

Sequenza di eventi in una reazione infiammatoria

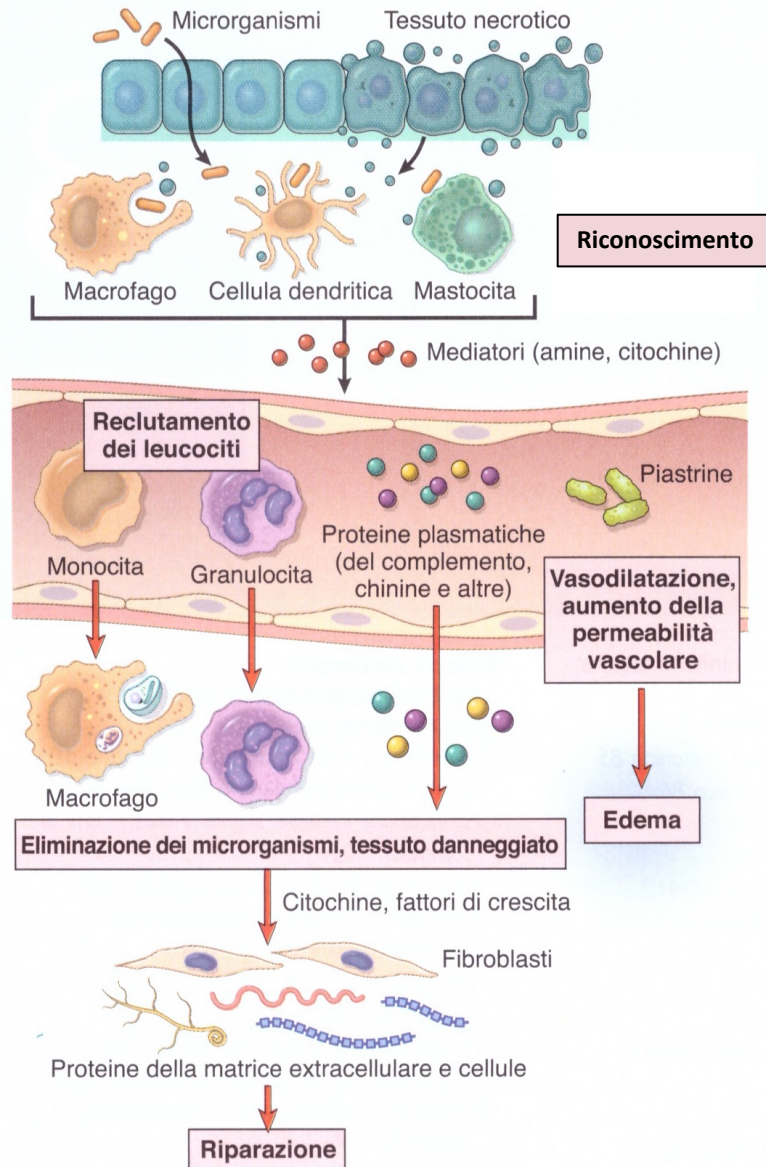


Figura 3.1 Sequenza di eventi in una reazione infiammatoria. Le cellule sentinella presenti nei tessuti (macrofagi, cellule dendritiche, e altre) liberano i mediatori che attivano le reazioni vascolari e cellulari dell'infiammazione in seguito al riconoscimento di microrganismi e cellule danneggiate.

Sequenza di eventi della reazione infiammatoria:

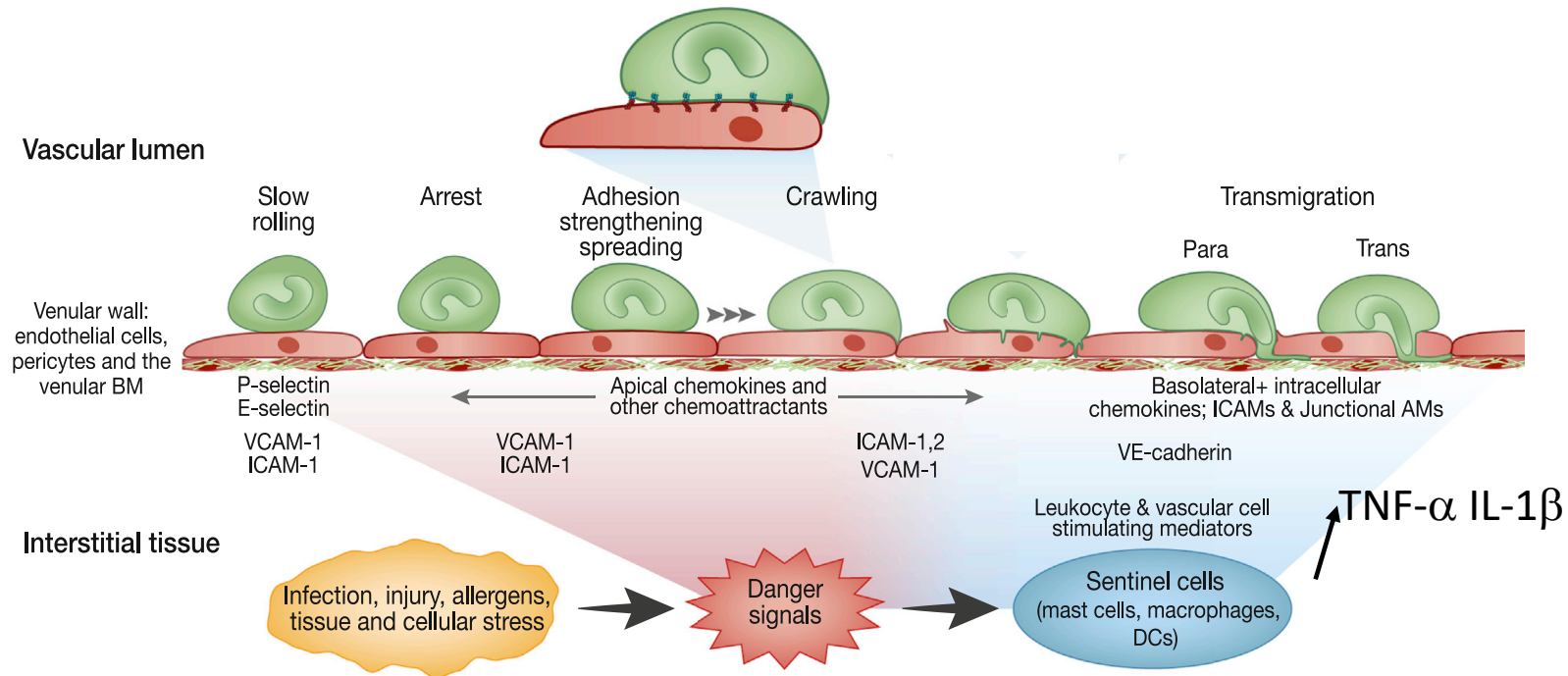
Riconoscimento: le cellule residenti nei tessuti quali mastociti, macrofagi e cellule dendritiche in seguito al riconoscimento dell'agente flogogeno (prodotti microbici, detriti cellulari) da parte di recettori producono mediatori (molecole vasoattive e citochine) che favoriscono le fasi successive del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

