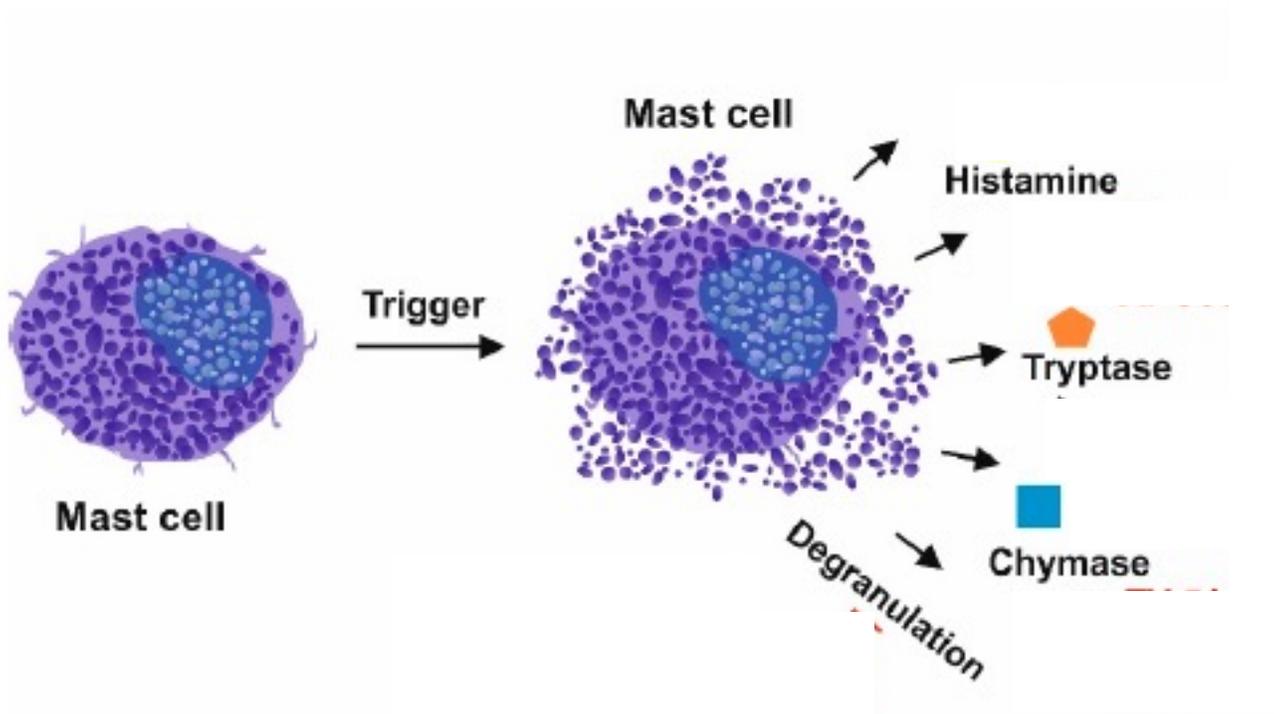


Stimoli che inducono la degranulazione dei mastociti



La degranulazione dei mastociti è indotta da diversi stimoli:

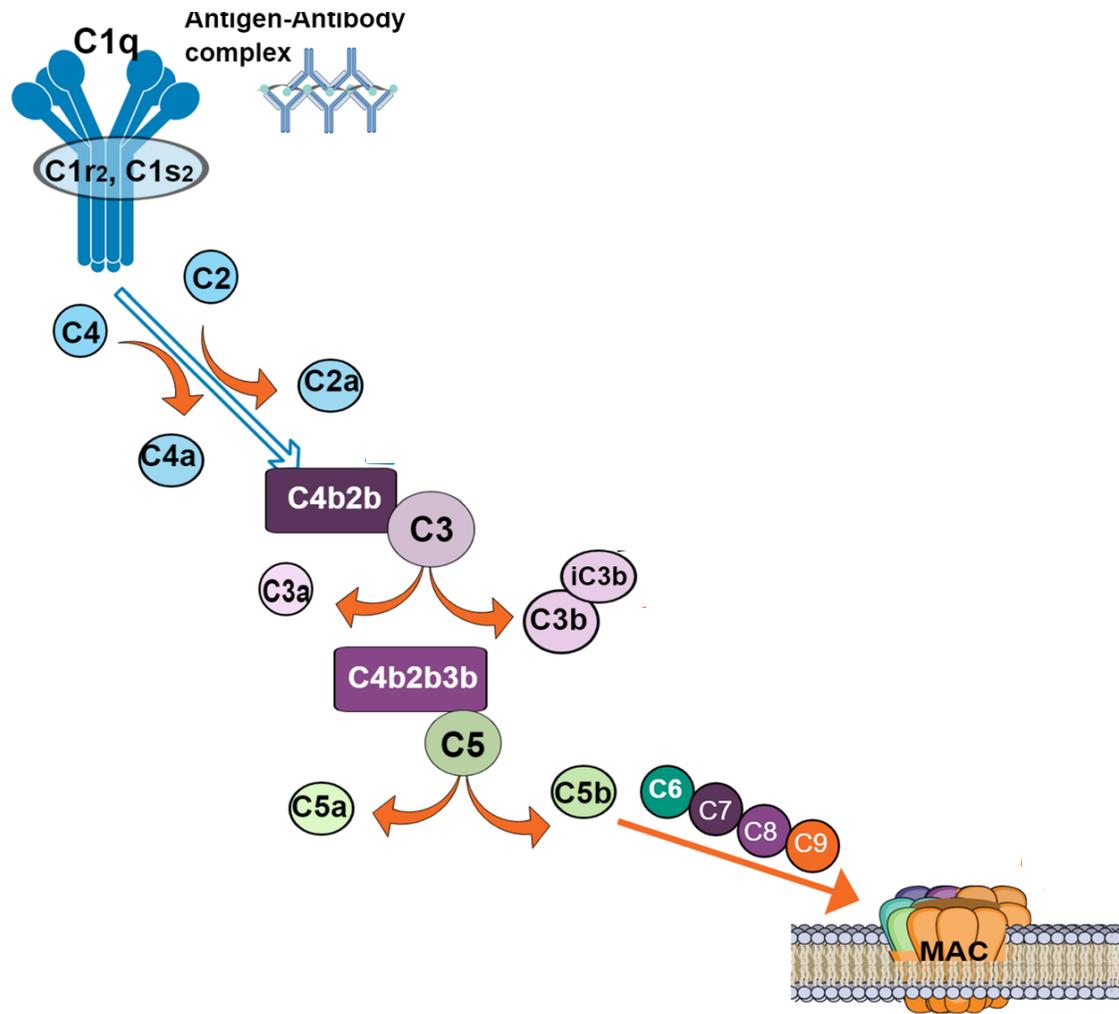
- calore , trauma meccanico
- legame con il fattore C3a e C5a del complemento
- interazione con batteri

Altri mediatori vasoattivi nel processo infiammatorio

Mediatori vasoattivi dell'infiammazione	
Vasodilatazione	Istamina Ossido nitrico Prostaglandine
Aumento della permeabilità vascolare	Istamina C3a e C5a (tramite il rilascio di istamina) Bradichinina Leucotrieni C ₄ ,D ₄ ,E ₄ PAF Sostanza P

Le modificazioni vascolari ed in particolare l'aumento della permeabilità vascolare sono mediate anche da proteine plasmatiche che appartengono ai sistemi delle chinine e del complemento.

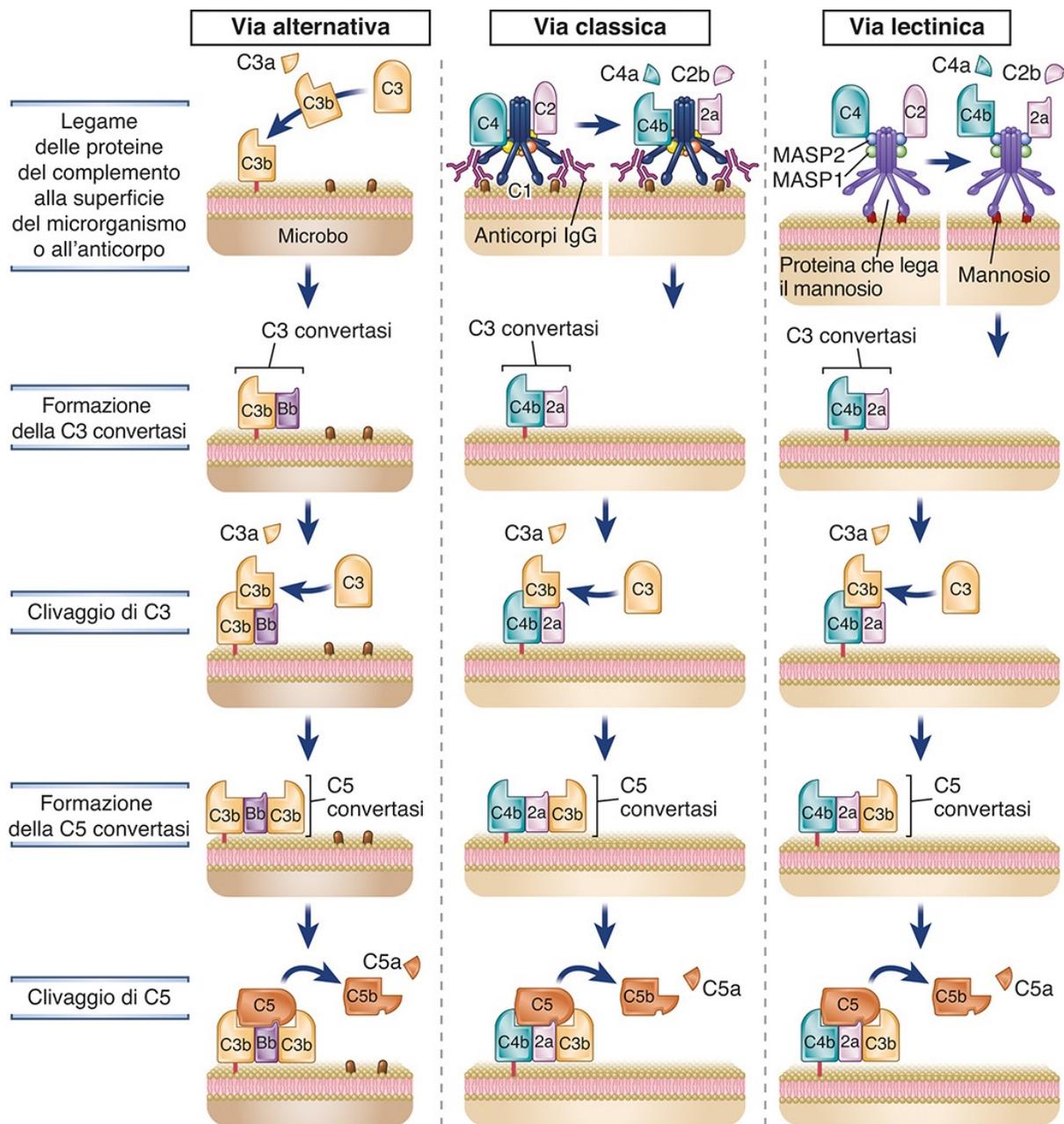
Il Complemento



Il sistema del complemento è costituito da proteine inattive nel plasma e denominate C1-C9. Molte di queste proteine sono attivate in modo da divenire enzimi proteolitici che scindono altre componenti del complemento così da realizzare una cascata enzimatica che culmina con la formazione del complesso di attacco della membrana (MAC) che è costituito da molecole C9.

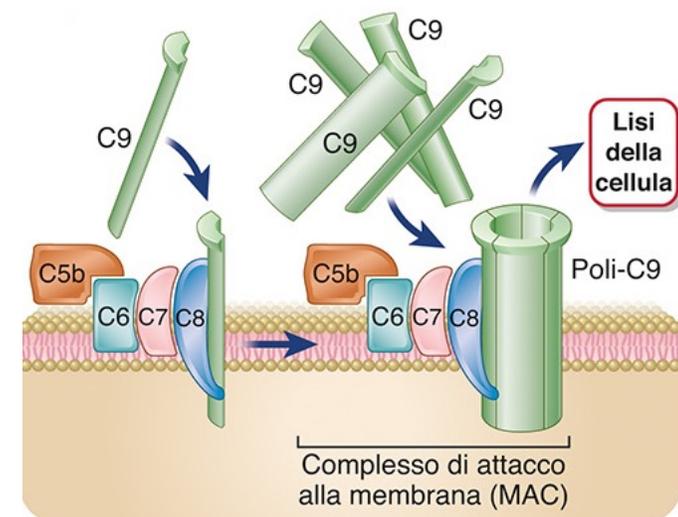
Le funzioni biologiche del complemento sono mediate dal MAC e dall'azione dei frammenti che derivano dal taglio proteolitico dei componenti del complemento.

Sistema del complemento

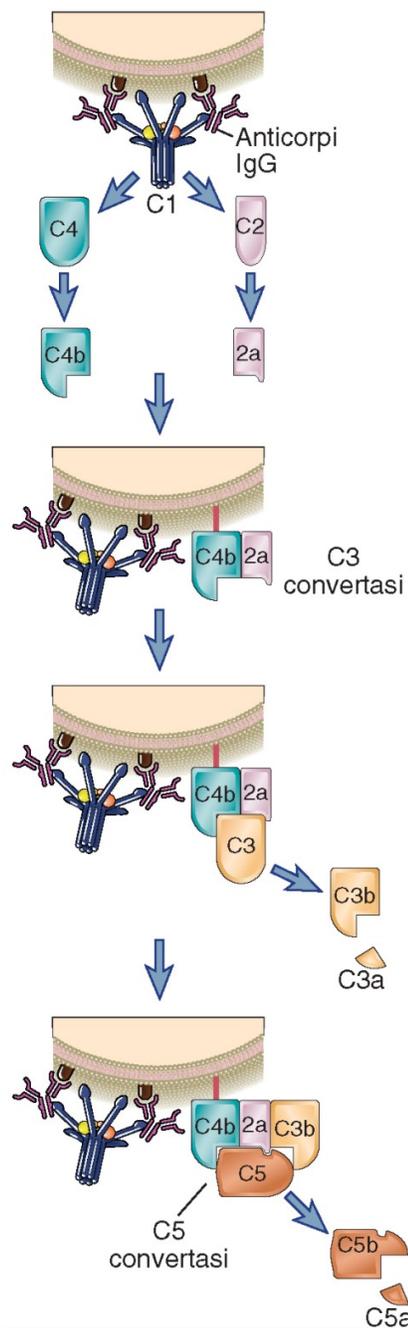


Il sistema del complemento può essere attivato dai complessi antigene- anticorpo (via classica); da componenti delle superfici dei microbi (via alternativa); via lectinica (zuccheri microbici).

Attivazione delle componenti terminali del complemento



Via classica



Via classica di attivazione del complemento

La via classica di attivazione del complemento viene avviata dal legame della componente C1 alle IgG o alle IgM legate all'antigene. C1 è composto da C1q, r, s. C1q composta da sei catene lega gli anticorpi mentre C1s e r hanno attività enzimatica.

Il cambiamento conformazionale dovuto al legame C1q-Ig permette l'attivazione del C1r che scinde il C1s attivandolo.

