione dei recettori toll-like sia quella di riconoscere i patogeni, essi possono essere interessati alla patogenesi della malattia, soprattutto quando la risposta innata sia inappropriata ed eccessiva; qualcosa del genere può contribuire alla genesi di alcune comuni malattie, come la sepsi grave, la meningite, l'aterosclerosi, la malattia cronica intestinale, le malattie autoimmuni, come la sclerosi multipla, il lupus eritematoso sistemico e l'epatite.

E' ormai evidente che i recettori toll-like hanno, come ruolo primario, quello di riconoscere patogeni batterici, virali o fungini, che potrebbero essere deleteri per l'organismo ospite. Ne deriva che mutazioni a carico dei recettori toll-like contri-

buiscono ad aumentare la suscettibilità per alcune infezioni o per rendere più grave il decorso della malattia. E' stato dimostrato che mutazioni rare dei recettori toll-like 4, contribuiscono a sviluppare infezioni meningococciche gravi. Analogamente è stato visto che la deficienza del recettore associato all'interleuchina 1 chinasi-4 (IRAK-4) è stata diagnosticata in 28 pazienti con malattia invasiva, causata da batteri piogeni, principalmente lo *Streptococcus pneumoniae* e, in minor misura, lo *Staphylococcus aureus*.

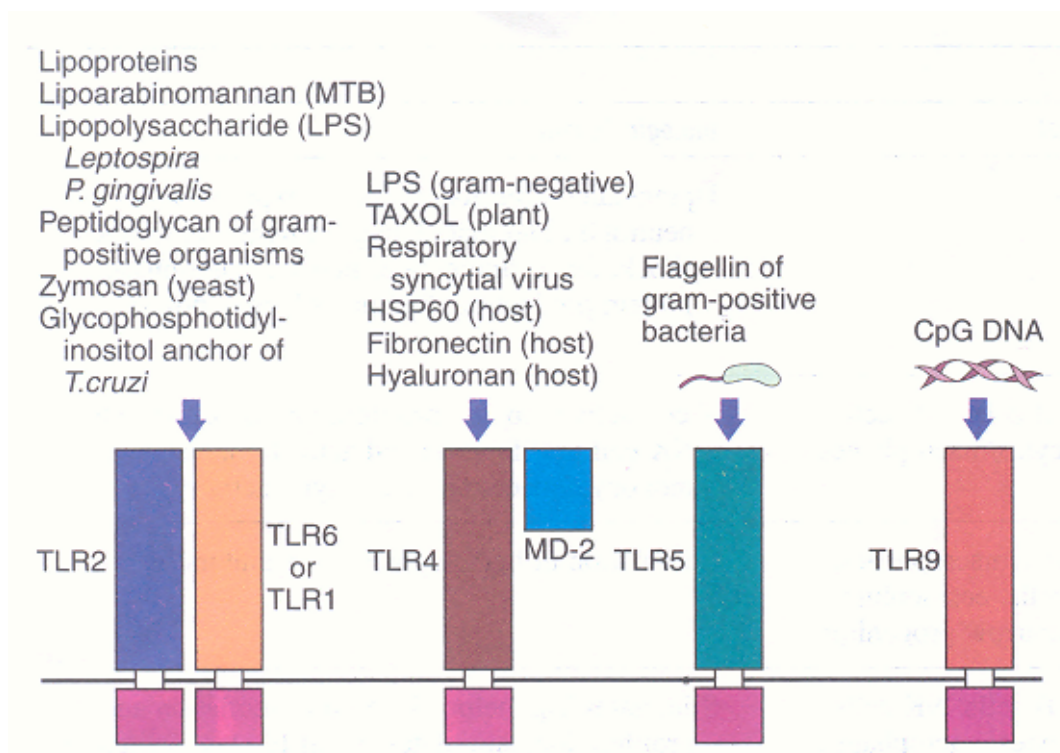
Analogamente la deficienza di UNV-93B sembra conferire una predisposizione selettiva verso la meningo-encefalite, causata dal virus dell'herpes simplex.

