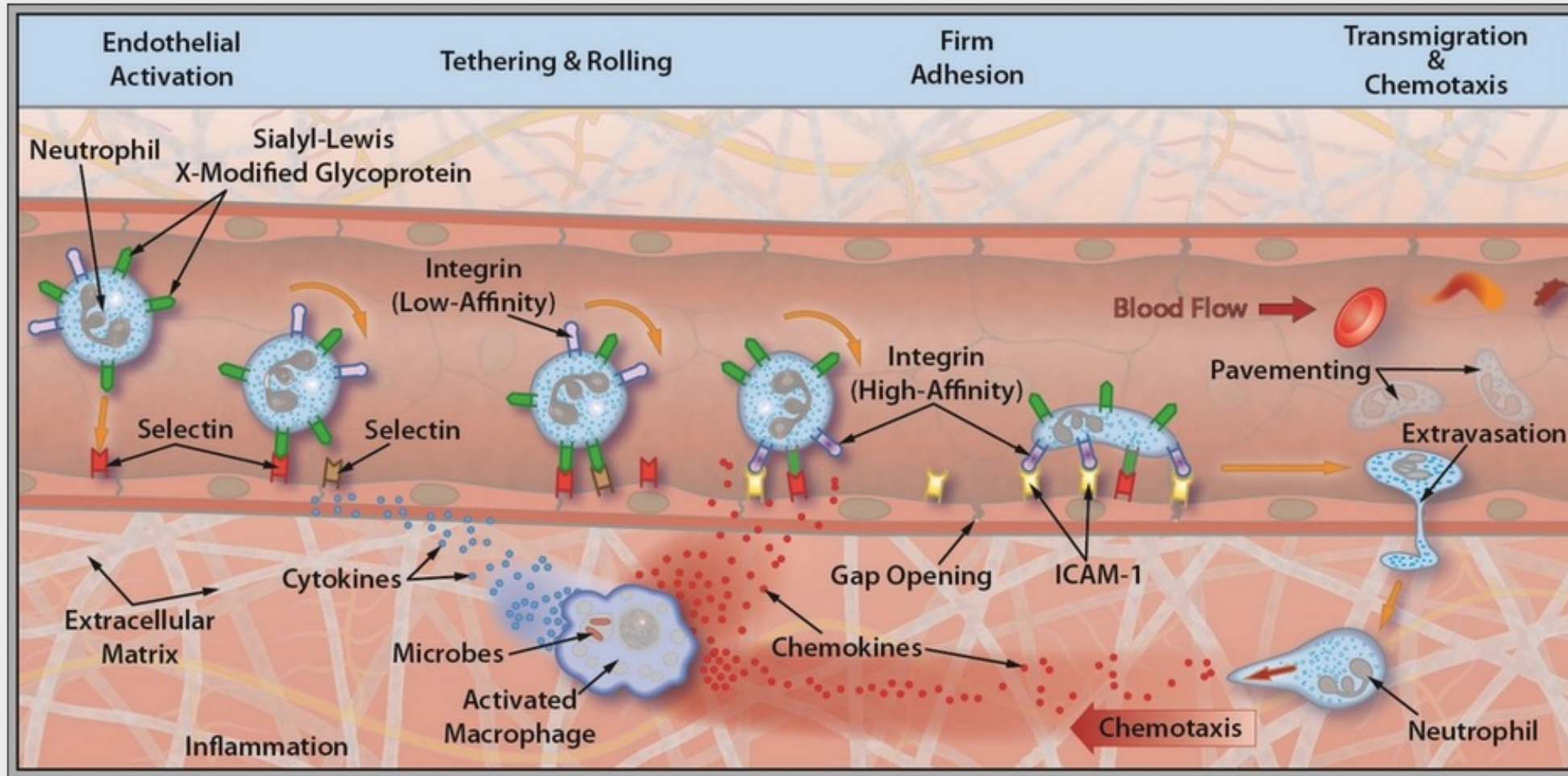
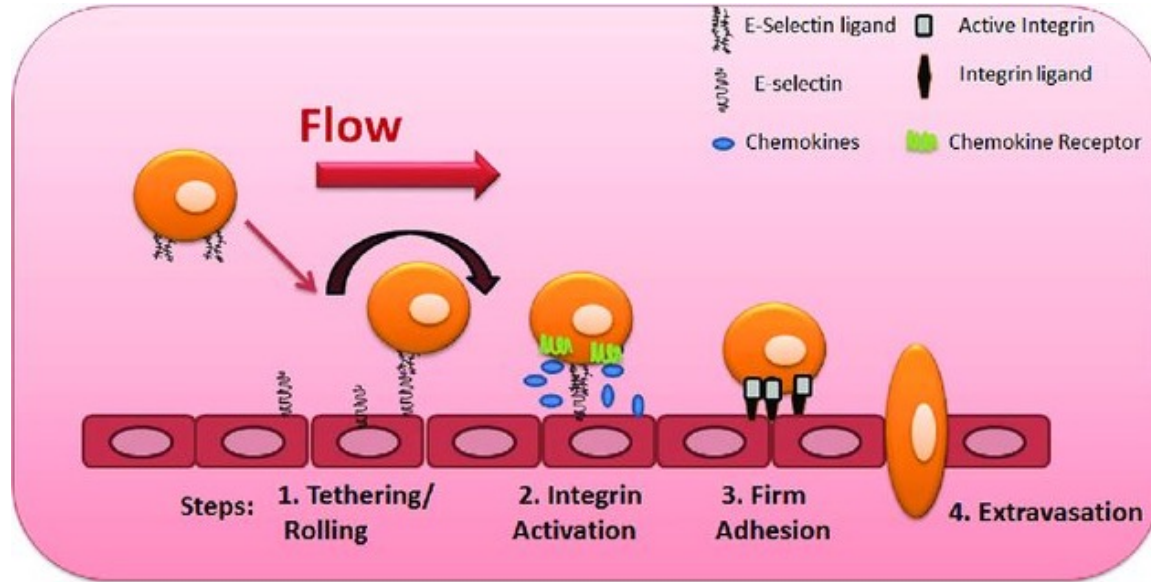


Extravasazione dei leucociti

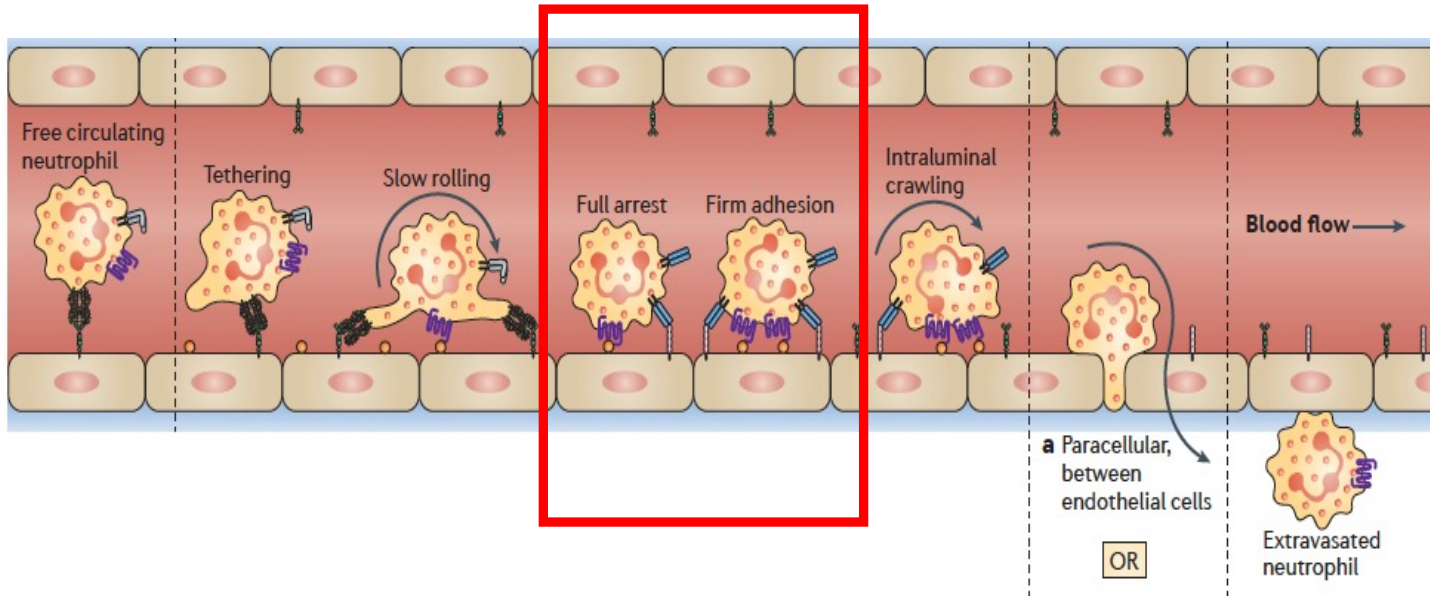


La fuoriuscita dei leucociti dai vasi avviene attraverso diverse fasi che includono: i) la cattura e il rotolamento dei leucociti sull'endotelio; ii) l'arresto dei leucociti sull'endotelio e lo scivolamento dei leucociti sulle cellule endoteliali e iii) la transmigrazione dei leucociti dai vasi nel tessuto.

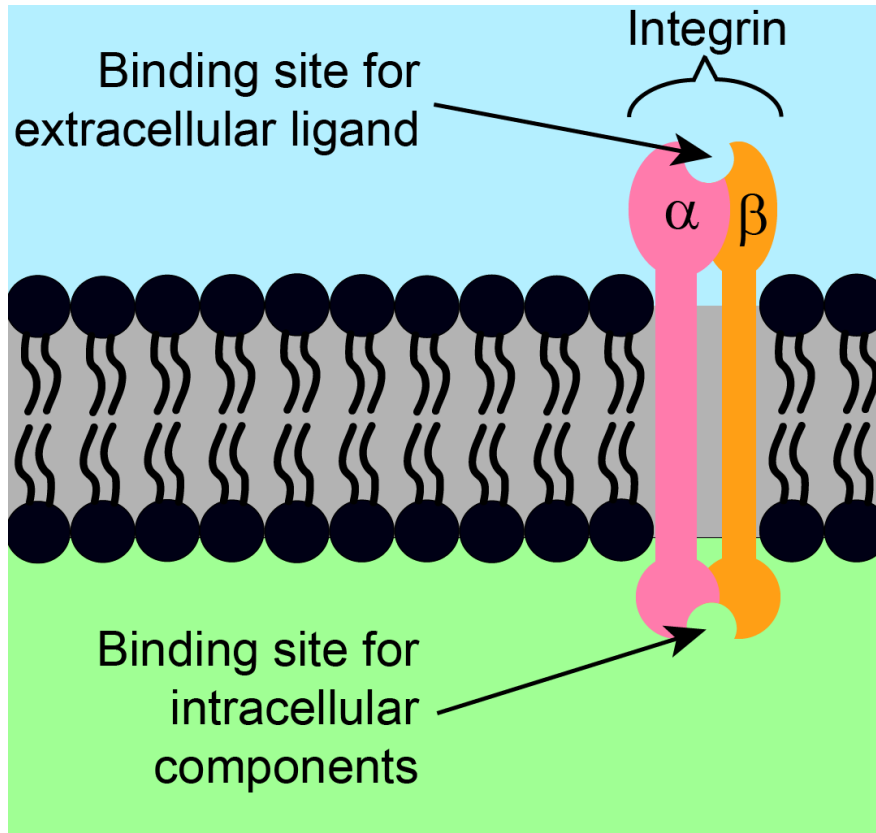
Arresto e adesione forte dei leucociti all'endotelio



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



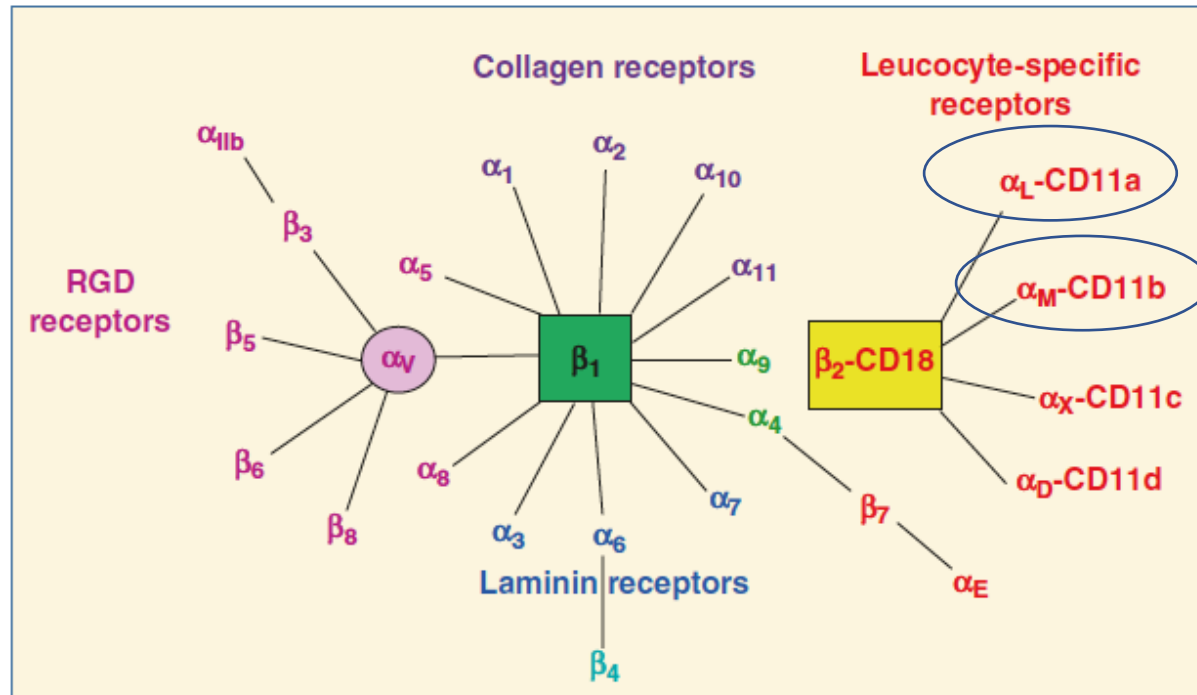
Le integrine sono molecole di adesione coinvolte nel legame delle cellule alla matrice extracellulare o con altre cellule. Sono eterodimeri costituiti da 1 catena alfa e 1 catena beta. Nell'uomo sono stati identificati 9 tipi di subunità β e 18 subunità α .

Le integrine composte dalla catena $\beta 1$, 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 $\beta 2$ sono espresse esclusivamente sulla superficie dei leucociti e sono coinvolte nella interazione con le cellule endoteliali.

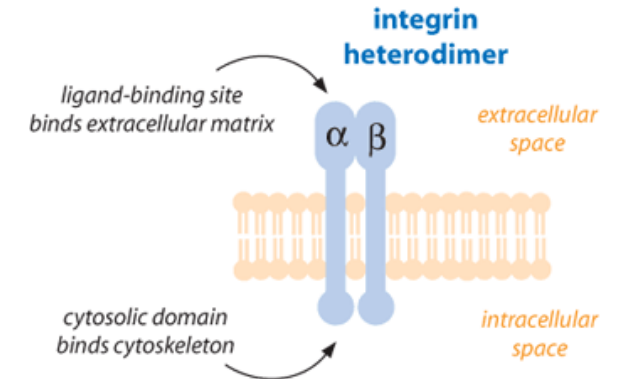
Le integrine più importanti nell'extravasazione dei neutrofili e dei monociti sono: LFA1 espresso da tutti i leucociti e MAC-1 espresso dalle cellule mieloidi (monociti, granulociti, cellule dendritiche).

Le Integrine LFA-1 e Mac-1 sono principalmente coinvolte nell'adesione dei leucociti all'endotelio



LFA-1

Mac-1



RGD dominio principale di interazione con le integrine presente nelle proteine della matrice extracellulare come la fibronectina, vitronectina, fattore di von Willebrand .

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.