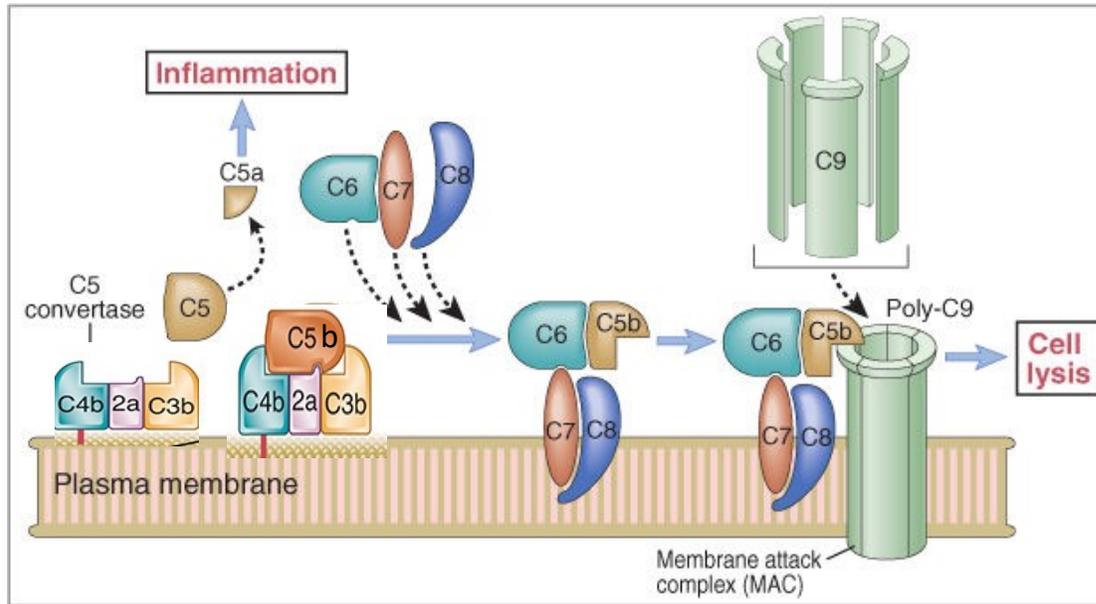
Il C1s scinde il C4 in C4a e C4b che si lega covalentemente all'antigene o all'anticorpo.

Il C2 che ha una tendenza a legare il C4b viene scisso dal C1s in C2a e C2b.

Il complesso C4bC2a è la C3 convertasi.

La C3 convertasi scinde il C3 dando origine ai due prodotti C3a e C3b. Quest'ultimo si lega covalentemente al complesso C4b2a generando la C5 convertasi.

Tappe tardive dell'attivazione del complemento



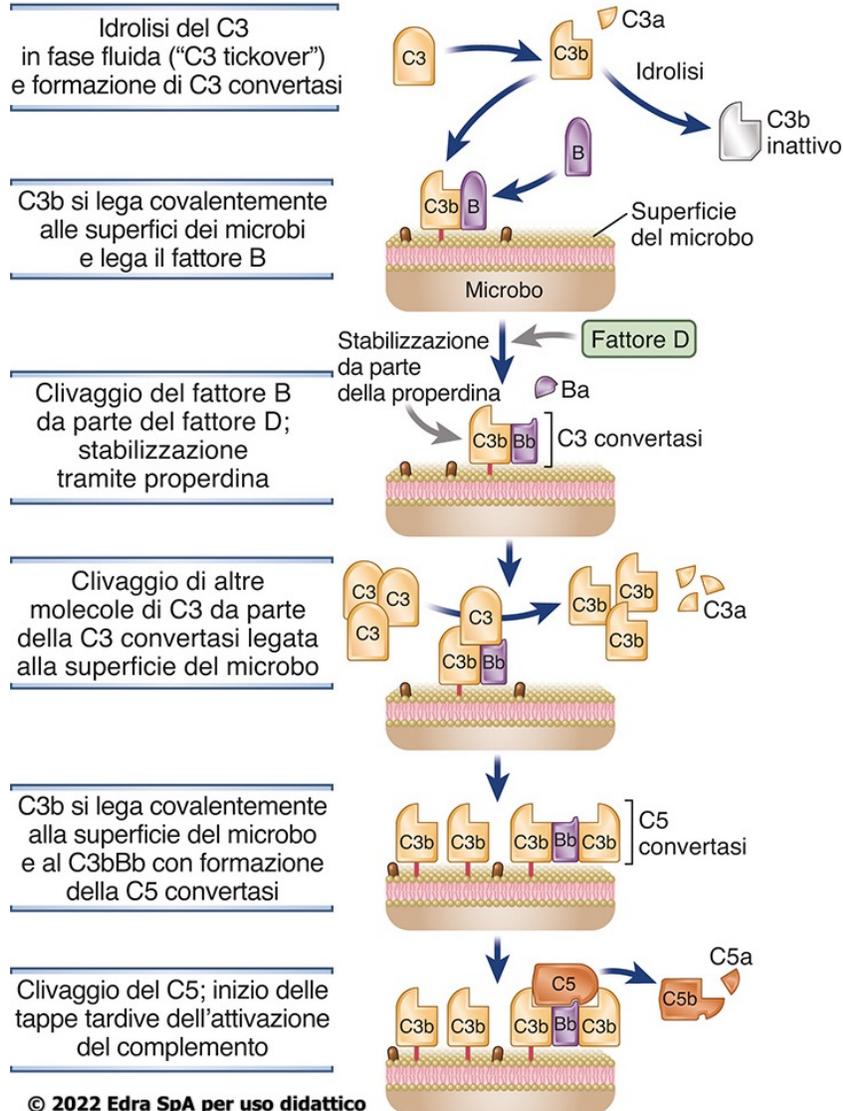
© Elsevier 2005. Abbas & Lichtman: Cellular and Molecular Immunology 5e www.studentconsult.com

La C5 convertasi da
inizio alla
formazione del
complesso di
attacco della
membrana
denominato MAC
cha causa lisi della
cellula

Il C5b mantiene una conformazione in grado di legare il C6, successivamente si legheranno C7, C8.

Infine la polimerizzazione del C9 determina la formazione di pori sulla membrana che permettono l'entrata nella cellula di acqua e ioni extracellulari mediando la lisi della cellula.

Via alternativa di attivazione del complemento



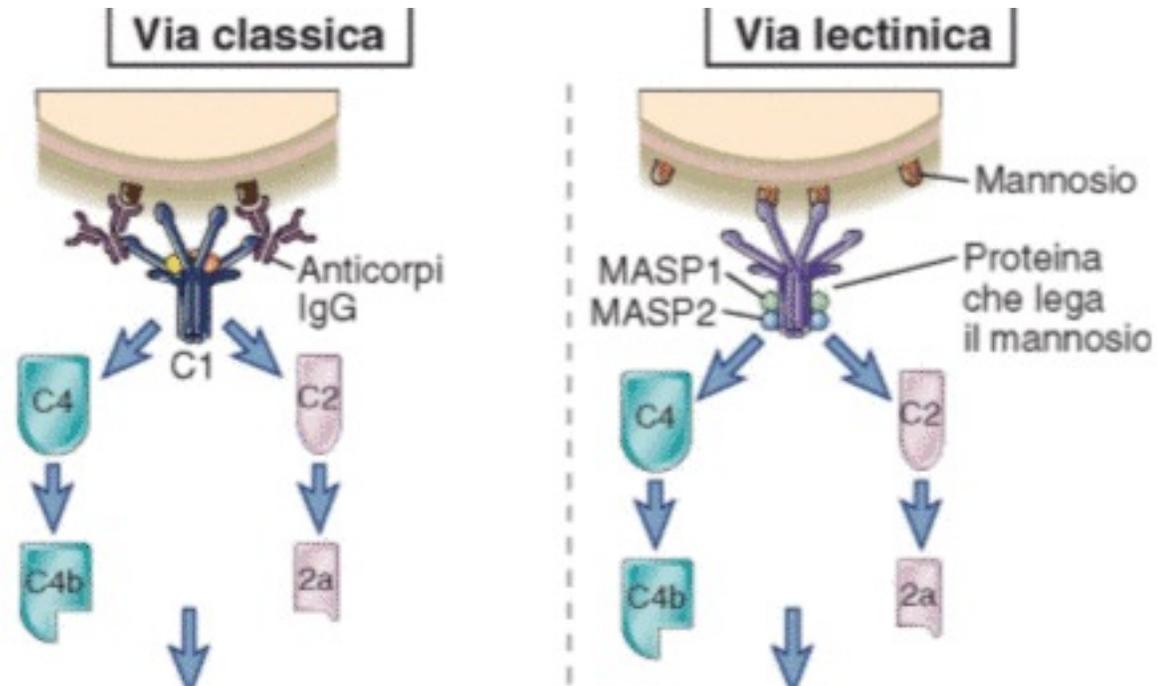
La cascata del complemento può essere attivata attraverso **la via alternativa**.

Il C3 spontaneamente può generare C3b. Questa molecola è altamente reattiva e può legarsi a superfici cellulari. Il C3b sulla superficie cellulare lega la proteina B.

La proteina B legata viene scissa ad opera della fattore D (serin proteasi) rilasciando un frammento Ba mentre il frammento Bb resta legato al C3b formando C3bBb che è la C3 convertasi che quindi scinde il C3 amplificando la produzione C3b.

Questo meccanismo viene innescato in seguito al legame del C3b sulla superficie dei batteri.

Attivazione del complemento attraverso la via lectinica



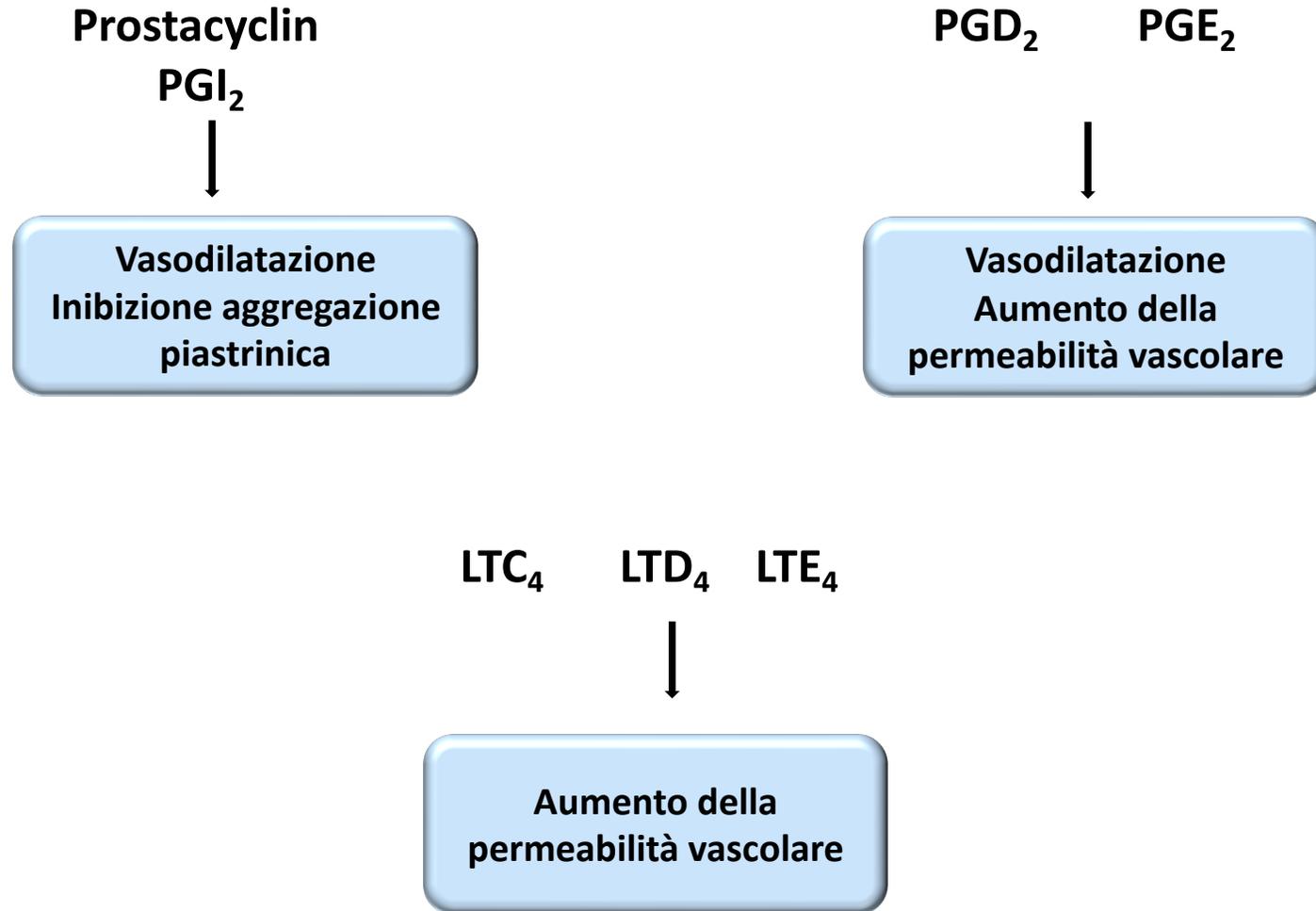
La via lectinica di attivazione del complemento si attiva a partire dall'interazione dei polisaccaridi microbici con le lectine circolanti quali la lectina legante il mannosio (Mannose/mannan binding lectin MBL). La MBL che ha legato gli zuccheri presenti sul microorganismo interagisce con le serine proteasi associate, le MASP; i cui membri sono: MASP-1, MASP-2 e MASP-3. Le proteine MASP hanno una struttura omologa a quella delle proteasi C1r e C1s della frazione C1 e svolgono funzioni molto simili. MASP-2 che forma un complesso con MASP-1 cliva le frazioni C4 e C2. Gli eventi conseguenti a questa reazione sono identici a quelli che avvengono nella via classica.

