

JULES HOFFMANN¹ – SILVIA NAITZA

L'IMMUNITÀ INNATA: DAGLI INSETTI ALL'UOMO

Gentili Signore e Signori,

Vorrei prima di tutto ringraziare il Presidente della Fondazione Balzan “Premio”, Enrico Decleva, e il Presidente del Comitato Generale Premi, Salvatore Veca, per il loro gentile invito a fare questa presentazione sull'Immunità Innata.

Sebbene gli studi nel mio laboratorio siano stati essenzialmente focalizzati su insetti modello, fornirò oggi una prospettiva più generale, come indicato dal titolo di questa presentazione: *dagli insetti all'uomo*.

Dai reperti archeologici e dai molti archivi, abbiamo una grande quantità di informazioni sull'aspettativa media di vita umana dal Paleolitico fino ai giorni nostri. È notevole il fatto che l'aspettativa media di vita per oltre diecimila anni sia stata costantemente intorno ai venticinque anni. E dopo, improvvisamente, nel corso degli ultimi centocinquant'anni, è stato registrato un aumento spettacolare, fino a raggiungere i valori attuali di circa ottant'anni.

Quali sono le ragioni per questo spettacolare aumento dell'aspettativa di vita avvenuto tra il 1860 e il 2000? Esso è il risultato di scoperte nella microbiologia e nell'immunologia, che hanno posto le basi per tre novità biomediche essenziali: l'introduzione dell'igiene, degli antisettici e della sterilizzazione; quella della vaccinazione, e la scoperta degli antibiotici.

Tuttavia, come sappiamo, ci sono attualmente importanti problemi. Relativamente alla vaccinazione il problema principale è la mancanza di vaccini contro molti microbi, e anche la copertura soltanto parziale di alcuni vaccini contro microbi quali gli streptococchi e stafilococchi.

Un importante problema, diventato significativo negli ultimi decenni, è la crescente resistenza di molti ceppi microbici agli antibiotici disponibili.

¹ Premio Balzan 2007 per l'immunità innata. Lectio Magistralis, Milano, Fondazione Corriere della Sera, 7 settembre 2015.

Complessivamente, oggi la situazione sul fronte della lotta alle malattie infettive è deprimente, come illustrato dal fatto che circa 50 mila persone muoiono ogni giorno a causa di infezioni.

Di fronte a questa situazione delicata, ci possiamo tuttavia sentire confortati dal fatto che i settori della microbiologia e dell'immunologia stanno vivendo un grosso sviluppo grazie all'avvento della genetica molecolare, alla facilità attuale con cui si può sequenziare il genoma, e alle possibilità offerte dalla generazione di organismi transgenici, giusto per citare alcuni dei nuovi sviluppi.

Prima di parlarvi dei progressi recenti nello studio delle difese antimicrobiche, permettetemi di ricordare che il sistema immunitario degli animali ha sviluppato, nell'arco di un miliardo di anni di evoluzione, due strategie principali:

(1) l'immunità innata, inizialmente definita come una reazione immediata da parte di una cellula specifica, chiamata «fagocita», che ingloba i microrganismi invasori. L'immunità innata è priva di memoria;

(2) l'immunità acquisita o adattativa è la seconda linea di difesa. Si basa primariamente sui linfociti, un tipo speciale di leucocita del sangue dei vertebrati. Questa difesa segue l'immunità innata di diversi giorni. I linfociti portano un numero strabiliante di recettori, risultato di un complesso riarrangiamento di frammenti genici. Questi recettori appartengono, dal punto di vista strutturale, alla famiglia delle immunoglobuline. Fatto di rilevante importanza, alcuni specifici linfociti si possono convertire in cellule della memoria, un processo alla base della possibilità della vaccinazione. Gli studi condotti tra gli anni Cinquanta e Ottanta dello scorso secolo si sono concentrati essenzialmente sulla risposta immunitaria adattativa. L'immunità innata è rimasta un settore trascurato fino agli anni Novanta.

Dopo questa breve introduzione, consentitemi di tornare alla domanda centrale degli nostri lavori: Perché studiare l'immunità degli insetti?

Permettetemi di fare alcuni passi indietro. Quando ho iniziato il mio lavoro di Ph.D. all'Università di Strasburgo, sapevamo due cose:

- Da una parte, gli insetti rappresentano un gruppo particolarmente importante di animali sulla terra, che comprendono oggi circa l'80 per cento di tutte le specie viventi, e che mettono un terzo dell'umanità a rischio di malattie severe attraverso le loro capacità vettoriali; come risultato, ogni anno molti milioni di esseri umani muoiono e molti di più sono severamente colpiti.
- D'altra parte, sapevamo che gli insetti sono particolarmente resistenti alle infezioni, ma i meccanismi di resistenza erano sconosciuti.