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

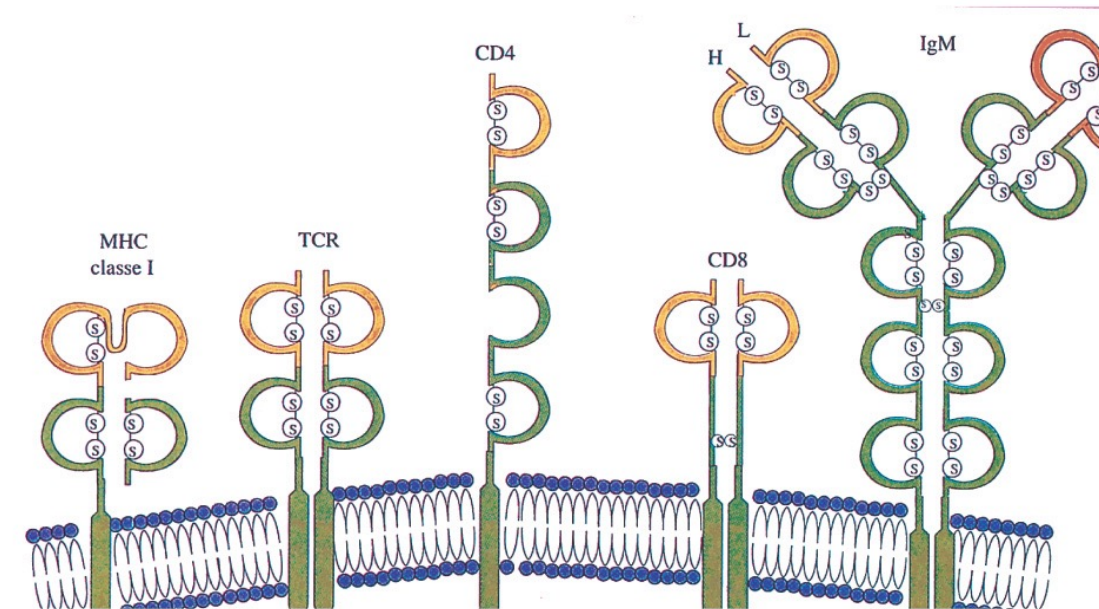
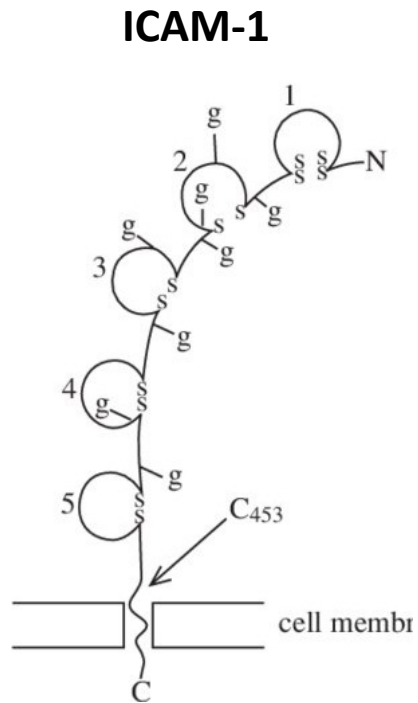


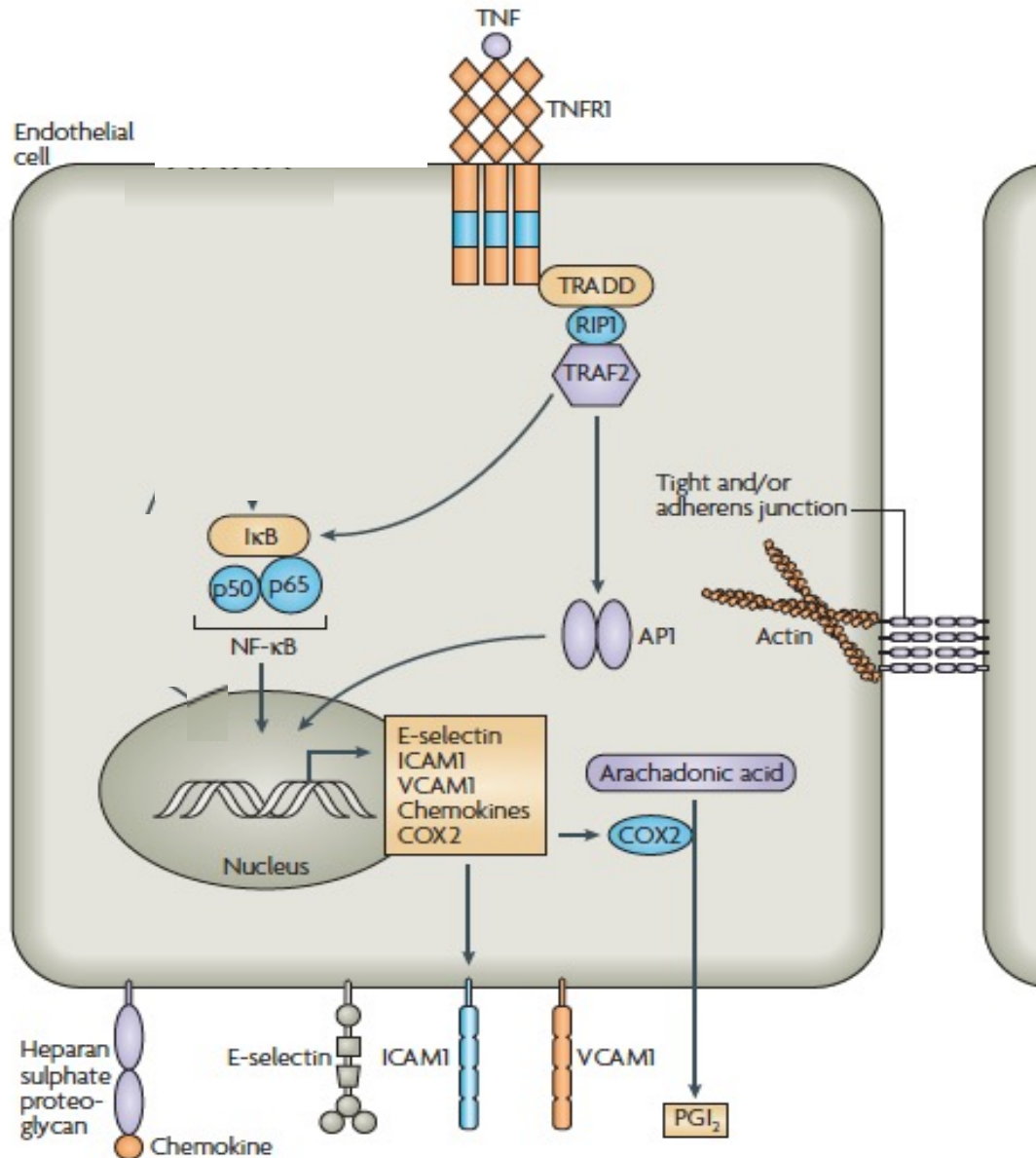
FIGURA 4-4. Somiglianza strutturale di base di alcune molecole della 'superfamiglia delle Immunoglobuline'. In giallo i domini variabili la cui diversità - nelle Ig e nel TCR - è il risultato del riarrangiamento dei rispettivi segmenti genici; in verde i domini e i segmenti polipeptidici costanti.

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.

Le molecole ICAM appartengono alla superfamiglia delle Immunoglobuline.

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.

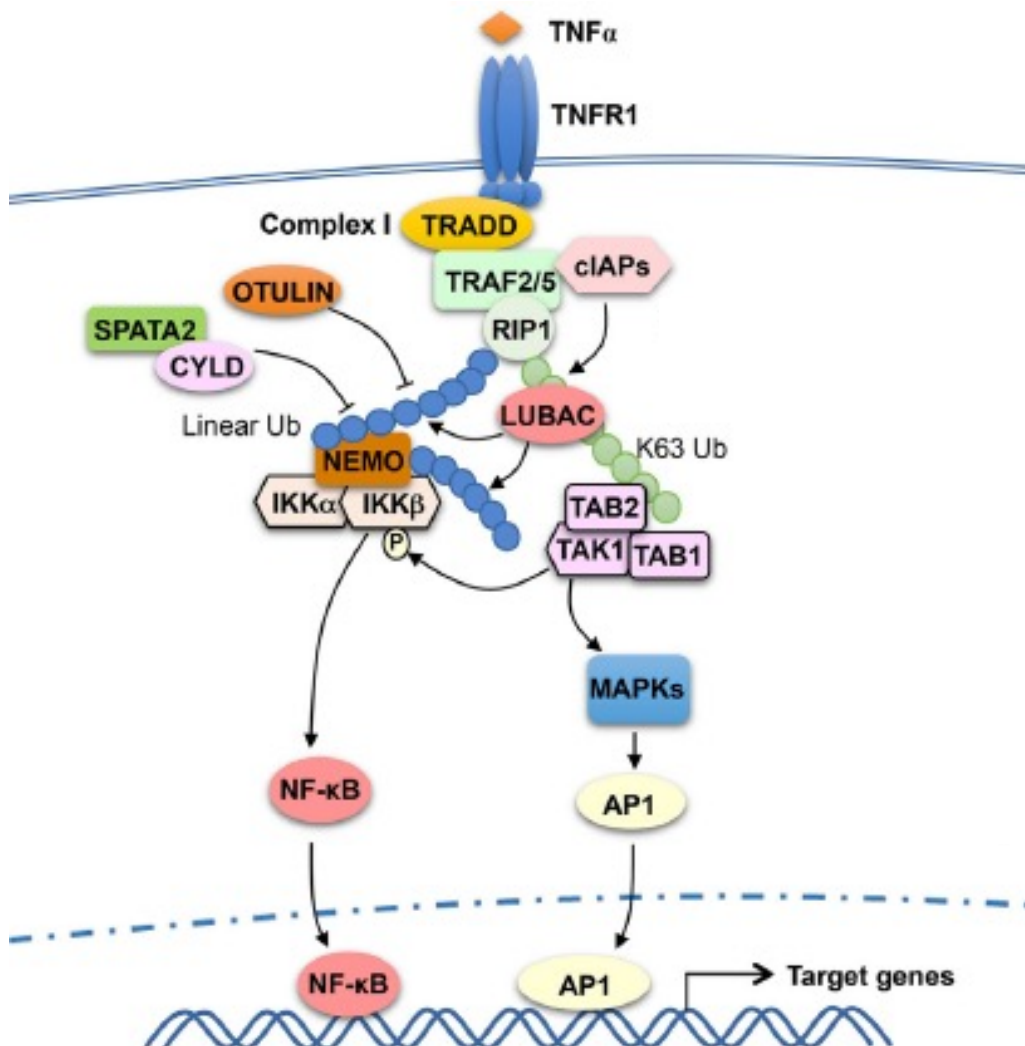
Attivazione dell'endotelio mediata dal TNF- α



Le citochine TNF- α e l'IL-1 β prodotte dalle cellule sentinella in risposta allo stimolo infiammatorio attivano le cellule endoteliali e inducono l'espressione delle molecole di adesione.

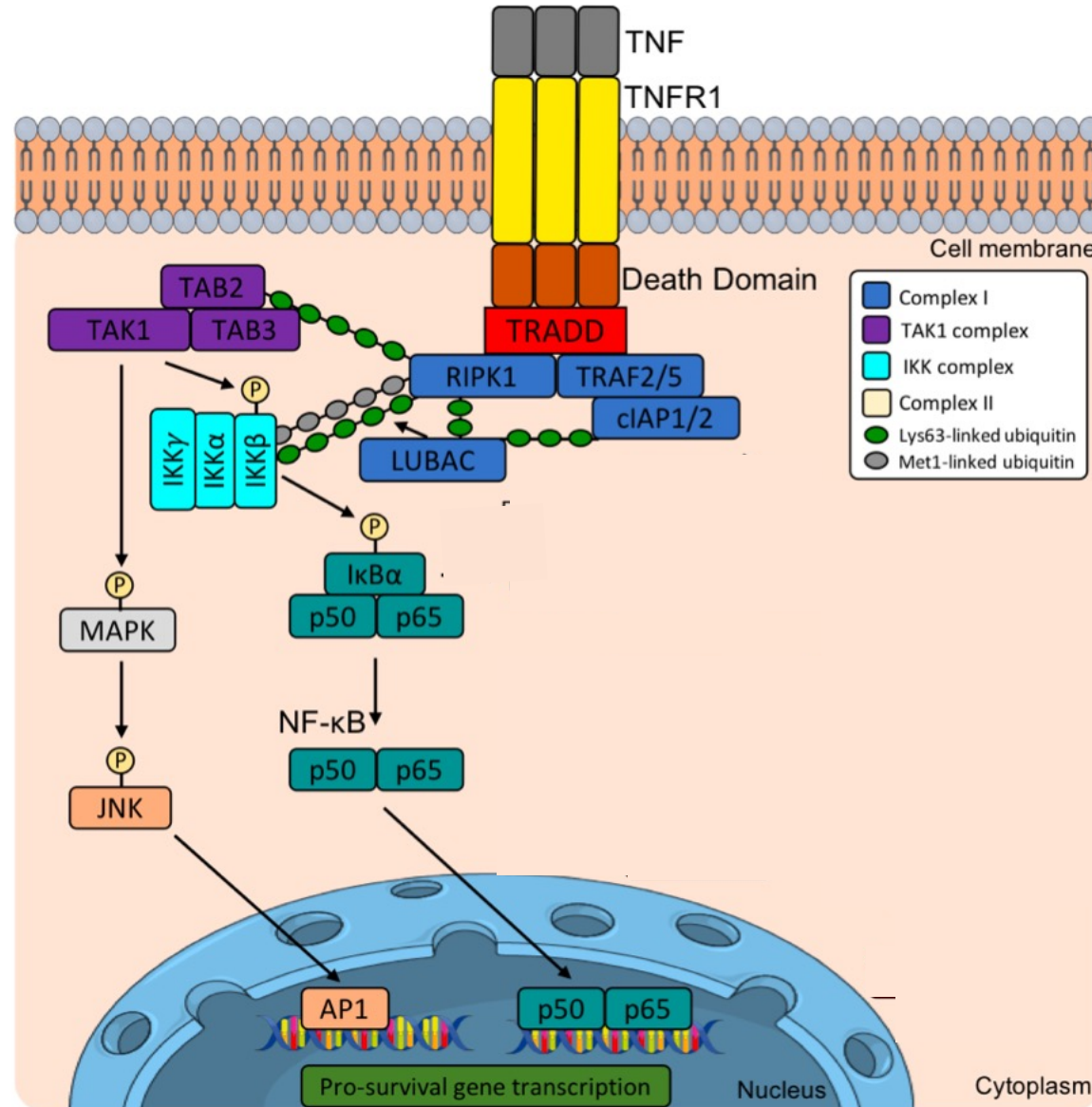
Tali citochine inducono l'espressione di E-selettina, ICAM1, VCAM chemochine quali l'IL-8 e COX2. L'espressione di tali molecole dipende dai fattori trascrizionali NF- κ B e AP-1.

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 (TNF associated factor), RIP1 (receptor interacting protein kinase 1), e le E3 ubiquitin ligasi cIAP1 e cIAP2. In seguito a stimolazione del recettore cIAP1 e cIAP2 coniugano le 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.

Segnalazione del recettore del TNF- α 1 (TNF-R1)

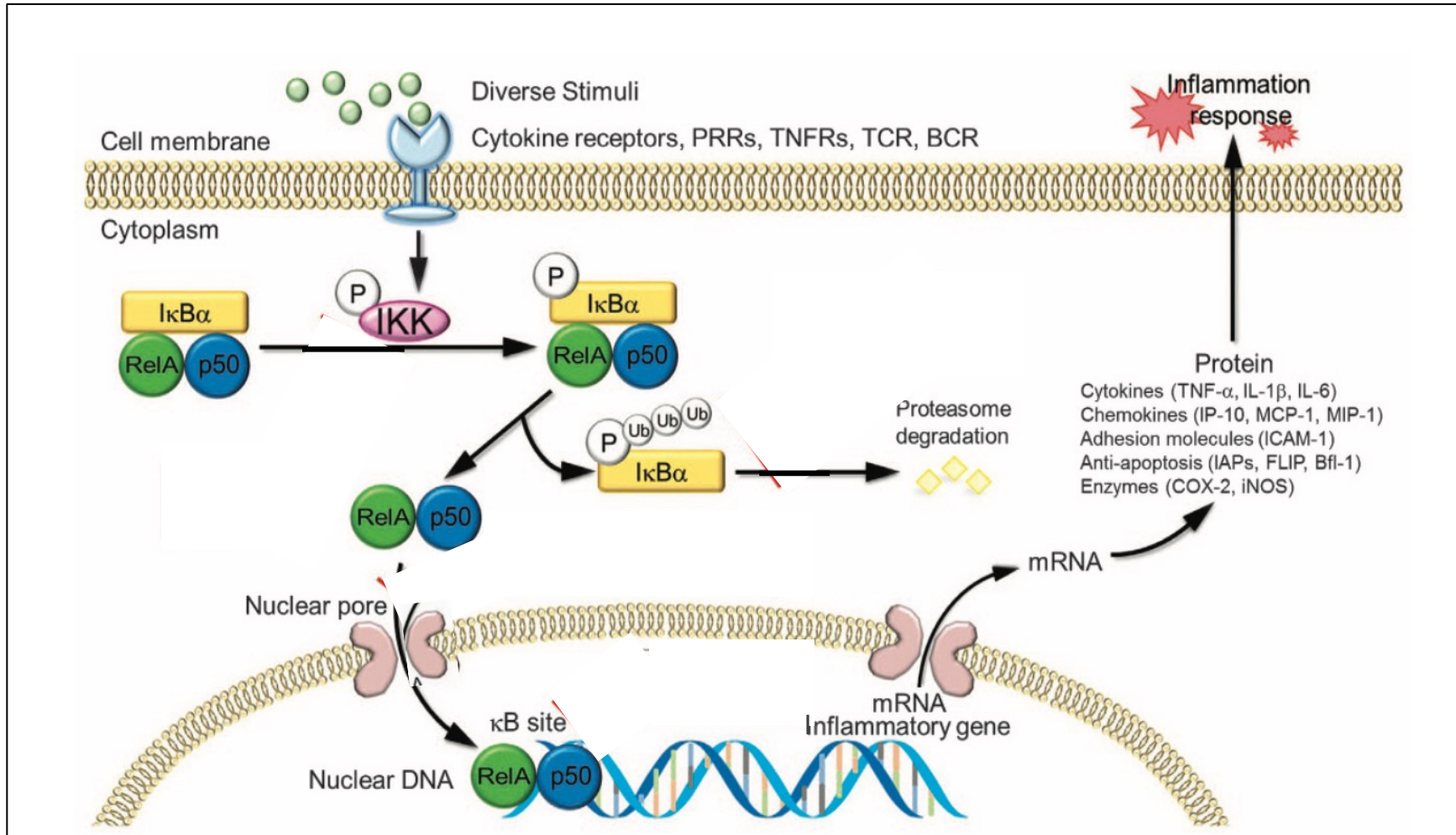


In seguito al legame con il TNF- α il recettore interagisce con l'adattatore TRADD che a sua volta forma un complesso con la chinasi RIPK1, le molecole associate a TRAF TRAF2/5 e le molecole cIAP (complesso I).