Altri mediatori vasoattivi nel processo infiammatorio

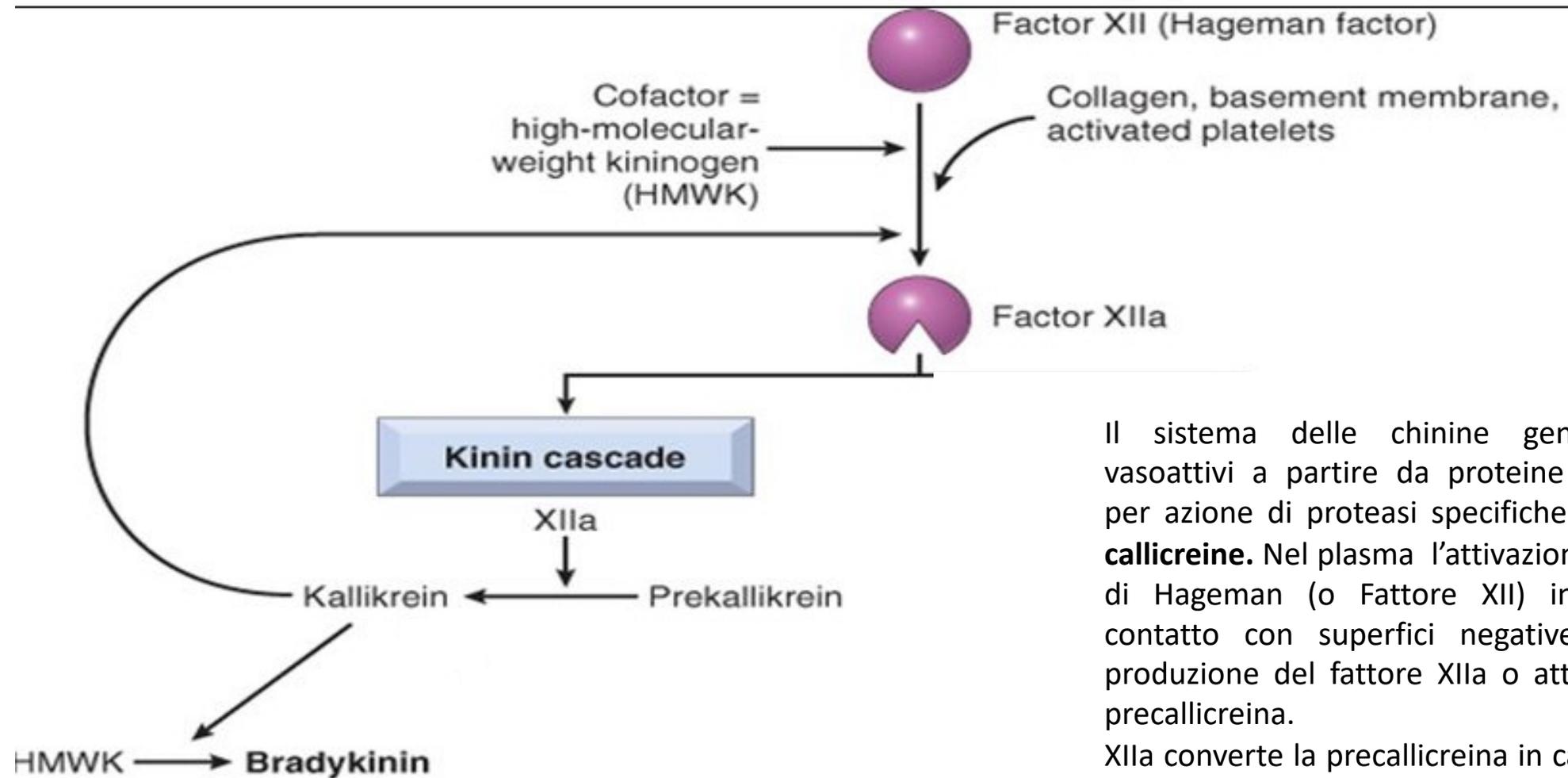
Mediatori vasoattivi nell'infiammazione	
Vasodilatazione	Istamina Ossido nitrico Prostaglandine
Aumento della permeabilità vascolare	Istamina C3a e C5a (per liberazione di istamina da parte dei mastociti) Leucotrieni C ₄ , D ₄ , E ₄ Bradichinina PAF Sostanza P

Le modificazioni vascolari ed in particolare l'aumento della permeabilità vascolare sono mediate da proteine plasmatiche che appartengono ai sistemi delle chinine e del complemento.

Azione biologica delle prostaglandine e dei leucotrieni



Altri mediatori vasoattivi nel processo infiammatorio: la bradichinina

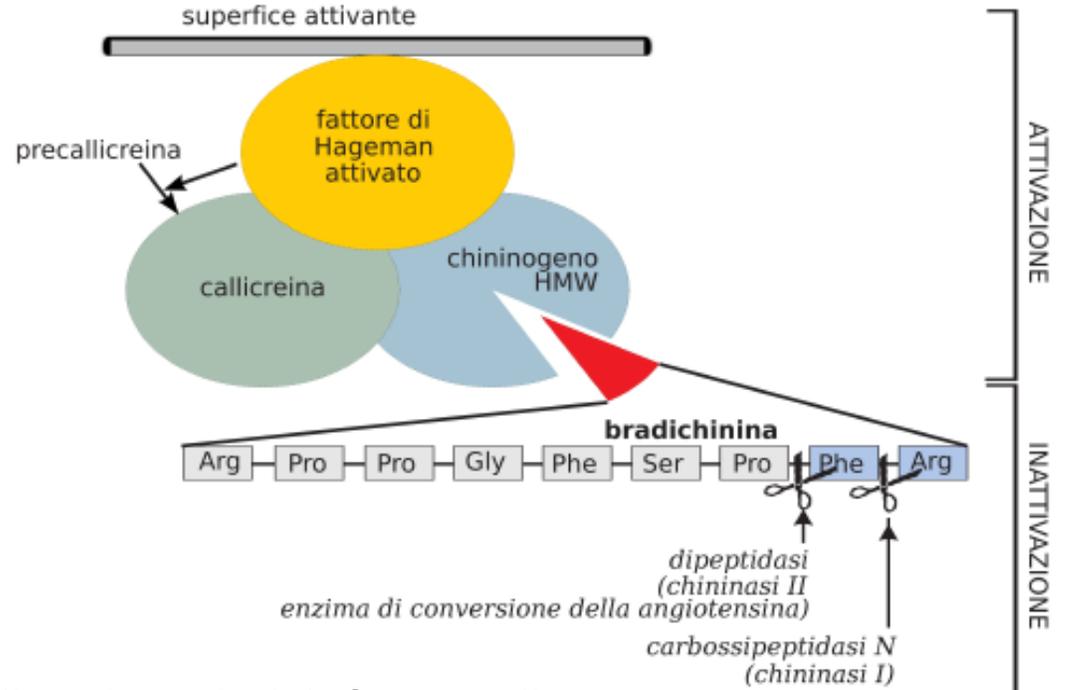
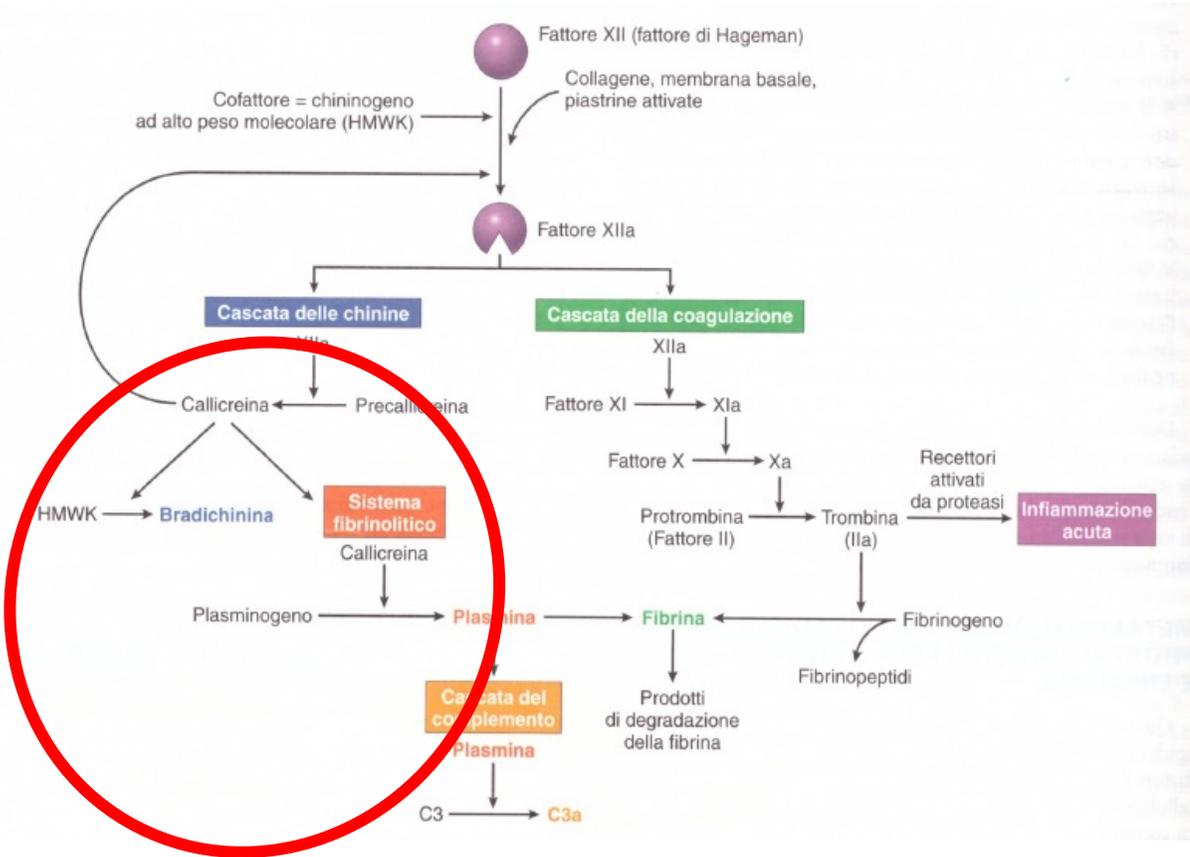


HMWK= chininogeno ad alto peso molecolare

Il sistema delle chinine genera peptidi vasoattivi a partire da proteine plasmatiche per azione di proteasi specifiche denominate **callicreine**. Nel plasma l'attivazione del fattore di Hageman (o Fattore XII) in seguito al contatto con superfici negative porta alla produzione del fattore XIIa o attivatore della precallicreina.

XIIa converte la precallicreina in callicreina che a sua volta scinde il chininogeno ad alto peso molecolare in **bradichinina**.

Produzione della bradichinina

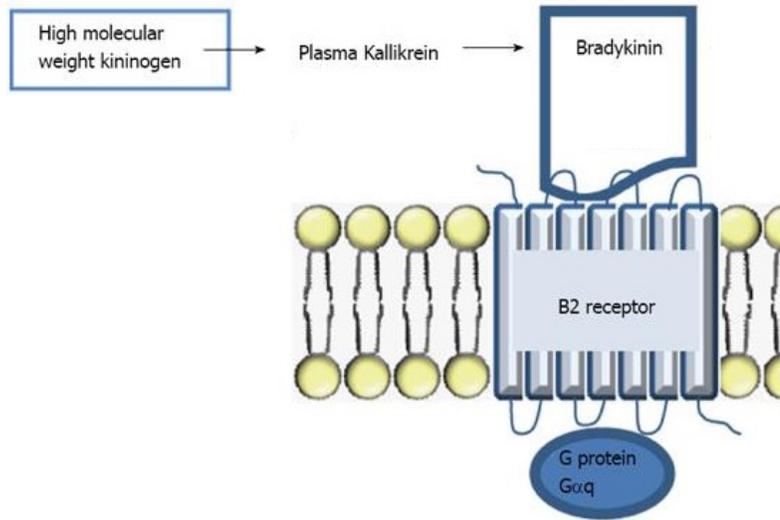


Gli attivatori del fattore di Hageman includono: collagene, membrana basale, o piastrine attivate

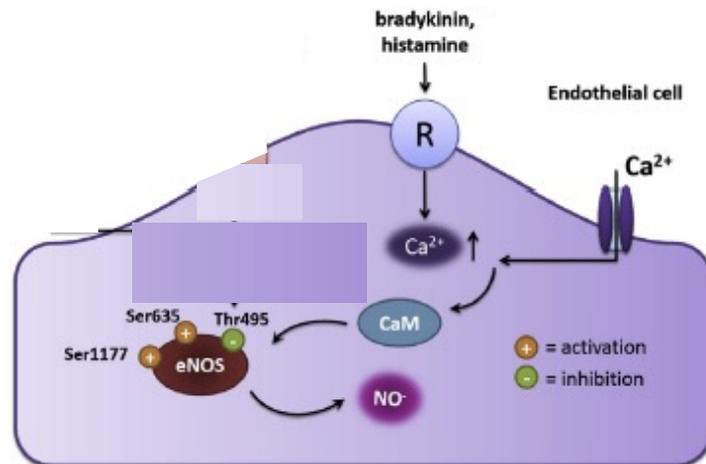
Il fattore di Hageman attivato da origine a 4 sistemi:

- Sistema delle chinine
- Sistema della coagulazione
- Sistema della fibrinolisi
- Sistema del complemento

Recettori e meccanismo di azione della Bradichinina



La bradichinina lega recettori espressi sulle cellule endoteliali appartenenti ai «G protein-coupled receptors» (GPCRs) anche definiti seven-(pass)-transmembrane domain *receptors* (recettori che attraversano la membrana 7 volte). Il legame della bradichinina alle cellule endoteliali ha effetti simili a quelli della istamina che includono la contrazione delle cellule endoteliali ➡ aumento permeabilità
Produzione di Ossido Nitrico (NO) ➡ vasodilatazione



Sequenza di eventi in una reazione infiammatoria

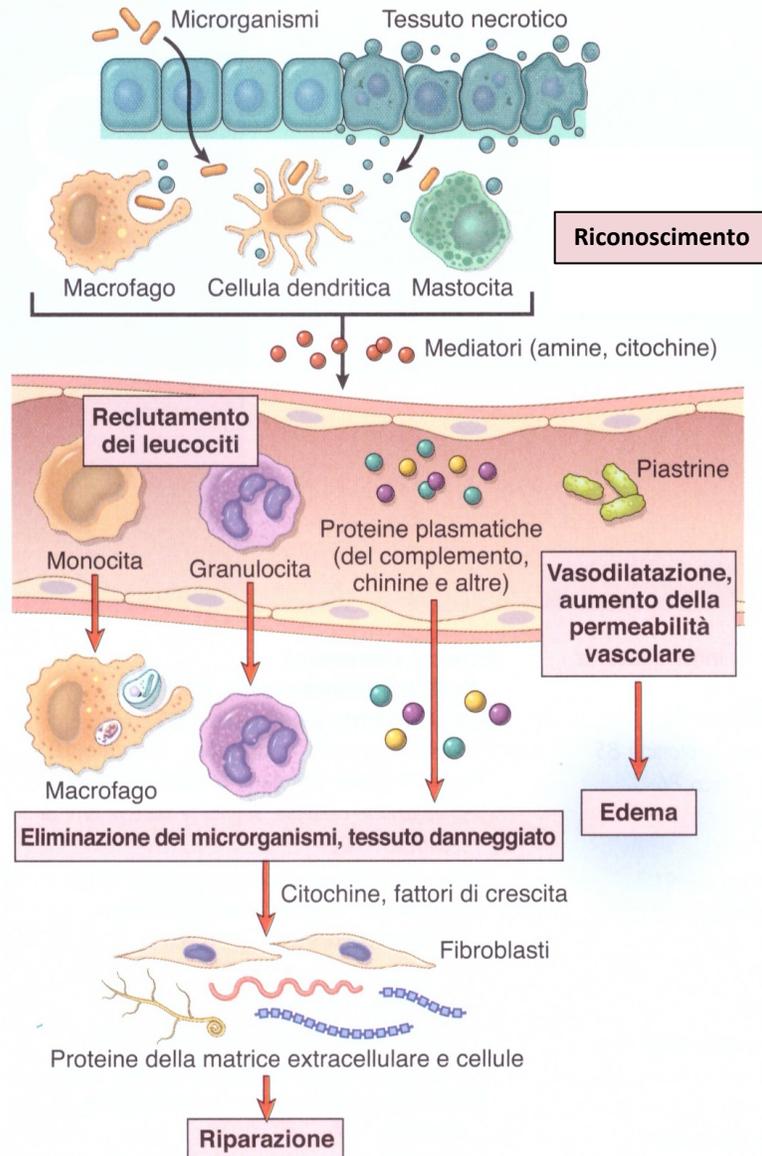


Figura 3.1 Sequenza di eventi in una reazione infiammatoria. Le cellule sentinella presenti nei tessuti (macrofagi, cellule dendritiche, e altre) liberano i mediatori che attivano le reazioni vascolari e cellulari dell'infiammazione in seguito al riconoscimento di microrganismi e cellule danneggiate.

