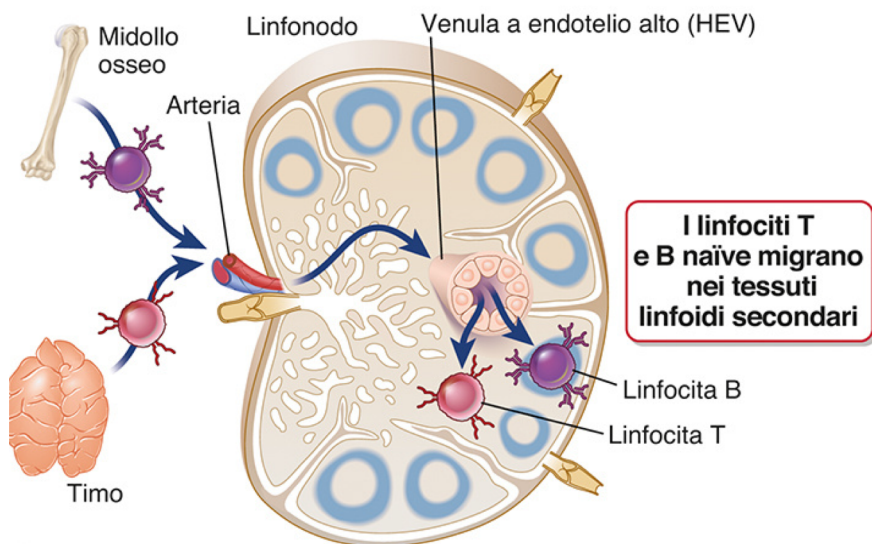


Reclutamento dei leucociti

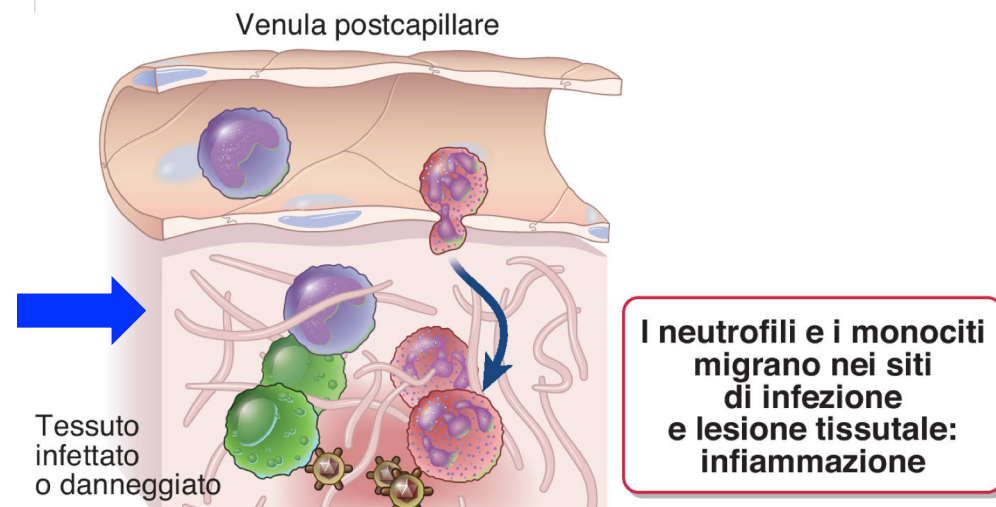
Reclutamento leucocitario (*homing*)

Movimento costante e regolato di cellule del sistema immunitario dal sangue ai tessuti o dal sangue ai linfonodi e viceversa

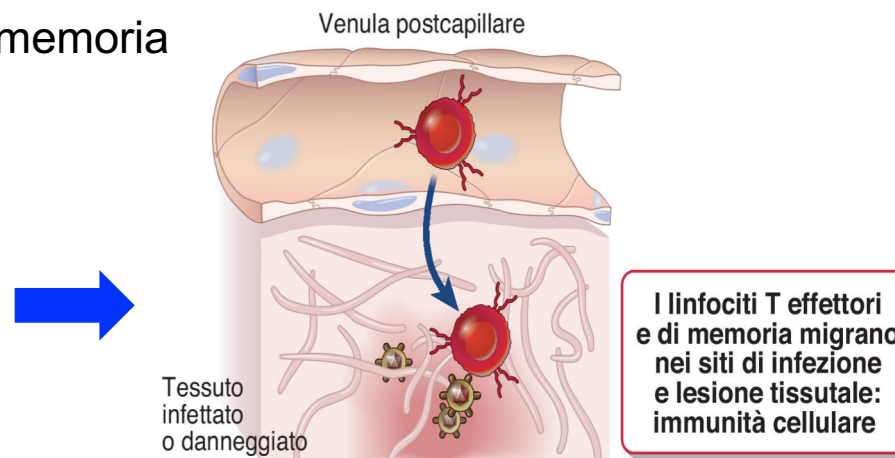
Reclutamento dei **leucociti** (**neutrofili, monociti, basofili, eosinofili, NK**) dal midollo osseo (**sito di maturazione**) al circolo ematico e poi ai focolai di infezione e/o danno (tessuti) (**venule post-capillari**) → eliminazione patogeni, cellule morte (detriti cellulari) e riparazione delle lesioni



Reclutamento dei **linfociti effettori** (e memory) dagli organi linfoidi secondari ai siti di infezione e/o danno (**venule post-capillari**)



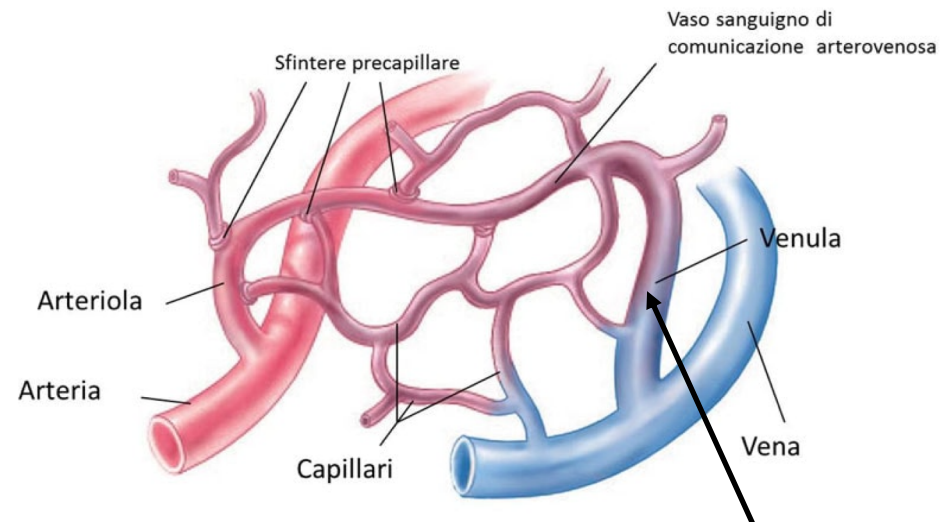
Reclutamento dei **linfociti T e B naïve** dagli organi di maturazione (**timo e midollo osseo**) agli organi **linfoidi secondari** (**venule ad alto endotelio**) → riconoscimento degli antigeni e differenziamento in **linfociti effettori** e memoria



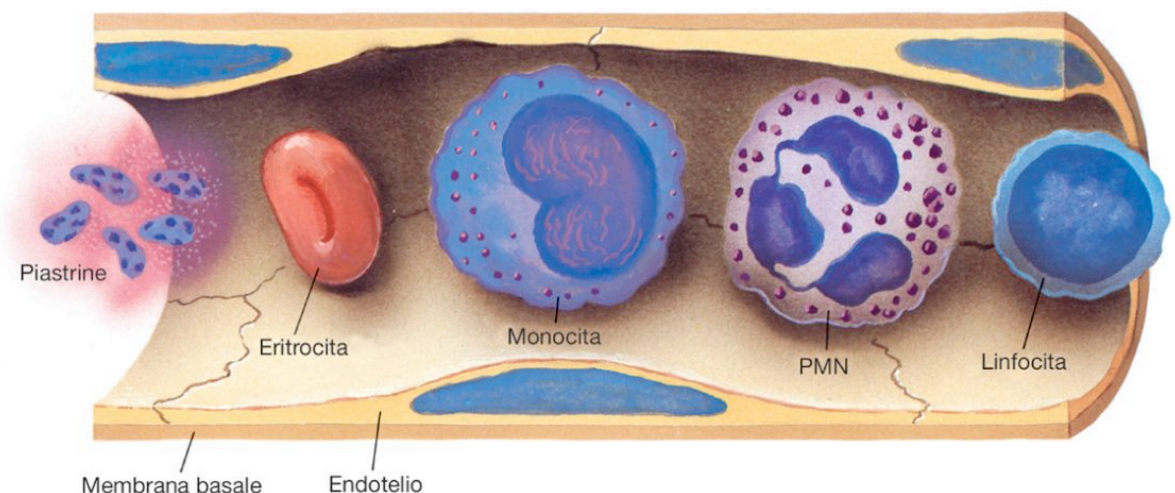
Reclutamento leucociti (infiammazione)

In seguito al riconoscimento dei patogeni e/o danno, i **macrofagi residenti** (ma anche **cellule dendritiche** e **mastociti**) nei tessuti secernono citochine e chemochine che reclutano cellule effettrici nell'area interessata e creano un focolaio infiammatorio.

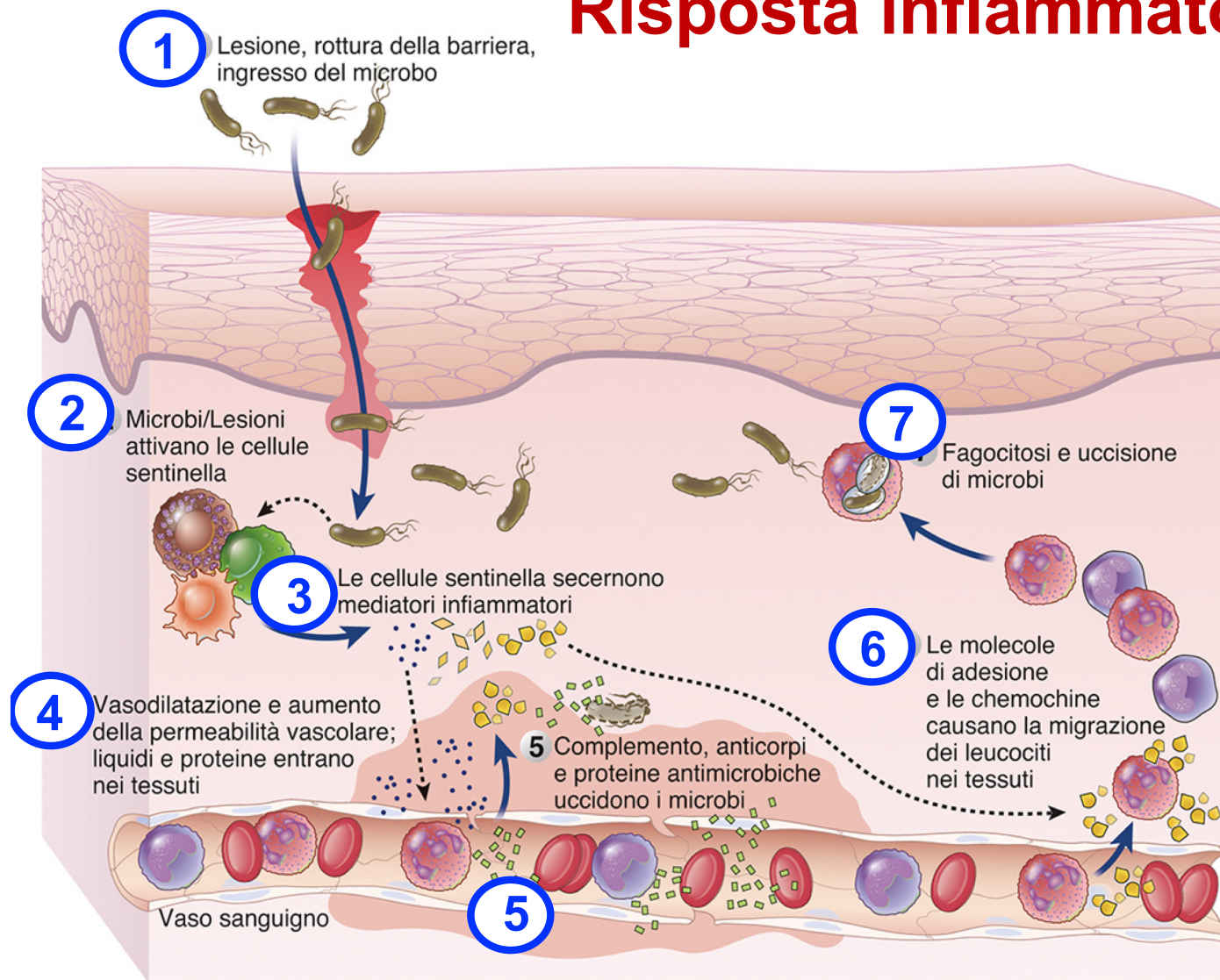
- Il processo di reclutamento richiede l'adesione dei leucociti alle cellule dell'**endotelio** delle **venule post-capillari**.
- Le **cellule endoteliali** nei siti di infiammazione e/o danno vanno incontro ad attivazione mediata da citochine e **aumenta** la loro espressione di **molecole di adesione** e produzione di **chemochine** (netto aumento dell'adesività endotelio-leucociti).
- I leucociti abbandonano il torrente e si accumulano nei tessuti costituendo l'infiltrato infiammatorio.



Venule post-capillari



Risposta infiammatoria acuta



Le risposte infiammatorie acute iniziano quando i microbi superano le barriere epiteliali o quando il tessuto viene danneggiato (1). Successivamente, i profili molecolari associati ai patogeni (PAMP) e i profili molecolari associati al danno (DAMP) attivano le cellule sentinella come macrofagi, cellule dendritiche (DC) e mastociti (2) per secernere citochine e altri mediatori (3). Alcuni di questi mediatori (per esempio, istamina, prostaglandine) aumentano la permeabilità di capillari (4) portando

all'ingresso di proteine plasmatiche (per esempio, proteine del complemento) nei tessuti (5). Altri mediatori (interleuchina-1 IL-1, fattore di necrosi tumorale TNF) aumentano l'espressione delle molecole di adesione endoteliale ed infine, le chemochine promuovono il movimento dei leucociti dalle **venule post-capillari** ai tessuti (6) dove i leucociti eliminano i microbi e le cellule danneggiate (7), amplificano l'infiammazione e promuovono i processi di riparazione.