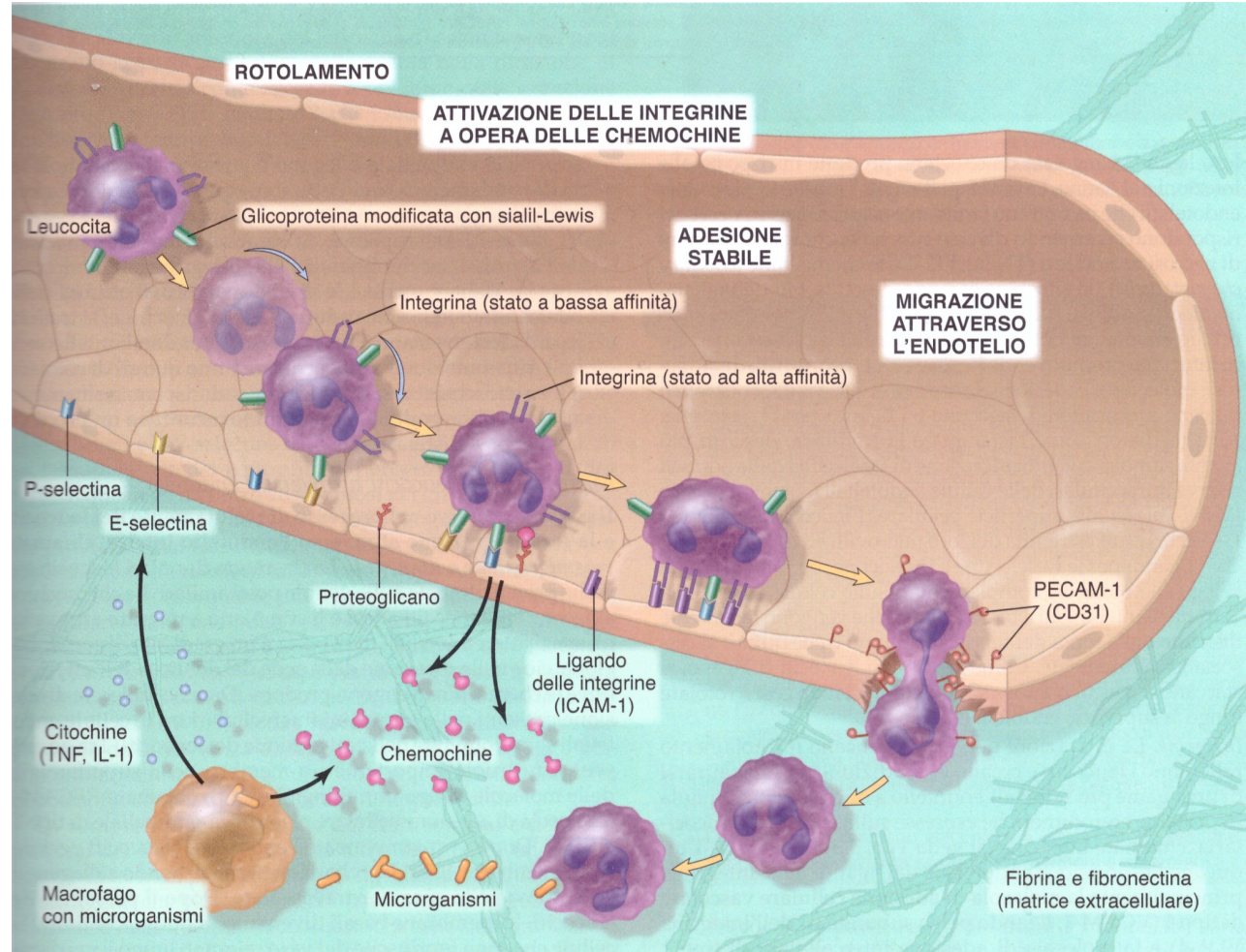
Interazioni fra i leucociti e le cellule endoteliali nell'inflammazione



Una funzione principale dell'inflammation 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.

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. In particolare le citochine quali il TNF- α e l'IL-1 β inducono l'espressione di molecole di adesione (selettine e ligandi delle integrine) sulla superficie delle cellule endoteliali. Questo permette ai leucociti di rilevare la presenza delle modificazioni dell'endotelio nelle regioni in cui è presente lo stimolo flogogeno.

