

Ruolo dell'inflammasoma NLRP3 nelle patologie ostruttive del polmone

Chiara Cipollina

Il sistema immunitario innato rappresenta la prima linea di difesa contro i patogeni. A tale scopo, le cellule responsabili della risposta immunitaria innata sono equipaggiate con una grande varietà di recettori, definiti *pattern recognition receptors* (PRR) in grado di riconoscere componenti tipiche dei microrganismi patogeni (*pathogen-associated molecular patterns*, PAMPs). Nelle vie aeree, l'espressione di PRRs è costitutiva in diversi tipi cellulari di origine mieloide e non, come macrofagi e neutrofilii, cellule presentanti l'antigene (APC) e cellule epiteliali bronchiali. Tra i PRR, la famiglia dei *nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors* (NLRs) è stata estensivamente studiata per via dell'ampio *range* di attivatori endogeni ed esogeni, infettivi e non infettivi, fino a ora identificati. In presenza di questi stimoli, i recettori NLRs si attivano formando un complesso multiproteico denominato "inflammasoma". L'inflammasoma è costituito da tre componenti principali: una molecola con il ruolo di "sensore",

una molecola adattatrice, nota come *apoptosis-associated speck-like protein containing caspase activation and recruitment domain*, CARD (ASC), e una componente effettrice costituita dalla caspasi-1. L'assemblaggio del complesso dell'inflammasoma attivo induce taglio autoproteolitico e attivazione di caspasi-1 che a sua volta taglia i precursori delle citochine interleuchina 1 β (IL-1 β) e interleuchina 18 (IL-18) nelle loro forme mature che poi vengono rilasciate nello spazio extracellulare. La gasdermina D (GSDMD) è un altro importante substrato della caspasi-1. Una volta tagliata, GSDMD genera pori sulla membrana cellulare che portano alla morte cellulare attraverso un meccanismo noto come piroptosi.

L'inflammasoma NLRP3 è sicuramente uno dei recettori NLRs più studiati. L'attivazione dell'inflammasoma NLRP3 genera la formazione di grossi aggregati di ASC, detti *ASC speck*, che attraggono la caspasi-1 inducendone taglio autoproteolitico e attivazione massiva. Questi eventi sono soggetti a diversi livelli di controllo. Infatti, per la formazione del complesso attivo di NLRP3 è necessario che siano atti-

vati due segnali principali:

- 1) *priming* necessario per l'attivazione trascrizionale di NLRP3, di pro-IL-1 β e pro-IL-18 e per l'induzione di modificazioni post-traduzionali (PTM) necessarie all'attivazione di NLRP3;
- 2) secondo segnale che promuove la formazione del complesso attivo (Figura 1).

Una peculiare caratteristica di NLRP3 è l'enorme varietà di segnali che fungono da agonisti (segnale 2) in grado di promuovere la formazione del complesso attivo tra cui patogeni (per esempio, batteri, funghi, virus), PAMPs (per esempio tossine batteriche o nucleosidi virali) e attivatori sterili derivati dall'ambiente, come asbesto e silice. Inoltre, NLRP3 viene attivato anche in pre-

senza di attivatori endogeni generati da danno cellulare, cosiddetti *damage-associated molecular patterns* (DAMPs) quali ATP extracellulare, DNA mitocondriale, aggregati proteici, cristalli di colesterolo, acidi grassi, specie reattive dell'ossigeno, proteine rilasciate in seguito a necrosi cellulare e molte altre ancora. Proprio la capacità di attivarsi in risposta a tale varietà di stimoli rende NLRP3 un recettore centrale nello sviluppo di numerose patologie infiammatorie croniche. Tuttavia, i meccanismi molecolari che portano all'attivazione di questo recettore non sono stati ancora chiariti nel dettaglio.

Le vie aeree sono esposte a una grande varietà di insulti, ambientali e provenienti da microrganismi patogeni. L'epitelio