Le cIAP con LUBAC (linear ubiquitin chain assembly complex) aggiungono a RIPK1 catene di poliubiquitina K63 stabilizzando RIPK1.

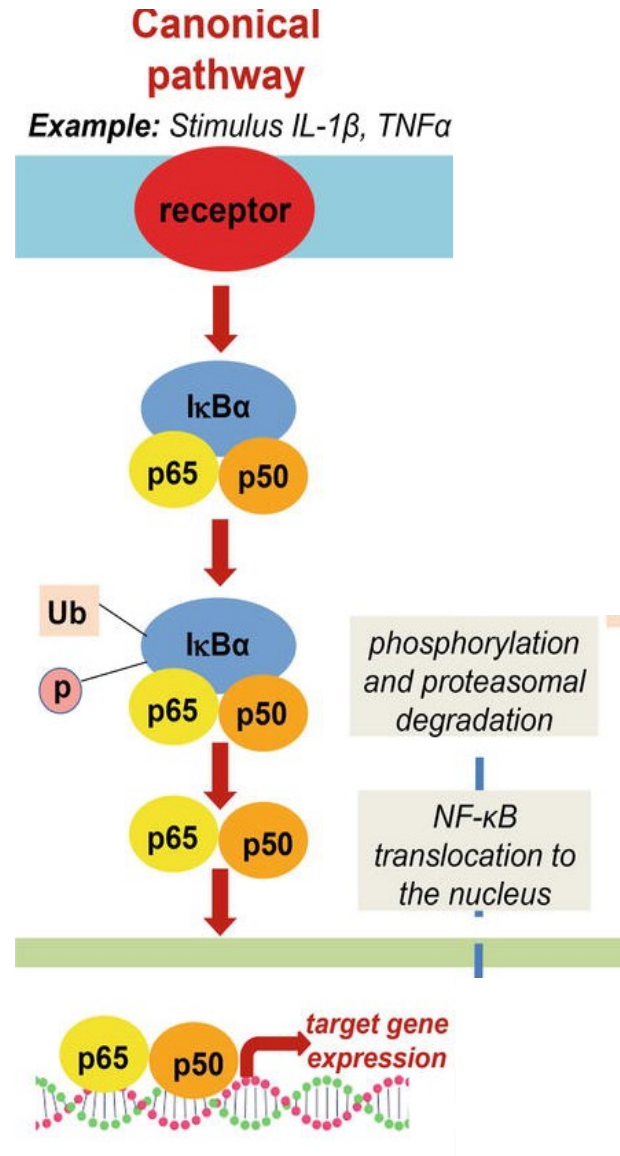
RIPK1 recluta la chinasi TAK1 (TGF-beta activated kinase 1) che attiva l'I κ B kinase complex (IKK) e la via delle MAP kinasi.

Attivazione canonica di NF- κ B



Il fattore nucleare- κ B (NF- κ B) rappresenta una famiglia di fattori di trascrizione inducibili che regolano geni coinvolti nella risposta infiammatoria (p50, p52, p65, RelB e c-Rel). Queste proteine formano omo o eterodimeri e generalmente sono presenti in forma inattiva nel citoplasma legati a una famiglia di proteine inibitrici fra cui I κ B α . L'attivazione del complesso IKK (complesso delle chinasi dell'inibitore di κ B) determina la fosforilazione della subunità inibitoria del complesso p65 (RelA) p50 e I κ B α con liberazione del dimero p65p50 che trasloca nel nucleo inducendo la trascrizione di geni codificanti citochine (TNF- α , IL-1 β , IL-6) molecole di adesione (E-selettina, ICAM-1), enzimi (COX-2, INOS).

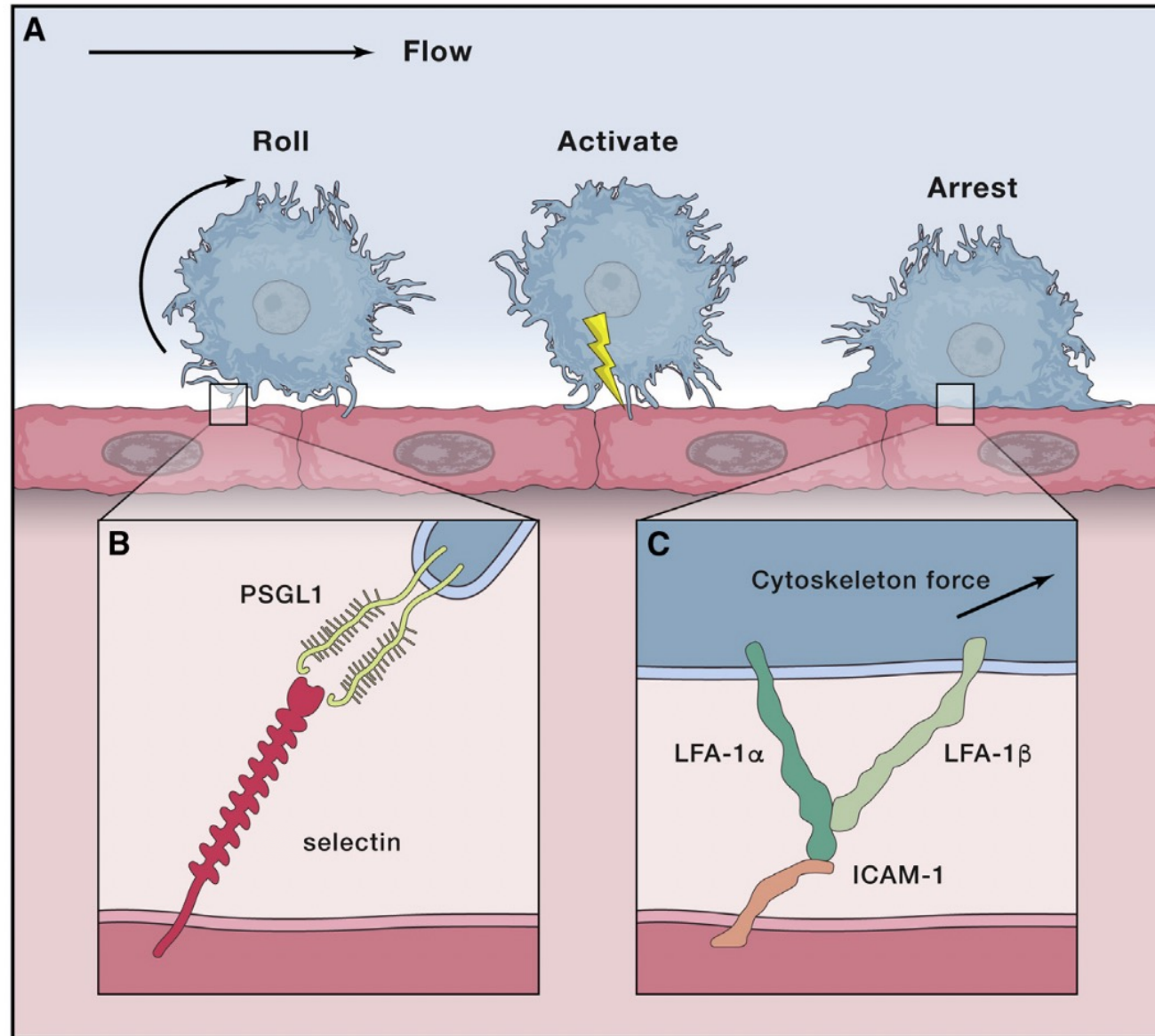
Attivazione canonica di NF- κ B



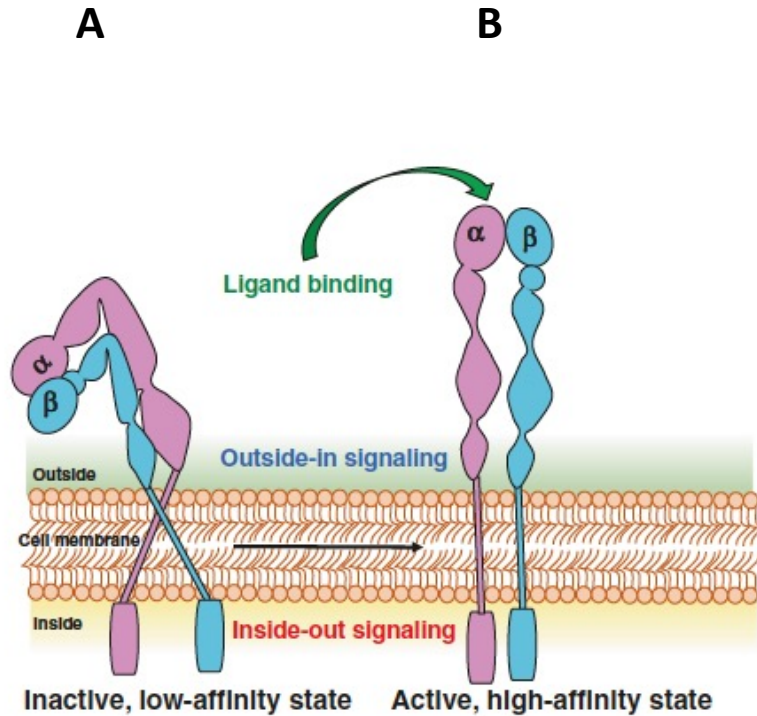
Il complesso IKK è costituito da due subunità catalitiche, le chinasi IKK α e IKK β e da una subunità a funzione regolatoria IKK γ (NEMO).

La fosforilazione dell'inibitore I κ B α in due serine determina la degradazione dell'inibitore da parte del complesso ubiquitina proteosoma con liberazione del dimero p65/p50.

L'adesione forte e l'arresto dei leucociti all'endotelio richiede l'attivazione delle integrine



Attivazione delle integrine

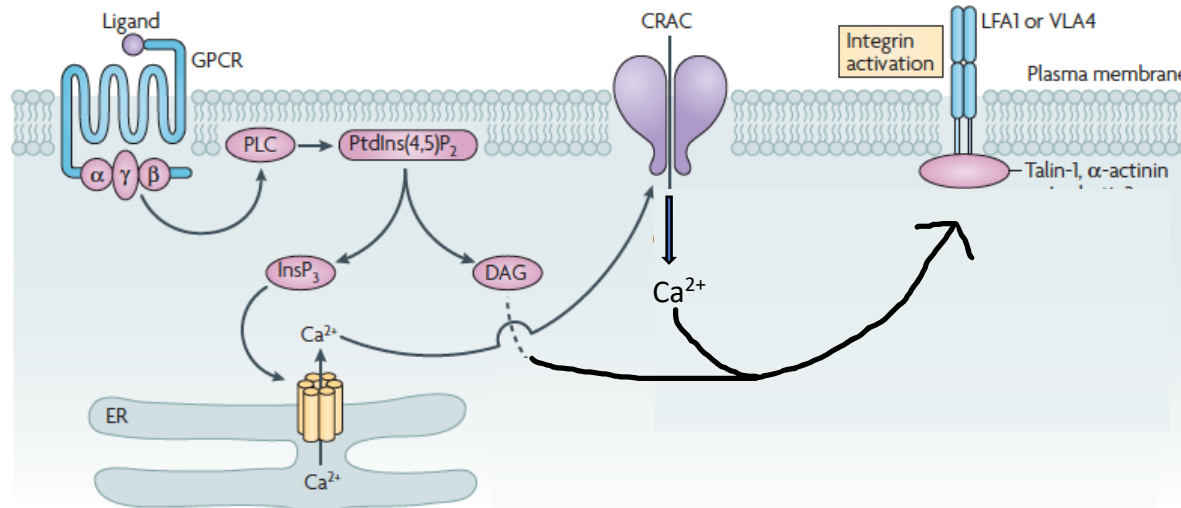
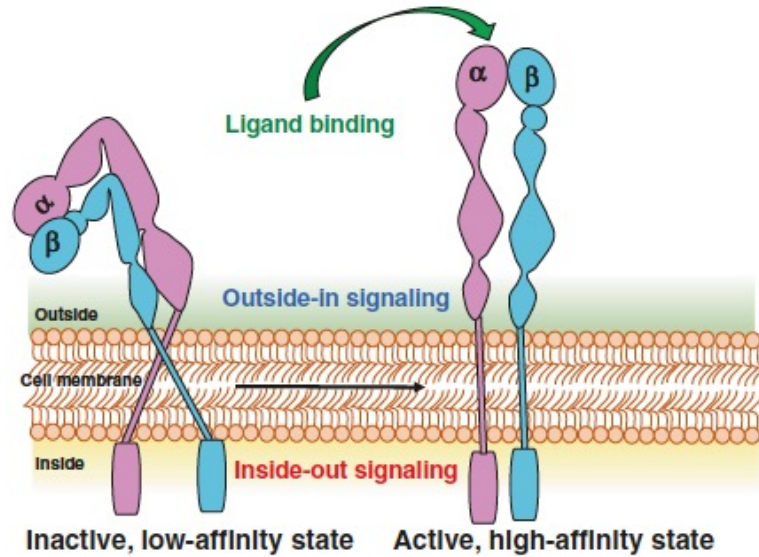


Le integrine nei leucociti non attivati sono presenti in una forma in grado di legare con bassa affinità i loro ligandi (low affinity state).

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.

Durante il processo infiammatorio sono prodotte molecole come le chemochine che, legando i recettori espressi dai leucociti, attivano una cascata di segnalazione intracellulare nel leucocita che culmina con l'aumento dell'affinità dell'integrina per il suo ligando.

Attivazione delle integrine sul leucocita

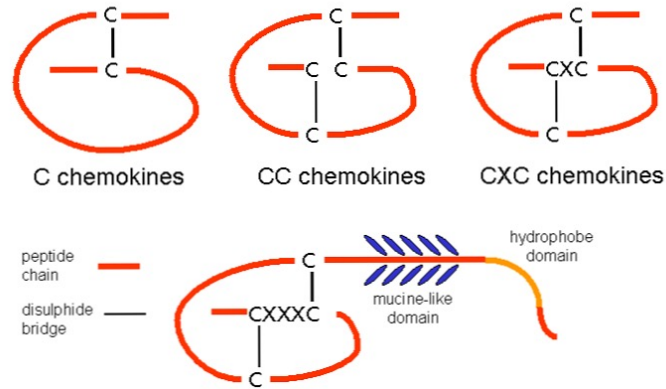


L'interazione delle **chemochine** con il recettore espresso dal leucocita induce un rapido cambiamento di conformazione dell'integrina definito attivazione dell'integrina «inside-out»

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. Sia il DAG, attraverso l'attivazione di altre molecole, che l'aumento di Ca²⁺ favoriscono l'interazione della proteina intracitoplasmatica talina con la regione intracitoplasmatica dell'integrina con conseguente cambiamento conformazionale e aumento della affinità dell'integrina per il suo ligando.