Sequenza di eventi della reazione infiammatoria:

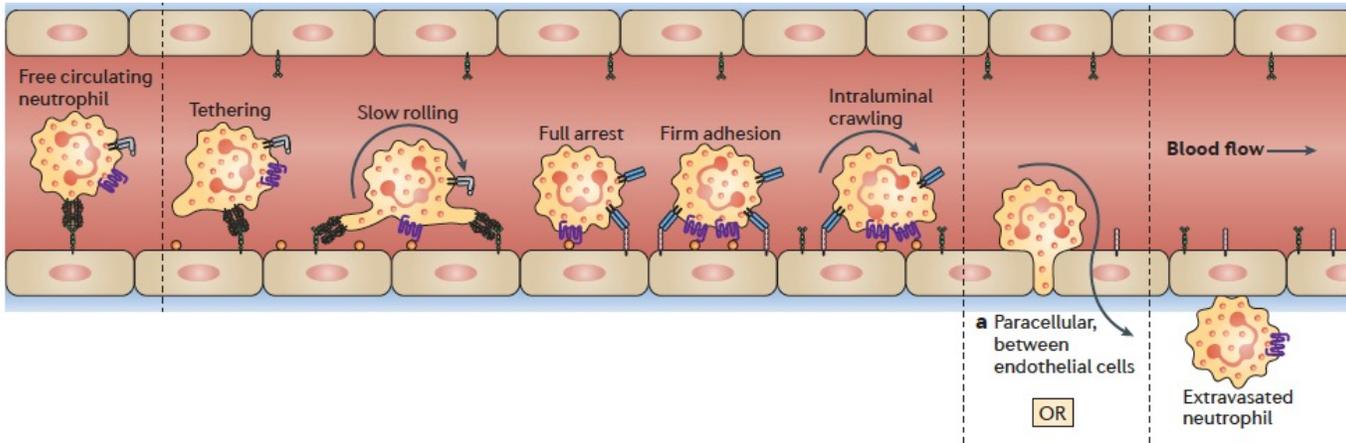
Riconoscimento: le cellule residenti nei tessuti quali mastociti, macrofagi e cellule dendritiche in seguito al riconoscimento dell'agente flogogeno (prodotti microbici, detriti cellulari) da parte di recettori producono mediatori (molecole vasoattive e citochine) che favoriscono le fasi successive del processo infiammatorio (reclutamento dei leucociti e fuoriuscita di proteine del plasma)

Reclutamento i leucociti e le proteine del plasma lasciano i vasi sanguigni per raggiungere il sito dove è presente lo stimolo flogogeno. La fuoriuscita di cellule e proteine plasmatiche richiede delle modificazioni dei vasi sanguigni

Rimozione dello stimolo infiammatorio operata dai fagociti che ingeriscono e degradano i patogeni e i detriti cellulari

Riparazione del tessuto leso attraverso la rigenerazione delle cellule e la formazione di tessuto connettivo (cicattrizzazione)

Fuoriuscita dei leucociti dai vasi nel sito leso

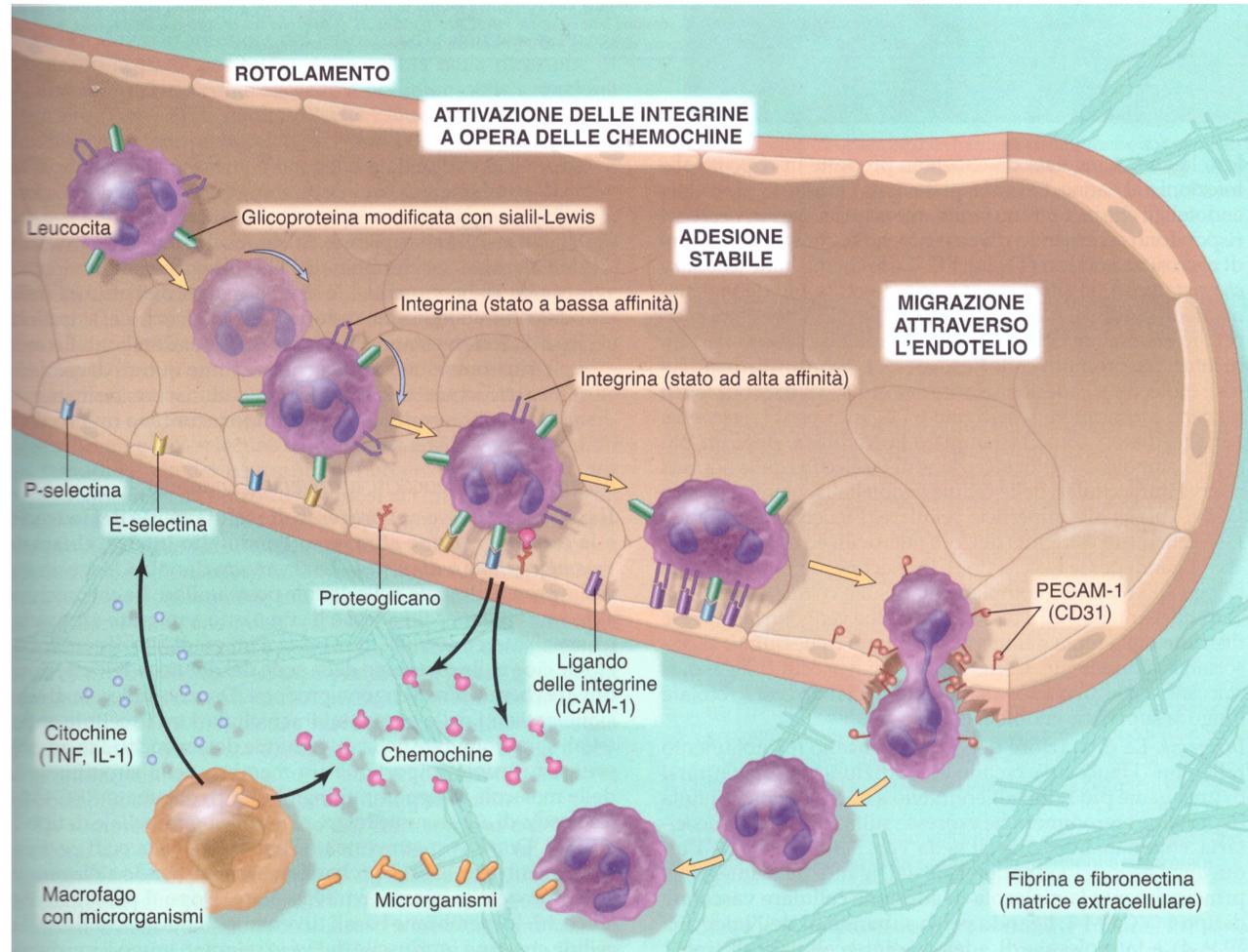


Una funzione principale dell'infiammazione è quella di portare i leucociti nella sede dove è presente lo stimolo flogogeno (microrganismo, tessuto necrotico etc.) in modo che questi (neutrofili, monociti) possano inglobarlo e distruggerlo.

I cambiamenti nel flusso sanguigno e nella permeabilità sono seguiti da un afflusso di leucociti nel tessuto.

I leucociti che sono maggiormente coinvolti nella risposta infiammatoria acuta sono i neutrofili e i monociti.

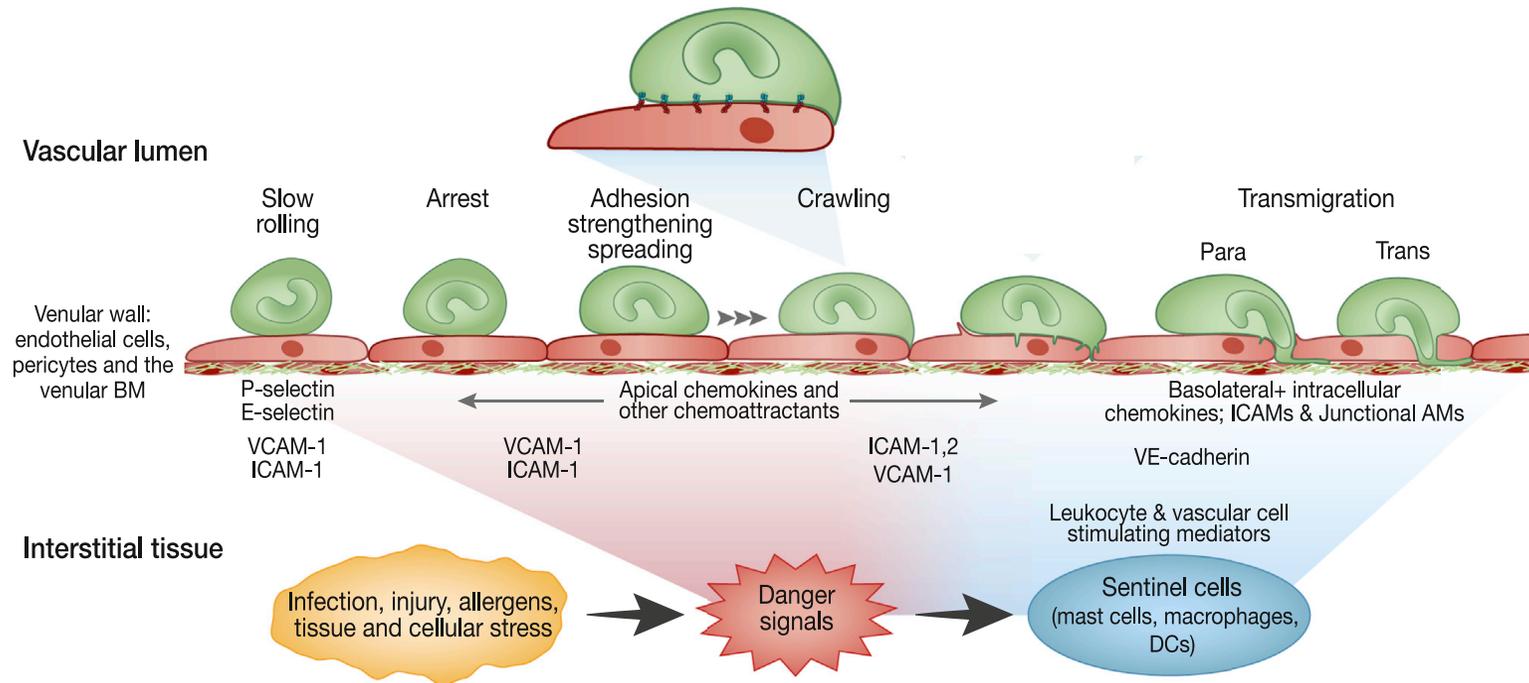
Reclutamento dei leucociti nelle sedi dove è presente lo stimolo lesivo



Gli eventi che caratterizzano il passaggio dei leucociti dal circolo sanguigno al tessuto interstiziale includono:

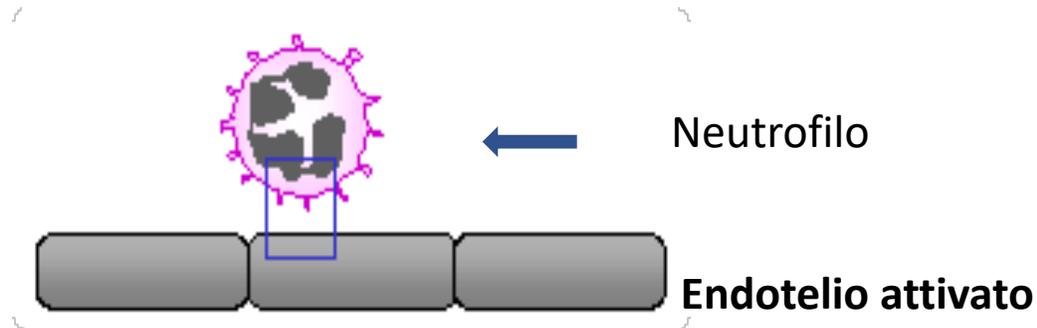
- i) La marginazione, il rotolamento e l'adesione dei leucociti all'endotelio.
- ii) Il passaggio attraverso l'endotelio
- iii) Migrazione nei tessuti interstiziali

Interazioni fra i leucociti e le cellule endoteliali nell'inflammazione



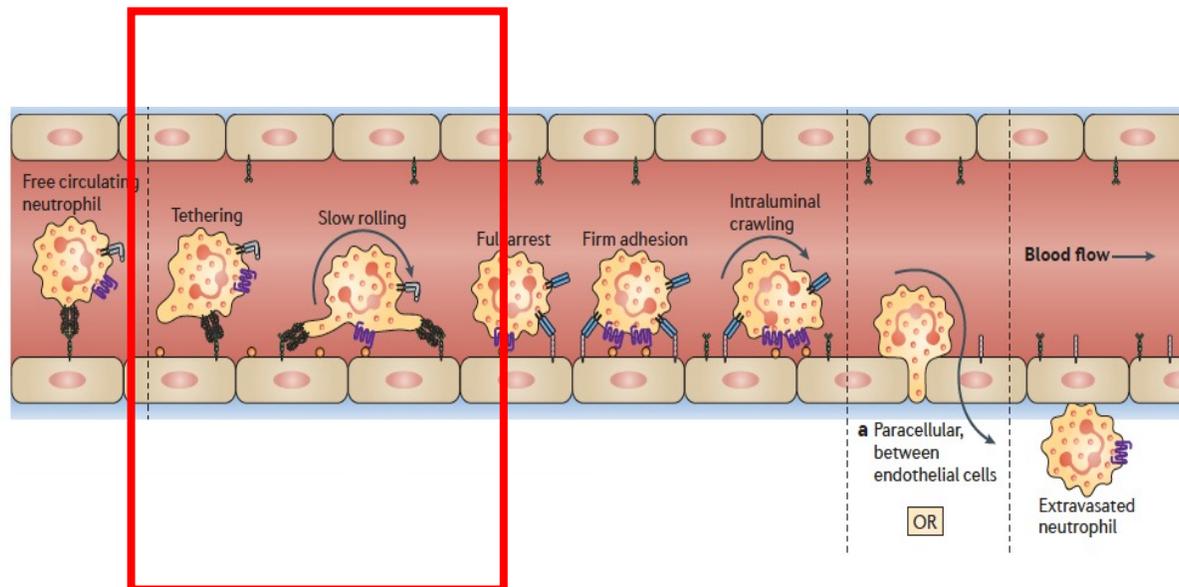
In risposta a stimoli infiammatori, i mediatori (citochine e chemochine) prodotti dalle cellule sentinella dei tessuti (macrofagi, cellule dendritiche, mastociti) stimolano l'adesione dei leucociti all'endotelio vascolare e la motilità dei leucociti. Questo permette ai leucociti di rilevare la presenza delle modificazioni dell'endotelio nelle regioni in cui è presente lo stimolo flogogeno.