Figura 1. I recettori toll-like e i loro ligandi (Harrison's , *Principles of Internal Medicine* 2005, 16° ed. Pag. 1913)

Alcune molecole, associate ai patogeni, e alcuni prodotti, originati dall'ospite, utilizzano i membri della famiglia dei recettori toll-like (TLR) come trasmettitori di segnali di grande importanza. Il TLR2 riconosce una varietà di prodotti microbici; il TLR4 è essenziale per segnalare la presenza di lipopolisaccaridi (LPS), originati dai batteri gram negativi; fan-

no eccezione la *Leptospira* e la *Pseudomonas gingivalis*, i cui polisaccaridi sono riconosciuti dal TLR2. Il TLR4 riconosce non solo le sostanze dei virus e delle piante, ma anche i prodotti originati dall'organismo stesso del soggetto, come la proteina dello shock termico 60 (HSP60) e frammenti delle

fibronectina e dell'ialuronan. In confronto ai TLR2 e TLR4, il riconoscimento da parte dei TLR5 e TLR9 sono più ristretti e richiedono rispettivamente le segnalazioni della flagellina e del CpG mediato dal DNA.



I 10 recettori toll-like (TLR) (ma soprattutto i TLR3 e TLR4) utilizzano l'IRAK-4 come trasmettitore per l'interferon antivirale. L'IRAK-4 d'altra parte è essenziale per l'induzione precoce delle citochine pro-infiammatorie, come il tumor necrosis factor α , l'interleuchina-1 β e l'interleuchina-6 da parte dei batteri piogenici, attraverso il TLR1/2, TLR4, TLR5, TLR2/6 e TLR9 (vedi Figura 2). Le citochine, la cui produzione è indotta dai TLR, determinano l'infiammazione e tutti i fenomeni a essa connessi.

I segnali dei vari TLR reclutano i linfociti T e B del sistema dell'immunità adattativa perché inizino la loro risposta immune umorale e cellulare.

Quattro TLR (TLR3, TLR7, TLR9, TLR10) richiedono l'UNC-93B per la segnalazione.

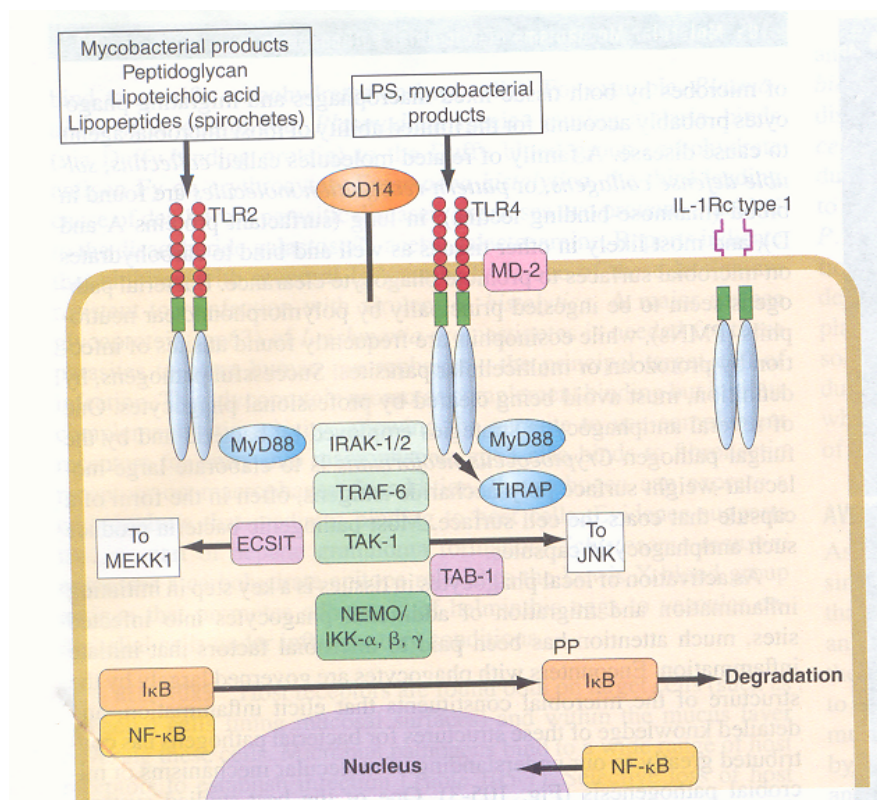
I TLR sono localizzati anche a livello dell'endotelio ipotalamico: essi vengono attivati da prodotti microbici (endotossine soprattutto), originate da germi gram negativi, e dagli acidi teicoici dei batteri gram positivi, a produrre PGE2 e quindi la febbre.