Chemochine e recettori delle chemochine

Structure of chemokine classes



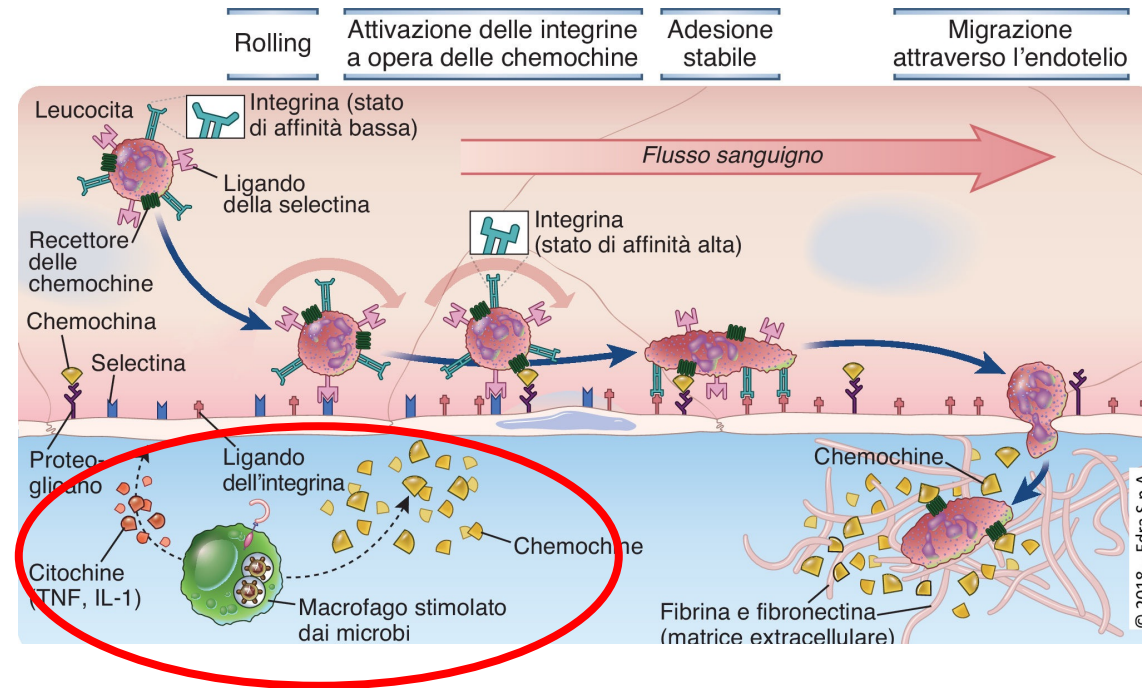
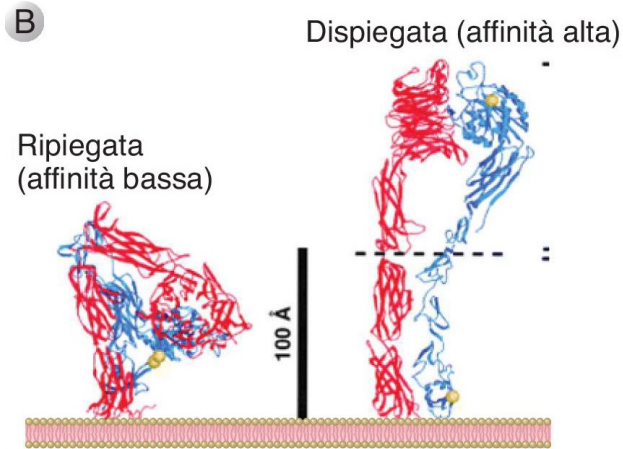
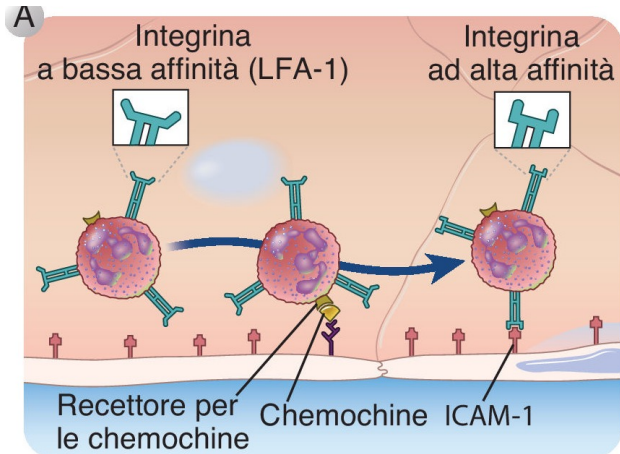
Subfamily	Old nomenclature	New nomenclature	Receptor(s) bound
CXC	GRO- α , KC ^{a,b} , MIP-2 ^{a,b}	CXCL1	CXCR2
	GRO- β	CXCL2	CXCR2
	GRO- γ	CXCL4	CXCR2
	ENA-78	CXCL5	CXCR1, CXCR2
	IL-8; CINC ^b	CXCL8	CXCR1, CXCR2
	Mig	CXCL9	CXCR3
	IP-10; Crg-2 ^b	CXCL10	CXCR3
	I-TAC	CXCL11	CXCR3
	SDF-1	CXCL12	CXCR4
	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
	Lymphotactin- α	XCL1	XCR1
	Lymphotactin- β	XCL2	XCR1
C	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.

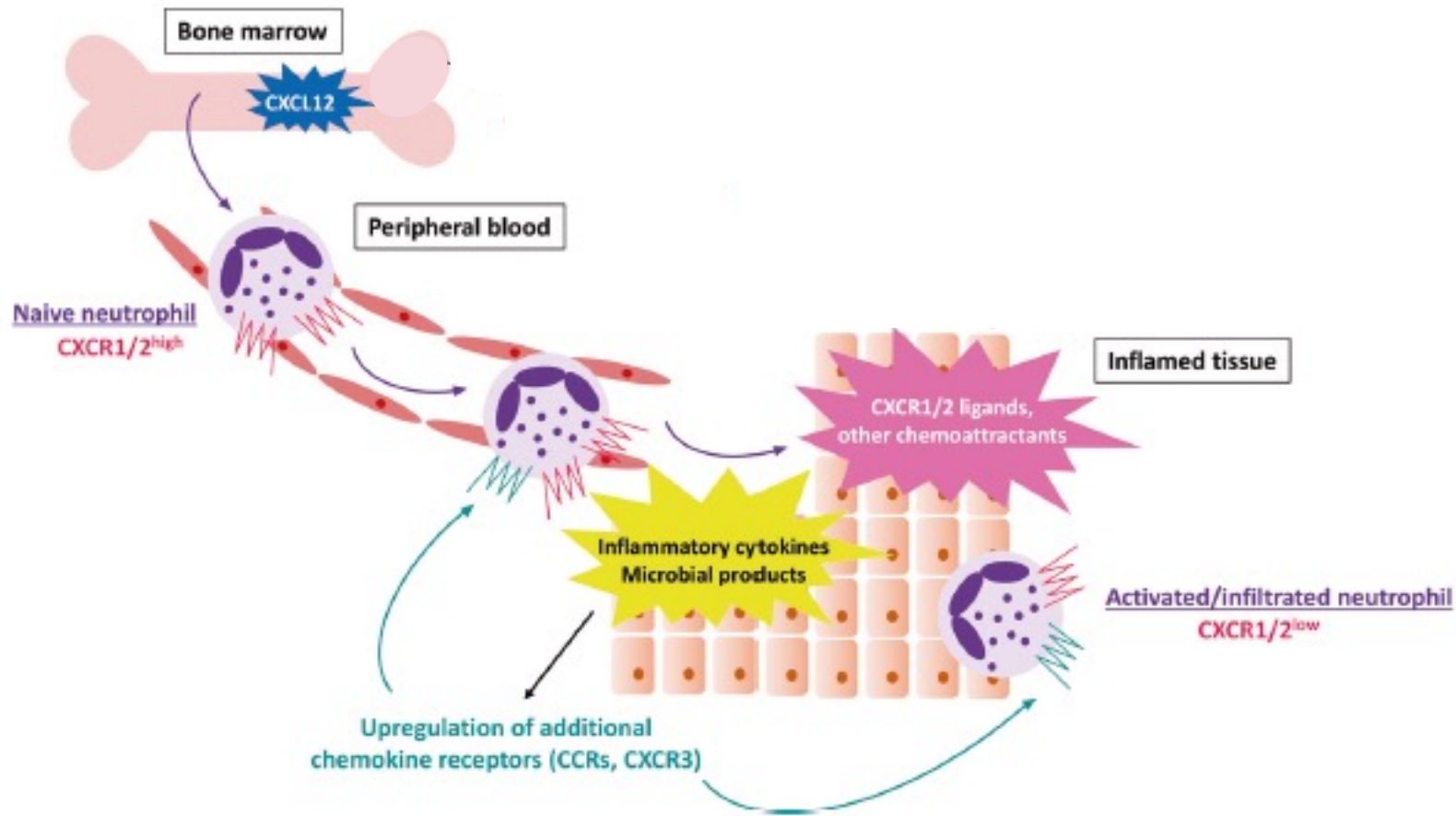
I recettori per le chemochine appartengono alla famiglia dei recettori a sette domini transmembrana accoppiati alle proteine G trimeriche.

I macrofagi attivati producono le chemochine



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.

Chemochine e recettori per le chemochine e neutrofili



I neutrofili esprimono elevati livelli di CXCR1 e CXCR2 che legano l'IL-8 che rappresenta la principale chemochina coinvolta nel traffico dei neutrofili. L'esposizione prolungata alla chemochina induce la down regolazione del recettore.

Le cellule endoteliali espongono le chemochine prodotte nello spazio extracellulare

Tessuto non infiammato

Tessuto infiammato

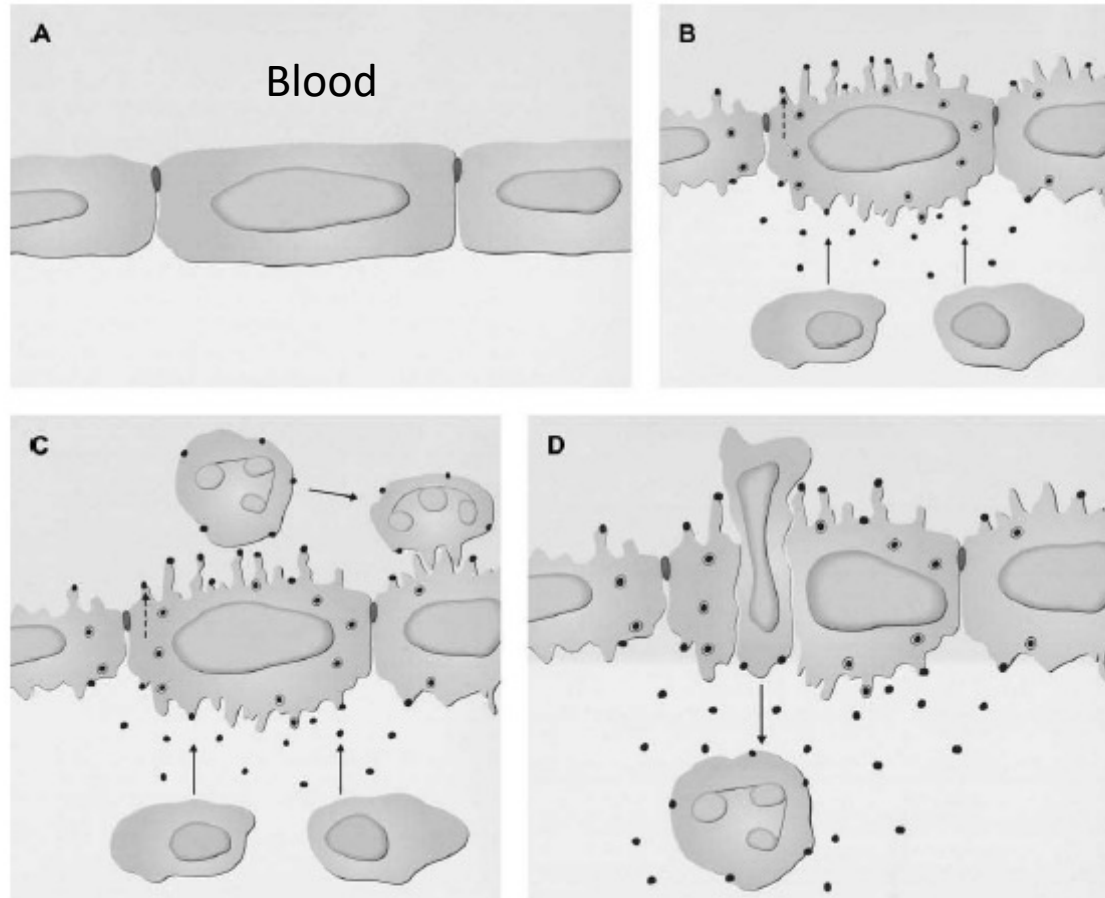
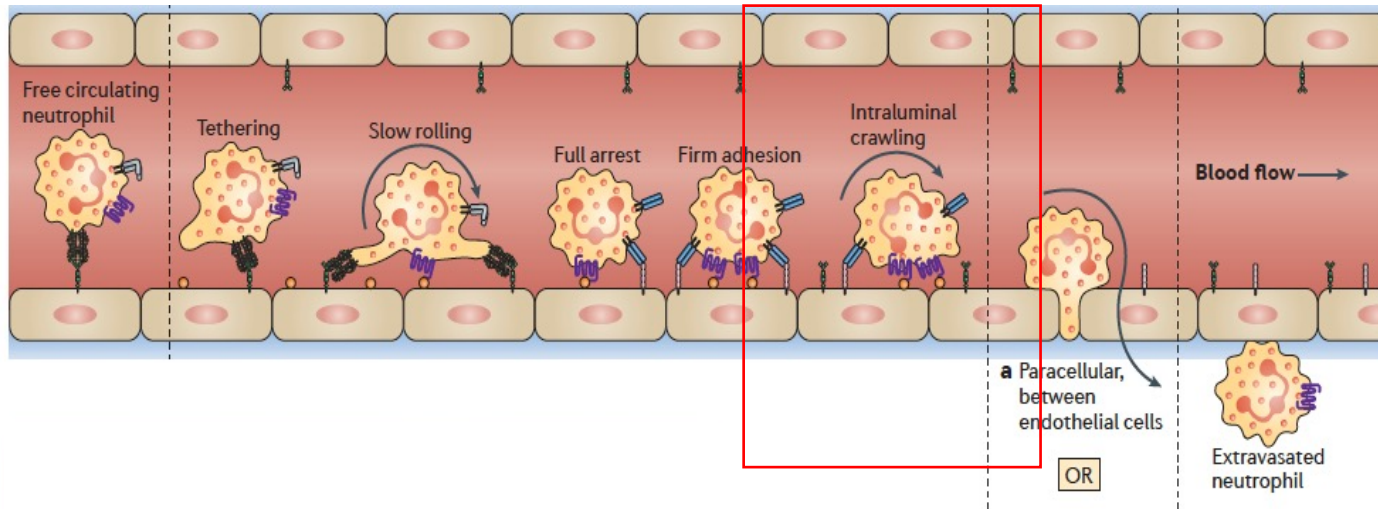


Figure 1. Subcellular events in the endothelium during chemokine-directed leukocyte extravasation. (A) Noninflamed tissue. (B) Inflamed tissue. Release of chemokines from extravascular cells in the tissue occurs (→), and there is wrinkling of the endothelial cell surface. Chemokines are taken up at the 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.