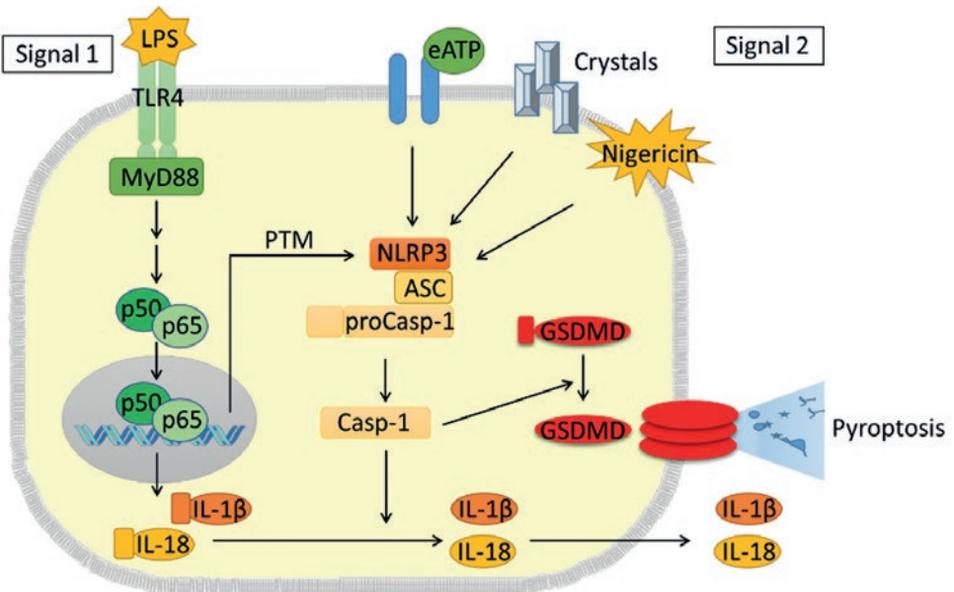


Figura 1. Modello schematico di attivazione dell'inflammasoma NLRP3. Il segnale 1 induce l'attivazione trascrizionale dei geni codificanti per NLRP3, pro-IL-1 β e pro-IL-18 oltre che modificazioni post-traduzionali. Il segnale 2 porta alla formazione del complesso attivo che induce attivazione di caspasi-1 con conseguente taglio proteolitico di pro-IL-1 β e pro-IL-18 nelle loro forme mature che vengono rilasciate nell'ambiente extracellulare e di gasdermina D (GSDMD) che, una volta attivata, crea dei pori nella membrana cellulare causando piroptosi. TLR4, *toll-like receptor 4*; LPS, lipopolisaccaride; eATP, ATP extracellulare; GSDMD, gasdermin D; Casp-1, caspasi-1; PTM, modificazione post-traduzionale.

bronchiale e i macrofagi alveolari, primariamente esposti a questi insulti, rispondono anche attivando risposte immunitarie infiammatorie dipendenti che contribuiscono alla rimozione di questi stimoli dannosi per l'organismo. In particolare, il rilascio di IL-1 β riveste un ruolo fondamentale nella risposta infiammatoria acuta che si attiva a seguito di infezioni respiratorie e che è necessaria per eliminare efficacemente i patogeni. Tuttavia, l'esposizione acuta o cronica ad agenti dannosi, in combinazione con fattori di predisposizione genetica, può contribuire all'insorgenza di stati patologici. Infatti, sebbene le risposte immunitarie mediate da infiammazione siano cruciali per la difesa dell'organismo, una loro eccessiva e incontrollata attivazione promuove danno tissutale e contribuisce all'instaurazione di stati patologici. Negli anni recenti, sono emerse numerose evidenze riguardo al ruolo dell'infiammazione NLRP3 nella patogenesi di diverse patologie croniche ostruttive delle vie aeree come asma, in particolare asma severo, e Broncopneumopatia Cronica Ostruttiva (BPCO).

Il ruolo dell'infiammazione nella BPCO emerge da studi effettuati su pazienti, su modelli murini e modelli cellulari esposti al fumo di sigaretta. Il fumo di sigaretta è infatti uno dei maggiori fattori di rischio per lo sviluppo della BPCO e il suo utilizzo in modelli preclinici e in vitro è diffuso perché in grado di riprodurre le alterazioni fenotipiche e funzionali osservate nella BPCO. Diversi studi clinici hanno mostrato che i livelli di IL-1 β sono elevati nei pazienti con BPCO e che aumentano ulteriormente in caso di riacutizzazioni. Anche l'espressione di NLRP3 e caspasi-1, così come l'attivazione di caspasi-1, aumentano nell'epitelio bronchiale dei pazienti con BPCO. Le cellule epiteliali bronchiali esposte al fumo di

sigaretta rilasciano livelli più elevati di IL-18 e IL-1 β attraverso un meccanismo dipendente da NLRP3 e caspasi-1.¹ Inoltre, è stato riportato che la trascrizione di IL-1 β è significativamente incrementata nelle cellule epiteliali delle piccole vie aeree dei pazienti con BPCO ma non nell'intero polmone e che il rilascio di IL-1 β e NLRP3 è aumentato nel tessuto polmonare di pazienti con BPCO rispetto ai non fumatori o ai fumatori senza BPCO. A questo proposito, in pazienti BPCO, l'espressione di NLRP3 correla con la severità dell'ostruzione delle vie aeree e l'espressione di IL-1 β sembrerebbe correlata con la riduzione di FEV₁.² È stata riportata una maggiore espressione di IL-18 nell'epitelio polmonare e nel siero di pazienti con BPCO. Inoltre, sono stati identificati ASC *speck* nei fluidi di lavaggio broncoalveolare di pazienti con BPCO ma non nei donatori sani. Tutte queste evidenze suggeriscono che l'attivazione dell'infiammazione NLRP3 a livello dell'epitelio bronchiale in pazienti con BPCO potrebbe contribuire alla patogenesi della BPCO. Di contro, diversi dati pubblicati suggeriscono che il fumo di sigaretta inibisce l'infiammazione NLRP3 nei macrofagi, alterando la risposta a valle del *toll-like receptor 4*, promuovendo l'attivazione di caspasi-8 e caspasi-1 con meccanismi alternativi, e causando le alterazioni immunometaboliche tipicamente osservate nei pazienti affetti da BPCO.³ Nel complesso, i dati finora riportati suggeriscono che alterazioni delle risposte dipendenti da NLRP3 a carico dell'epitelio bronchiale e dei macrofagi possano contribuire alla disfunzione immunitaria, all'infiammazione cronica e al danno cellulare che si osservano nella BPCO. Tuttavia, ulteriori studi saranno necessari per comprendere i meccanismi molecolari coinvolti e per analizzare a fondo l'esistenza di correlazioni tra