Reclutamento leucocitario: meccanismo

Citochine quali **TNF, IL-1** modificano l'adesività e la permeabilità dell'endotelio e fattori chemotattici (**chemochine**) richiamano i leucociti

Rolling (selectine)

Adesione (Integrine)

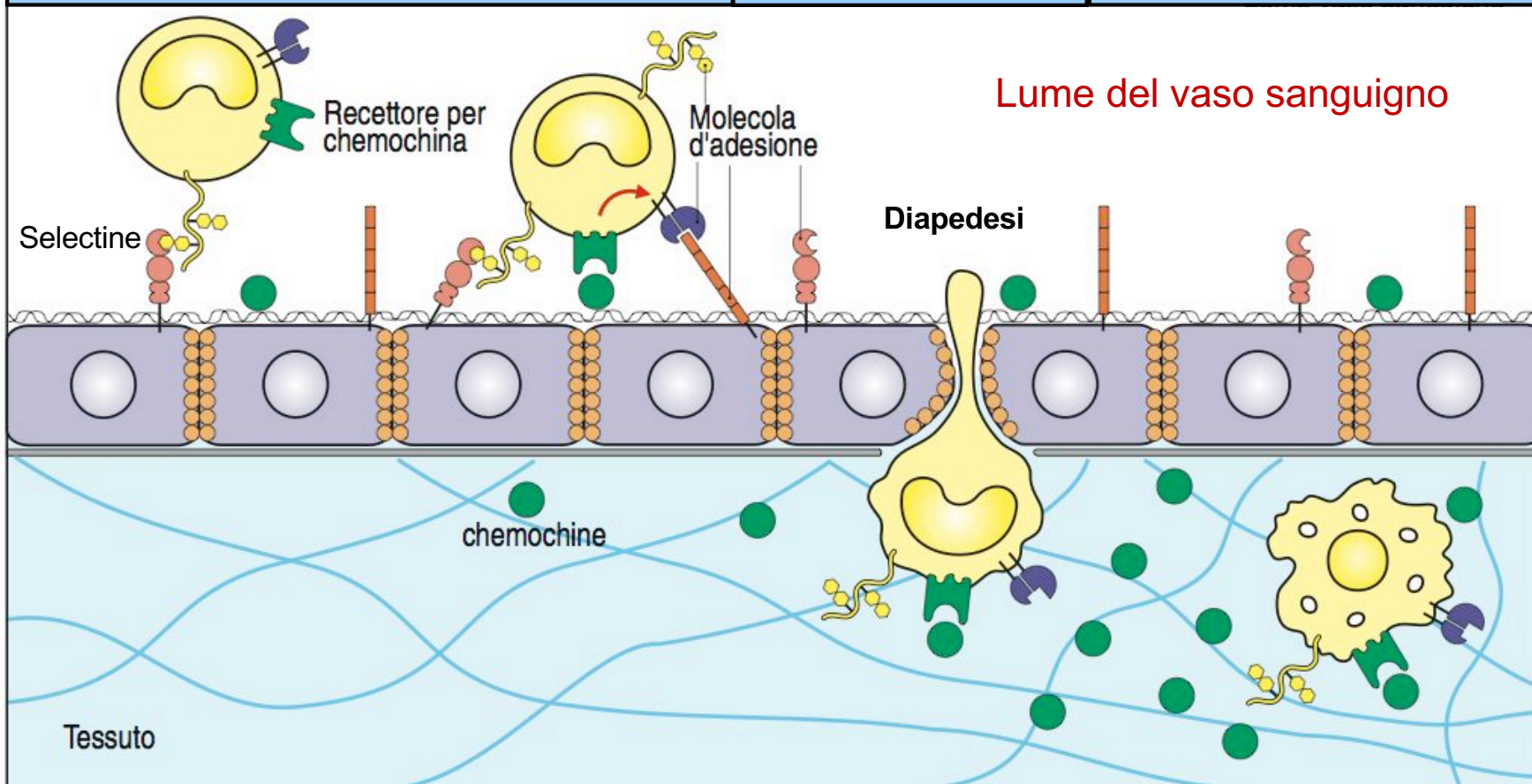
Extravasazione

Diapedesi/transmigrazione

I leucociti legano le molecole di adesione sull'endotelio vascolare vicino ai siti di infezione e ricevono il segnale dalle chemochine

I leucociti attraversano l'endotelio e migrano nel tessuto sottostante

I leucociti si attivano e agiscono nel sito di infezione



Le chemochine

Nell'uomo **47** proteine con attività chemotattica e struttura simile. Sono proteine basiche (**60-80 aa**; **8-12 kDa**) contenenti **Cys N-terminali** altamente conservate che formano **ponti disolfuro**.

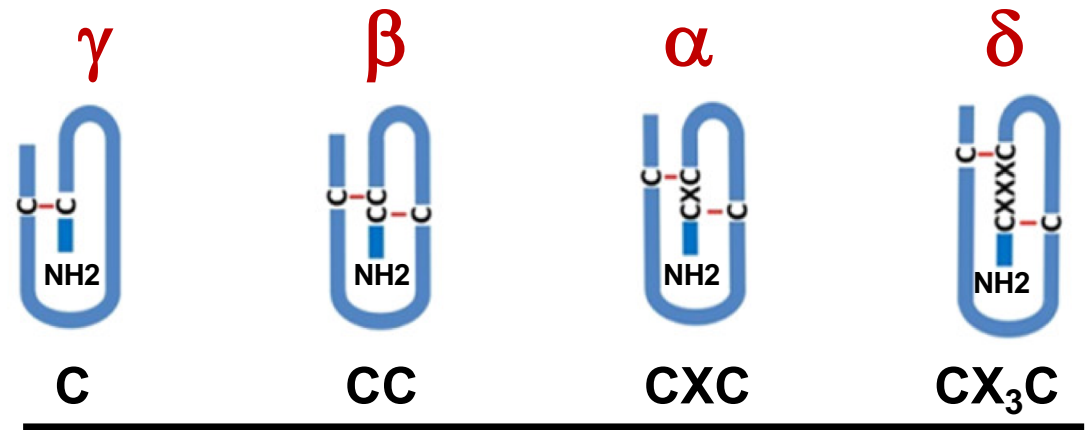
4 famiglie in base al numero/posizione delle Cys all'aminotermine:

CxC o chemochine α (Cys-x-Cys) separate da un aa: **CXCL8 (IL8)**;

CC o chemochine β prime 2 Cys adiacenti (Cys-Cys): **CCL2 (MCP1)**; **CCL19**; **CCL21**

C o chemochina γ (solo **1 Cys**): **XCL1 (linfotattina)** e **XCL2**

CX₃C o chemochina δ (Cys-**XXX**-Cys) separate da 3 aa: **fractalkina**



-Sono importanti per **direzionare la migrazione** dei leucociti attraverso la barriera endoteliale al **sito infiammatorio** o nei **linfonodi**.

-Aumentano l'adesione dei leucociti all'endotelio vascolare (**aumento affinità delle molecole di adesione**).

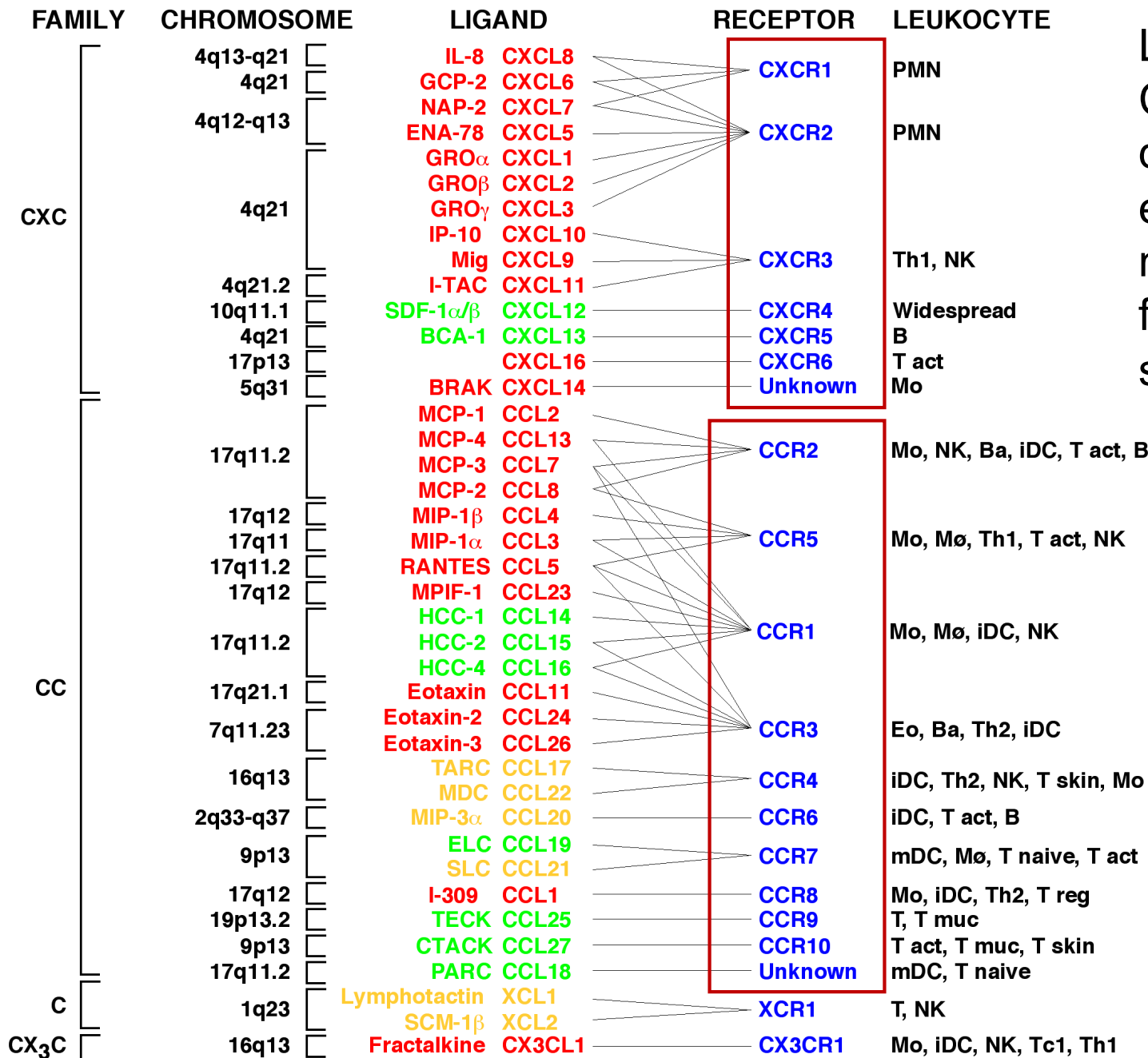
Indotte da stimoli di natura:

Microbica: diverse molecole (inclusi RNA e DNA microbici) riconosciute da specifici recettori (**TLRs**) ne inducono espressione genica e secrezione.

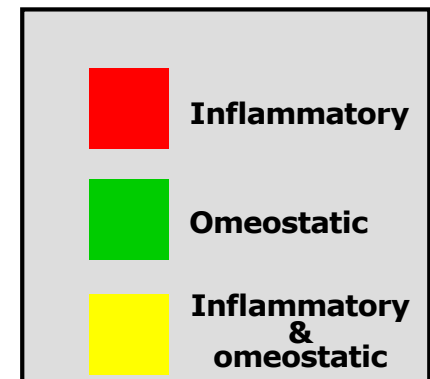
Infiammazione: **TNF, IL-1**, fattore attivante le piastrine (**PAF**), **leucotriene B4**

Anafilotossine: **C5a, C4a, C3a** derivate dall'attivazione della cascata del complemento

The chemokine system



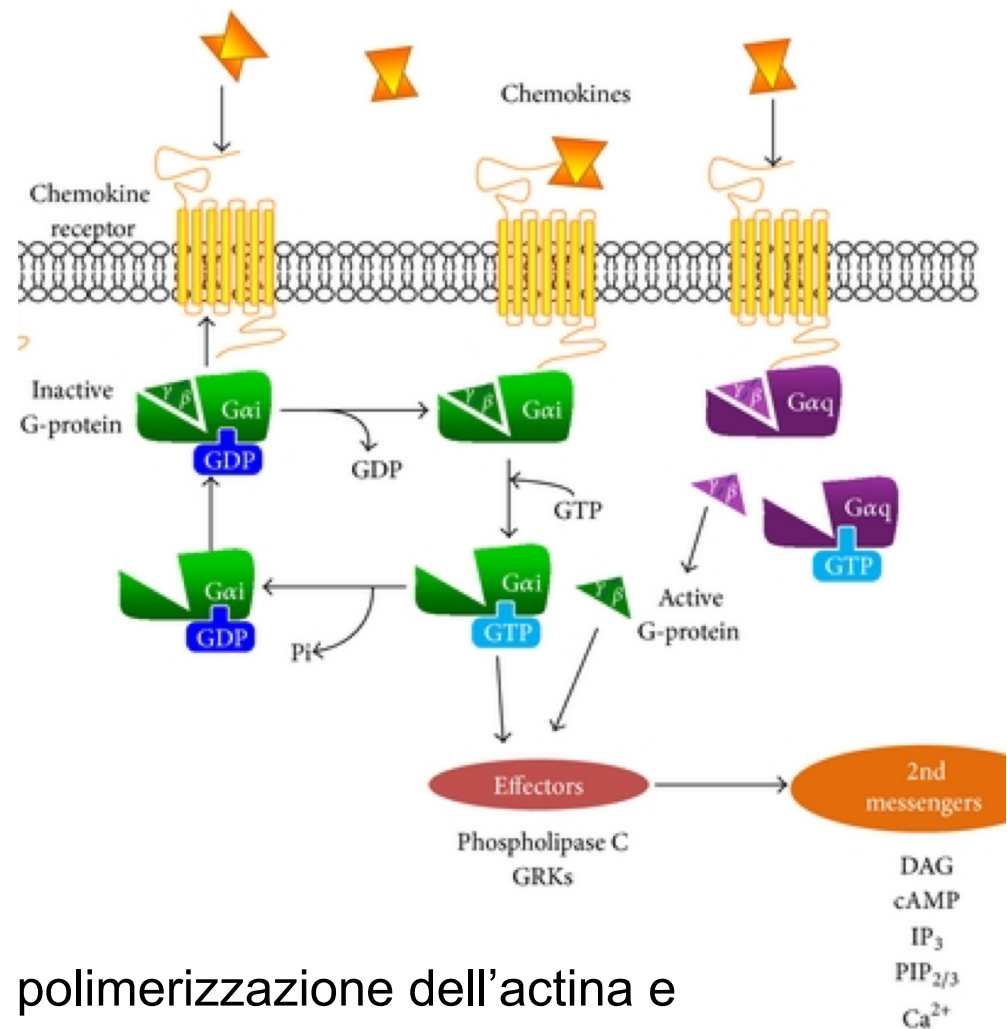
Le chemochine CC e CXC sono prodotte dai leucociti, cellule epiteliali, endoteliali, macrofagi residenti, fibroblasti e da cellule stromali