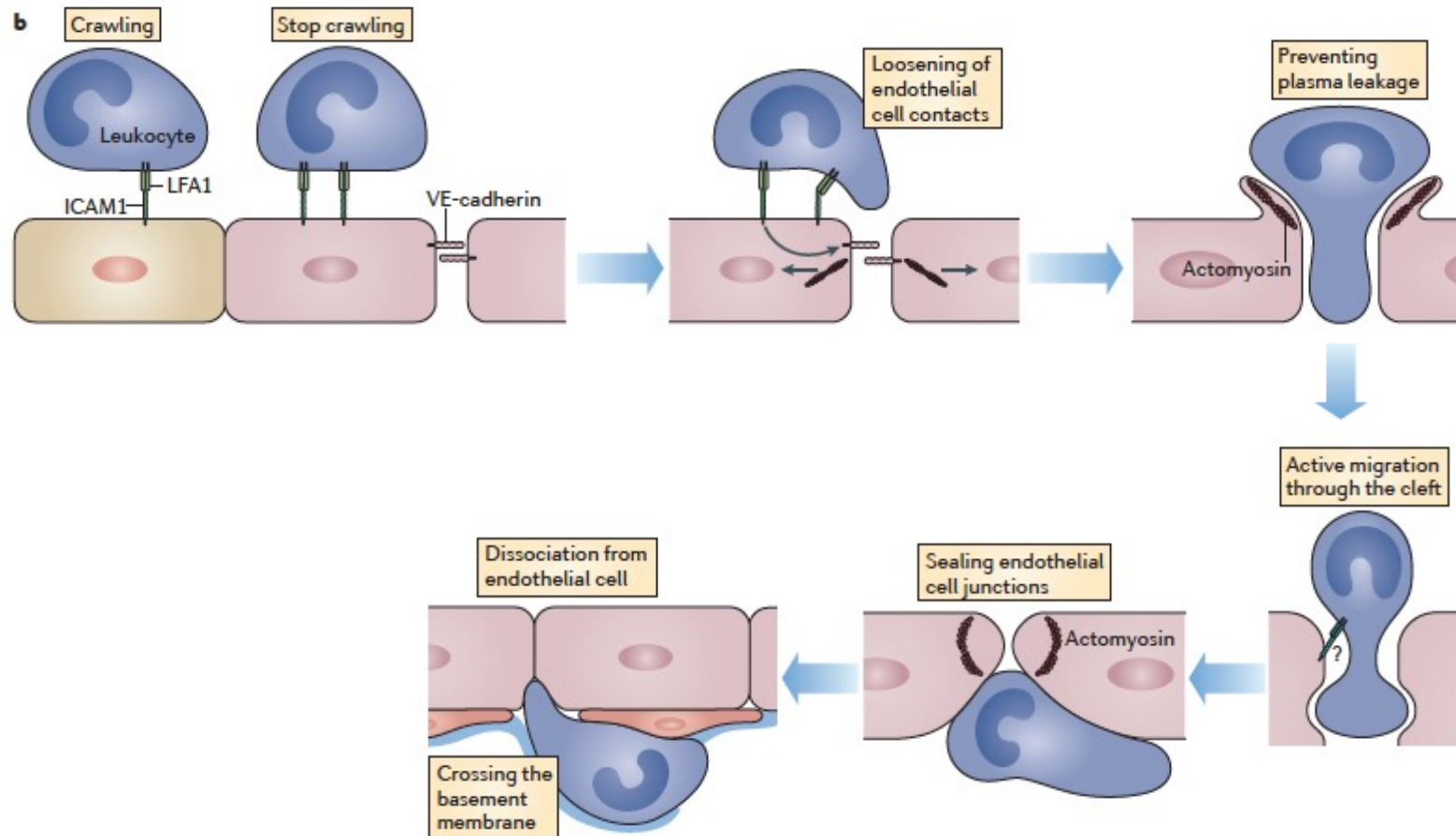
Anche le cellule endoteliali possono produrre chemochine.

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

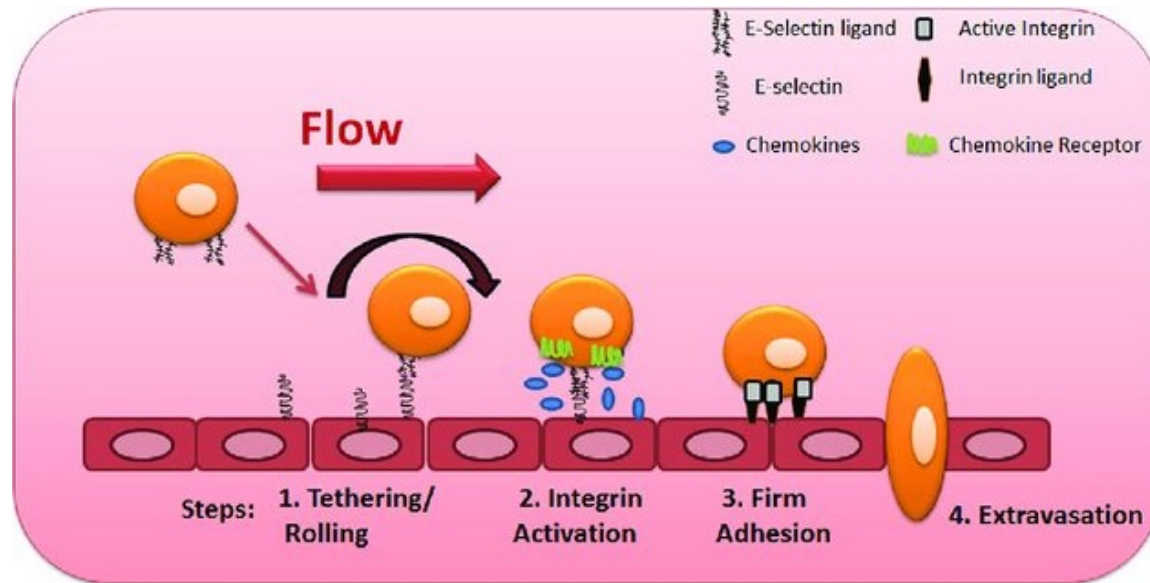
Migrazione dei leucociti nel tessuto



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.

Molecole e mediatori coinvolti nella extravasazione dei leucociti



- il $\text{TNF-}\alpha$ e l' $\text{IL-1}\beta$ prodotte dalle cellule sentinella (macrofagi, cellule dendritiche) attivano l'endotelio
- le chemochine prodotte dalle cellule sentinella e dall'endotelio attivano le integrine

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 ($\text{TNF}\alpha$, 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 ($\text{TNF}\alpha$, 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)

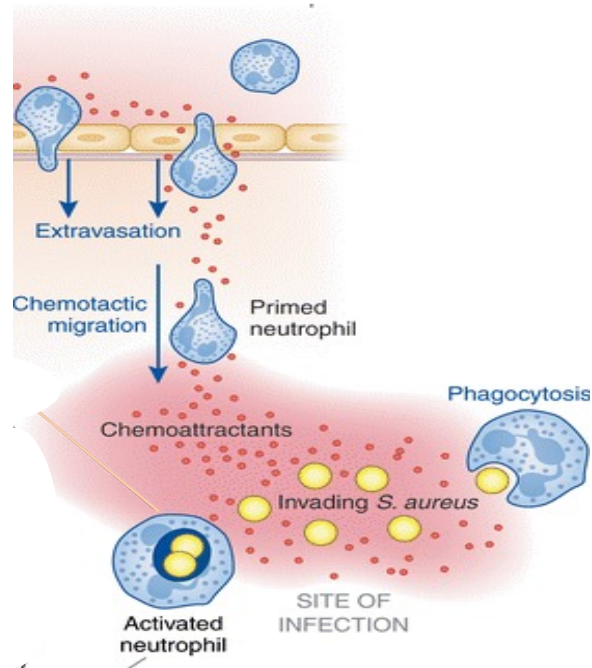
Chemiotassi

Nel tessuto infetto i leucociti seguono i fattori di richiamo prodotti dalle cellule dell'ospite o di origine batterica (fMLP).

Dopo l'extravasazione i leucociti si muovono verso i siti di infezione o di danno lungo un gradiente chimico. La chemiotassi è il movimento di una cellula verso una sostanza chimica.

I fattori chemotattici per i leucociti possono essere :

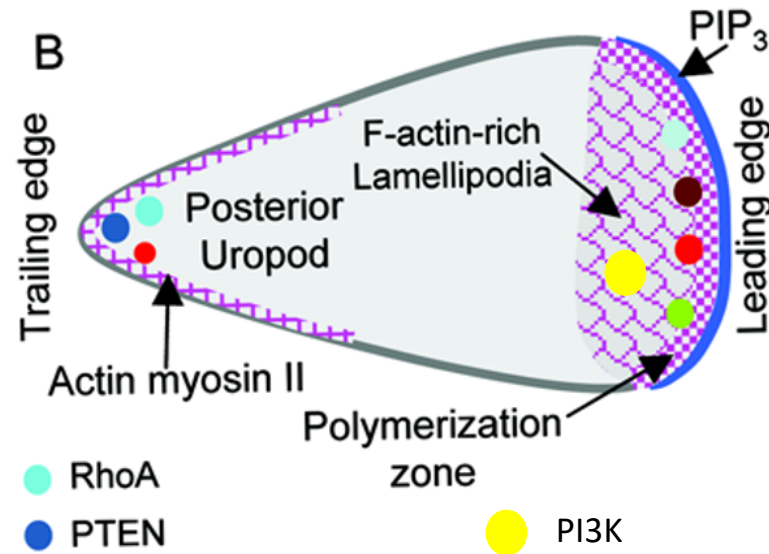
- Chemochine
- Prodotti batterici (peptidi con N-formil metionina)
- Leucotriene B4
- Componenti del sistema del complemento (C5a)



Tutti questi fattori agiscono legandosi a recettori che presentano 7 regioni transmembrana e sono accoppiati alle proteine G (GPCR).

Le molecole chemiotattiche dopo aver legato i recettori cellulari inducono l'assemblaggio di elementi contrattili del citoscheletro necessari per il movimento. I leucociti si muovono estendendo pseudopodi che si ancorano alla matrice extracellulare trainando la cellula nella direzione dell'estensione.

Chemiotassi



Il movimento della cellula si accompagna ad un cambiamento della forma cellulare in cui si distingue un fronte anteriore (leading edge) e una regione posteriore (trailing edge). Il fronte anteriore ricco in lamellipodi è caratterizzato dalla costante generazione di reti di F-actina che spingono il movimento della cellula in avanti.

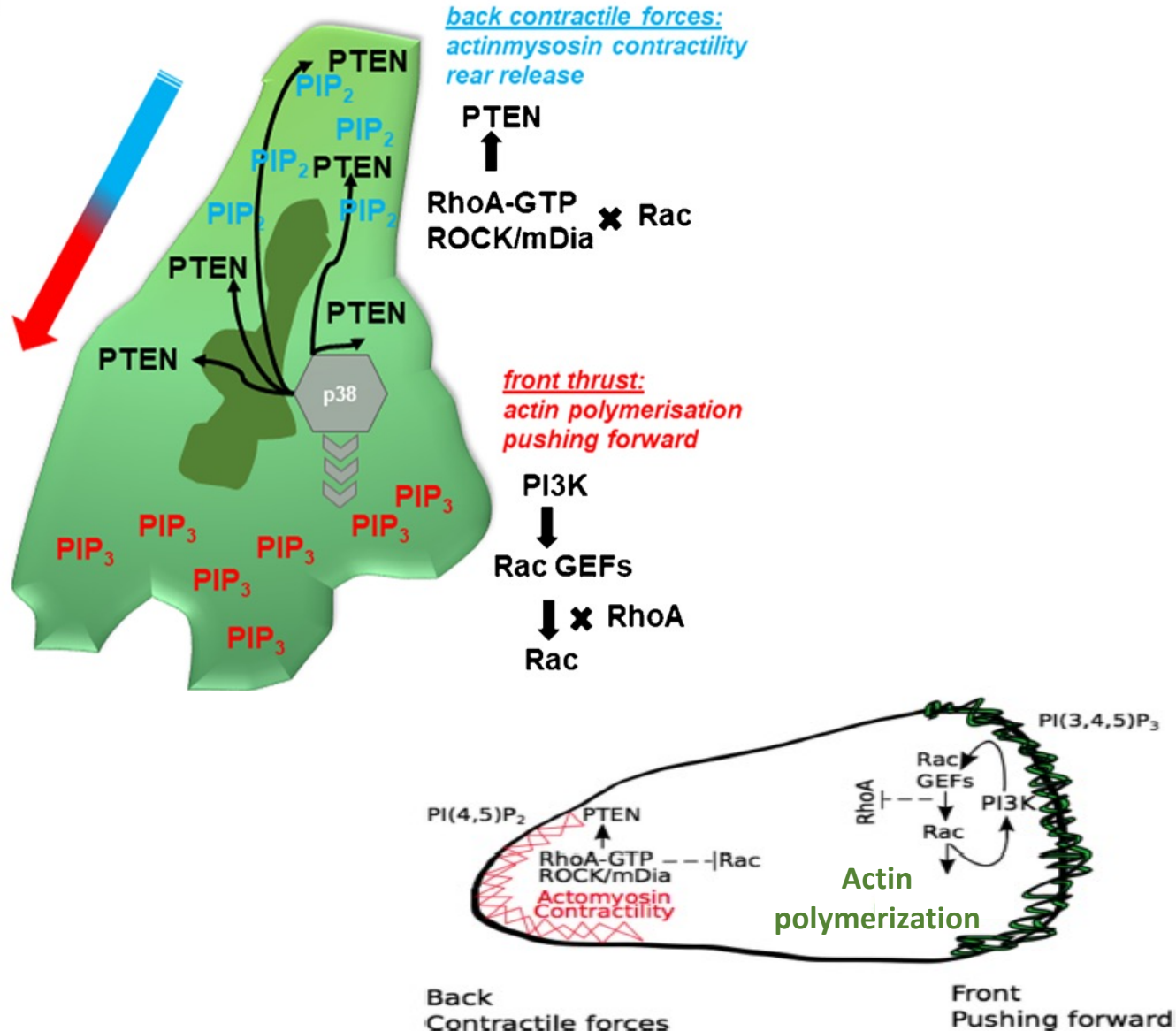
Nella regione posteriore l'adesione della cellula al substrato è dissolta permettendo la traslocazione della cellula.

La produzione di fosfatidil inositolo trifosfato (PIP₃) nel fronte anteriore della cellula è un evento precoce nella chemiotassi dei leucociti. Mentre la fosfatasi PTEN che defosforila il PIP₃ si localizza preferenzialmente nella regione posteriore della cellula.

Chemiotassi

b

polarized neutrophil during chemotaxis/migration



I segnali generati dall'interazione fra fattore chemiotattico e recettore, danno luogo al reclutamento di proteine G e alla successiva attivazione di molecole effettrici quali la fosfoinositolo-3-chinasi (PI3K) che genera fosfatidil inositolo-trifosfato (PIP₃). Questo determina l'attivazione di piccole GTPasi che inducono la polimerizzazione dell'actina sul margine avanzante della cellula mentre nella zona posteriore si ha il distacco dal substrato.

Fagocitosi

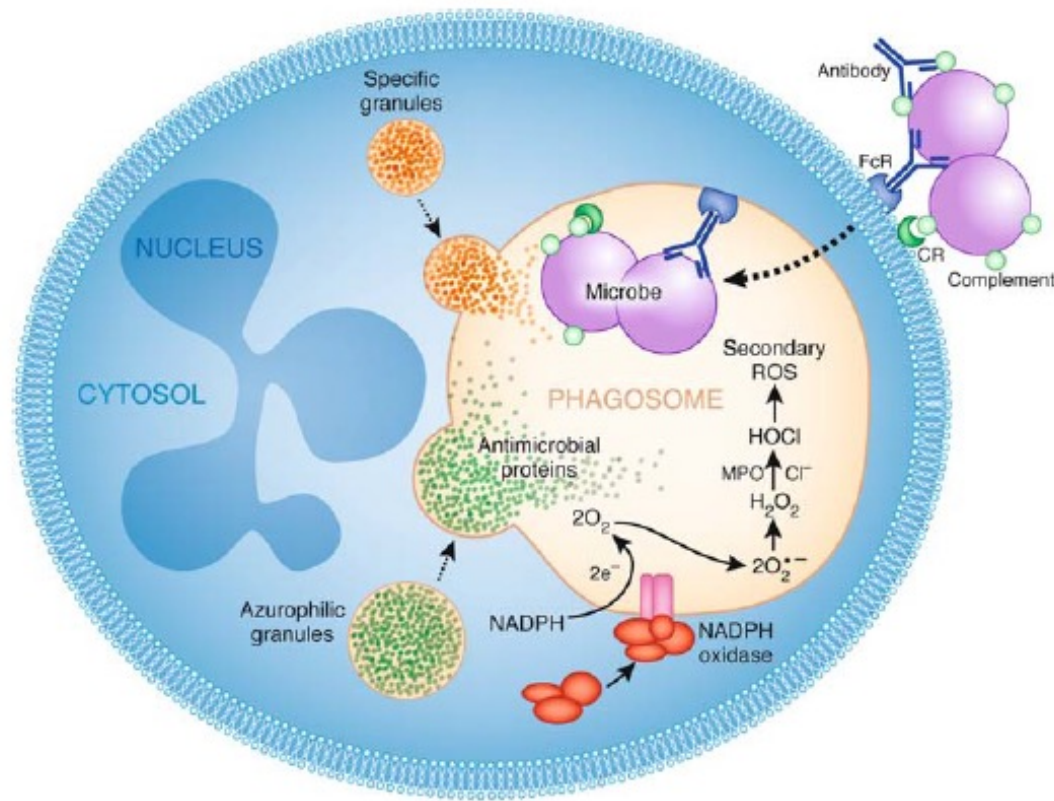


Fig. 1 Neutrophil phagocytosis and microbicidal activity. Following phagocytosis, microbes are destroyed by ROS and antimicrobial proteins released from granules. See text for details. FcR, Fc receptor; CR, complement receptor; MPO, myeloperoxidase

L'accumulo dei leucociti nella sede di infiammazione è responsabile della eliminazione degli agenti lesivi.