– Dunque la nostra domanda: capire come funziona questa efficiente difesa che cosa ci può insegnare sulle risposte immunitarie in generale?

Nel corso degli anni il nostro laboratorio ha lavorato sulle difese antimicrobiche di vari tipi di insetti, focalizzandosi alla fine sul moscerino della frutta *Drosophila*, che è particolarmente adatto per gli studi genetici. Come gli altri invertebrati, la mosca si difende dalle infezioni soltanto con l'immunità innata.

Un primo importante risultato del nostro lavoro su questo organismo fu l'identificazione di sette distinte famiglie di peptidi antimicrobici inducibili, i cui nomi non sono importanti per noi. Lasciatemi giusto menzionare che queste nuove sostanze antibiotiche sono prodotte dal corpo grasso dell'insetto (un equivalente del fegato dei mammiferi) in risposta a uno stimolo immunologico e sono secrete nel sangue, dove combattono i microrganismi invasori, interagendo con e destabilizzando le loro membrane.

È da notare che è stato scoperto che anche noi esseri umani produciamo abbondanti quantità di molecole simili nelle nostre barriere epiteliali dell'intestino, polmoni, tratto uro-genitale, e nella pelle.

Il nostro obiettivo successivo – sempre nel modello della mosca – è stato di analizzare il controllo dell'espressione dei geni che codificano per questi peptidi antimicrobici.

Quando clonammo questi geni, notammo la presenza nel loro promotore di siti di legame per il trasattivatore dei geni della risposta immunitaria, chiamato NF- κ B, scoperto pochi anni prima da David Baltimore negli Stati Uniti e implicato nel controllo dell'espressione dei geni immunitari dell'uomo. La mutazione di questi siti di legame nella mosca aboliva l'inducibilità dei peptidi antimicrobici, dimostrando che la loro presenza era obbligatoria per l'attivazione di una risposta immunitaria. Importante per i nostri studi, Christiane Nüsslein-Volhard, a Tübingen, che ha ottenuto il Premio Nobel 1995, e i suoi collaboratori, avevano osservato alcuni anni prima, che una proteina appartenente alla famiglia di NF- κ B era presente nelle mosche e controllava la formazione dell'asse dorsoventrale durante lo sviluppo embrionale di *Drosophila*. Come anche mostrato dagli studi di Nüsslein-Volhard e colleghi, l'attivazione di NF- κ B durante lo sviluppo embrionale dipendeva da un segnale trasmesso attraverso un recettore di membrana che chiamarono Toll.

Al nostro gruppo occorsero parecchi anni per decifrare il problema del controllo dell'espressione dei peptidi antimicrobici nelle mosche in seguito a un'infezione. Le due diapositive successive riassumono i nostri risultati:

(1) una via controlla l'espressione dei geni coinvolti nella difesa contro i funghi – basandosi sul parziale riutilizzo dei geni coinvolti nella formazione dell'asse dorso-ventrale nell'embrione di mosca, incluso il recettore transmembrana Toll, mentre

(2) una distinta cascata di geni controlla la difesa contro le infezioni di batteri Gram-negativi. Chiamammo questa via IMD per Immunodeficienza.

Le cascate del segnale comprendono ciascuno più di una dozzina di geni, tutti ormai identificati.

È importante notare che mutazioni in questi geni aboliscono la rispettiva difesa immunitaria e rendono le mosche altamente vulnerabili alle infezioni. Per esempio, mutazioni in geni della via Toll aboliscono la risposta ai funghi, mentre mutazioni nella via IMD aboliscono la resistenza alle infezioni di batteri Gram-negativi. La sfortunata mosca apparsa sulla copertina della rivista *Cell* nel 1996 e in seguito diventata celebre, è stata utilizzata per illustrare esperimenti fatti nel nostro laboratorio (da Bruno Lemaitre, due studenti di dottorato, e Jean-Marc Reichhart) su mosche mutanti per il recettore transmembrana Toll, che Bruno aveva infettato con spore del fungo *Aspergillus*. La mosca è morta ricoperta da ife fungine; la morte in questi mutanti avviene diversi giorni prima di quella delle mosche di controllo. Questa fu la prima volta in cui venne dimostrato il coinvolgimento di un recettore transmembrana Toll nelle difese immunitarie. Da allora, oltre 25 mila articoli sono stati pubblicati sulle funzioni di questi recettori in molti sistemi biologici, e in particolare in studi biomedici e clinici, come vedremo.