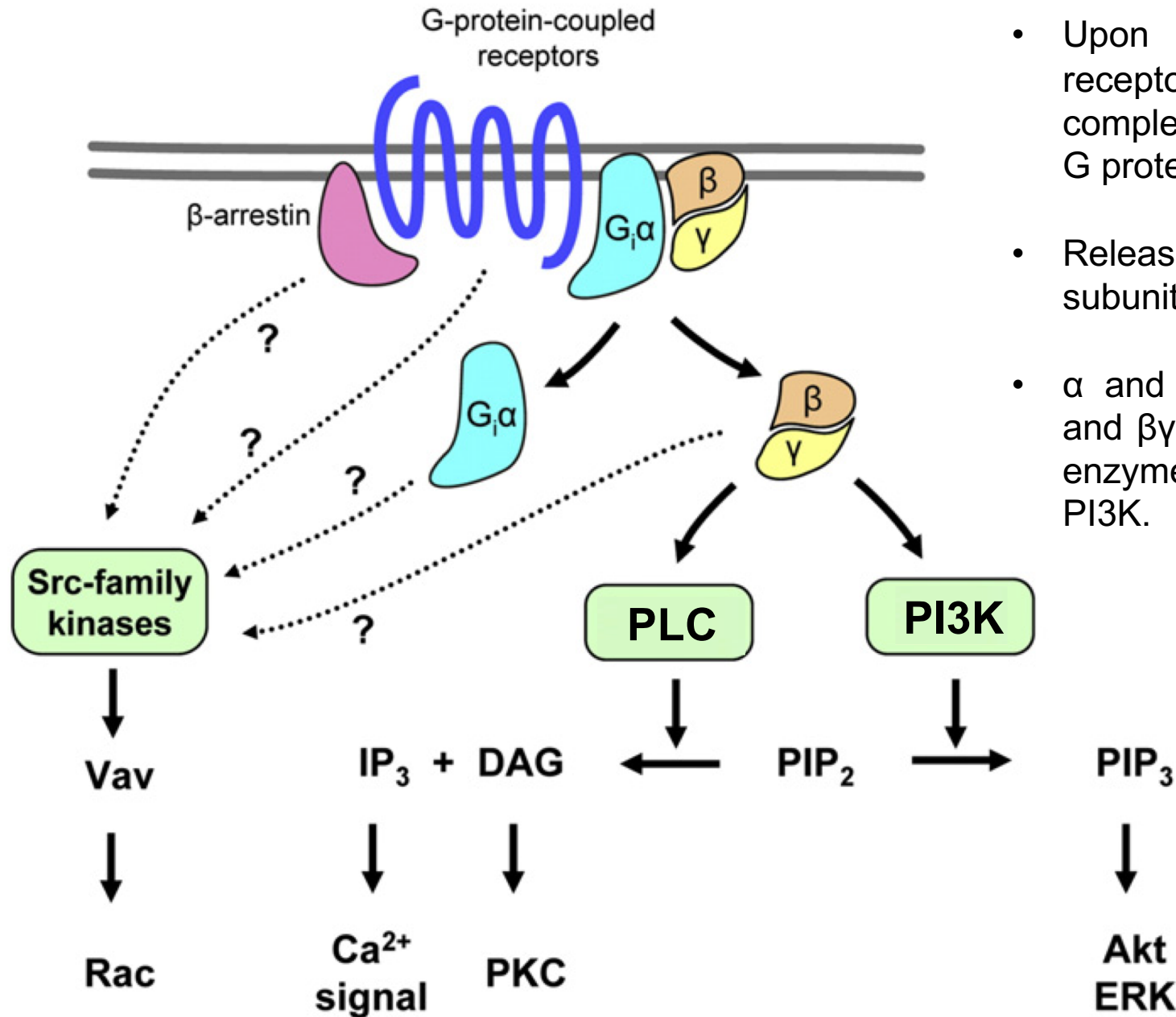
Recettori delle chemochine

Superfamiglia di **recettori accoppiati a proteine G (GCPR)** con 7 domini transmembrana associati alle proteine G leganti il GTP

- A riposo la proteina G è legata al GDP → dopo il riconoscimento della chemochina la proteina G scambia il GDP con il GTP.
- Attivazione di diversi enzimi tra i quali fosfolipasi C (PLC) e PI3K
- **Riorganizzazione del citoscheletro** con polimerizzazione dell'actina e miosina → **movimento cellulare** e **modificazione affinità delle molecole di adesione (integrine)**
- Dopo interazione con le chemochine **i recettori sono internalizzati** → spegnimento della risposta

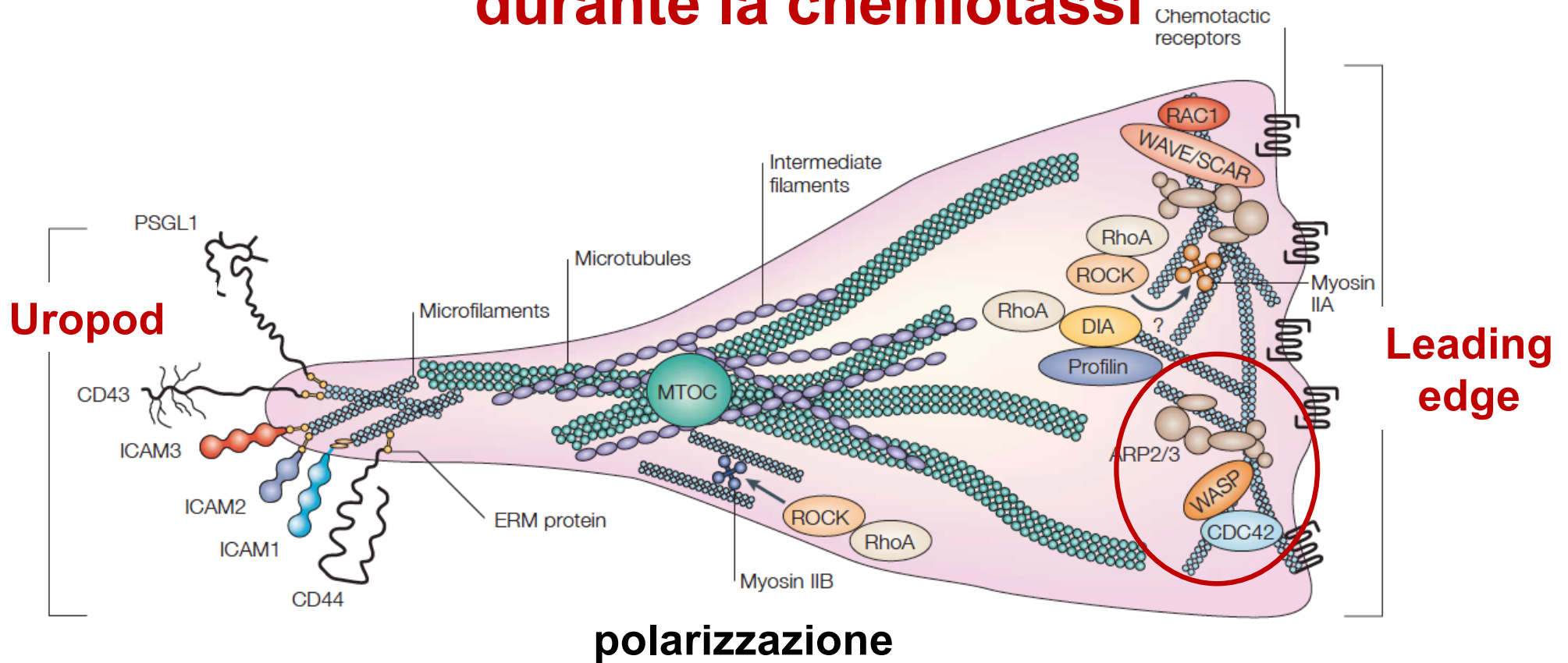


Chemokine Signaling



- Upon stimulation chemokine receptors form a ternary complex with a heterotrimeric G protein.
- Release of GDP from the α subunit and GTP binding.
- α and $\beta\gamma$ subunits dissociate and $\beta\gamma$ bind to cellular effector enzymes such as PLC and PI3K.

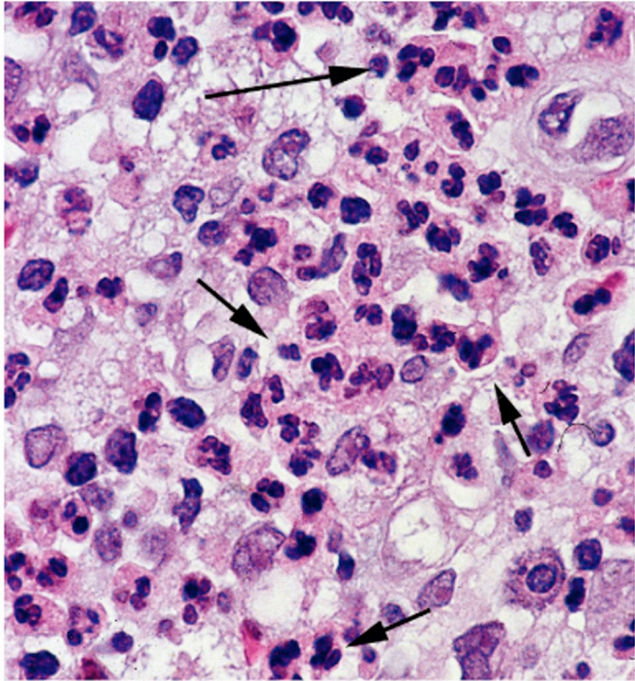
Chemochine e riorganizzazione citoscheletrica durante la chemiotassi



1. Polimerizzazione dell'actina (F-actina) indotta dai **recettori per chemochine** nel leading edge dove si concentrano tutti i recettori delle chemochine.
2. Riorganizzazione dei microtubuli con polarizzazione MTOC per la formazione del leading edge e dell'uropodo.
3. Nell'uropodo si concentrano le molecole di adesione con F-actina per il contatto leucocita-endotelio.

Reclutamento neutrofili

Neutrofili o Polimorfonucleati
(*infiammazione acuta*)



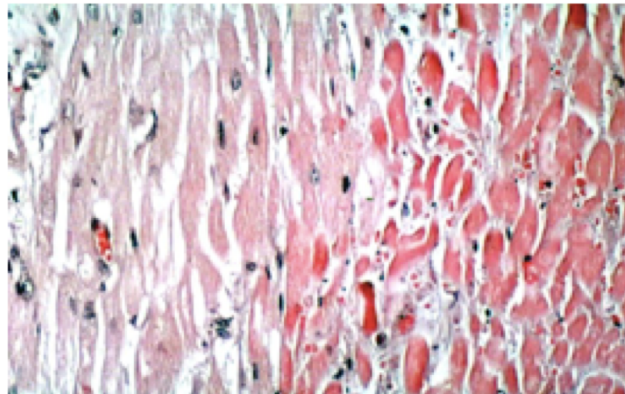
Rubin, Patologia

Copyright 2006 Casa

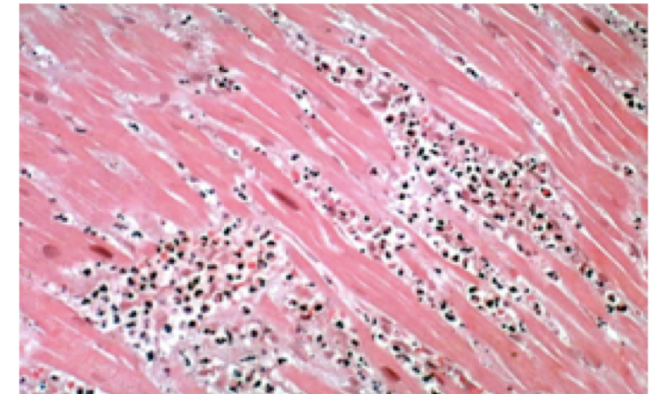
Lo stimolo chemotattico è rappresentato da **IL-8/CXCL8** che lega CXCR1 e CXCR2 espressi dai neutrofili

Accumulo delle cellule deputate alla neutralizzazione del patogeno e sua eliminazione (fagocitosi)