Questo avviene attraverso la fagocitosi degli agenti estranei da parte dei neutrofili e dei macrofagi.

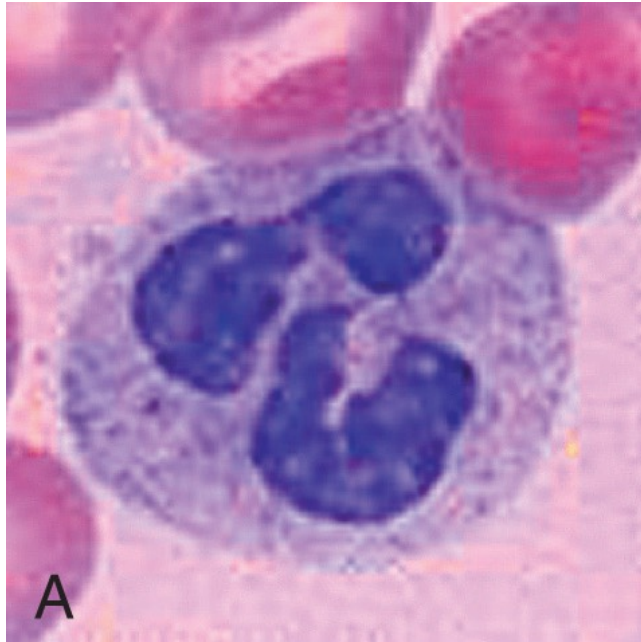
La fagocitosi comporta tre fasi distinte:

- i) Riconoscimento e adesione alla particella da eliminare
- ii) Ingestione
- iii) Uccisione e degradazione del patogeno

I neutrofili

I neutrofili sono la popolazione cellulare più abbondante nel sangue (60-70% dei leucociti) e sono le prime cellule ad essere reclutate durante la risposta infiammatoria.

La principale funzione dei neutrofili è di inglobare e distruggere le sostanze estranee.



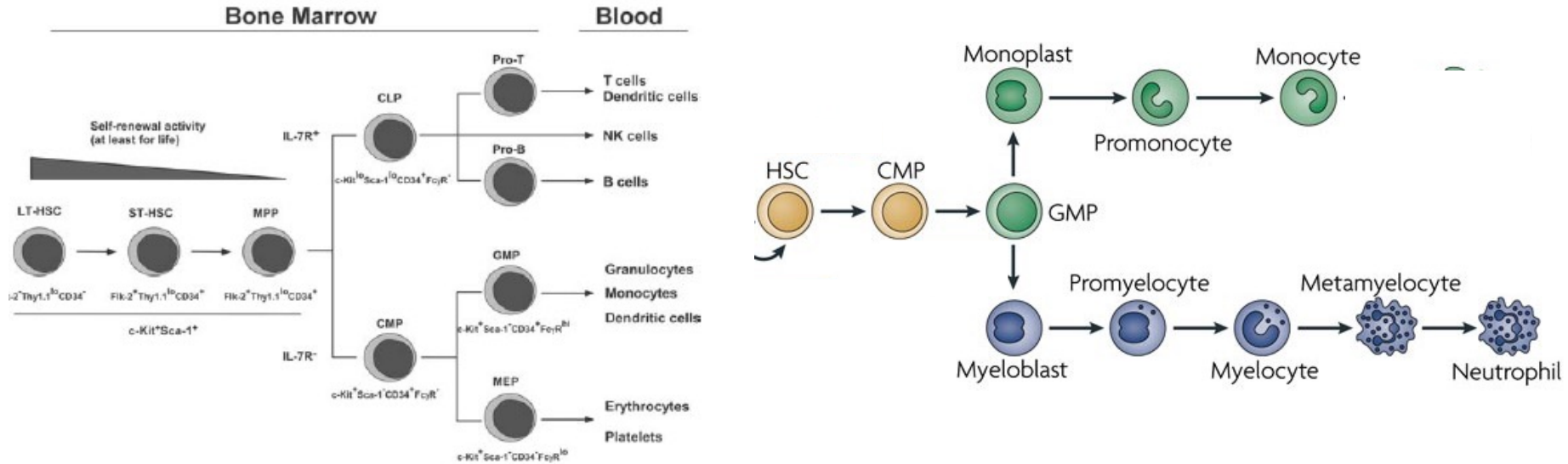
Queste cellule sono state descritte per la prima volta da E. Metchnikoff che in esperimenti in cui inseriva spine di rosa nelle larve di stella di mare dimostrò che i fagociti migrano nei siti offesi e partecipano alla digestione dei microrganismi. Identificò due tipi di cellule i macrofagi e i microfagi corrispondenti ai neutrofili.

Il nucleo lobulato caratteristico dei neutrofili ispirò il nome di polimorfonucleati a Metchnikoff. Con gli eosinofili e i basofili i neutrofili appartengono alla famiglia dei granulociti caratterizzati dalla presenza nel citoplasma di granuli in cui sono accumulate molecole ad azione antimicrobica.

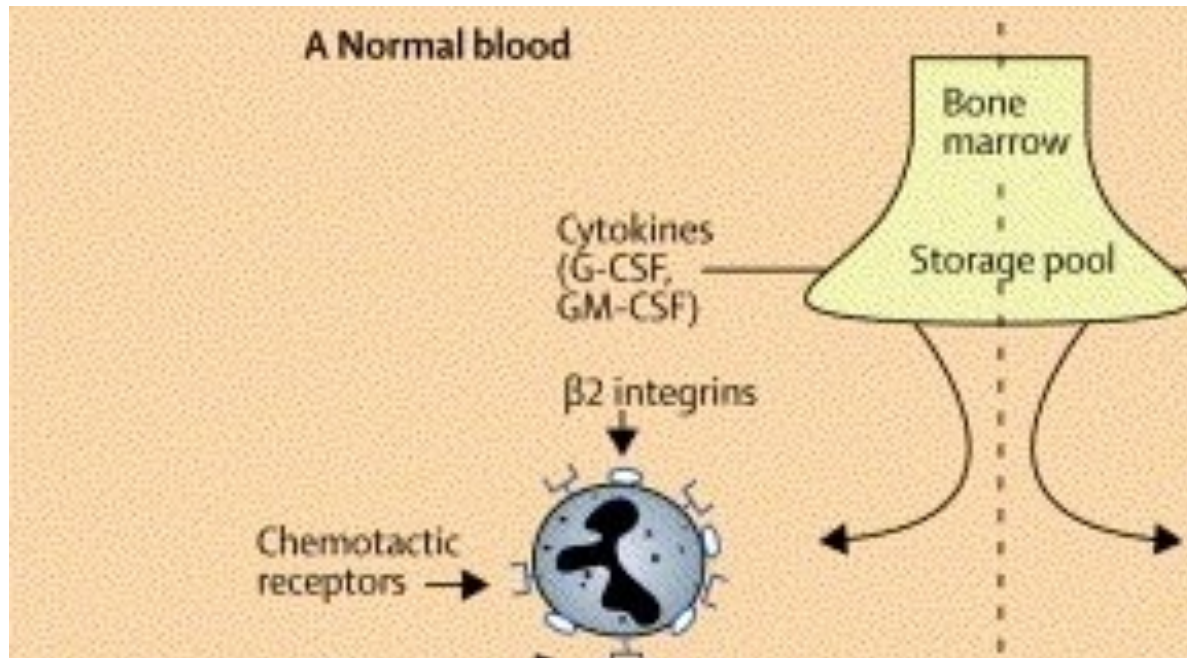
L'importanza di queste cellule nella difesa dell'organismo è dimostrata da diverse evidenze quali l'aumento di infezioni da parte di batteri e funghi in pazienti con neutropenia.

Origine dei neutrofili

I neutrofili sono cellule a vita breve che derivano dalle cellule staminali totipotenti. I neutrofili maturano nel midollo dove circa il 60% delle cellule totali è rappresentata da precursori dei granulociti.

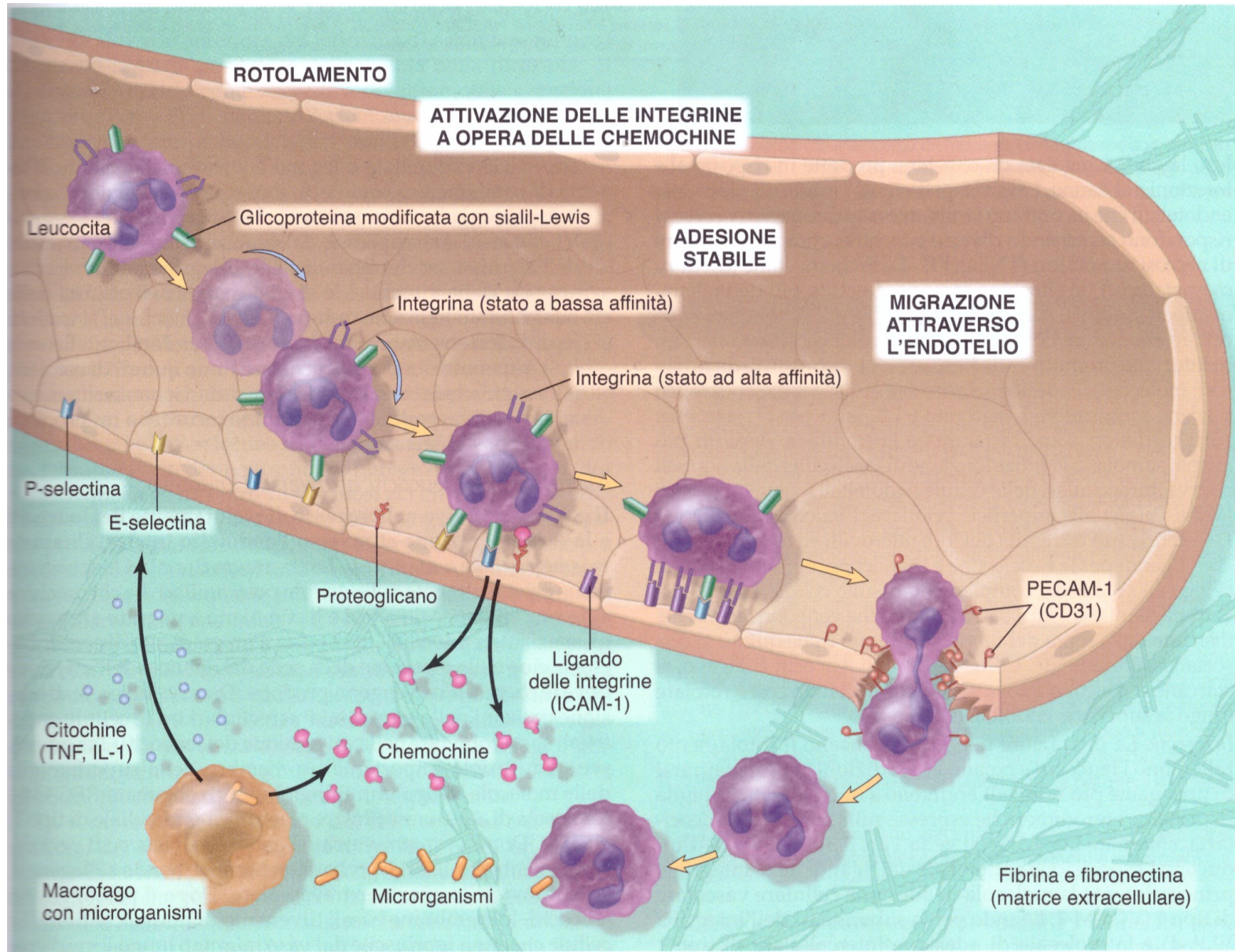


Caratteristiche dei neutrofili



I neutrofili sono rilasciati dal midollo osseo nel circolo sanguigno dove circolano per 6-8h. In presenza di un segnale infiammatorio i neutrofili sono richiamati nel tessuto infiammato.

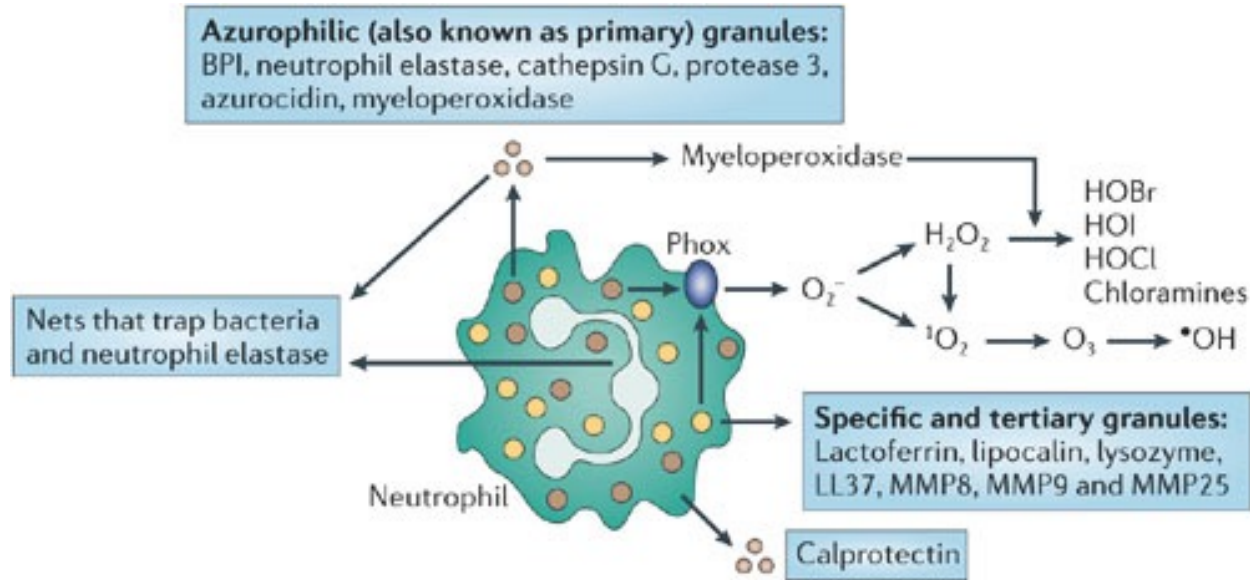
Reclutamento dei leucociti nelle sedi dove è presente lo stimolo lesivo



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

Caratteristiche dei neutrofili



Copyright © 2006 Nature Publishing Group
Nature Reviews | Immunology

Le diverse molecole ad azione antimicrobica sono mantenute all'interno dei granulociti nei granuli. Nei neutrofili si distinguono tre tipi di granuli:

Granuli azzurrofilici/primari: Mieloperoxidasi, proteasi, elastasi
Granuli specifici: lattoferrina, lisozima
Granuli terziari metalloproteasi.

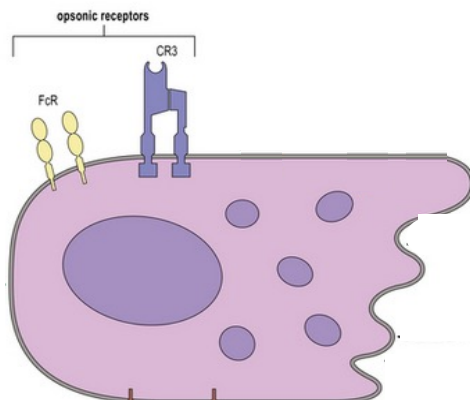
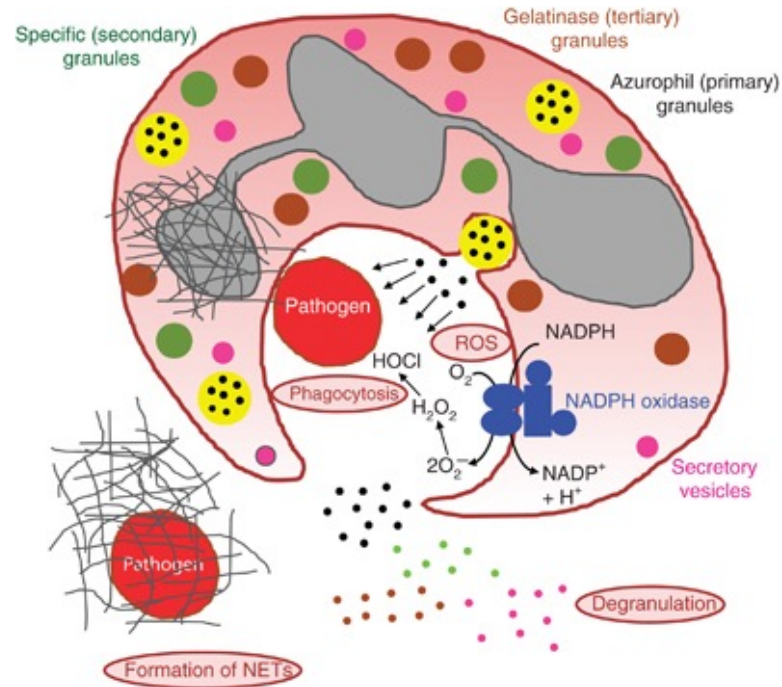
I granuli sono formati dalla fusione di vescicole che gemmano dal Golgi. Sono inoltre presenti delle vescicole secretorie che derivano dalla membrana plasmatica e che sono ricche in integrine e subunità p91 e p22 della NADPH ossidasi, recettori per il C3b del complemento e per l'Fc delle immunoglobuline.