Tethering del leucocita all'endotelio

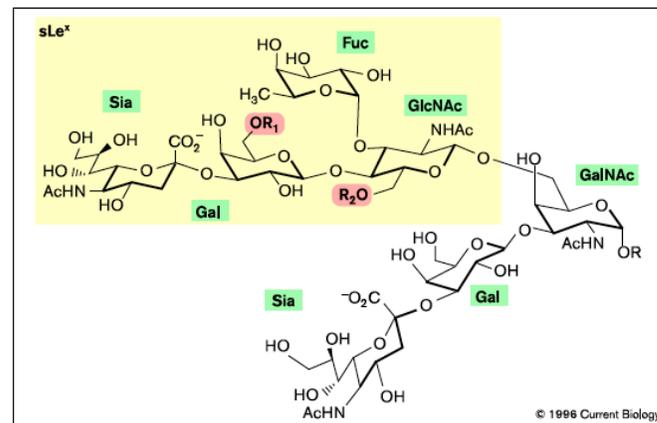
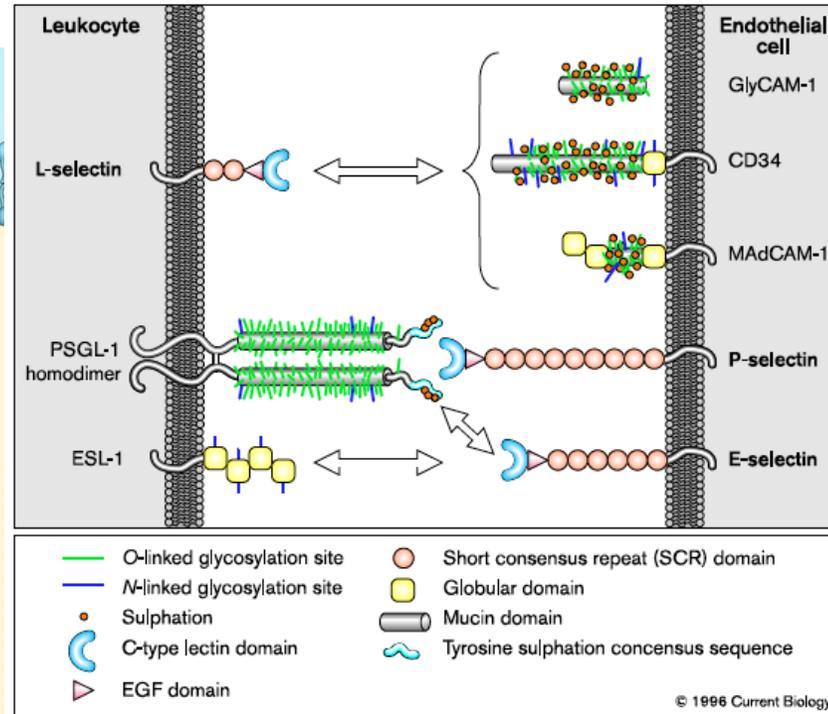
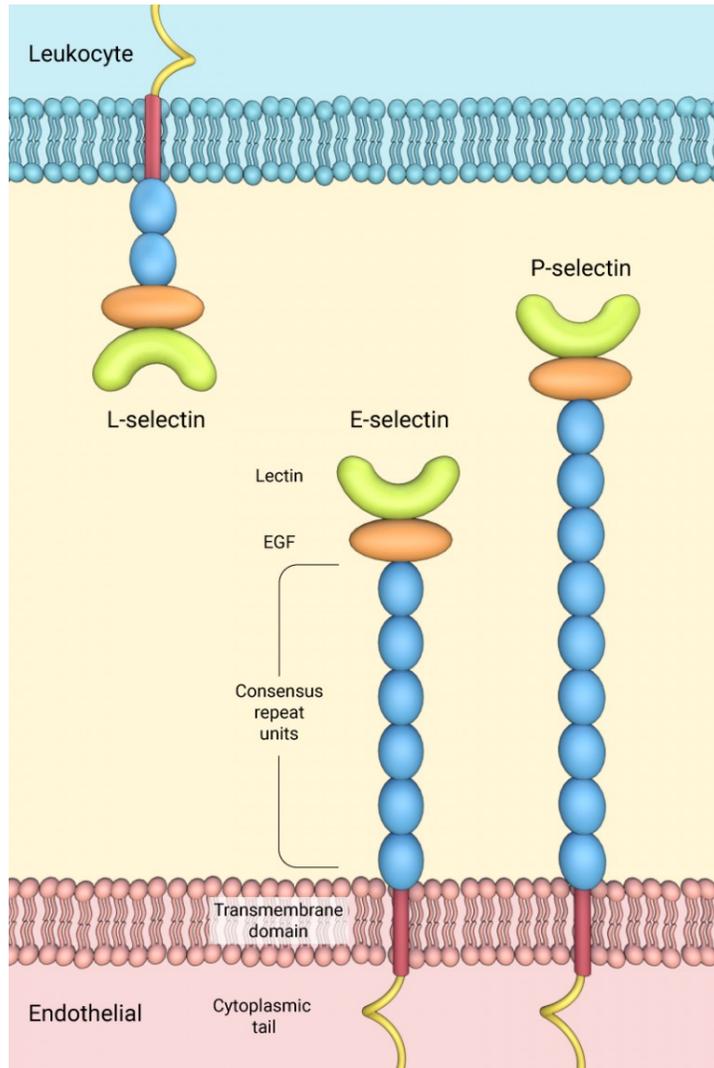


Il processo noto come cattura o “tethering” rappresenta il primo contatto di un leucocita con l’endotelio attivato. La cattura avviene dopo la marginazione che sposta il leucocita in una posizione vicina all’endotelio, lontano dal flusso ematico. Per iniziare la risposta infiammatoria, è necessaria **l’attivazione dell’endotelio**.

L’espressione delle selettine sulle cellule endoteliali è necessaria per l’adesione primaria e l’inizio del “rolling”. Il ligando principale delle selettine è PSGL-1.



Le selectine sono le molecole responsabili del "tethering" e rolling dei neutrofili sull'endotelio



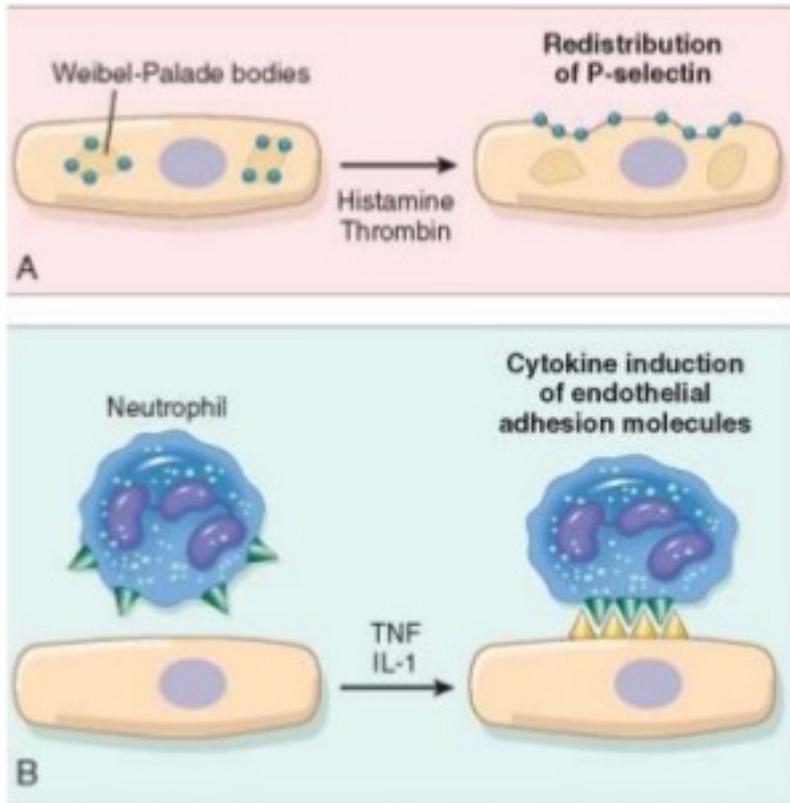
Le selettine sono una famiglia di molecole di adesione cellula-cellula a cui appartengono la P-, L- e E- selettina.

La P- e la E- selettina sono espresse sull'endotelio attivato mentre la L-selettina è espressa sui leucociti circolanti.

Strutturalmente presentano un dominio lectinico di tipo C in grado di riconoscere carboidrati un dominio EGF e domini SCR.

Le selettine riconoscono il tetrasaccaride sialyl-Lewis X (SLe^x) presente su molecole quali PSGL-1 che è il ligando della P-selettina e su altre glicoproteine che sono i ligandi della E-selettina.

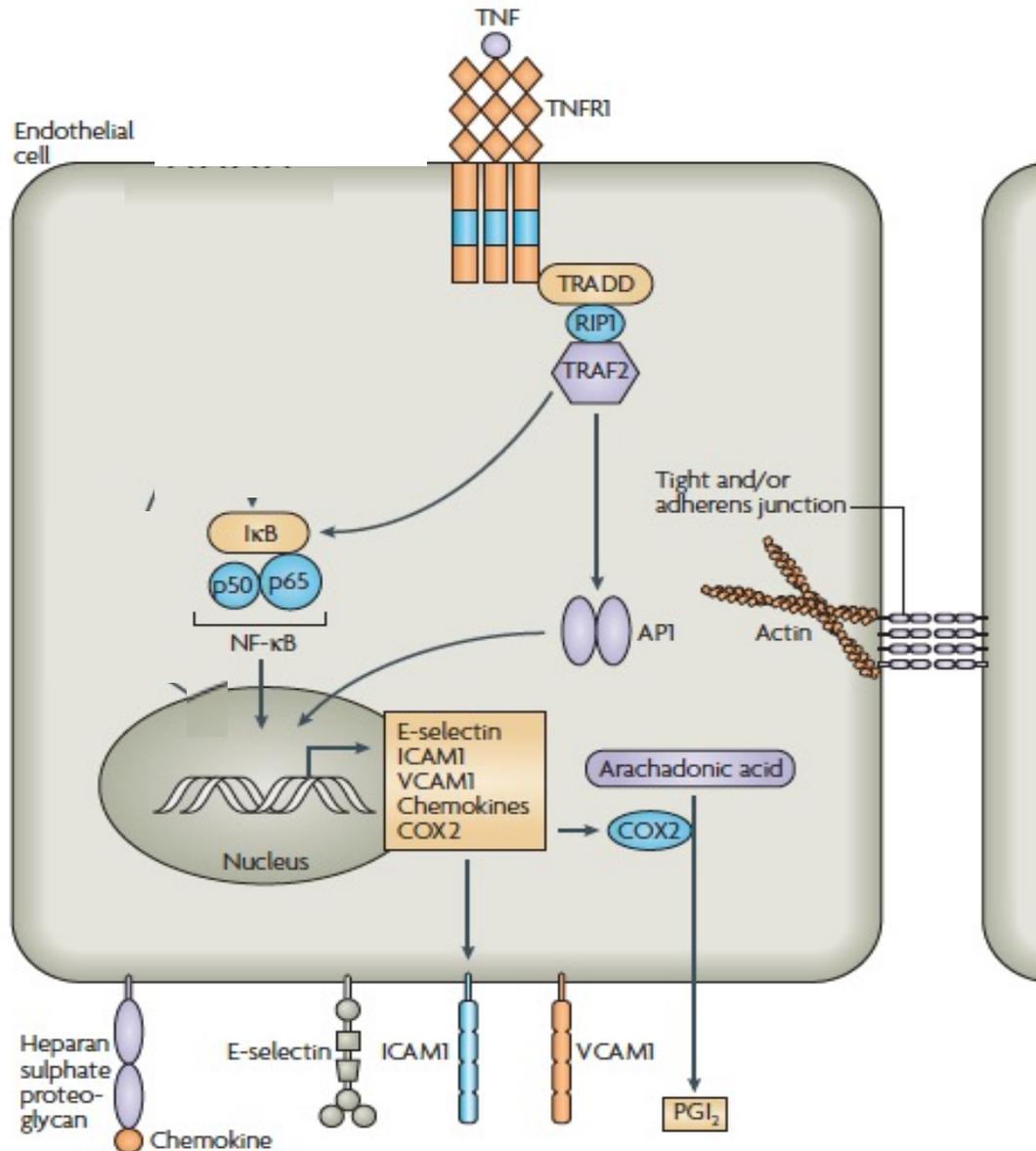
Il processo di extravasazione necessita dell'attivazione dell'endotelio



In seguito ad attivazione l'endotelio esprime le P- e le E-selettine.

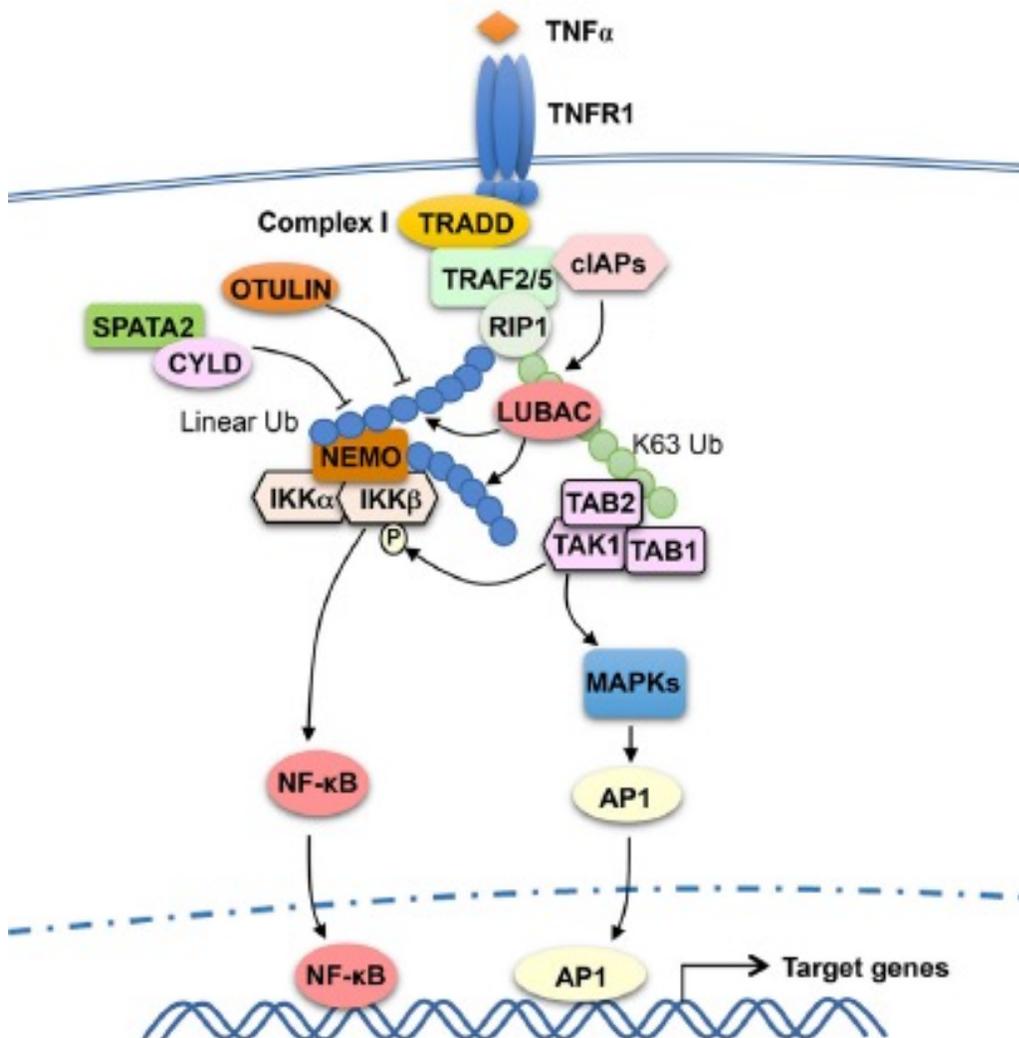
- La P-selettina viene ridistribuita dai Weibel-Palade bodies sulla superficie della cellula.
- La E-selettina viene espressa in seguito a induzione della trascrizione.