Nel 1992 ho visitato il Professor Charles Janeway all'Università di Yale e insieme al Professor Alan Ezekowitz alla Harvard Medical School abbiamo intrapreso una stretta interazione. Il professor Janeway stava esplorando l'idea di un'attivazione obbligatoria dell'immunità adattativa da parte dell'immunità innata. Contemporaneamente, il Professore Ralph Steinman al Rockefeller Institute di New York – e un laureato del Premio Nobel nel 2011 – aveva lavorato intensamente sul ruolo delle cellule dendritiche nell'attivazione delle cellule adattative del sangue, i linfociti, che ho già menzionato. L'idea centrale era che l'attivazione di NF-kB da parte di frammenti microbici stimolerebbe la produzione di una serie di molecole, che andrebbero a trasformare i linfociti naïve in cellule immunologicamente attive. A questa ipotesi, tuttavia, mancava un componente centrale: l'identità del recettore delle cellule immunitarie innate in grado di rispondere ai microbi e di iniziare la cascata del segnale che porta all'attivazione dei linfociti naïve. Un anno dopo il nostro studio sulle mosche, Janeway e il suo collaboratore Medzhitov riportarono il clonaggio di un omologo umano di

Toll di *Drosophila*, che nominarono recettore di tipo Toll (Toll-like receptor, TLR). Ancora un anno più tardi, Bruce Beutler, – un premiato Balzan nel 2007 e anche un laureato del Premio Nobel nell'2011 riuscì a identificare a San Diego negli Stati Uniti il recettore del topo per il lipopolisaccaride microbico, che risultò anche essere un omologo del Toll di *Drosophila*. Negli anni immediatamente successivi ci fu una vera esplosione nel campo, e divenne presto evidente che topi ed esseri umani producono circa una dozzina di recettori transmembrana di tipo Toll, che si trovano sulla superficie cellulare o nelle membrane endosomiali. Questi legano una varietà di componenti della parete cellulare o di sequenze nucleotidiche microbiche. Come risultato di questi legami, i domini di segnalazione intracitoplasmatici attivano cascate che portano a due principali effetti:

(1) produzione diretta di geni della risposta immunitaria innata, e precisamente dei peptidi antimicrobici,

(2) attivazione della risposta immunitaria adattativa. Come già detto sopra, più di 25 mila articoli sono apparsi negli ultimi quindici anni, sui TLRs, specialmente nei mammiferi e in contesti clinici, che collegano queste molecole a malattie infettive, all'infiammazione, alla vaccinazione, all'autoimmunità, all'immunoterapia e precisamente alla immunoterapia dei tumori, e alla neuro-immunologia. Di nota, alcune dozzine di compagnie biotecnologiche sta attualmente verificando il potenziale di questo sistema di difesa dipendente dai Toll nella terapia umana.

Le nostre conoscenze dell'attivazione dell'immunità innata dei mammiferi sono aumentate significativamente durante gli ultimi dieci anni.

(1) la nozione iniziale che i TLRs sono le sole sentinelle contro i microbi e che sono attivate solo da ligandi microbici si è dimostrata troppo restrittiva;

(2) infatti, numerose e varie molecole e specialmente cellule proprie danneggiate possono agire come attivatori dei TLRs;

(3) l'idea che i TLRs sono i soli recettori capaci di attivare NF- κ B in risposta a dei ligandi microbici o cellule proprie danneggiate si è ugualmente dimostrata troppo restrittiva.

Infatti adesso sappiamo, grazie agli sforzi di dozzine di laboratori in tutto il mondo, che almeno cinque distinte categorie di recettori riconoscono molecole microbiche o cellule proprie danneggiate. Purtroppo non abbiamo tempo in questa presentazione di entrare maggiormente nel dettaglio. Voglio solo menzionare che la maggior parte di questi recettori sono presenti sia nei mammiferi che negli invertebrati, in particolare in *Drosophila*.

Ora vorrei discutere dell'evoluzione della risposta immune innata.

Permettetemi di ricordare che quando iniziammo i nostri studi sulle difese immunitarie degli insetti, ci aspettavamo di trovare una situazione del tutto differente da quella dei mammiferi. Consentitemi di mostrarvi quanto ci eravamo sbagliati, paragonando alcuni dei parametri delle difese immunitarie tra mosche e uomo. Per questo ho selezionato alcuni componenti rappresentativi di queste cascate del segnale, nello specifico Toll e IMD nella mosca e le vie del recettore Toll-like 4 (TLR4) e del recettore del TNF (TNF-R) nei mammiferi.