Meccanismi di azione delle proteine antimicrobiche dei neutrofili

Table 1 Mechanism of action of neutrophil antimicrobial proteins

Antimicrobial peptide	Antimicrobial mechanism ^a
Cationic antimicrobial peptides	
α -defensins (HNP-1, HNP-2, HNP-3, HNP-4)	■ Permeabilize membrane bilayers containing negatively charged phospholipids ■ Inhibit DNA, RNA as well as protein biosynthesis ■ Inhibition of bacterial cell wall synthesis
LL-37	Transmembrane pore-forming
BPI	Increase bacterial permeability and hydrolysis of bacterial phospholipids by binding to LPS
Histones	Unknown mechanism
Proteolytic enzymes	
Lysozyme	Degrades bacterial cell wall
Proteinase 3 (PR3)	Mechanism independent of a proteolytic activity by binding to the bacterial membrane
Neutrophil elastase (NE), cathepsin G (CG)	■ Cleaves bacterial virulence factors and outer membrane proteins ■ Mechanism independent of a proteolytic activity by binding to the bacterial membrane
Azurocidin	Mechanism independent of a proteolytic activity by binding to the bacterial membrane
Metal chelator proteins	
Lactoferrin	■ Alters bacterial growth by binding to iron, an essential bacterial nutrient ■ Binds to the lipid A part of LPS, causing a release of LPS from the cell wall and an increase in membrane permeability
Calprotectin	Alters bacterial growth by sequestering manganese and zinc

Fagocitosi dei neutrofili



Nel sito infiammato i neutrofili fagocitano l'agente lesivo e questo processo prevede

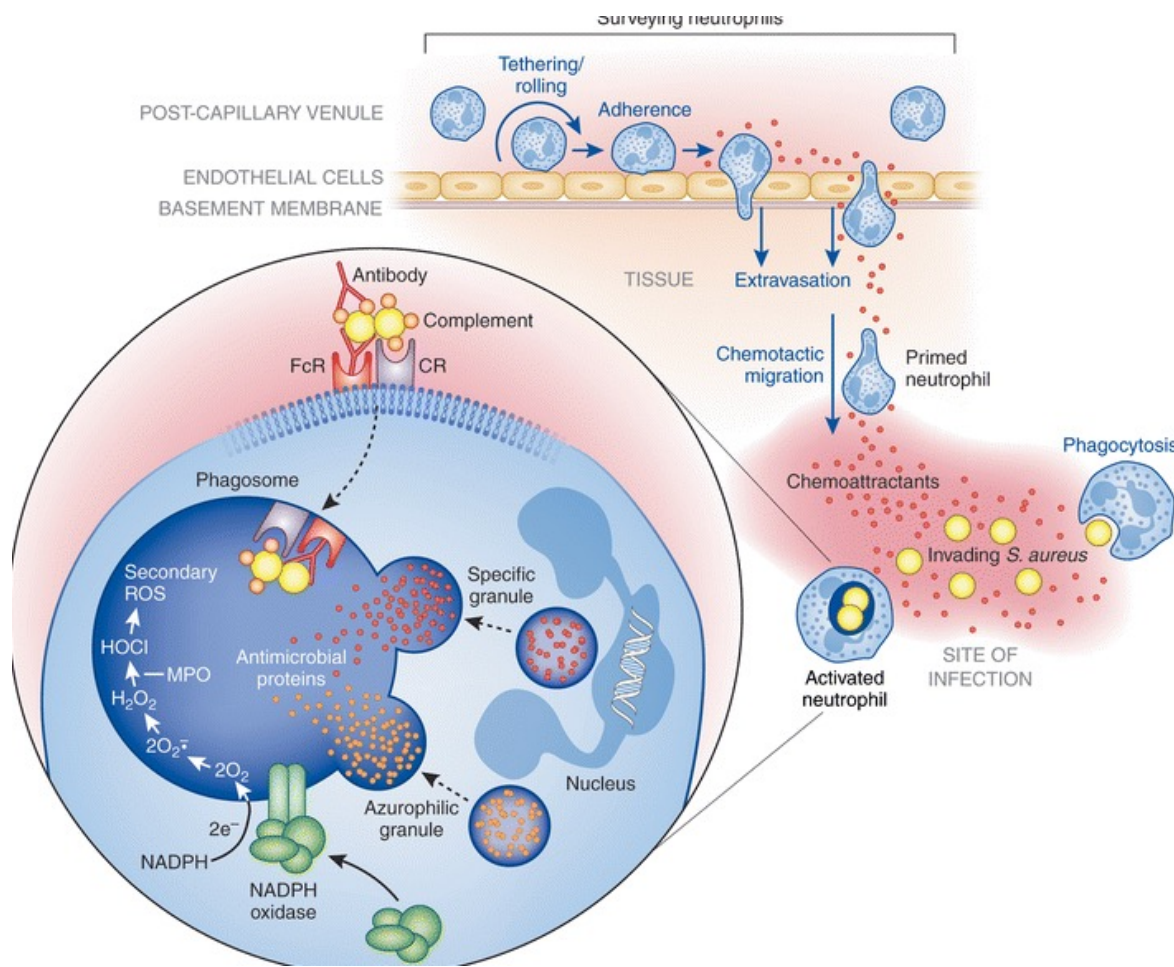
- i) Riconoscimento e adesione alla particella da eliminare
- ii) Ingestione
- iii) Uccisione e degradazione del patogeno

L'internalizzazione dei patogeni da parte dei neutrofili può essere mediata da recettori specifici (dectin che riconosce β -glucani sui funghi) o recettori per le opsonine (C3b, IgG, CR1, Fc γ R).

La captazione dei patogeni e degli antigeni può essere facilitata dalle opsonine. Le opsonine sono fattori dell'ospite come le immunoglobuline e fattori del complemento che si legano alla superficie del patogeno e che sono riconosciuti da recettori espressi dai fagociti. CR1, CR3 recettori del frammento C3b e C3bi del complemento, CD64 recettore ad alta affinità per le IgG.

Il fagosoma dei neutrofili ha un pH alcalino e viene caricato di molecole antimicrobiche in seguito alla fusione con i granuli.

Maturazione del fagosoma



Dopo la captazione del patogeno nel fagosoma questo va incontro alla maturazione attraverso la fusione con i granuli. Questo permette il rilascio di effettori tossici che direttamente o indirettamente uccidono i microbi.

Queste includono:

Specie reattive dell'ossigeno, proteasi, peptidi cationici, proteine che privano i microrganismi di nutrienti essenziali.

Meccanismi di uccisione dei neutrofili

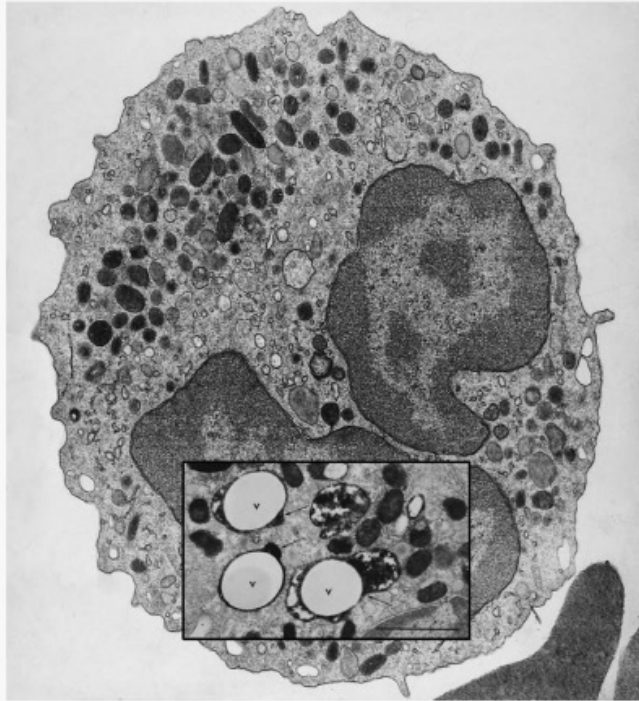
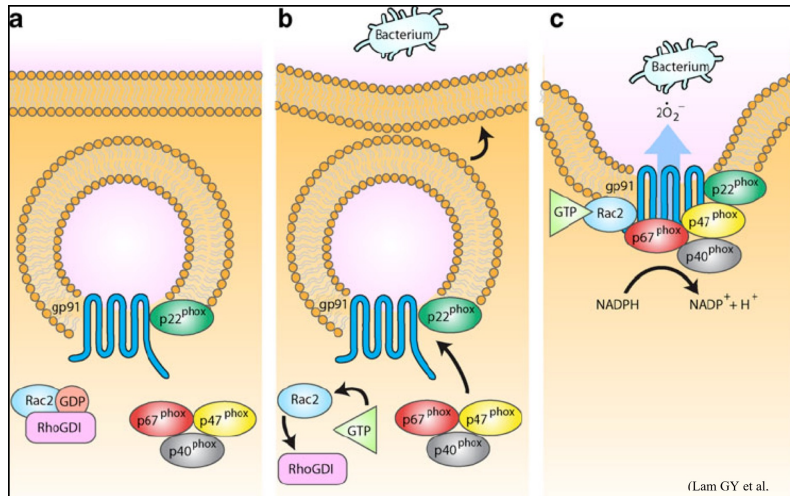


Figure 1. Transmission electron micrograph of a human neutrophil. Inset is an image taken from a neutrophil 20 s after the phagocytosis of latex particles opsonized with IgG (V, vacuole). The section was stained for myeloperoxidase (MPO) to reveal the electron-dense product in the azurophilic granules, some of which can be seen degranulating into the phagocytic vacuole (arrows). Bar = 1 μ m. (Figure from 17.)

I neutrofili utilizzano diversi meccanismi per eliminare gli agenti infettivi nel fagosoma:

- Produzione delle specie reattive dell'ossigeno
- Rilascio dei peptidi e degli enzimi all'interno del fagosoma
- Esocitosi dei granuli all'esterno della cellula
- Netosis

I ROS generati dalla NADPH ossidasi sono tossici per i patogeni



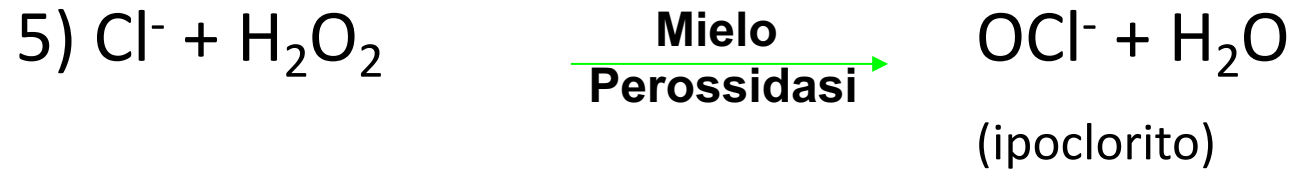
L'NADPH ossidasi media la generazione delle specie reattive dell'ossigeno. L'NADPH ossidasi converte NADPH a NADP⁺ liberando elettroni che all'interno del fagosoma reagiranno con l'O₂ generando ioni superossido. Questa reazione nei neutrofili prende il nome di esplosione respiratoria (respiratory burst).

NOX2 è un complesso multiproteico composto da due proteine di membrana gp91phox and gp22phox e 4 subunità citoplasmatiche: p40phox, p47phox, p67phox, e la piccola GTPase Rac2. In seguito ad attivazione dei neutrofili p47 fosforilato si associa a p22 mediando l'assemblaggio del complesso.

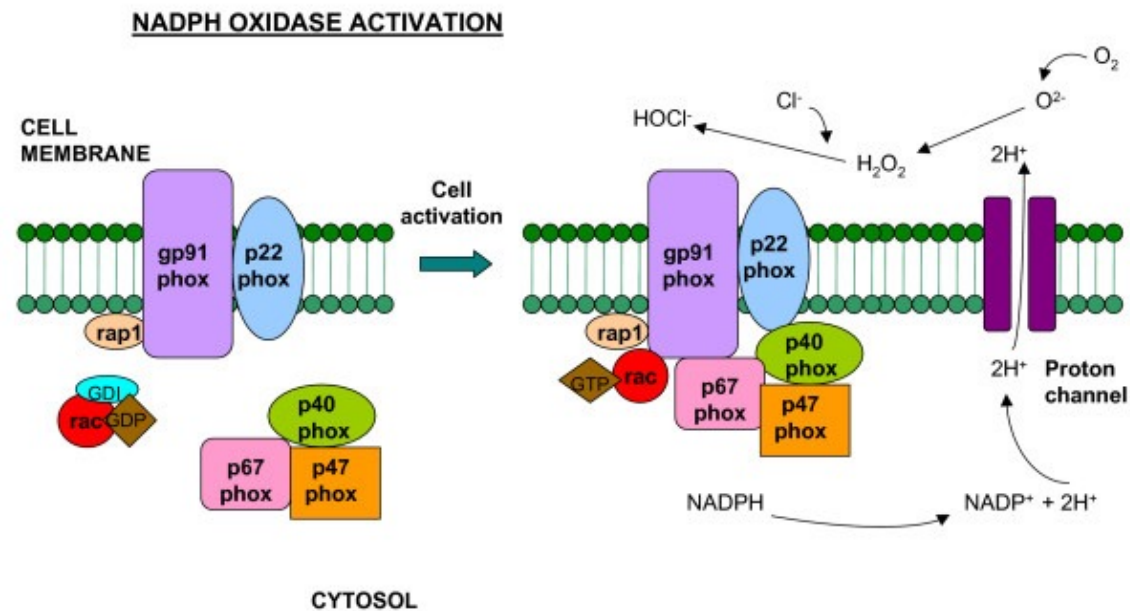
L'attivazione del complesso richiede il reclutamento di RacGTP alla membrana.

Gp91phox e gp22phox nei neutrofili sono localizzate nelle membrane dei granuli e sulla membrana plasmatica.