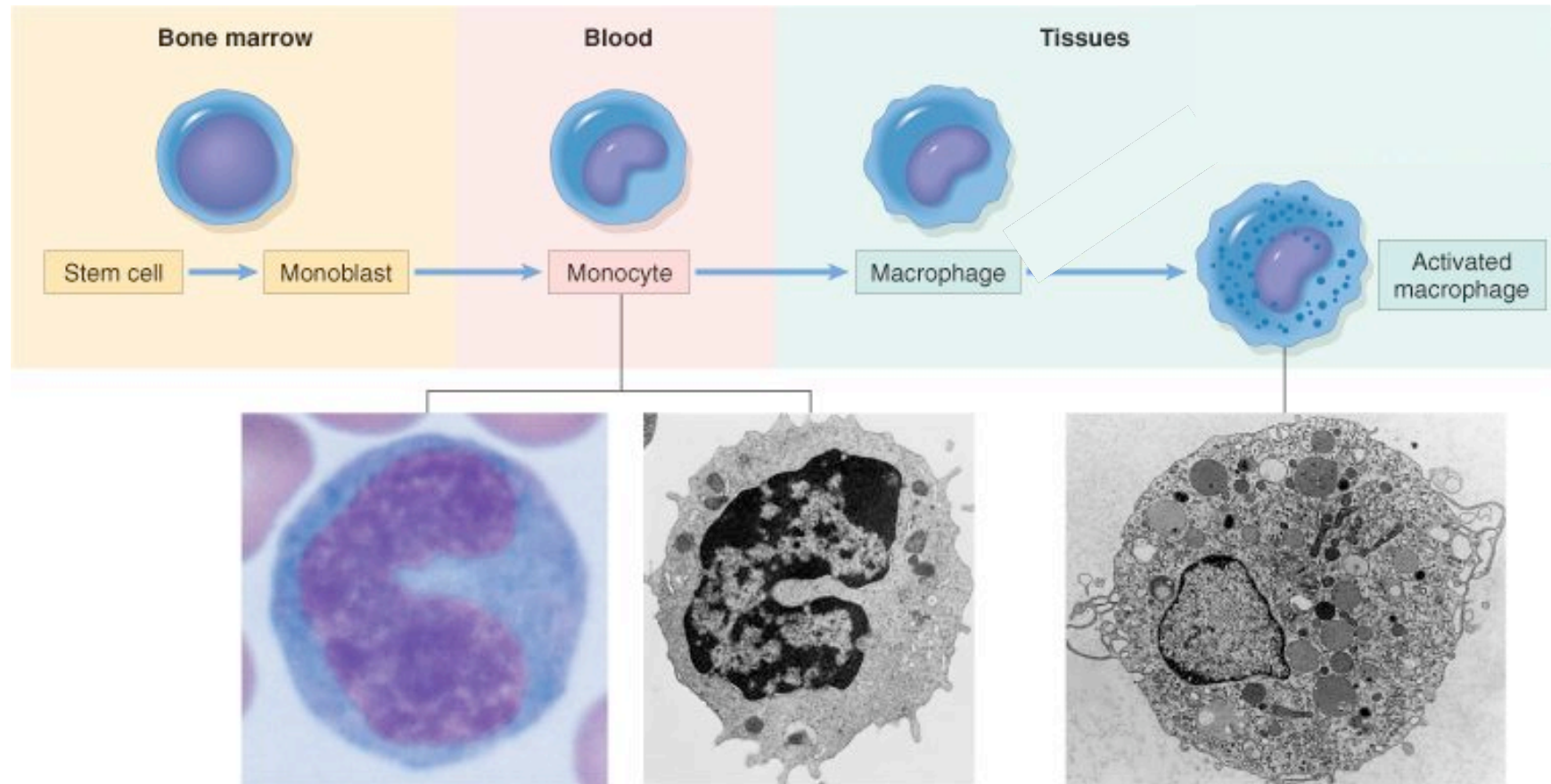
<10 hours



24-72 hours



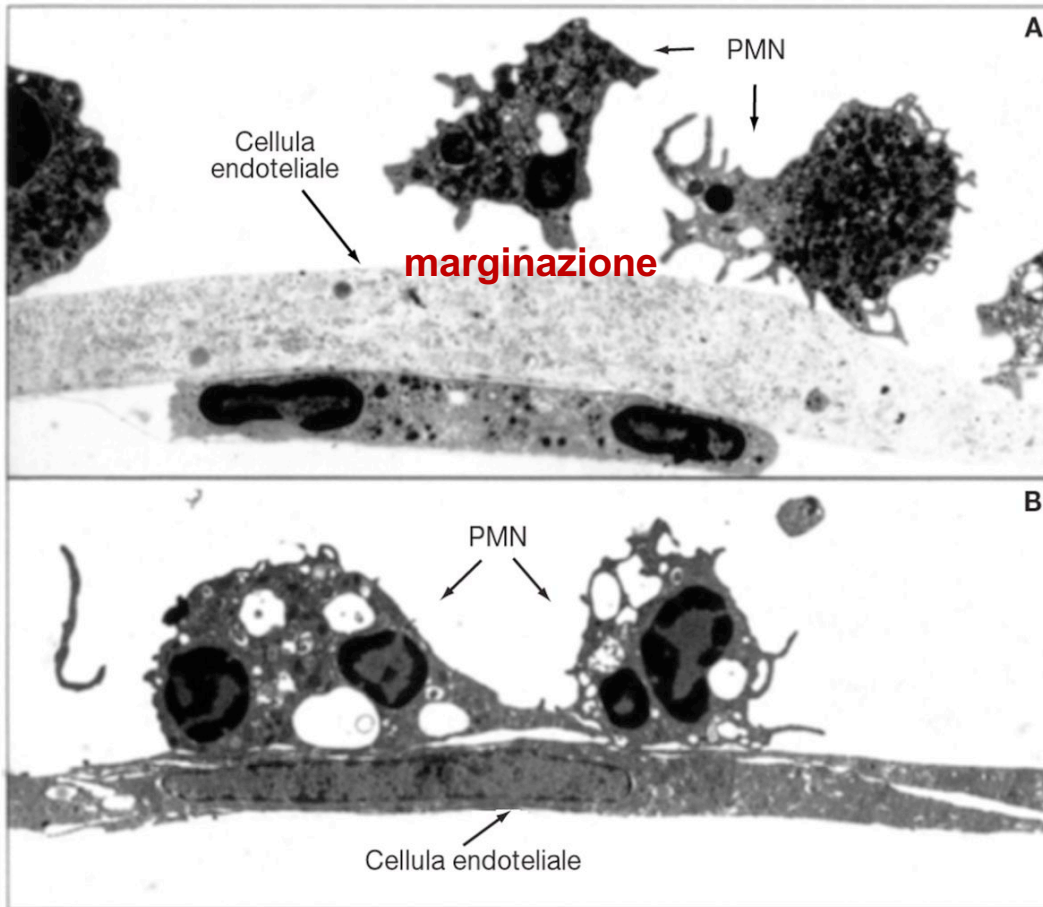
Monociti/macrofagi esprimono CCR2 recettore per CCL2 (MCP-1)



© Elsevier 2005

Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1/CCL2)

Adesione blanda all'endotelio

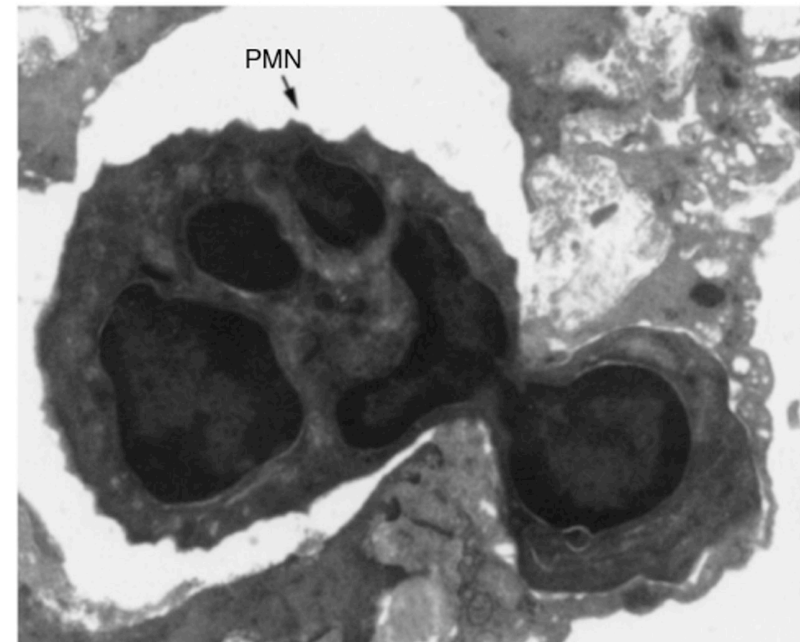


Rubin, Patologia

Copyright 2006 Casa Editrice Ar

Le **cellule endoteliali** hanno granuli detti corpi di Weibel-Palade che contengono **P-selectina**.

- I mediatori dell'infiammazione (es. **TNF, IL-1**) inducono l'espressione sulla membrana della **P-selectina** e la sintesi ed espressione della **E-selectina** (1-2 ore)

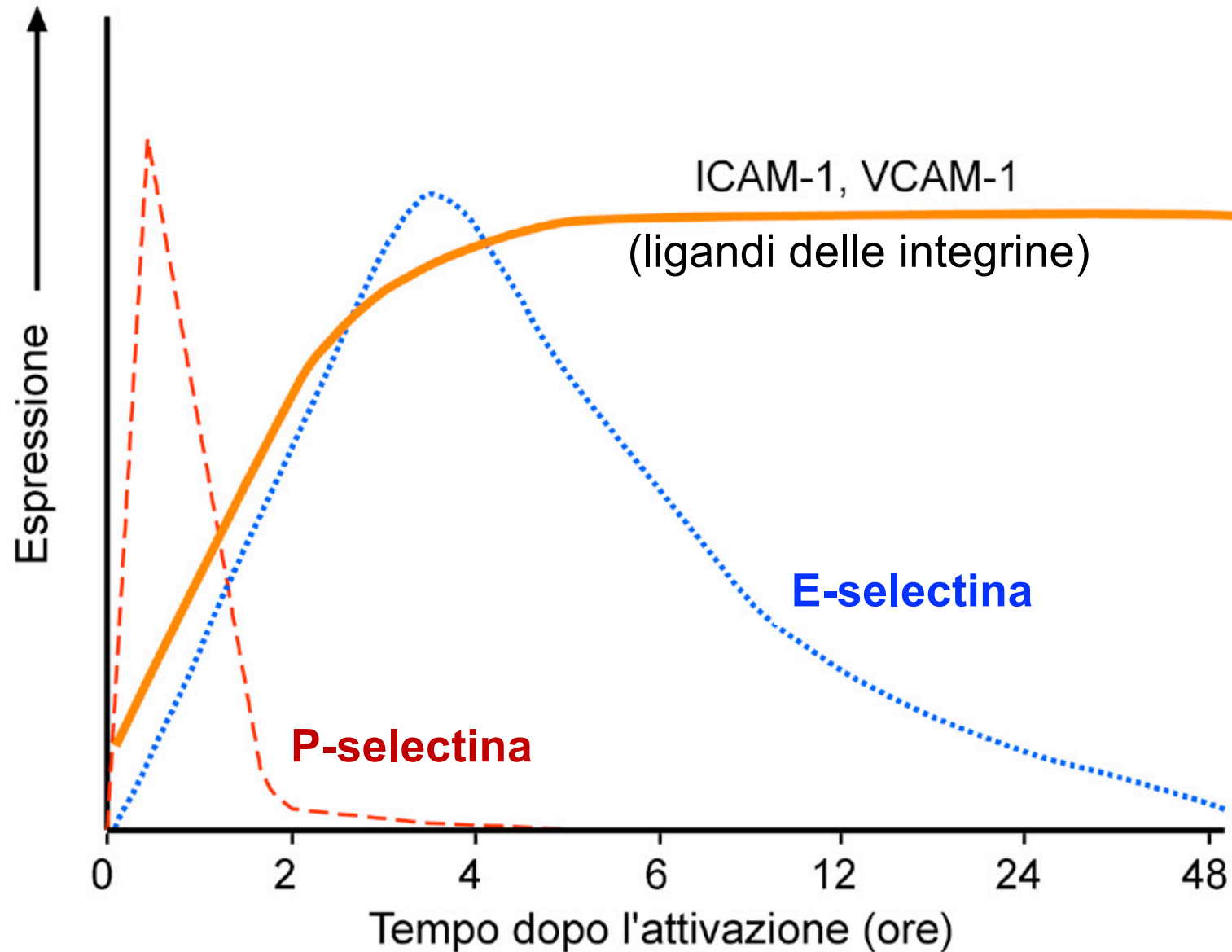


Rubin, Patologia

Copyright 2006 Casa Editrice Ambrosiana

selectine → ROLLING

Endotelio: cinetica di espressione delle molecole per l'adesione dei leucociti



Le selectine

P-selectina (CD62P):

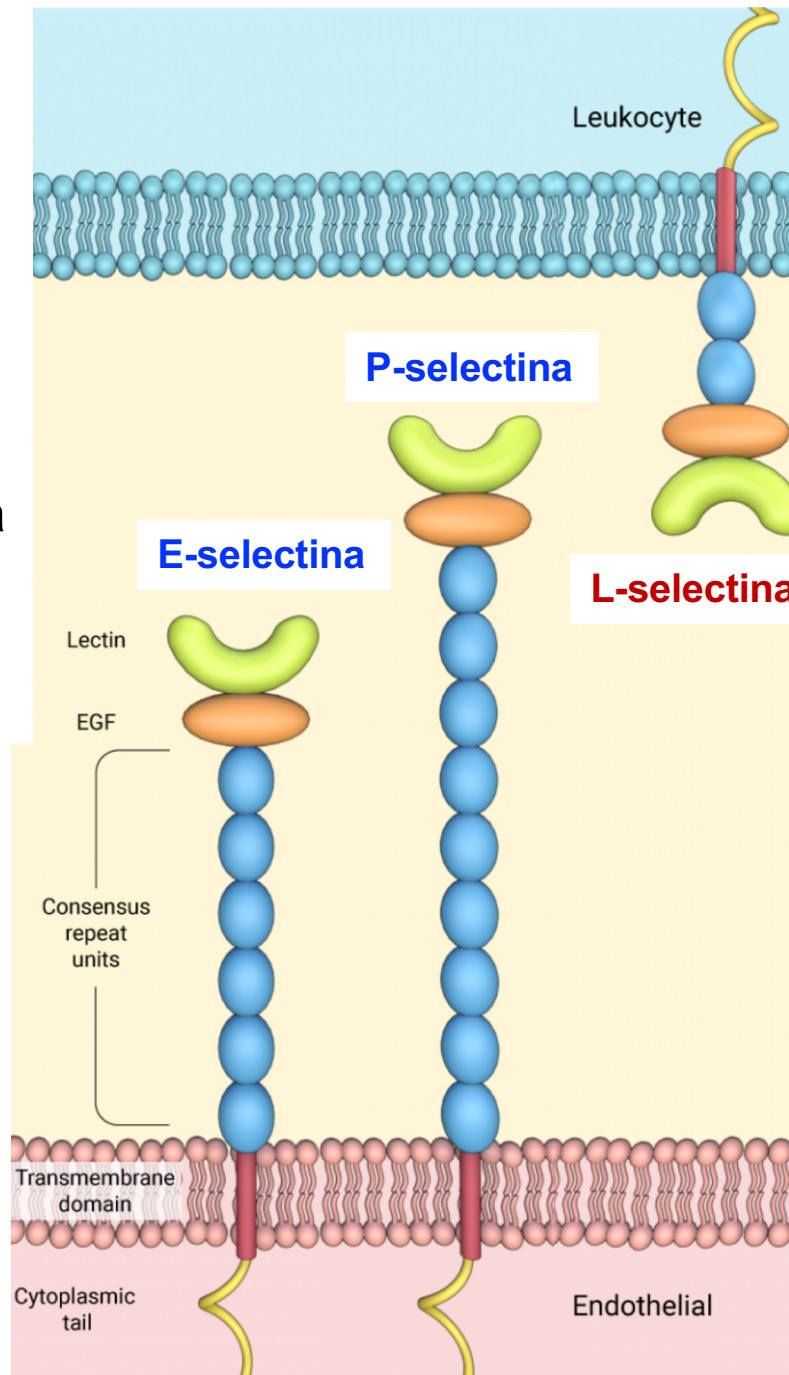
glicoproteina preformata e conservata in granuli citoplasmatici (corpi di Weibel-Palade) nelle cellule endoteliali.