Attivazione dell'endotelio mediata dal TNF- α



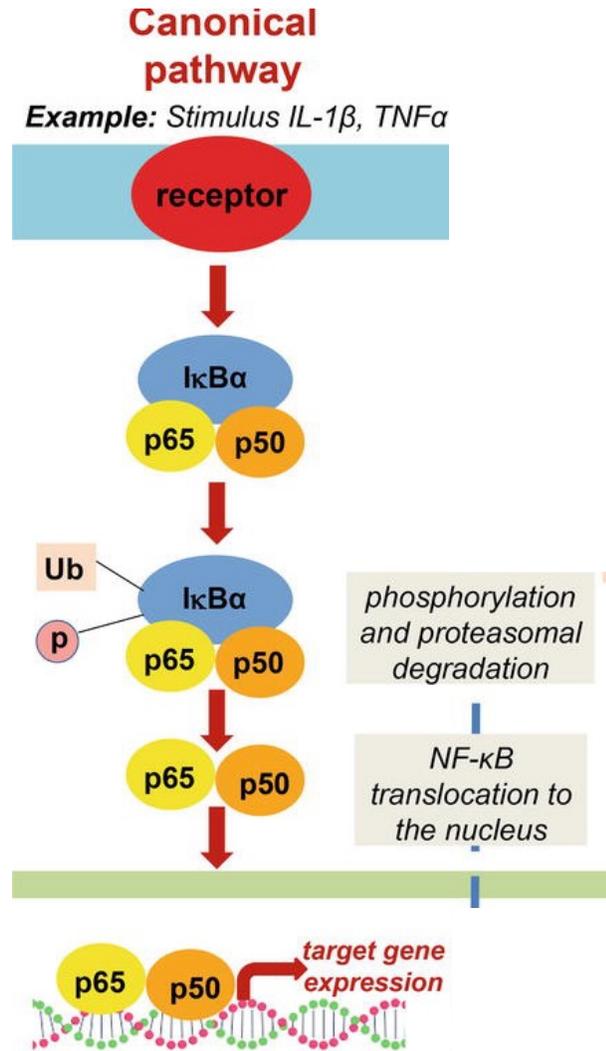
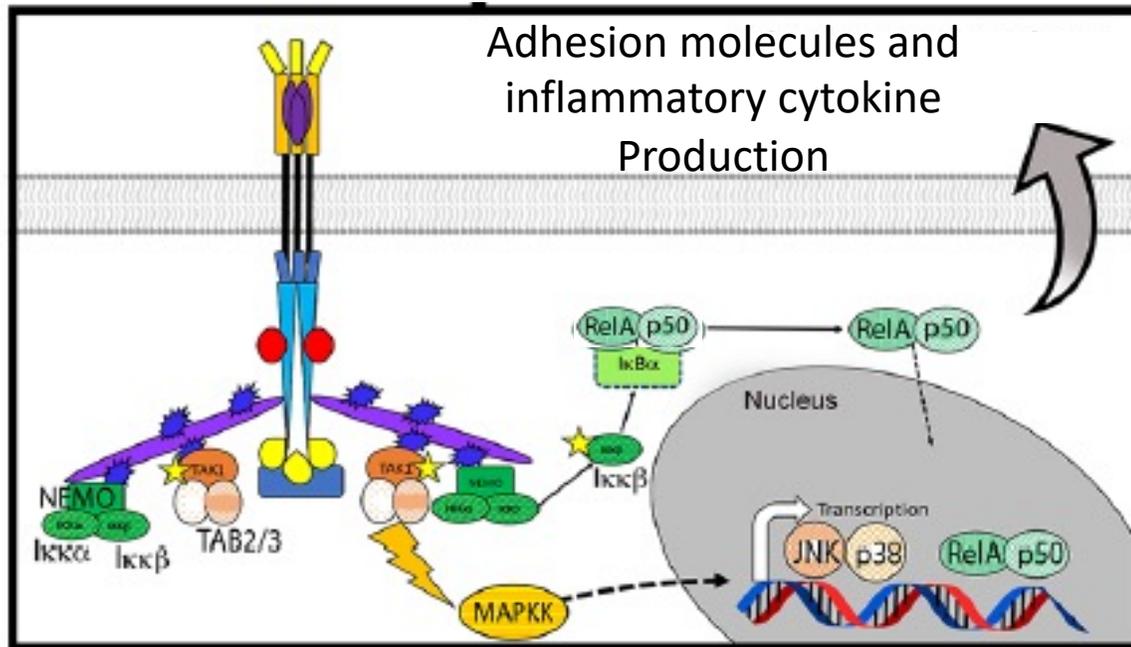
La segnalazione inviata dai recettori associati alle proteine G (es. recettore per l'istamina) ha una durata breve di circa 10-20 minuti). L'attivazione protratta nel tempo dell'endotelio richiede l'azione di citochine quali il TNF- α e l'IL-1 β . Tali citochine inducono l'espressione di E-selettina, ICAM1, VCAM1 chemochine quali l'IL-8 e COX2. COX-2 media la sintesi della prostaciclina PGI₂. L'espressione di tali molecole dipende dai fattori trascrizionali NF- κ B e AP-1.

Il TNF- α induce l'attivazione del fattore trascrizionale NF- κ B e dei fattori trascrizionali regolati dalle MAPK



Il legame del TNF- α al TNFR1 induce l'assemblaggio del complesso di segnalazione associato al recettore (complesso I) che è composto dalle molecole TRADD (TNF receptor-associated death domain), TRAF2 o l'omologo TRAF5, RIP1 (receptor interacting protein kinase 1), e le E3 ubiquitin ligasi cIAP1 e cIAP2. In seguito a stimolazione del recettore cIAP1 e cIAP2 coniugano la catene di ubiquitina (K63) a RIP facilitando il reclutamento della chinasi TAK1. TAK1 fosforila IKK β del complesso IKK (inhibitor of kappa B Kinases) con conseguente attivazione di NF- κ B.

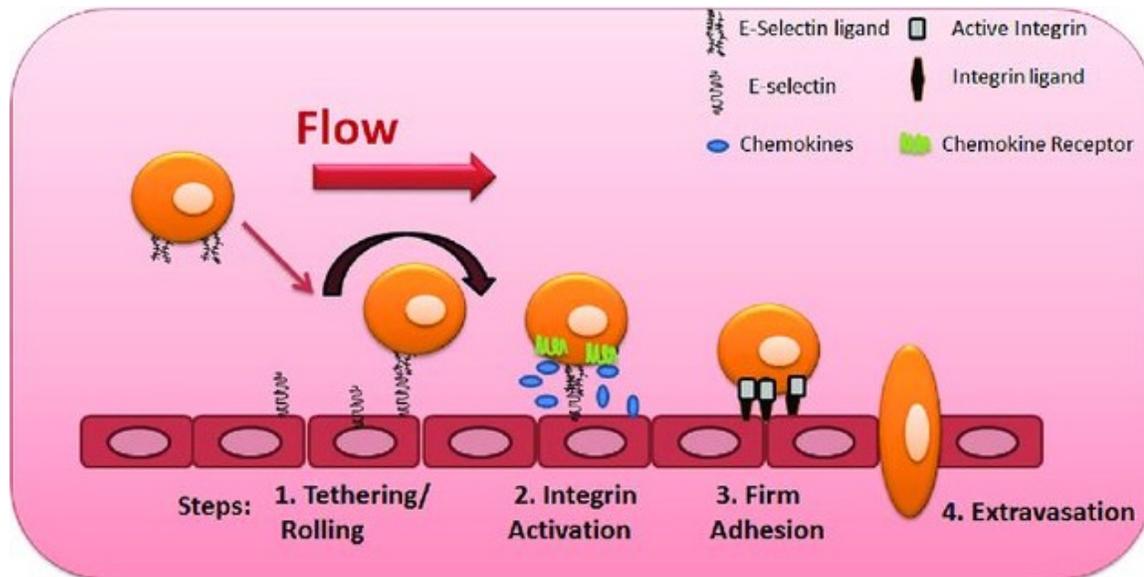
Attivazione canonica di NF- κ B



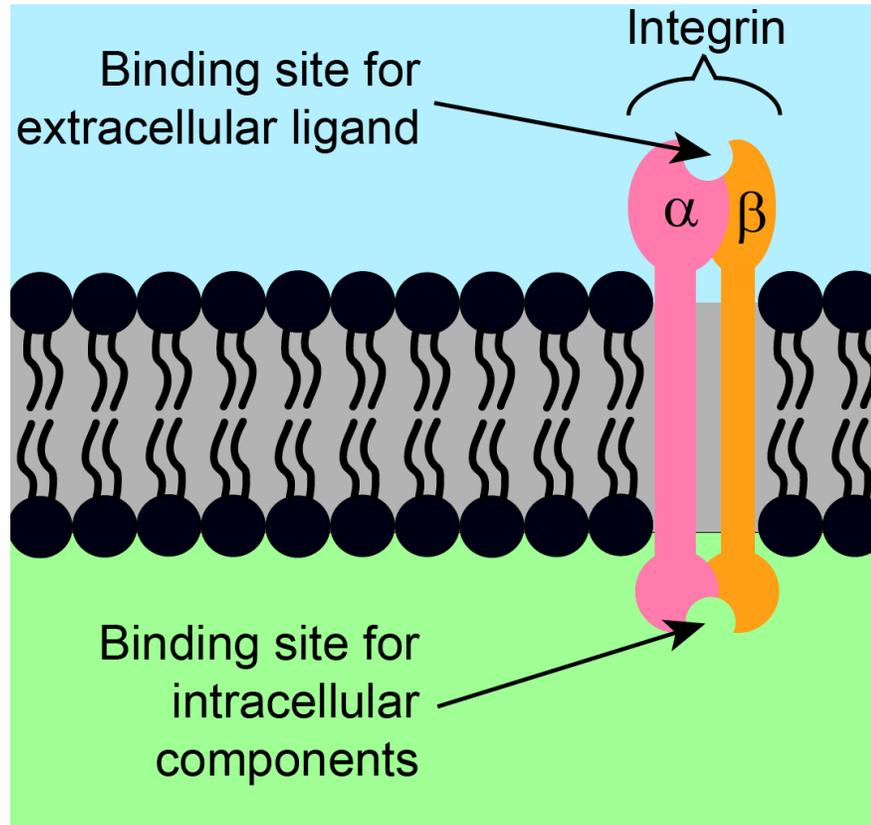
Arresto e adesione forte dei leucociti all'endotelio



L'arresto dei leucociti sull'endotelio è mediato dall'interazione fra le integrine espresse dai leucociti e i loro ligandi ICAM-1, VCAM-2 espressi dall'endotelio attivato. L'adesione forte necessita di un cambiamento dell'affinità delle integrine indotto dall'interazione del leucocita con le chemochine.



Le Integrine



Le integrine sono molecole di adesione coinvolte nel legame delle cellule alla matrice extracellulare o con altre cellule. Sono eterodimeri costituiti da 1 catena alfa e 1 catena beta. Nell'uomo sono stati identificati 9 tipi di subunità β e 18 subunità α .

Le integrine composte dalla catena β 1 formano dimeri con 12 catene α sono ampiamente espresse sulle cellule dei vertebrati e legano le proteine della matrice extracellulare quali il collagene.

Le integrine composte dalla catena β 2 sono espresse esclusivamente sulla superficie dei leucociti e sono coinvolte nella interazione con le cellule endoteliali.

Le Integrine

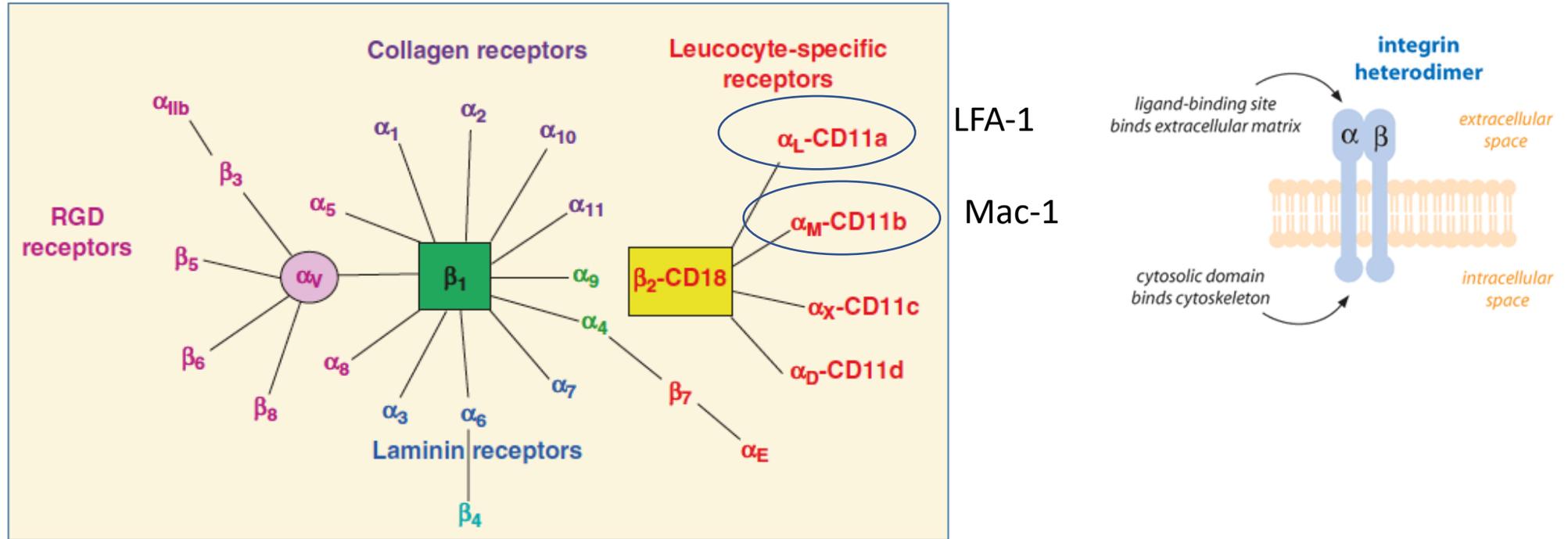


Fig. 1 Classification of integrin family. Integrin heterodimers consists of numerous combinations of α and β subunits. With respect to ligand specificity, integrins are generally classified as collagen-binding integrins ($\alpha_1\beta_1$, $\alpha_2\beta_1$, $\alpha_{10}\beta_1$, and $\alpha_{11}\beta_1$), RGD-recognizing integrins ($\alpha_5\beta_1$, $\alpha_V\beta_1$, $\alpha_V\beta_3$, $\alpha_V\beta_5$, $\alpha_V\beta_6$, $\alpha_V\beta_8$, and $\alpha_{11b}\beta_3$), laminin-binding integrins ($\alpha_3\beta_1$, $\alpha_6\beta_1$, $\alpha_7\beta_1$, and $\alpha_6\beta_4$), and leukocyte integrins ($\alpha_L\beta_2$, $\alpha_M\beta_2$, $\alpha_X\beta_2$, and $\alpha_D\beta_2$). The β_2 integrin subunit (CD18) can pair with one of the four α subunits (α_L -CD11a, α_M -CD11b, α_X -CD11c, and α_D -CD11d), forming leukocyte function-associated antigen-1, Mac1/CR3 (macrophage-1 antigen, complement receptor 3), 150.95/CR4 (complement receptor 4), and CD18/CD11d, respectively. CD11a/CD18 is expressed mainly on all leukocytes, while CD11b/CD18, CD11c/CD18, and CD11d/CD18 are expressed on myeloid cells.^{106,107} The $\alpha_M\beta_2$ integrin (also known as CR3, CD11b/CD18, or Mac-1) is found on phagocytic cells and implicated in the adhesion of leucocytes to endothelium and opsonization of microbes. Ligands for CR3 include the complement component iC3b, the intercellular adhesion molecule (ICAM-1), and coagulation factors like fibrinogen and factor X.