Ne emerge ciò che nessuno di noi, sia nel settore delle difese immunitarie della mosca, sia in quello dell'immunità dei mammiferi, avrebbe potuto prevedere vent'anni fa, cioè l'alta conservazione nelle vie del segnale dell'immunità innata tra questi due gruppi. In entrambi i casi,

- Recettori transmembrana sono attivati o da citochine processate (Spätzle/TNF-) o dall'interazione diretta con strutture microbiche (lipopolisaccaride, peptidoglicano),
- L'attivazione è poi trasmessa, attraverso proteine adattatrici simili, a chinasi altamente conservate, nello specifico la molecola chiamata chinase TAK1 (uno).
- Poi è trasmessa a un complesso attivatore di NF-kB e all'espressione dei geni della risposta immune.

Come possiamo spiegarci che i meccanismi di controllo basilari dell'immunità innata siano così ben conservati tra mosche e uomo? E quando è apparso questo sistema nell'evoluzione?

Il genoma di molte migliaia di organismi è stato ormai completamente sequenziato, e attraverso ricerche in banche di dati possiamo infatti notare che le caratteristiche essenziali della diapositiva precedente erano già presenti in organismi tanto antichi come gli anemoni di mare (diapositiva 25). In altre parole, apparvero insieme alla multicellularità, un miliardo di anni fa, e sono stati conservati nel corso dell'evoluzione fino agli esseri umani dei nostri giorni, dove continuano a servire come prima linea di difesa immunitaria E (insisto ancora su questo E) attivano/rafforzano la risposta immunitaria adattativa che comparve nei pesci, circa 450 milioni di anni fa, quando i linfociti si differenziarono dai precursori mieloidi.

In conclusione, fatemi sottolineare ancora che la nostra comprensione delle difese antimicrobiche è andata incontro negli ultimi trent'anni a un cambiamento di paradigma. Mentre l'analisi dell'altamente sofisticata Immunità Adattativa – basata essenzialmente sui linfociti – ha fatto dei pro-

gressi notevoli, la relativamente poco studiata Immunità innata ha rivelato un alto livello di sofisticazione, complessità ed efficienza.

In particolare, è stato ora stabilito che l'immunità innata è la sola responsabile, e al 100 per cento, per le efficaci difese antimicrobiche di tutti gli invertebrati, cioè il 95 per cento di tutte le specie animali esistenti attualmente sulla terra, e probabilmente, direttamente per il 95 per cento delle nostre proprie difese.

Infatti, il numero di specie microbiche che supera le difese dell'immunità innata è incredibilmente piccolo: si stima che solo circa cinquanta specie batteriche, e una dozzina fungine, su molti milioni di specie, sopravvivano alle difese innate, e diventino ciò che chiamiamo patogeni. Normalmente, nelle migliori situazioni, queste vengono poi eliminate con più o meno efficacia dalle difese adattative che – ricordiamolo – sono state stimulate dalle difese innate.

ABSTRACT – “Innate Immunity: from Insects to Man”, the title of the Lectio Magistralis following the announcement of the 2015 Balzan Prizes, delivered by Jules Hoffmann, winner of the 2007 Balzan Prize for Innate Immunity and of the 2011 Nobel Prize for Medicine and Physiology, presents a general view of the discipline, starting with some primary considerations on the dramatic increase in human life expectancy from prehistoric days to our own times – an increase resulting from advances in microbiology and immunobiology that laid the foundations for essential biomedical innovations like antiseptics, sterilization, vaccination, and antibiotics. Hoffmann continues with an overview of his career, starting with his PhD work on the immune systems of insects at the University of Strasburg, which led to studies on peptides and recognition of their importance in defending the organism against infections. His study of immune responses in *Drosophila* led to the crucial discovery of the Toll pathway, the microbial sensor that activates intracellular signalling molecules when potentially infectious microorganisms are present, thereby stimulating the production of antimicrobial peptides that destroy infectious agents. This work inspired other scientists to search for Toll-like receptors with antimicrobial activity in mammals, which subsequently led to significant advances in scientists' understanding of innate immunity in humans, and in the development of new antimicrobial agents. In conclusion, innate immunity – although not as extensively studied as adaptive immunity – turns out to be very sophisticated, complex and efficient, the sole factor responsible for the antimicrobial defences of all invertebrates, and probably directly responsible for our own defences.