TNF, IL-1, istamina e trombina inducono dislocazione di P-selectina sulla superficie cellulare. Picco di espressione **10-15 min.**

E-selectina (CD62E):

Glicoproteina espressa dalle cellule endoteliali attivate (**TNF e IL-1**) per **neo-sintesi**.

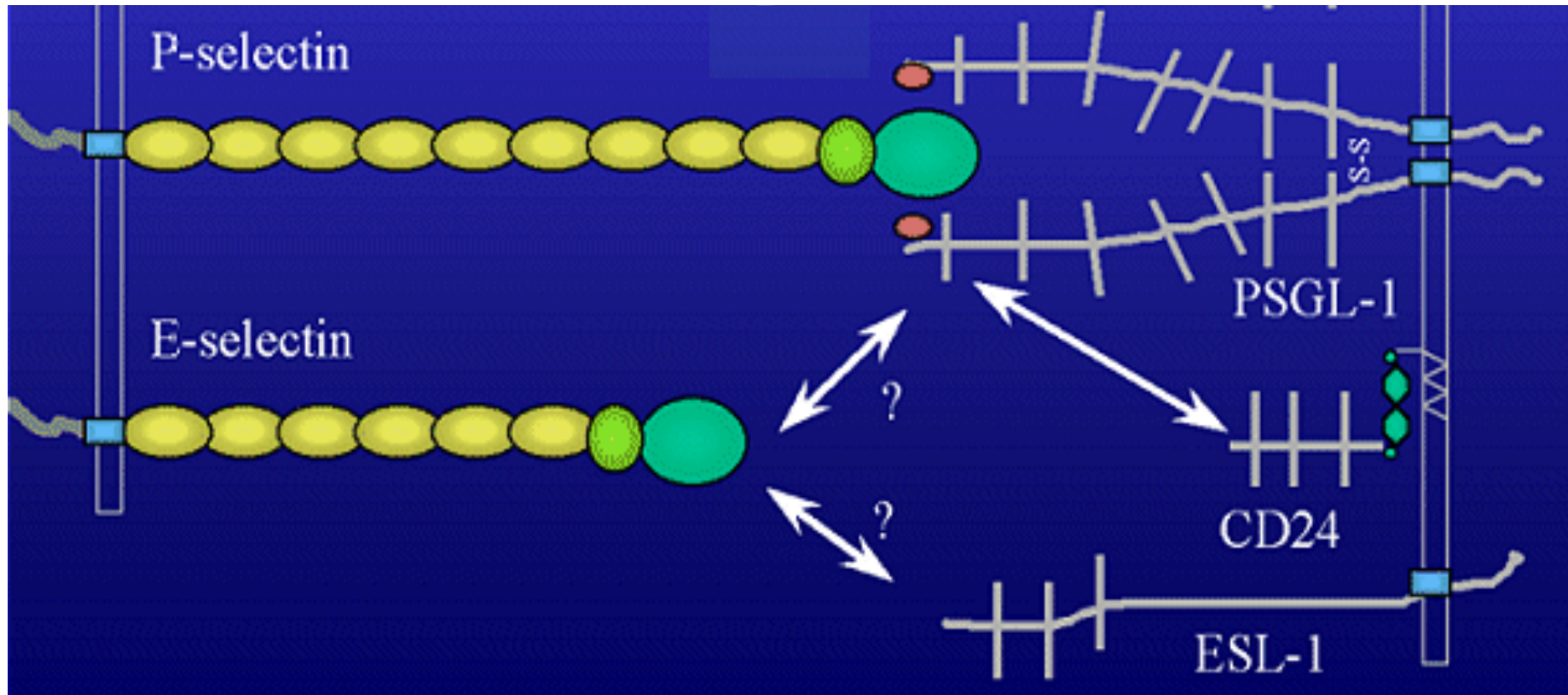
Piccola espressione a **4 ore**. Esclusivamente espressa dall'endotelio delle venule post-capillari infiammate e dei linfonodi.



L-selectina (CD62L):

Glicoproteina espressa sui leucociti e **linfociti T naive e memoria centrale**. I ligandi sono **sialomucine**; sulle **HEV** il ligando è **PNA_d** (addressina dei linfonodi periferici).

L-selectina è importante per l'homing dei linfociti T e B naive nei linfonodi.



P-selectine e E-selectine interagiscono con carboidrati sialilati (**sialil-Lewis X o A**) presenti su molte glicoproteine espresse dai leucociti, linfociti T effettori e della memoria

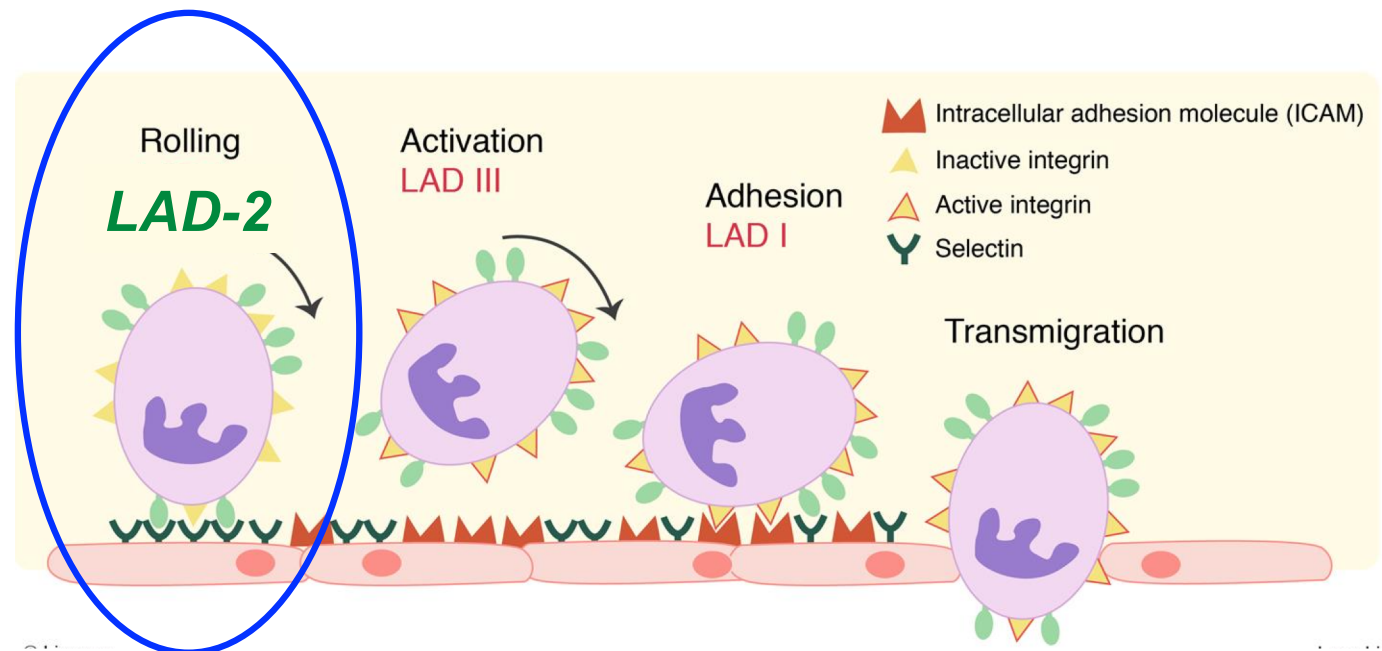
Sindrome da deficit di adesione leucocitaria di tipo 2: Leukocyte adhesion deficiency (LAD-2)

Mutazione del gene codificante per il **trasportatore del GDP-fucosio** essenziale per la sintesi dei **sialil-Lewis X** (carboidrati sialilati), ligandi leucocitari delle **E-** e **P-selectine** espresse sull'endotelio attivato.

Rolling leucocitario ridotto.

LAD-2:

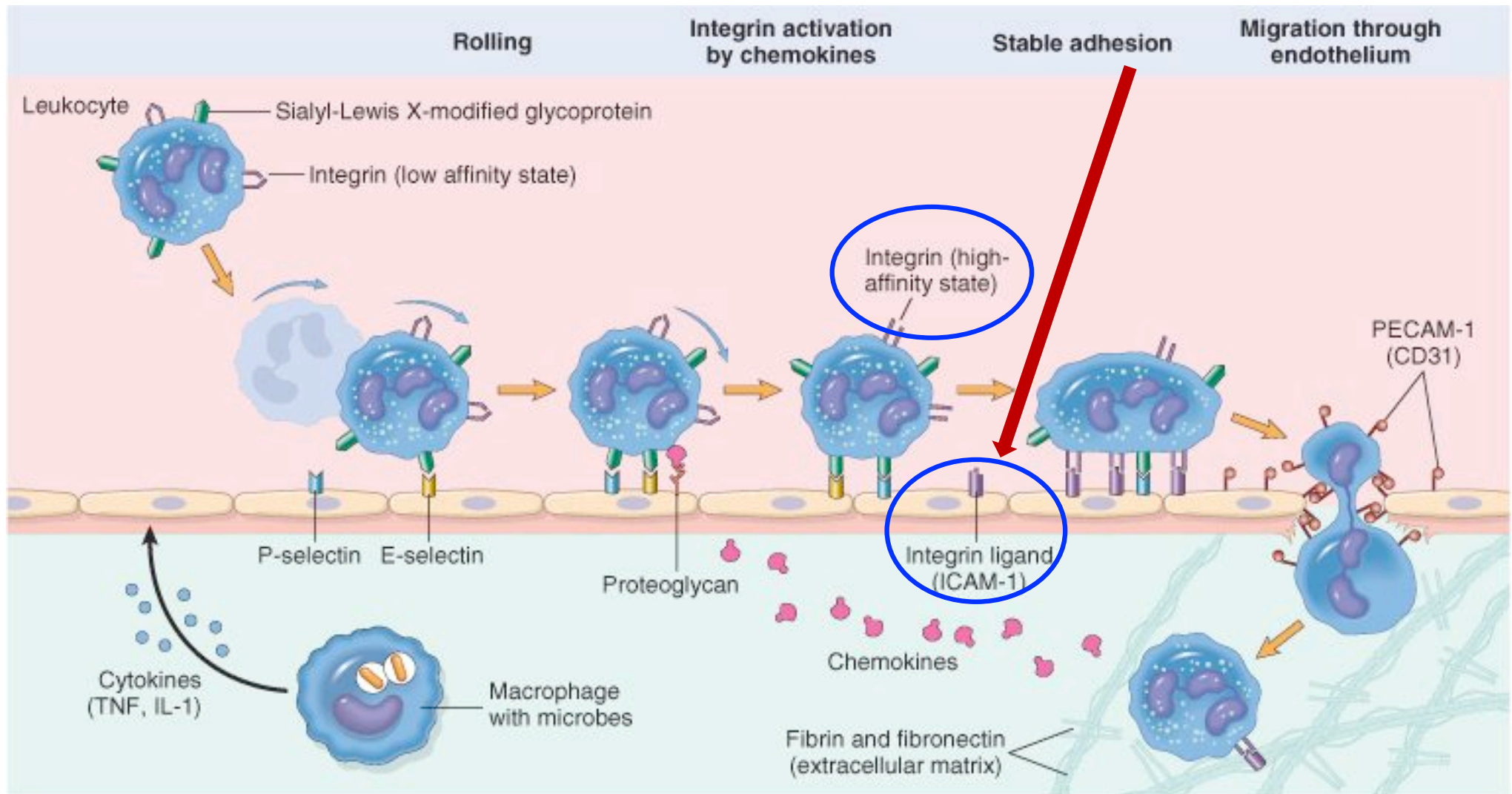
Immunodeficienza con infezioni ricorrenti da batteri e funghi

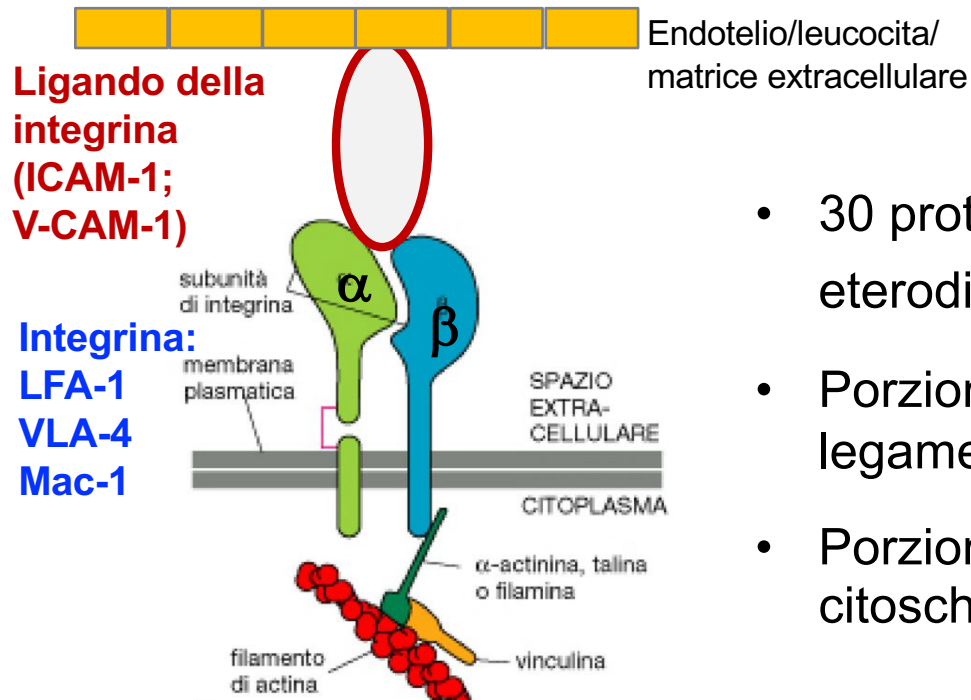


Adesione stretta all'endotelio

L'endotelio esprime bassi livelli di molecole di adesione (**ICAM-1**, **ICAM-2** e **VCAM-1**)

TNF- e IL-1 prodotte dai macrofagi tissutali inducono up-regolazione di molecole di adesione per granulociti (PMN), monociti e linfociti





Le integrine

- 30 proteine di membrana, omologhe costituite da un eterodimero di catena α (15 tipi diversi) e β (7 tipi)
- Porzione extracellulare globulare responsabile del legame tra le due catene e con il ligando.
- Porzione intracitoplasmatica interagisce con citoscheletro (**vinculina, talina, actina, kindlina**).