Tabella 3.3 Molecole di adesione endoteliale e leucocitaria

Famiglia	Molecola	Distribuzione	Ligando
Selectine	L-selectina (CD62L)	Neutrofili, monociti, linfociti T (immaturi e della memoria), linfociti B (immaturi)	Sialil-Lewis X/PNAd su GlyCAM-1, CD34, MAdCAM-1, altri; espressi dall'endotelio (HEV)
	E-selectina (CD62E)	Endotelio attivato dalle citochine (TNF α , IL-1)	Sialil-Lewis X (per esempio, CLA) sulle glicoproteine; espresso dai neutrofili, monociti, linfociti T (effettori, della memoria)
	P-selectina (CD62P)	Endotelio attivato dalle citochine (TNF α , IL-1), istamina, o trombina	Sialil-Lewis X su PSGL-1 e altre glicoproteine; espressi dai neutrofili, monociti, linfociti T (effettori, della memoria)
Integrine	LFA-1 (CD11a/CD18)	Neutrofili, monociti, linfociti T (immaturi, effettori, della memoria)	ICAM-1 (CD54), ICAM-2 (CD102); espressi dall'endotelio (indotti nell'endotelio attivato)
	Mac-1 (CD11b/CD18)	Monociti, cellule dendritiche	ICAM-1 (CD54), ICAM-2 (CD102); espressi dall'endotelio (indotti nell'endotelio attivato)

LFA-1 e Mac-1 legano le molecole di adesione ICAM-1 e ICAM-2

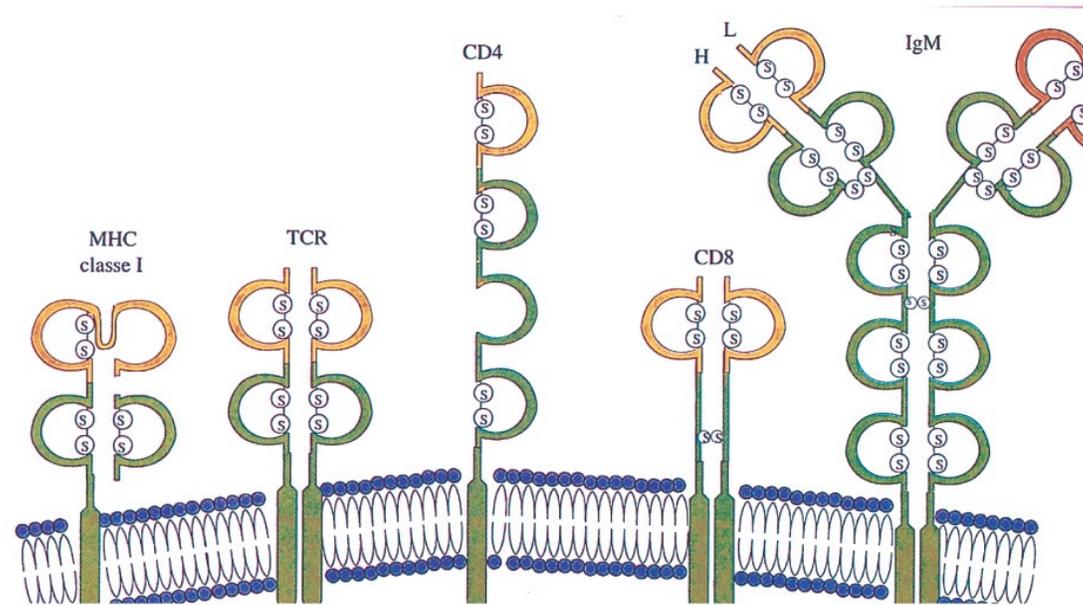
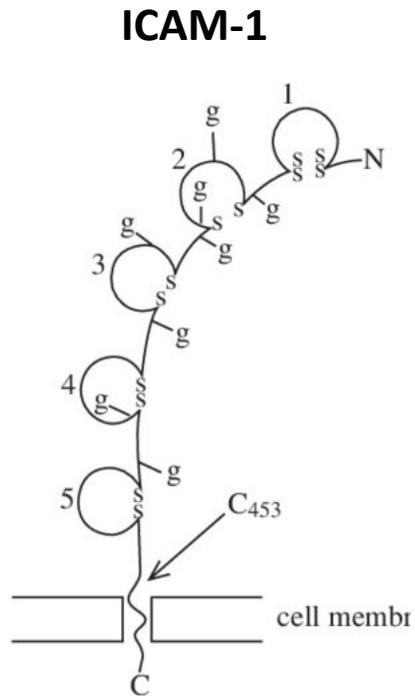
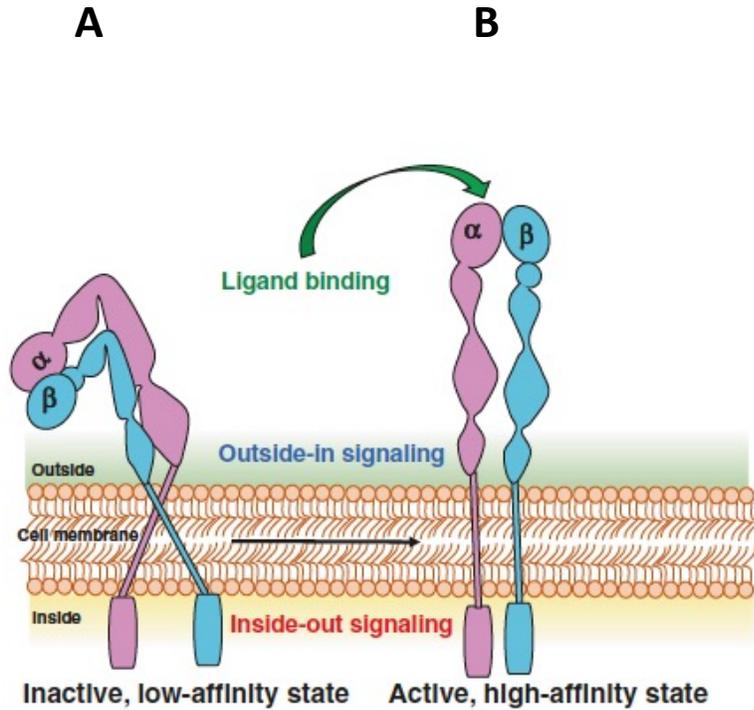


FIGURA 4-4. Somiglianza strutturale di base di alcune molecole della 'superfamiglia delle Immunoglobuline'. In giallo i domini variabili la cui diversità - nelle Ig e nel TCR - è il risultato del riarrangiamento dei rispettivi segmenti genici; in verde i domini e i segmenti polipeptidici costanti.

Le molecole di adesione ICAM-1 e ICAM-2 sono i ligandi delle integrine LFA1 e Mac-1 rispettivamente che mediano l'adesione forte dei leucociti all'endotelio.

L'espressione di ICAM-1 è indotta sulle cellule endoteliali dalle citochine infiammatorie $\text{TNF-}\alpha$ e $\text{IL-1}\beta$. L'espressione di ICAM-2 è costitutiva sulle cellule endoteliali.

Attivazione delle integrine

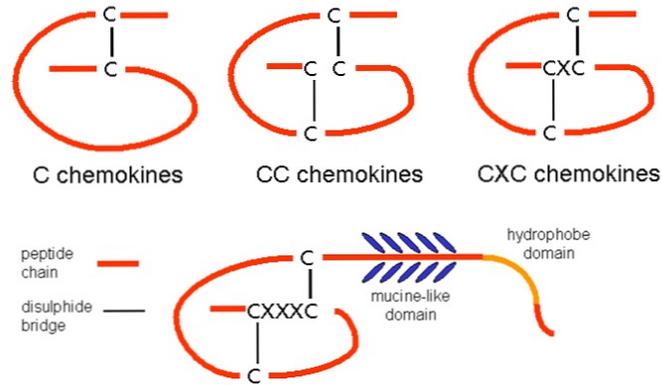


Le integrine nel leucocita non attivato sono presenti in una forma in grado di legare con bassa affinità i loro ligandi (A low affinity state).

Alcuni stimoli avviano una cascata di segnalazione intracellulare nel leucocita che determina un cambiamento conformazionale della regione extracellulare dell'integrina con conseguente aumento della affinità dell'integrina per il suo ligando. Questo meccanismo prende il nome di inside-out signaling.

Chemochine e recettori delle chemochine

Structure of chemokine classes



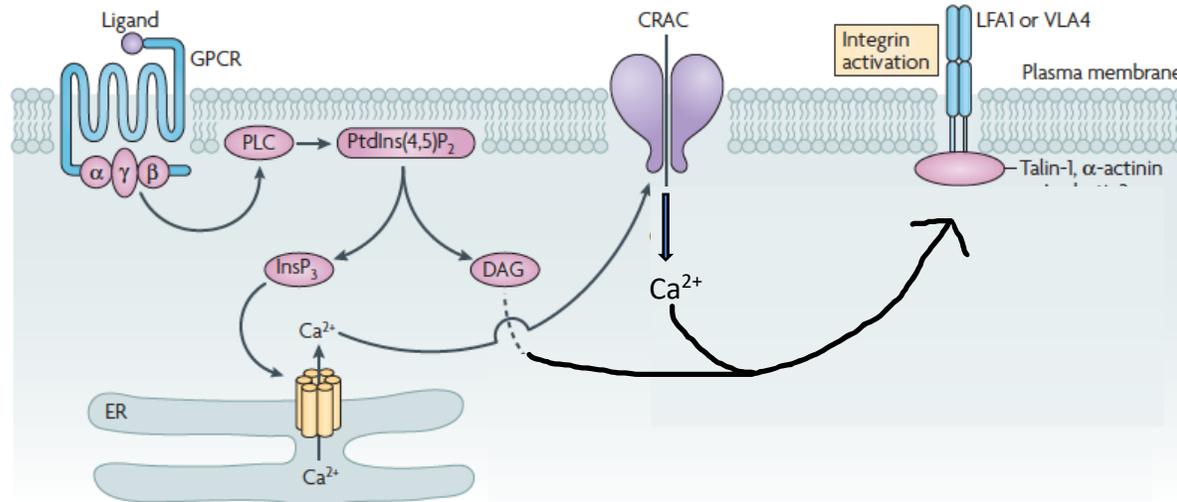
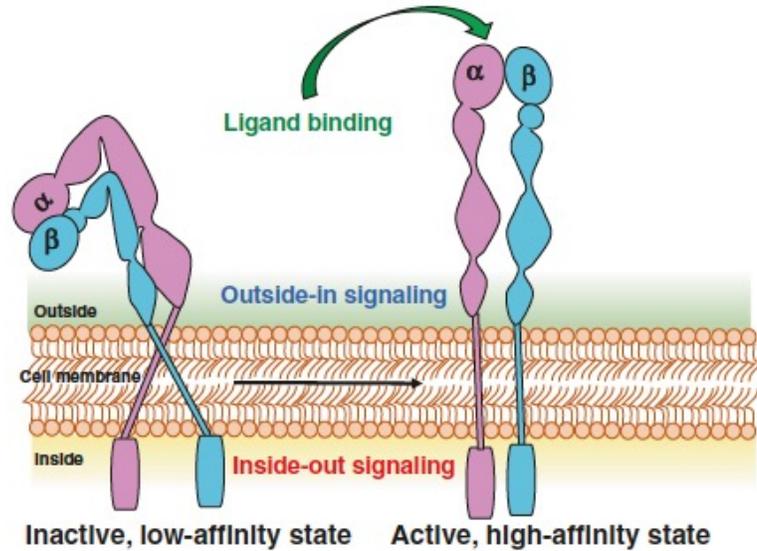
Subfamily	Old nomenclature	New nomenclature	Receptor(s) bound	
CXC	GRO- α , KC ^{a,b} , MIP-2 ^{a,b}	CXCL1	CXCR2	
	GRO- β	CXCL2	CXCR2	
	GRO- γ	CXCL4	CXCR2	
	ENA-78	CXCL5	CXCR1, CXCR2	
	IL-8; CINC ^b	CXCL8	CXCR1, CXCR2	
	Mig	CXCL9	CXCR3	
	IP-10; Crg-2 ^b	CXCL10	CXCR3	
	I-TAC	CXCL11	CXCR3	
	SDF-1	CXCL12	CXCR4	
	MCP-1	CCL2	CCR2	
	MIP-1 α	CCL3	CCR1, CCR5	
	MIP-1 β	CCL4	CCR1, CCR5	
CC	RANTES	CCL5	CCR1, CCR3, CCR5	
	MCP-3	CCL7	CCR1, CCR2, CCR3	
	MCP-2	CCL8	CCR1, CCR2, CCR3, CCR5	
	Eotaxin	CCL11	CCR3, CCR5	
	TARC	CCL17	CCR4	
	PARC	CCL18	Unknown	
	ELC	CCL19	CCR7	
	SLC	CCL21	CCR7	
	C	Lymphotactin- α	XCL1	XCR1
		Lymphotactin- β	XCL2	XCR1
CX3C	Fractalkine	CX3CR1	CX3CR1	

Le chemochine sono una famiglia di proteine di 8-10 KD contenenti nella maggior parte dei casi 2 ponti disolfuro.

Sono state identificate circa 40 chemochine suddivise in 4 gruppi sulla base del numero e della posizione della prima coppia di cisteine. Le chemochine CC e CXC sono prodotte dai leucociti, macrofagi, cellule endoteliali, cellule epiteliali. L'IL-8 denominata CXCL8 è secreta dai macrofagi, cellule dendritiche, cellule epiteliali e promuove l'attivazione e la chemiotassi dei neutrofili nel sito infiammato.

I recettori per le chemochine appartengono alla famiglia dei recettori a sette domini transmembrana accoppiati alle proteine G trimeriche.