Figura 2. Vie di segnalazione dei recettori toll-like per la produzione delle citochine pro-infiammatorie in risposta ai prodotti batterici

(Harrison's, *Principles of Internal Medicine*, 2005, 16° ed., pag. 704)

Alcune sostanze presenti sulla superficie delle cellule microbiche interagiscono con il CD14, che a sua volta interagisce

con i recettori toll-like (TLR); alcuni costituenti microbici non necessitano del CD14 per interagire con i TLR: sia il CD14 che i TLR contengono domini ricchi di leucina. Associato al TRF4 c'è un cofattore (MD-2) che facilita la risposta ai lipopolisaccaridi. La parte citoplasmatica dei TLR si lega con la proteina, adattatore generale, MyD88, che si lega anche ai membri delle proteine transmembrana, recettori dell'interleuchina-1. La proteina adattatore, contenente il dominio TIR (TIRAP), partecipa al trasferimento dei segnali originati dal TLR4. Si arriva così all'attivazione delle molecole di trasferimento del segnale, come l'IRAK1/2 (recettore dell'interleuchina 1 chinasi 1- o 2), il TRAF-6 (recettore del tumor necrosis factor associato al fattore 6), TAK-1 (fattore β trasformante la crescita, attivante la chinasi 1), TAB1 (proteina 1 legante TAK1). Oltre all'attivazione di altre vie di segnalazione, che portano alla produzione di citochine e di risposte allo stress, come la via del c-Jun N-terminal chinasi (JNK) e la via MAP chinasi chinasi (MEKK1), i segnali mediati dal TLR portano all'attivazione del complesso della chinasi inducibile, IKK- α , - β e - γ . L'IKK- γ è chiamato anche NEMO (fattore nucleare κ B (NF- κ B) modulatore essenziale) fa parte di un vasto complesso che fosforilizza la porzione inibitoria (I) dell'NF- κ B, che porta alla liberazione dell'I κ B da parte dell'NF- κ B. L'I κ B fosforilato (PP) viene degradato e l'NF- κ B traslocato al nucleo, dove si lega ai siti di trascrizione sui geni bersaglio, la maggior parte dei quali codifica per le proteine proinfiammatorie.



La mancanza del TRF4 è incompatibile con la vita, perché si associa a malattie piogeniche invasive, causate tipicamente da batteri gram positivi, come lo *Streptococcus pneumoniae* e lo *Staphylococcus aureus* e più di rado da batteri gram negativi. Le infezioni iniziano nell'infanzia e nelle fanciullezza e sono rappresentate dalla meningite, artrite e/o setticemia. Altri aspetti tipici includono le lievi reazioni cliniche e le infiammazioni biologiche oltre alla ritardata caduta del cordone ombelicale. Con queste malattie sono già state descritte 18 famiglie con 28 pazienti in 11 Paesi. E' stato notato che i soggetti con deficienza di IRAK-4 non sono particolarmente suscettibili alle infezioni da micobatteri, da funghi e da virus. Al contrario la mancanza di UNC-93B si associa a encefalite da herpes virus e non a infezioni dovute a batteri.

Va sottolineato che in questi pazienti non si riscontra nessuna alterazione immunologica sia a carico della serie mieloide che linfoide.

La mancanza di IRAK-4 viene usualmente dimostrata misurando in vitro la produzione di $\text{TNF-}\alpha$ o di IL-6 da parte di cellule mononucleate, isolate dal sangue intero e stimulate con agonisti dei TLR (come i lipopolisaccaridi), o usando la prova immuno-enzimatica (ELISA) o infine all'interno delle cellule con la citometria di flusso. Analogamente la mancanza di UNCB-93B viene accertata misurando la produzione di interferon antivirale da parte delle cellule ematiche mononucleate, stimulate con TLR agonisti.

Tutte queste prove sono complesse, costose e richiedono molto tempo, per cui solo pochi laboratori sono in grado di eseguirle.

Di recente è stata descritta una prova rapida e di poco prezzo per la dimostrazione dei difetti dei TLR, basata sulla dimostrazione con la citometria di flusso mediante la valutazione

del distacco della L-selettina legata alla membrana (CD62L) dei granulociti (von Bernuth H, Ku C-L, Rodriguez-Gallego C, et al. A fast procedure for the detection of defects in toll-like receptor signaling. *Pediatrics* 2006, 118:2498-503).

Con questa nuova prova sono stati studiati 38 controlli sani e 7 pazienti nei quali geneticamente era stata dimostrata la presenza di difetti del recettore toll-like: 5 pazienti con una deficienza della chinasi 4, associata al recettore dell'interleuchina 1 e 2 pazienti con UNC-93B deficienza.