Integrine espresse da leucociti:

- **LFA-1** ($\alpha_1\beta_2$ o CD11a/CD18) lega ICAM-1 (endotelio, DC, macrofagi e linfociti), ICAM-2 (endotelio) e ICAM-3 (linfociti)
- **VLA-4** ($\alpha_4\beta_1$ o CD49d/CD29) lega VCAM-1 (cellule endoteliali attivate)

Ligandi delle integrine:

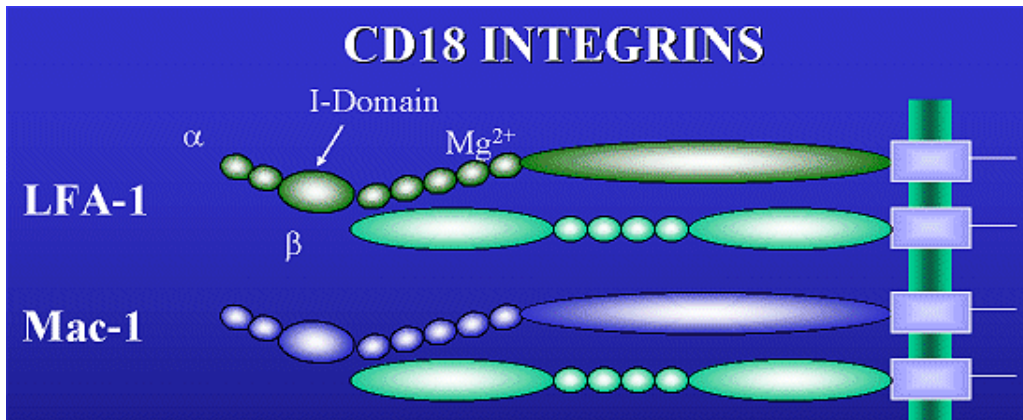
ICAM-1 e ICAM-2 (superfamiglia delle Ig)

- Espresi a bassa concentrazione sull'endotelio e up-regolati da IL-1 e TNF
- Legano **LFA-1** espresso sui leucociti e linfociti attivati e **Mac-1** ($\alpha_M\beta_2$ o CD11b/ CD18) espresso dai monociti circolanti

VCAM-1 (superfamiglia delle Ig)

- Espresso a bassa concentrazione sull'endotelio e up-regolato da IL-1 e TNF
- Lega **VLA-4** espresso sui linfociti e monociti

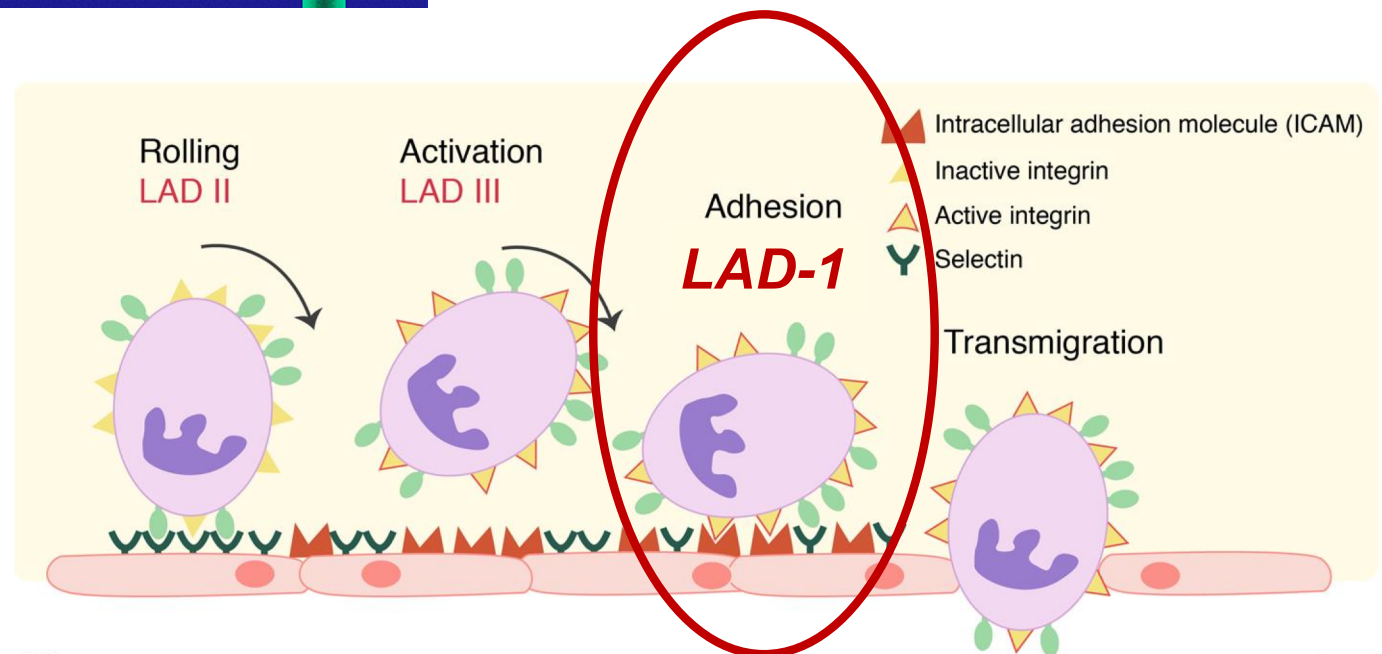
Sindrome da deficit di adesione leucocitaria di tipo 1: Leukocyte adhesion deficiency (LAD-1)



- Mutazione nella regione N-terminale della catena β2 o CD18 che impedisce l'assemblaggio dell'integrina
- **Assenza di LFA-1 (CD11a/CD18) e MAC-1 (CD11b/CD18) sui leucociti**

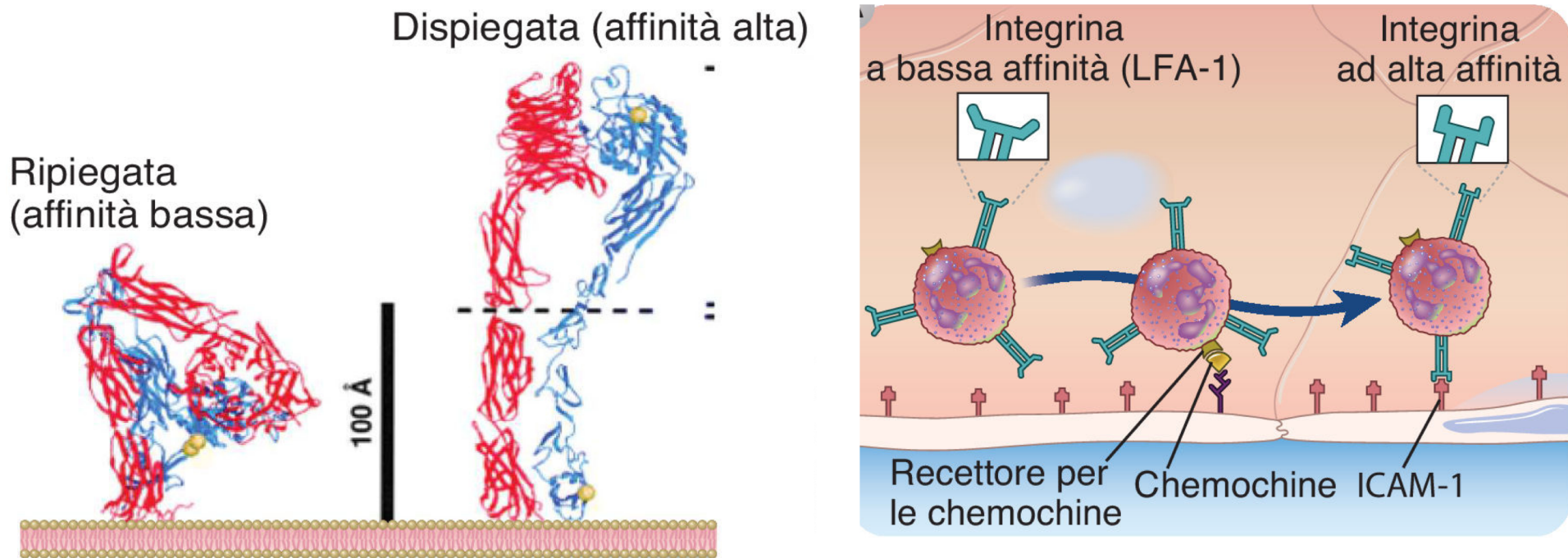
LAD-1:

Immunodeficienza;
Infezioni batteriche
ricorrenti



Le integrine

- Eterodimeri α/β di membrana (legati non covalentemente) responsabili dell'adesione intercellulare (es. leucocita-endotelio) o alla matrice extracellulare.
- Porzione citoplasmatica interagisce con il citoscheletro (**talina**, **kindlina**, **vinculina**, **actina**).

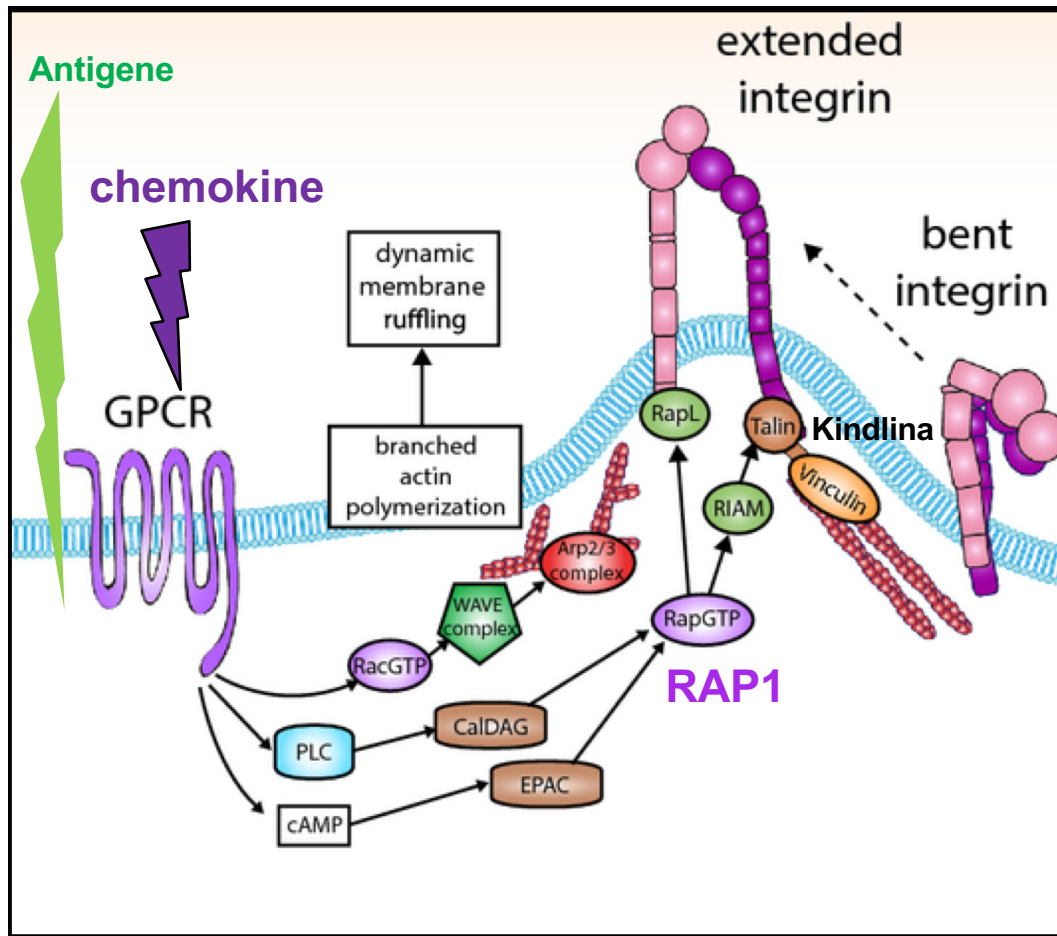


Le integrine sono espresse dai leucociti in uno **stato a bassa affinità**. Durante il rolling sull'endotelio, il leucocita capta le **chemochine** attraverso i recettori specifici e la trasduzione del segnale induce l'attivazione delle integrine che da uno stato a bassa affinità passano ad uno **stato ad alta affinità**.