l'attivazione di questo *pathway* e i dati clinici. Questi studi consentiranno di valutare il ruolo dell'inflammasoma NLRP3 come nuovo *target* terapeutico per la BPCO.

L'asma è una patologia cronica delle vie aeree caratterizzata da elevata complessità ed eterogeneità di fenotipi. Una piccola percentuale di pazienti asmatici mostra severe riacutizzazioni nonostante il trattamento con elevate dosi di corticosteroidi inalatori o sistemici. Questi pazienti sono affetti da asma severo steroido-resistente, una forma scarsamente controllabile e molto grave di asma associata a una risposta infiammatoria non eosinoflica di tipo Th1/Th17. L'eterogeneità di questa forma di asma e le poche conoscenze riguardo ai meccanismi molecolari ostacolano l'identificazione di nuovi *target* terapeutici e quindi lo sviluppo di terapie efficaci. Le alterazioni dell'espressione e dell'attività del recettore dei glucocorticoidi e la presenza di specifiche infezioni respiratorie sono state tra i meccanismi proposti per spiegare la patogenesi dell'asma severo steroido-resistente. Di recente, numerosi studi hanno indicato un ruolo importante anche per l'inflammasoma NLRP3 nella patogenesi di specifiche forme di asma severo. In particolare, l'asma neutrofilico è associato a elevati livelli di NLRP3 e caspasi-1 nelle vie aeree, e a un aumentato rilascio di IL-1 β e IL-17.⁴ Anche l'espressione di TLR4, IL-1 β e IL-8 è elevata nell'espettorato indotto di pazienti con asma severo e correla con parametri clinici e con l'infiammazione neutrofilica. A questo proposito, i macrofagi che si trovano nell'espettorato indotto sono una delle principali fonti di NLRP3, caspasi-1, caspasi-4 e IL-1 β . Anche nel caso di asma severo associato a infezioni respiratorie batteriche, è stato dimostrato che l'attivazione dell'inflammasoma NLRP3 mediata

da ATP attraverso il recettore P2X7R sia essenziale per l'insorgenza del fenotipo infiammatorio caratterizzato da elevati livelli di IL-1 β e attivazione di caspasi-1. A questo proposito, l'inibizione del *pathway* di NLRP3 (attraverso l'uso di un inibitore specifico di NLRP3, un inibitore di caspasi-1 o un anticorpo neutralizzante per IL-1 β) in modelli preclinici di asma severo associato a infezioni respiratorie, si è rivelato efficace nel ridurre l'infiammazione neutrofilica steroido-resistente e l'iperreattività bronchiale.⁵ Inoltre, evidenze emergenti sembrano indicare un ruolo dell'inflammasoma NLRP3 anche nello sviluppo di asma severo associato a obesità.

Nel complesso, numerosi studi sembrerebbero indicare che l'inflammasoma NLRP3 potrebbe essere coinvolto nella patogenesi di BPCO e asma severo. Tuttavia, le evidenze sperimentali a oggi disponibili sono ancora limitate e nuovi studi saranno quindi necessari per la validazione di NLRP3 come *target* terapeutico per queste patologie e per lo sviluppo di nuove efficaci terapie.

Bibliografia

- 1) LI C, ZHIHONG H, WENLONG L, ET AL. *The nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor family pyrin domain-containing 3 inflammasome regulates bronchial epithelial cell injury and proapoptosis after exposure to biomass fuel smoke*. Am J Respir Cell Mol Biol 2016;55:815-24.
- 2) FANER R, SOBRADILLO P, NOGUERA A, ET AL. *The inflammasome pathway in stable COPD and acute exacerbations*. ERJ Open Res 2016;2.
- 3) BUSCETTA M, DI VINCENZO S, MIELE M, ET AL. *Cigarette smoke inhibits the NLRP3 inflammasome and leads to caspase-1 activation via the TLR4-TRIF-caspase-8 axis in human macrophages*. FASEBJ 2020;34:1819-32.
- 4) SIMPSON JL, PHIPPS S, BAINES KJ, ET AL. *Elevated expression of the NLRP3 inflammasome in neutrophilic asthma*. Eur Respir J 2014;43:1067-76.
- 5) KIM RY, PINKERTON JW, ESSILFIE AT, ET AL. *Role for NLRP3 inflammasome-mediated, IL-1 β -dependent responses in severe, steroid-resistant asthma*. Am J Respir Crit Care Med 2017;196:283-97.