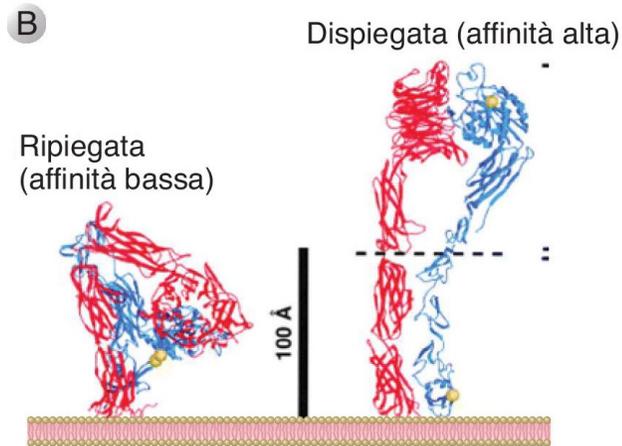
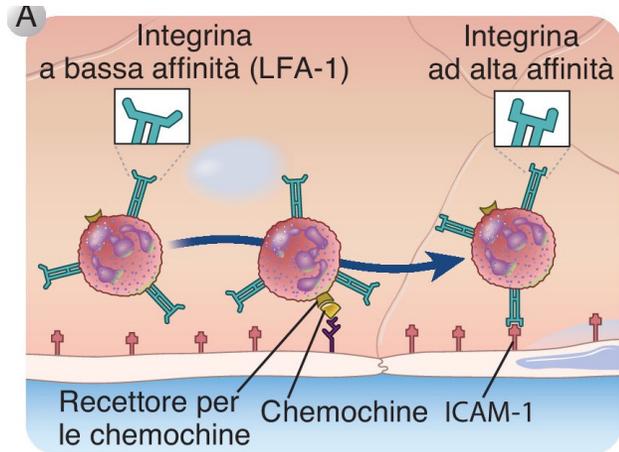
Attivazione delle integrine sul leucocita



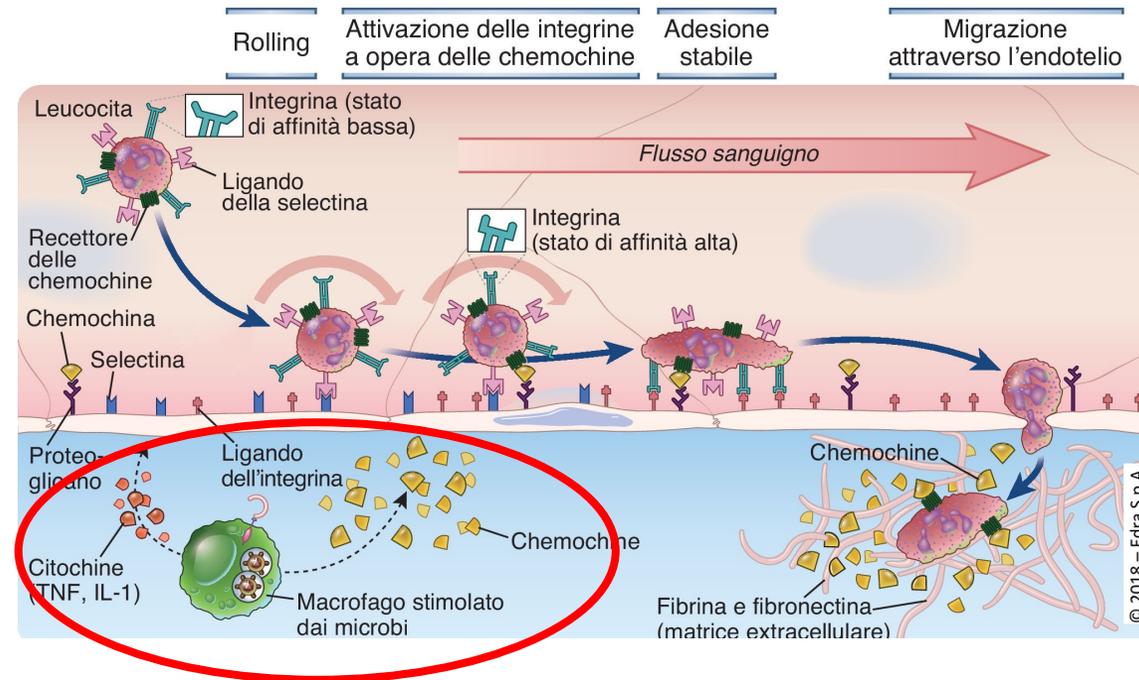
L'interazione delle **chemochine** con il recettore espresso dal leucocita induce un rapido cambiamento di conformazione dell'integrina definito attivazione dell'integrina «inside-out»

L'interazione fra chemochina con il recettore espresso dal leucocita attivando la proteina G associata al recettore determina l'attivazione della PLC (fosfolipasi C) con conseguente generazione di DAG e IP₃. Infine l'attivazione della talina favorisce l'interazione di questa con la regione intracitoplasmatica dell'integrina con conseguente cambiamento conformazionale e aumento della affinità dell'integrina per il suo ligando.

I macrofagi attivati producono le chemochine



© 2018 - Edra S.p.A.



Le chemochine sono prodotte nel tessuto infettato da parte delle cellule sentinella dei tessuti quali i macrofagi e le cellule dendritiche stimulate dai prodotti microbici o da danno tissutale.

Le cellule endoteliali espongono le chemochine prodotte nello spazio extracellulare

Tessuto non infiammato

Tessuto infiammato

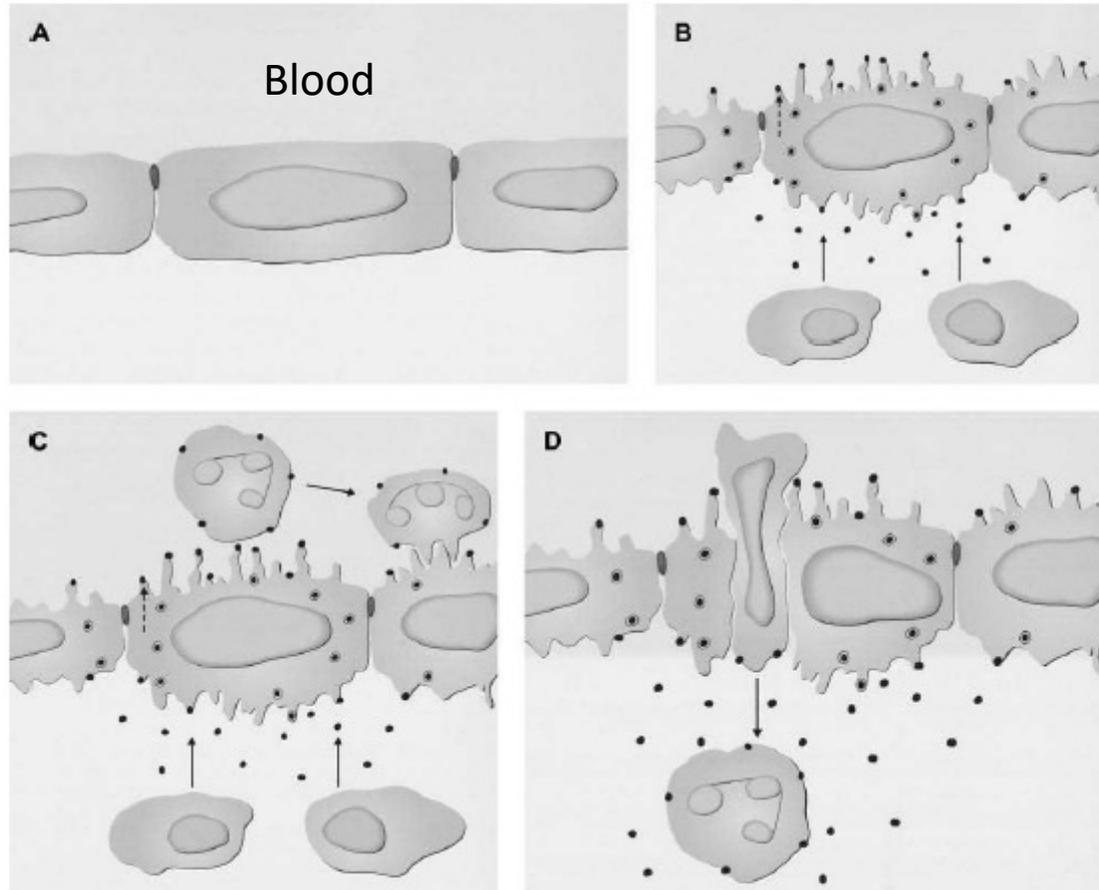
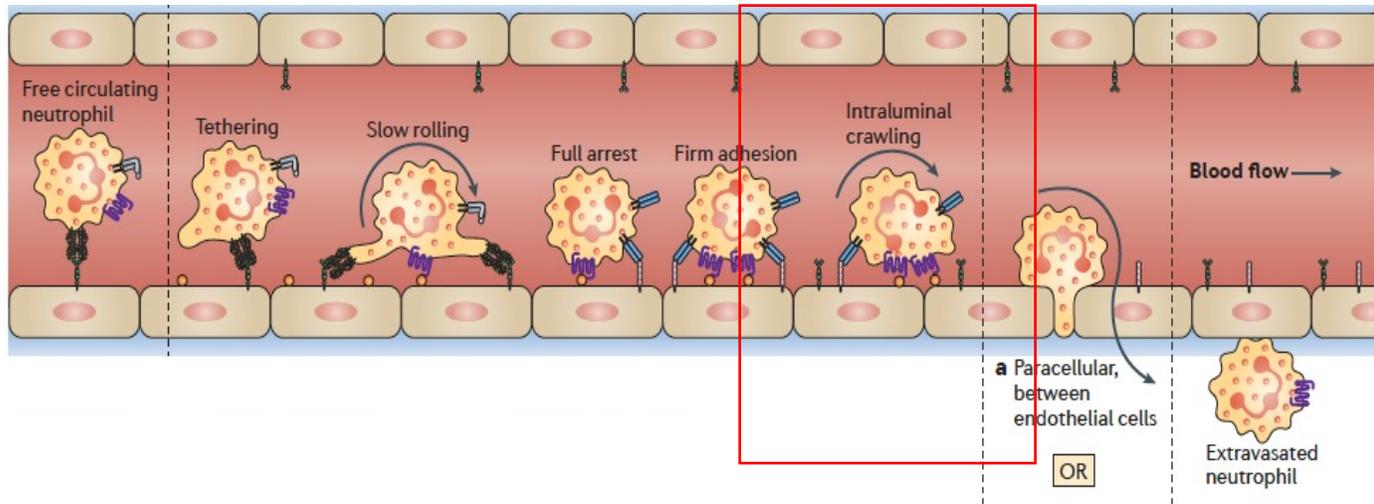


Figure 1. Subcellular events in the endothelium during chemokine-directed leukocyte extravasation. (A) Noninflamed tissue. (B) Inflamed tissue. Release of chemokines from extravascular cells in the tissue occurs (---), and there is wrinkling of the endothelial cell surface. Chemokines are taken up at the abluminal surface of the endothelium and transcytosed in caveolae. This process involves binding to glycosaminoglycans (GAGs) and/or the Duffy receptor. At the luminal surface, chemokines are released and bound preferentially on the tips of projections. These mediators may also be produced and released directly by endothelial cells, in which case they are also bound at the luminal surface but not transcytosed (- - ->). (C) Chemokines bound at the luminal endothelial cell surface build up in concentration. They do this sufficiently to bind to and activate the signaling receptors on the leukocyte cell surface, leading to activation of integrins and firm attachment. (D) Leukocyte migration occurs either transcellularly through a pore in the endothelial cell or through the intercellular junction, following a chemokine gradient bound to GAGs and/or the Duffy receptor. The cell then enters the basement membrane and continues migration along a chemokine gradient that is soluble or immobilized to the extracellular matrix.

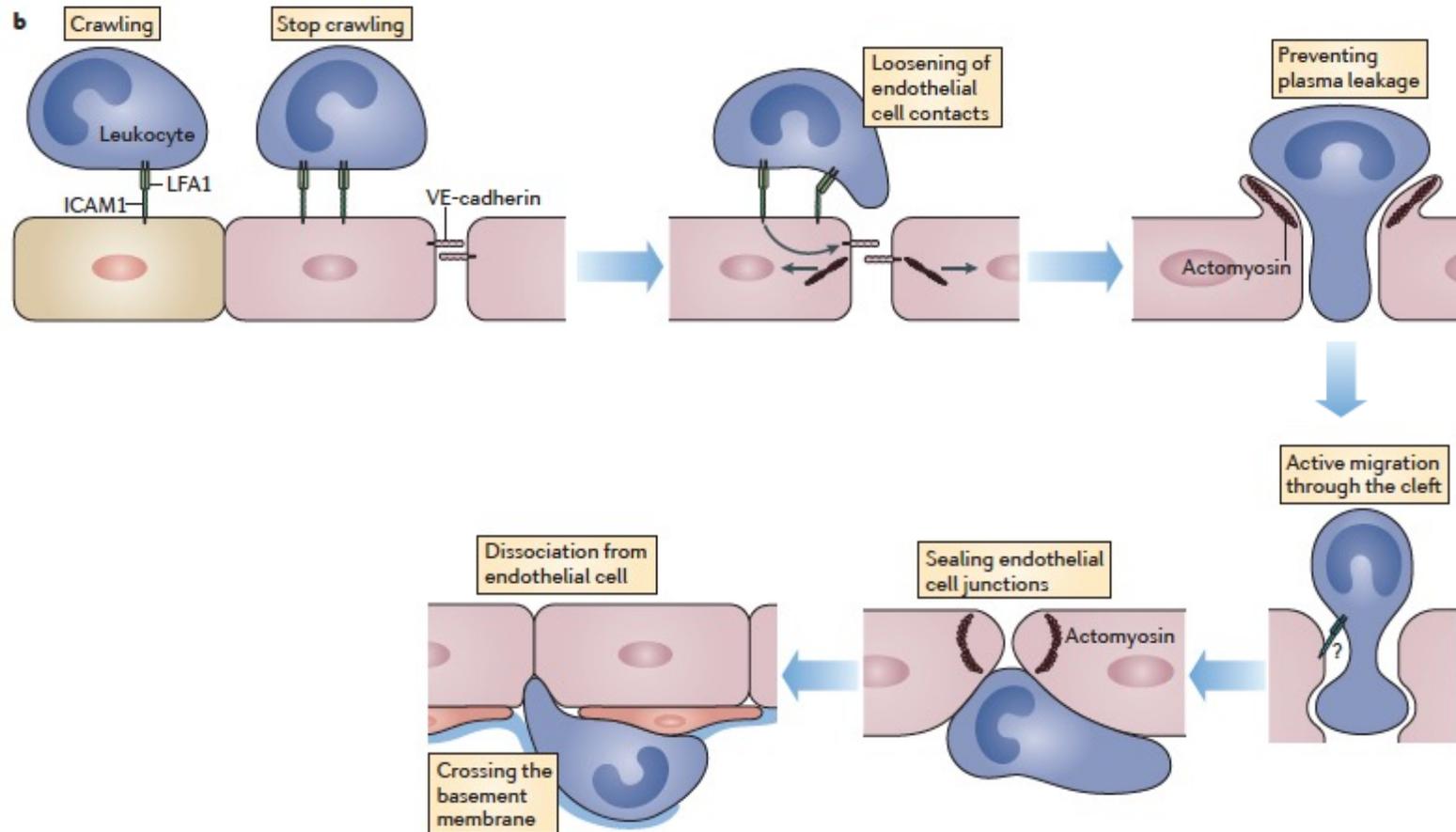
Le chemochine prodotte nel tessuto infettato sono captate dalle cellule endoteliali e esposte sulla superficie della cellula interna al vaso sanguigno. Questo aumenta la concentrazione delle chemochine che sono così in grado di legare e attivare i recettori espressi dai leucociti. Anche le cellule endoteliali possono produrre chemochine.

Crawling



L'adesione forte del leucocita all'endotelio è seguita da un lento avanzamento del leucocita sull'endotelio (crawling) che prepara il leucocita a raggiungere i siti da dove potrà trasmigrare dai vasi al tessuto. Questi siti sono in generale le zone di giunzione fra le cellule endoteliali (trasmigrazione paracellulare). Il crawling del neutrofilo è mediato dall'interazione fra Mac-1 e ICAM. La trasmigrazione può essere anche transcellulare

Migrazione dei leucociti nel tessuto



La transmigrazione dei leucociti attraverso le giunzioni delle cellule endoteliali richiede l'interruzione temporanea e transitoria delle giunzioni che sono principalmente costituite dall'interazioni fra VE-caderine. La struttura adesiva delle caderine è alterata dalla fosforilazione delle regioni intracitoplasmatiche da parte di chinasi attivate dall'interazione delle integrine leucocitarie con ICAM-1.

Dopo aver superato lo strato di cellule endoteliali, i leucociti devono attraversare la membrana basale che è una struttura continua costituita da proteine della matrice extracellulare come collagene e laminina e superare i periciti prima di raggiungere il tessuto lesso.