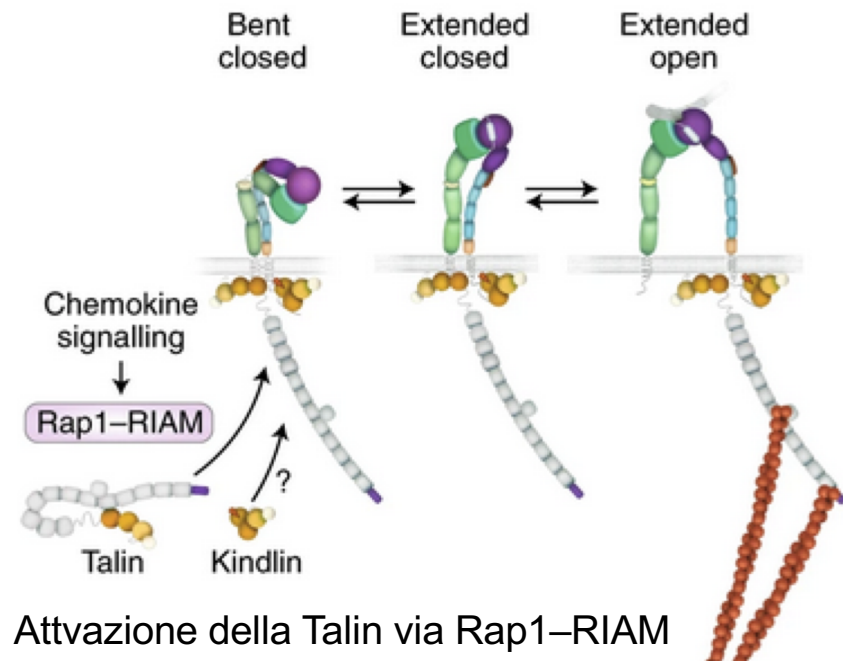
Attivazione delle integrine

inside-out activation

Aumento rapido dell'affinità delle integrine per i ligandi in risposta a segnali esterni (chemochine, antigene etc)



I recettori delle chemochine stimolati attraverso le proteine G inducono l'associazione delle regioni citoplasmatiche delle integrine con le proteine della famiglia RAP (RAP1-RIAM) e con proteine citoscheletriche aumentandone la loro affinità di legame con i ligandi specifici (**inside-out signaling**)



RAP1 (Ras-related protein 1 o RapGTP) **Small GTPase**

RIAM (Rap1-GTP-interacting adaptor molecule)

RAPL RAP-binding molecule

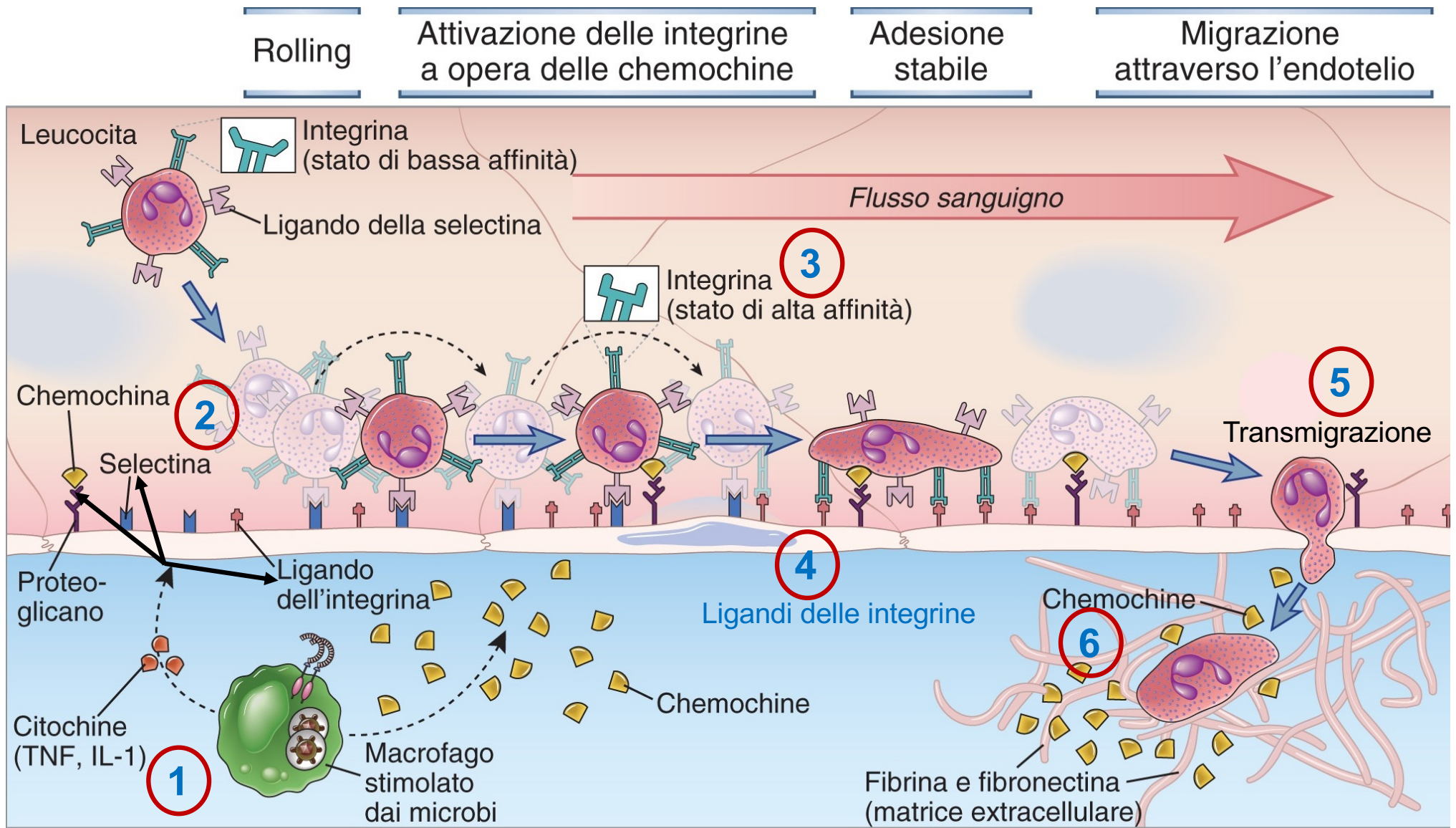
Attivazione della Talin via Rap1-RIAM

Principali molecole coinvolte nell'adesione dei leucociti all'endotelio

Famiglia	Molecola	Distribuzione	Ligando (molecola; tipo di cellula)
Selectine	P-selectina	Endotelio attivato dalle citochine (TNF, IL-1), dall'istamina o dalla trombina	Sialil-Lewis X su PSGL-1 e altre glicoproteine; neutrofilo, monociti, cellule T (effettrici, della memoria)
	E-selectina	Endotelio attivato dalle citochine (TNF, IL-1)	Sialil-Lewis X (per esempio, CLA-1) su varie glicoproteine; neutrofilo, monociti, cellule T (effettrici, della memoria)
	L-selectina	Neutrofilo, monociti, cellule T (naïve e della memoria centrale), cellule B (naïve)	Sialil-Lewis X/PNAd su GlyCAM-1, CD34, MadCAM-1, altri; endotelio (HEV)
Integrine	LFA-1 (CD11aCD18)	Neutrofilo, monociti, cellule T (naïve, effettrici, della memoria)	ICAM-1 (CD54), ICAM-2 (CD102); endotelio (indotte da citochine)
	Mac-1 (CD11bCD18)	Monociti, cellule dendritiche	ICAM-1 (CD54), ICAM-2 (CD102); endotelio (indotte da citochine)
	VLA-4 (CD49aCD29)	Monociti, cellule T (naïve, effettrici, della memoria)	VCAM-1 (CD106); endotelio (indotta da citochine)
	$\alpha_4\beta_7$ (CD49dCD29)	Monociti, cellule T (homing intestinale, naïve, effettrici, della memoria)	VCAM-1 (CD106), MadCAM-1; endotelio intestinale e tessuti linfoidi associati all'intestino

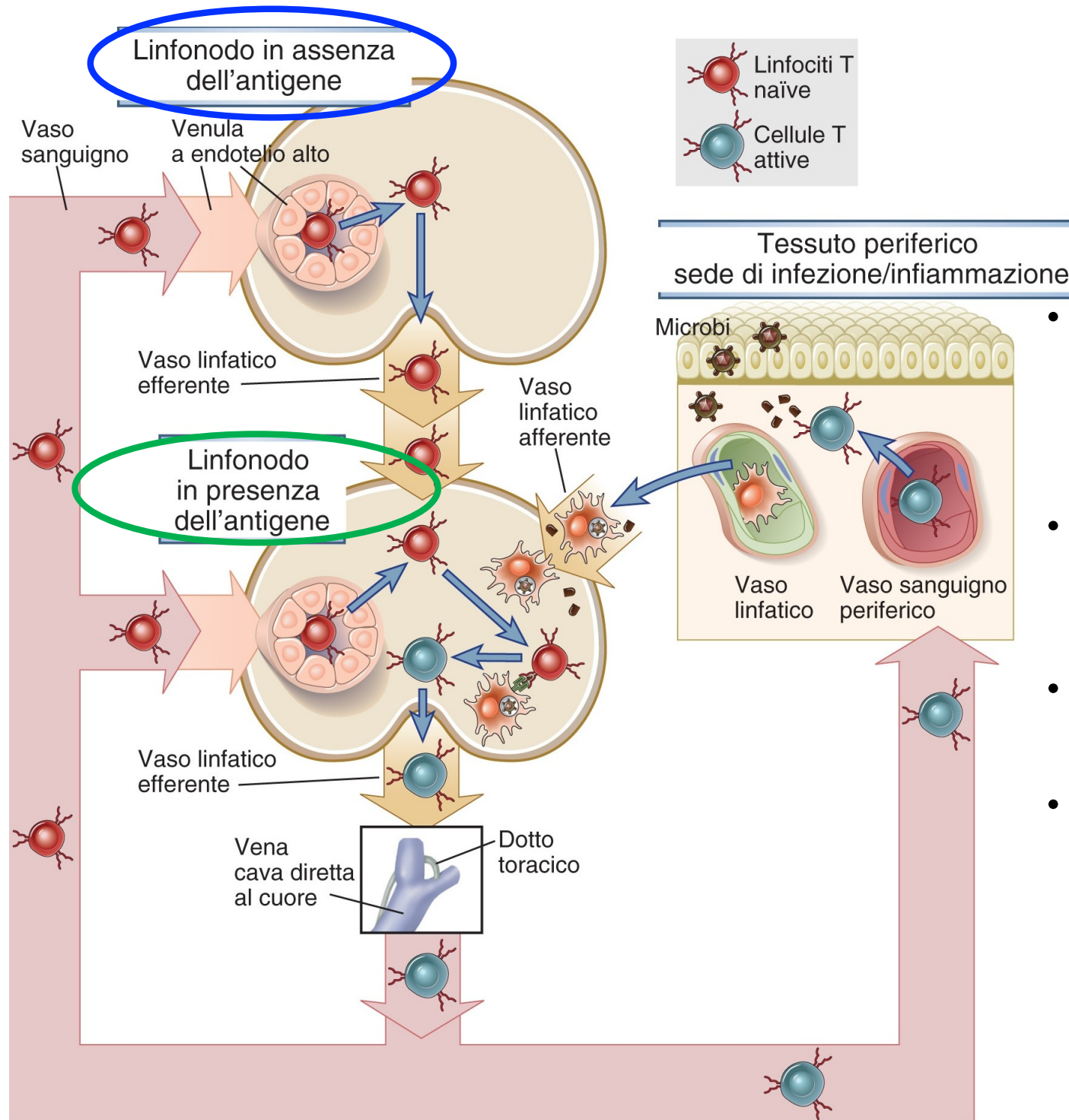
CLA-1, *Cutaneous Lymphocyte Antigen 1*; GlyCAM-1, *Glycan-bearing Cell Adhesion Molecule 1*; HEV, *High Endothelial Venule*; ICAM-1, *IntraCellular Adhesion Molecule 1*; IL-1, *Interleukin-1*; LFA-1, *Leukocyte Function-associated Antigen 1*; MadCAM-1, *Mucosal Addressin Cell Adhesion Molecule 1*; PNAd, *Peripheral Node Addressin*; PSGL-1, *P-Selectin Glycoprotein Ligand 1*; TNF, *Tumor Necrosis Factor*; VCAM-1, *Vascular Cell Adhesion Molecule 1*; VLA-4, *Very Late Antigen 4*.

Summary del processo di reclutamento leucocitario



(anche DC e altre cellule residenti nei tessuti)

Ricircolazione linfociti T



- Migrazione dei linfociti **T naïve** ai linfonodi tramite il circolo ematico
- Fuoriuscita dei linfociti **T naïve** dai linfonodi tramite il circolo linfatico
- Migrazione dei linfociti **T effettori** nei tessuti
- Migrazione linfociti **T memoria**

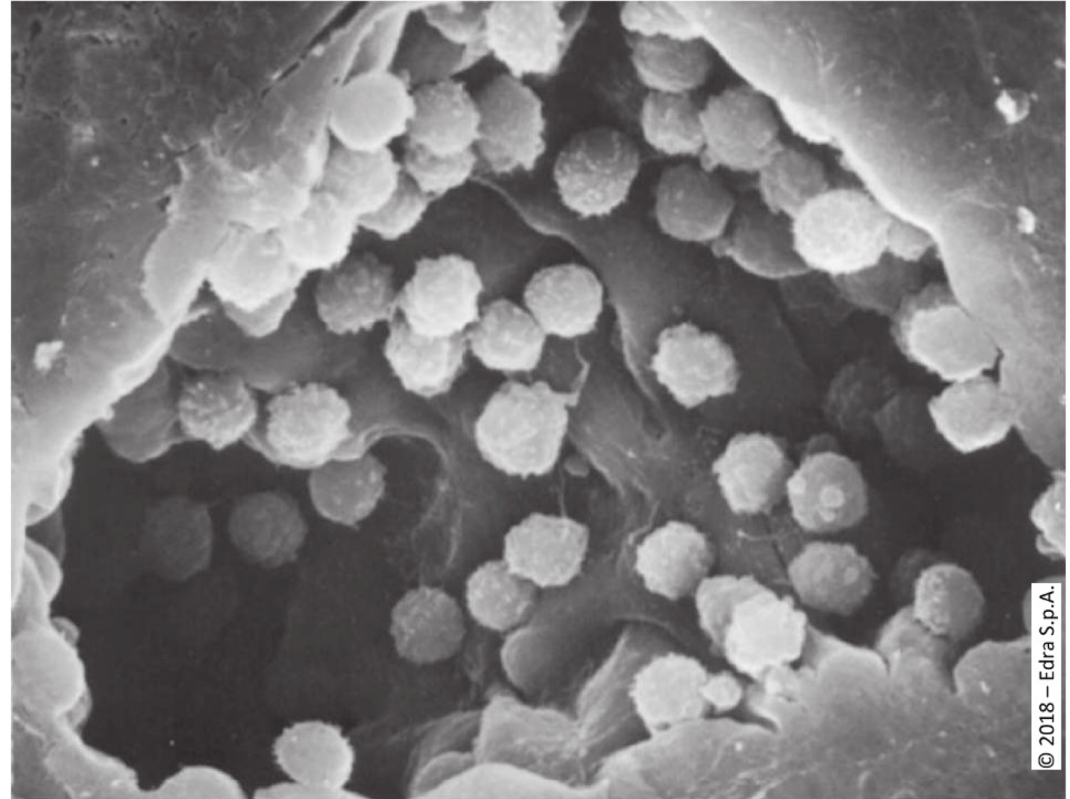
Migrazione linfociti T naïve (CD45RA) nei linfonodi

- Afflusso di **25 x10⁹** al giorno/linfonodo: ogni linfocita T naïve effettua almeno un passaggio al giorno nello stesso linfonodo.
- La ricircolazione dei linfociti T naïve tra sangue e linfonodi aumenta la probabilità che questi incontrino l'antigene e si attivino.
- In seguito ad un processo infiammatorio l'aumento del flusso sanguigno aumenta l'afflusso di linfociti T nel linfonodo ove permangono.
- Gli antigeni si concentrano nei linfonodi dove vengono presentati ai linfociti T naïve dalle cellule presentanti l'antigene o APC (cellule dendritiche).