Nei soggetti con mancanza della chinasi 4, associata ai recettori dell'interleuchina 1, è risultato evidente un disturbo della liberazione della L-selectina dai granulociti, in seguito alla attivazione con agonisti dei recettori toll-like 1/2, 2/6, 4, 7 e 8. Tutti i controlli sani risposero invece normalmente a questa stimolazione.

Gli autori concludono che la valutazione della liberazione della L-selectina, legata alla membrana dei granulociti, mediante la citometria di flusso può risultare utile per la dimostrazione delle immunodeficienze primarie nella via dei recettori toll-like, come la mancanza della chinasi 4, associata al recettore dell'interleuchina-1 e la mancanza di UNC-93B. Confermano inoltre che questa prova è semplice e rapida; viene consigliata l'esecuzione di questa prova routinariamente in tutto il mondo nei bambini con malattia pneumococcica e nei pazienti con encefalite da herpes virus.

CONSIDERAZIONI PERSONALI

I recettori toll-like sono un costituente essenziale della immunità innata, che, come si sa, è comparsa, nella storia dell'evoluzione, molto prima dell'immunità adattativa; essa è presente, per la prima volta, negli organismi multicellulari

e rappresenta una pietra miliare nella lotta contro le infezioni. L'immunità innata è già presente in ogni persona alla nascita: essa blocca l'entrata dei microrganismi, elimina quelli che riescono a passare le barriere cutanee e mucose e costituisce un elemento indispensabile per l'attivazione e l'istruzione dell'immunità adattativa, altamente specifica e basata sulla comparsa di anticorpi (immunità umorale) e di cellule (immunità cellulare).

Essa è costituita da cellule (macrofagi, neutrofili, cellule natural killer, cellule epiteliali delle mucose, cellule endoteliali) e da sostanze, come le citochine, le chemochine, gli interferoni, la proteina C reattiva, la catena del complemento, la lecitina legante il mannosio e altre.

L'immunità innata è attivata da antigeni non self, da virus, da batteri, da protozoi, da funghi e da organismi pluricellulari; essa inizia precocemente, da pochi minuti a qualche ora dopo il contatto con agenti estranei e si basa sulla neutralizzazione delle sostanze estranee e degli agenti infettivi. La sua caratteristica è quella di rimanere uguale nel tempo, cioè di non aumentare d'intensità anche dopo ripetute stimolazioni. Quando lo stesso agente infettivo colpisce l'individuo per la seconda volta, la risposta è uguale, pari pari a quella che si era manifestata la prima volta. Non c'è in altre parole nessun tipo di adattabilità in seguito a contatti successivi.

I sensori sono rappresentati dai recettori toll-like, presenti sulla superficie di molte cellule e dalle proteine leganti il mannosio.

I recettori toll-like costituiscono infatti la prima linea di difesa: se ne conoscono per ora 10, ognuno stimolato da antigeni diversi. Si tratta di proteine transmembrana con un dominio extracellulare e un dominio citoplasmatico.

Essi sono i segnalatori della presenza di agenti estranei: dopo la loro stimolazione si manifestano numerosi eventi:

- produzione di ossigeno nascente
- attivazione della cascata del complemento
- attivazione dell'interferone
- attivazione delle cellule natural killer
- produzione di citochine e di chemochine
- produzione di molecole di adesione
- produzione delle proteine della fase acuta
- produzione di peptidi di vario tipo.

Le mutazioni dei recettori toll-like costituiscono un settore nuovo della patologia infettiva, perchè una loro variazione funzionale (polimorfismo) può associarsi a un'aumentata suscettibilità verso particolari agenti infettivi, in modo tale da rendere più facile e talvolta straordinariamente più grave una determinata infezione.

Poter oggi disporre di una prova relativamente semplice per identificare i difetti funzionali dei recettori toll-like, apre una finestra nuova del campo della patologia infettiva. E' molto probabile che poter disporre di una prova che può essere usata facilmente in un gran numero di condizioni, permetterà l'individuazione di nuove affezioni e anche dei fattori di rischio in situazioni patologiche ben conosciute. Una migliore conoscenza della partecipazione dei toll-like recettori al-

l'immunità conferita dalla vaccinazione apre nuove strade di ricerca.

Dopo l'era dell'immunità adattativa e dei relativi anticorpi, si apre una nuova strada, quella dell'immunità innata e dei recettori toll-like.