ESPLOSIONE RESPIRATORIA

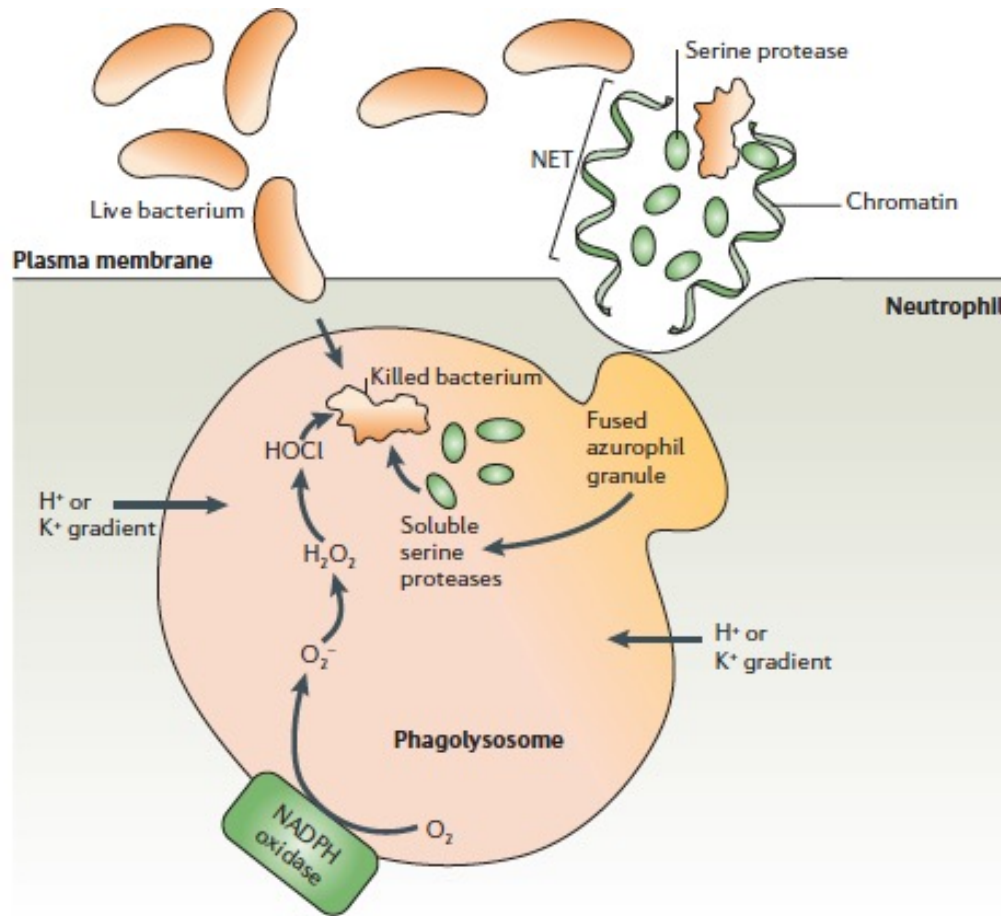


La mieloperossidasi media la produzione di acido ipocloroso (HOCl) nei neutrofili



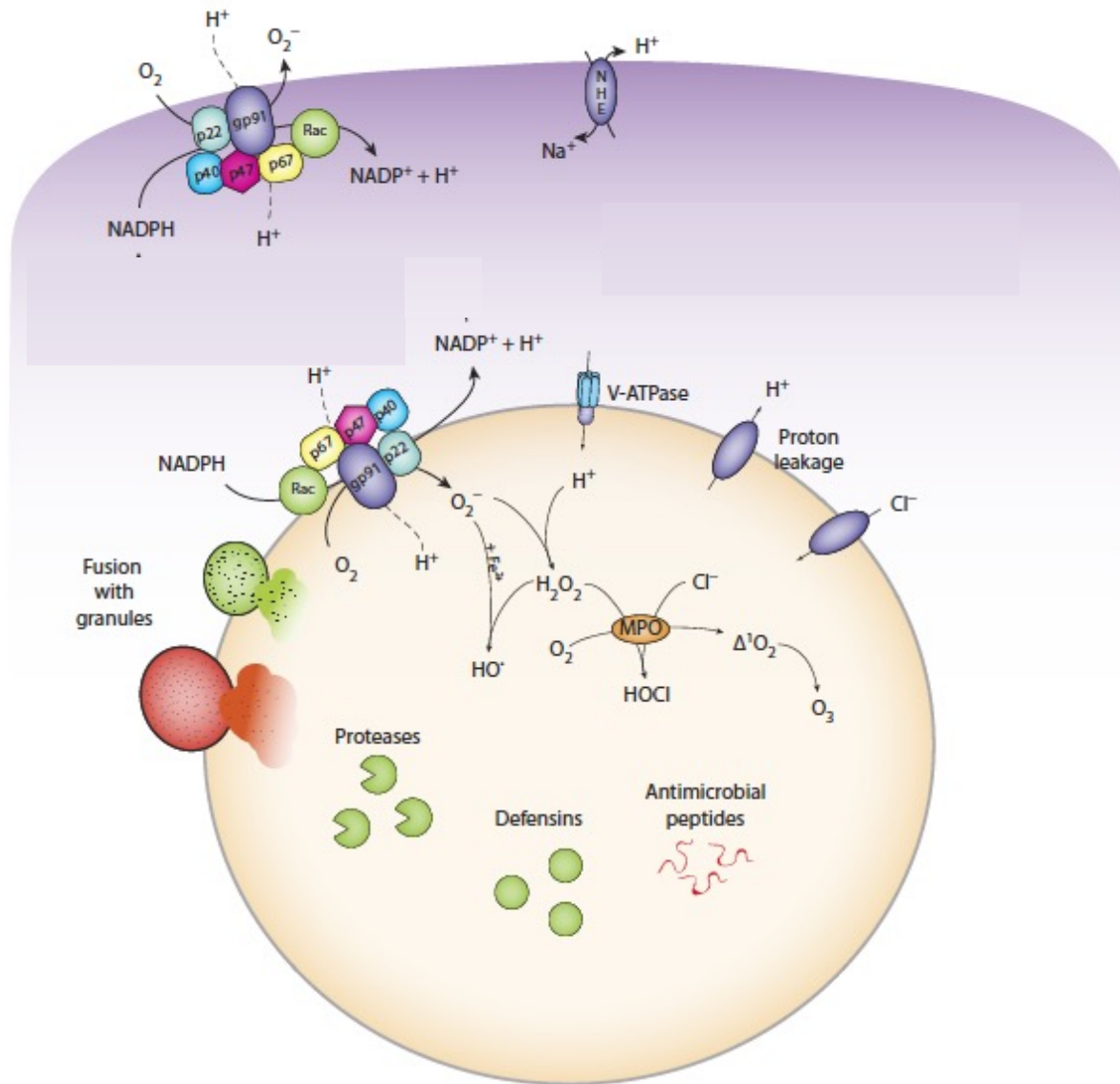
La mieloperossidasi utilizza $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Cl}^-$ per generare acidi ipoalogenati (acido ipocloroso)

Maturazione del fagosoma nei neutrofili



La fusione con i granuli specifici è necessaria per la generazione delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) all'interno del fagosoma infatti nelle membrane dei granuli sono presenti le componenti gp91phox/p22phox dell'NADPH ossidasi.

Le proteasi contribuiscono all'uccisione dei patogeni da parte dei neutrofili



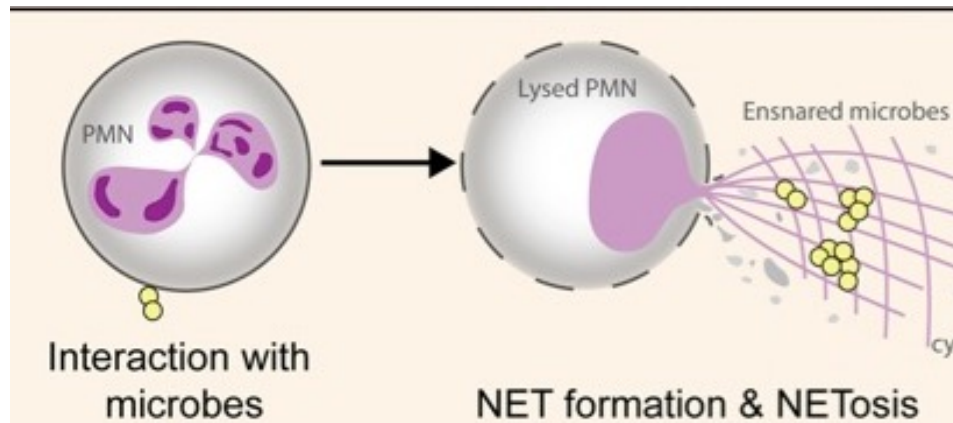
Una combinazione di ROS e proteasi è necessaria per eliminare i patogeni.

I topi deficienti nella elastasi dei neutrofili (NE) sono suscettibili alle infezioni da parte di batteri gram negativi (*Klebsiella pneumoniae*, *E. coli*) e da parte di *C. albicans*.

Difetti di NE e catepsina G rendono i topi suscettibili ad infezioni da parte di diversi microrganismi.

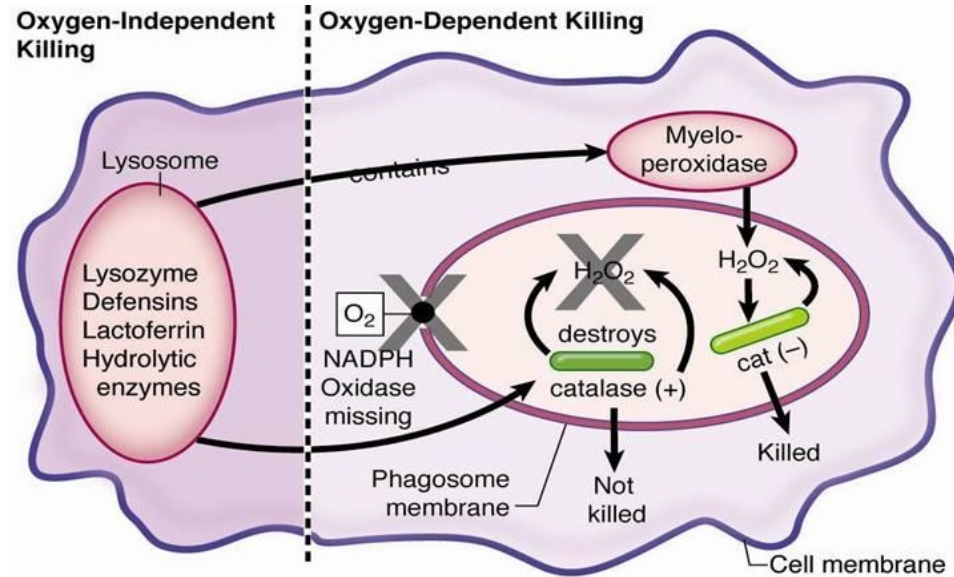
Neutrophil extracellular Traps

I neutrofili estendono la loro attività microbica anche nel processo di morte. Questi infatti vanno incontro a NETosis, una forma attiva di morte in cui i nuclei si rigonfiano e rilasciano la cromatina decondensata. I Net sono una struttura fibrosa costituita da istoni, proteine antimicrobiche (defensine, elastasi, proteasi catipsine...) e proteine citoplasmatiche.



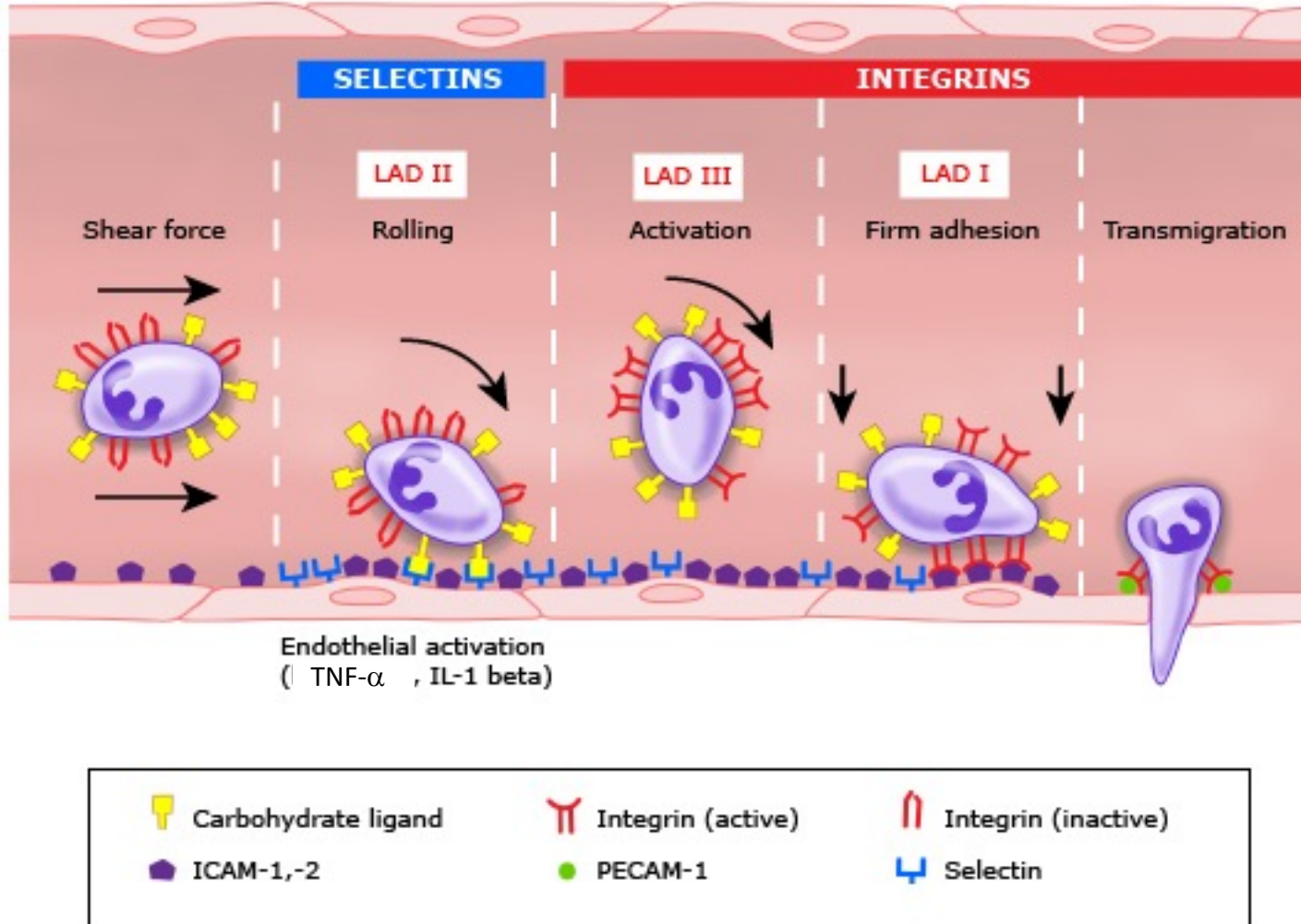
I Net intrappolano i microrganismi e si pensa ne medino l'uccisione esponendoli ad alte concentrazioni di molecole antimicrobiche.

Difetti nel burst ossidativo sono responsabili del Chronic granulomatous disease



Il CGD è una malattia genetica rara dovuta prevalentemente a difetti dei neutrofili. Questa malattia è causata da mutazioni in uno dei geni che codificano le componenti dell'ossidasi fagocitica. Può avere una trasmissione legata al cromosoma X o autosomica recessiva. I pazienti affetti da questa malattia non sono in grado di produrre specie reattive dell'ossigeno in risposta a infezioni batteriche o fungine. La maggior parte delle infezioni in questi pazienti sono causate da *S. aureus*, *Burkholderia cepacia complex*, *Aspergillus*. Le infezioni interessano la pelle, polmoni, l'intestino.

Difetti nella adesione dei leucociti causano malattia



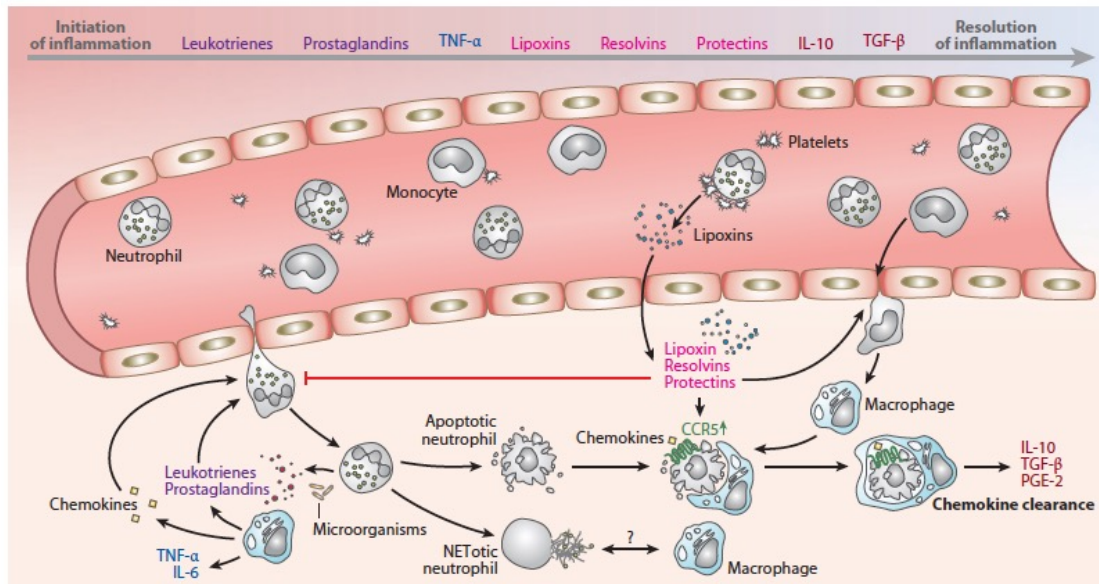
L'incapacità dei neutrofili di migrare ai siti di infezione determinando lo sviluppo di gravi infezioni e di malattie gravi è dovuta a difetti in molecole essenziali nella extravasazione dei neutrofili.

LAD I: malattia autosomica recessiva causata da mutazioni a carico della catena β_2 delle integrine (LFA1, Mac-1).

LAD II: difetto del tetrasaccaride Sialil-Lewis X che causa un difetto di rolling dei leucociti all'endotelio. Mutazione del gene che codifica per la proteina che media il trasporto del Fucosio nel Golgi.

LAD III: difetto di trasduzione del segnale responsabile dell'attivazione delle integrine.

I neutrofili e la risoluzione dell'infezione



Durante le fasi precoci del processo infiammatorio i neutrofili producono leucotrieni e prostaglandine successivamente queste cellule smettono di produrre leucotrieni e producono lipossine e resolvine.

Dopo aver eseguito la loro funzione microbica i neutrofili vanno incontro a morte per apoptosi. La rimozione dei corpi apoptotici viene mediata dai macrofagi.