Venule ad endotelio alto (HEV)

Legame linfociti T alle HEV: immagine al microscopio elettronico

- Sito attraverso il quale i linfociti T naïve, lasciato il flusso sanguigno, entrano nello stroma del **linfonodo**.
- HEV sono presenti in tutti i tessuti linfoidei, anche nel MALT (es. placche di Peyer) ma **non nella milza**.
- Cellule endoteliali rigonfie e non piatte come quelle degli altri vasi e prive di giunzioni strette.
- Espressione dei **ligandi di L-selectina** (espressa sui linfociti), **molecole di adesione e chemochine** che permettono l'attraversamento solo di alcune popolazioni linfocitarie
- La migrazione avviene sempre attraverso, **rolling, adesione e transmigrazione**.



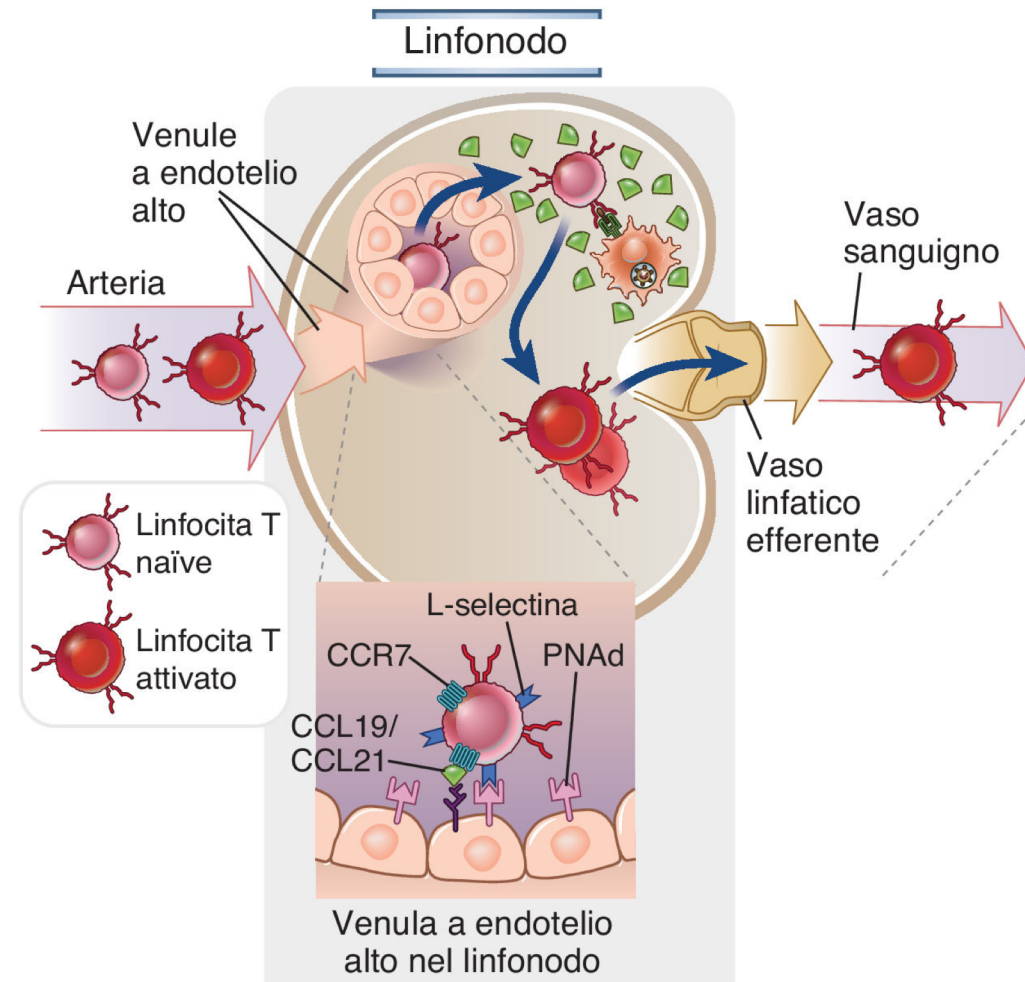
Molecole importanti per la migrazione dei linfociti T nei linfonodi

Rolling: **L-selectina (CD62L)** dei linfociti T lega i suoi ligandi che sono sialomucine (peripheral node addressin d, PNAd) sulle **HEV**

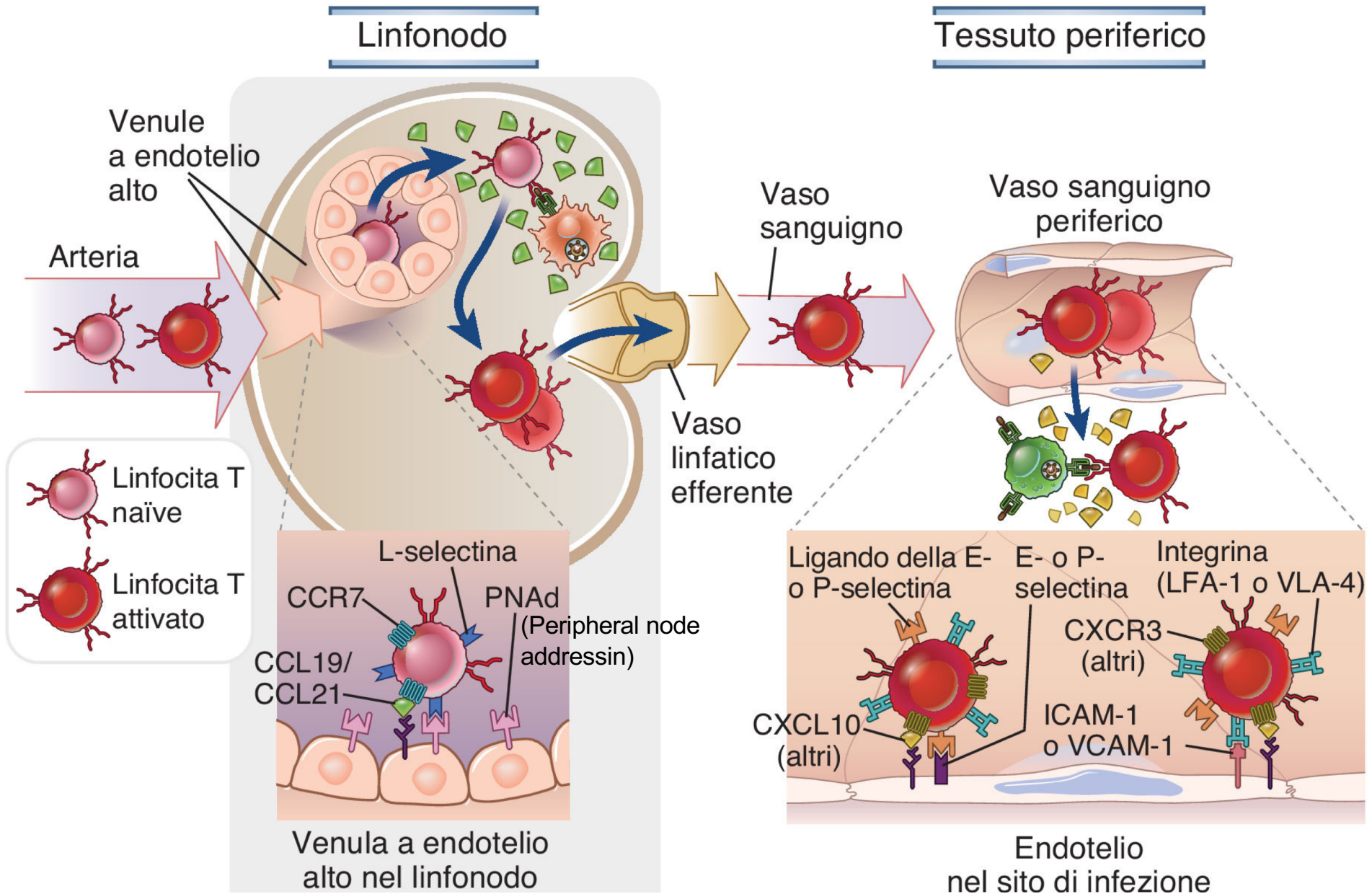
Adesione: **LFA-1** presente sui linfociti lega **ICAM-1** sulle **HEV** (adesione aumentata dalle chemochine)

Chemochine: **CCL19** e **CCL21** associate ai glicosaminoglicani e prodotte sia dalle HEV sia da altri tipi cellulari (fibroblasti reticolari **aree T del linfonodo**) legano il **CCR7** espresso sui linfociti T naïve

Extravasazione: migrazione nel linfonodo attraverso le giunzioni tra le cellule endoteliali

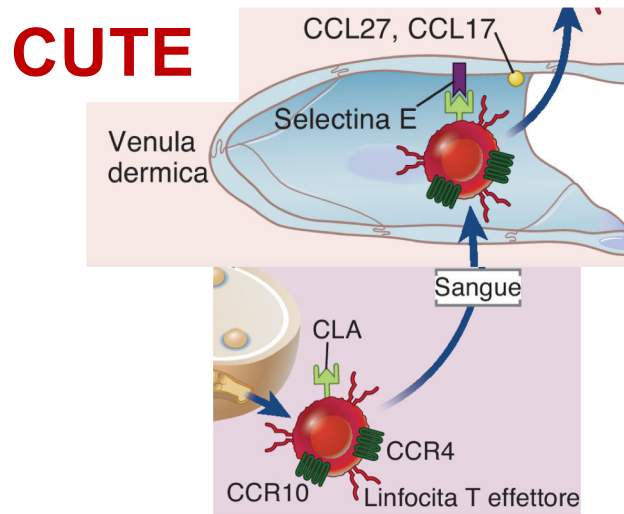


Molecole coinvolte nella migrazione dei linfociti T naïve ed effettori



Migrazione linfociti T effettori (CD45RO)

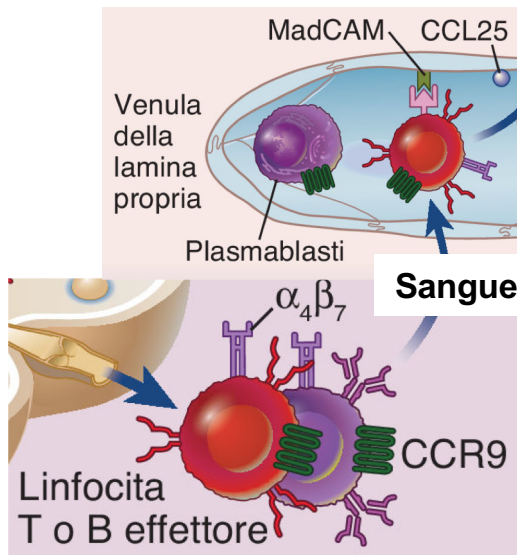
- Down-regolano L-selectina ed esprimono ligandi per E- e P-selectine
- Down-regolano CCR7 ed esprimono recettori (es. CXCR3, CCR4, CCR5, CCR9) per chemochine prodotte nei tessuti infiammati



Linfociti T effettori → homing nella cute esprimono:

- CLA-1 ligando della E-selectina
- CCR4 ligando di CCL17
- CCR10 ligando di CCL27




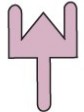


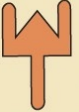







INTESTINO



Linfociti T effettori → homing nell'intestino esprimono:

- integrina $\alpha_4\beta_7$ (ligando di MadCAM-1)
- CCR9 ligando di CCL25

Molecole coinvolte nella migrazione dei linfociti T naïve ed effettori

Recettore di homing dei linfociti T	Ligando sulla cellula endoteliale	Funzione dell'interazione recettore: ligando
<p>Linfociti T naïve</p> <p> L-selectina</p> <hr/> <p> CCR7</p> <hr/> <p> LFA-1 (β2-integrina)</p>	<p> Ligando della L-selectina</p> <hr/> <p> CCL19 o CCL21</p> <hr/> <p> ICAM-1</p>	<p>Adesione iniziale debole dei linfociti T naïve alle venule a endotelio alto nel linfonodo</p> <hr/> <p>Attivazione delle integrine e chemotassi</p> <hr/> <p>Arresto sulle cellule a endotelio alto nel linfonodo</p>
<p>Linfociti T attivati (effettori e della memoria)</p> <p> Ligando della E- e P-selectina</p> <hr/> <p> CXCR3</p> <hr/> <p> CCR5</p> <hr/> <p> LFA-1 (β2-integrina) o VLA-4 (β1-integrina)</p>	<p> E- e P-selectina</p> <hr/> <p> CXCL10 (altri)</p> <hr/> <p> CCL4 (altri)</p> <hr/> <p> ICAM-1 o VCAM-1</p>	<p>Adesione iniziale debole dei linfociti T effettori e della memoria all'endotelio attivato dalle citochine nel sito periferico di infezione</p> <hr/> <p>Attivazione di integrine e chemochine</p> <hr/> <p>Attivazione di integrine e chemochine</p> <hr/> <p>Arresto saldo su endotelio attivato da citochine nei siti di infezione</p>

Migrazione linfociti B

- I linfociti B naïve usano gli stessi meccanismi dei T naïve per andare negli organi linfoidi
- Lasciato il **midollo osseo** entrano nella polpa rossa della **milza**, poi localizzano nella polpa bianca grazie alla chemochina **CXCL13** che lega **CXCR5** espresso sui linfociti B (linfociti B follicolari) e completano la maturazione.
- Dalla milza attraverso il circolo ematico arrivano negli altri **linfonodi** tramite le **HEV**
- Le **plasmacellule** (linfociti B secernenti anticorpi) dai linfonodi si versano nel circolo ematico per andare nei tessuti o nel midollo osseo
- Alcuni **linfociti B secernenti IgG** vanno nel **midollo** ed esprimono:
VLA-4 che lega **VCAM-1***
CXCR4 ligando di **CXCL12***
(*le cellule endoteliali dei sinusoidi del midollo ne esprimono alti livelli)
Dal midollo possono migrare in tutti i tessuti dell'organismo e raggiungono i siti di infiammazione grazie **VLA-4** e **CXCR3** ligando di **CXCL10**)
- **Linfociti B secernenti IgA** sono principalmente localizzati nei **tessuti linfoidi** associati alle **mucose** ed esprimono:
 $\alpha_4\beta_7$ che lega **MadCAM-1**
CCR9 che lega **CCL25**

Migrazione linfociti B