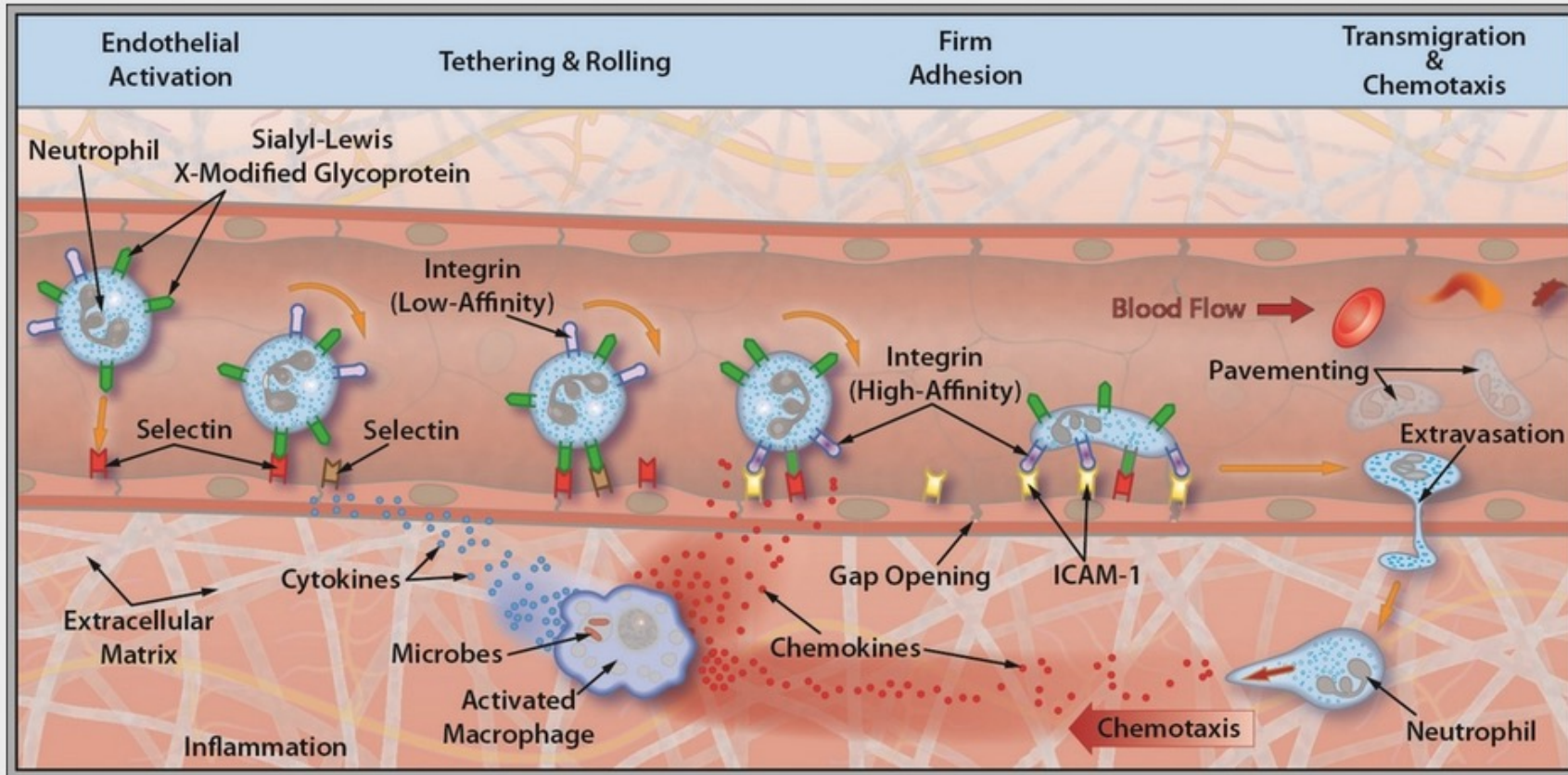
Reclutamento dei leucociti nelle sedi dove è presente lo stimolo lesivo



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

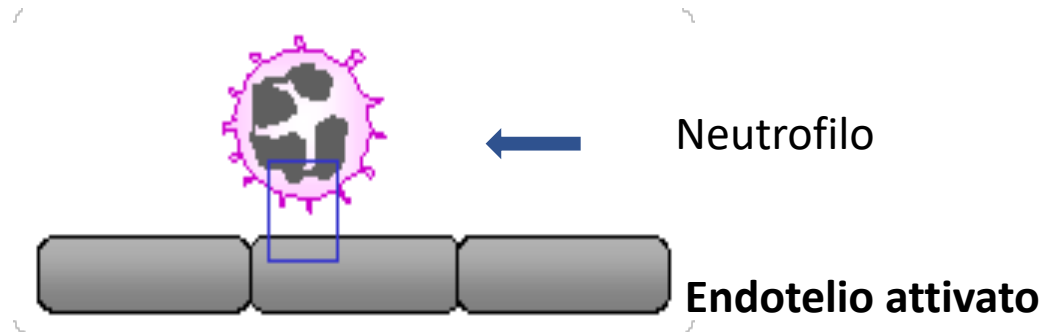
- i) La marginazione, il rotolamento e l'adesione dei leucociti all'endotelio.
- ii) Il passaggio attraverso l'endotelio
- iii) Migrazione nei tessuti interstiziali

Extravasazione dei leucociti



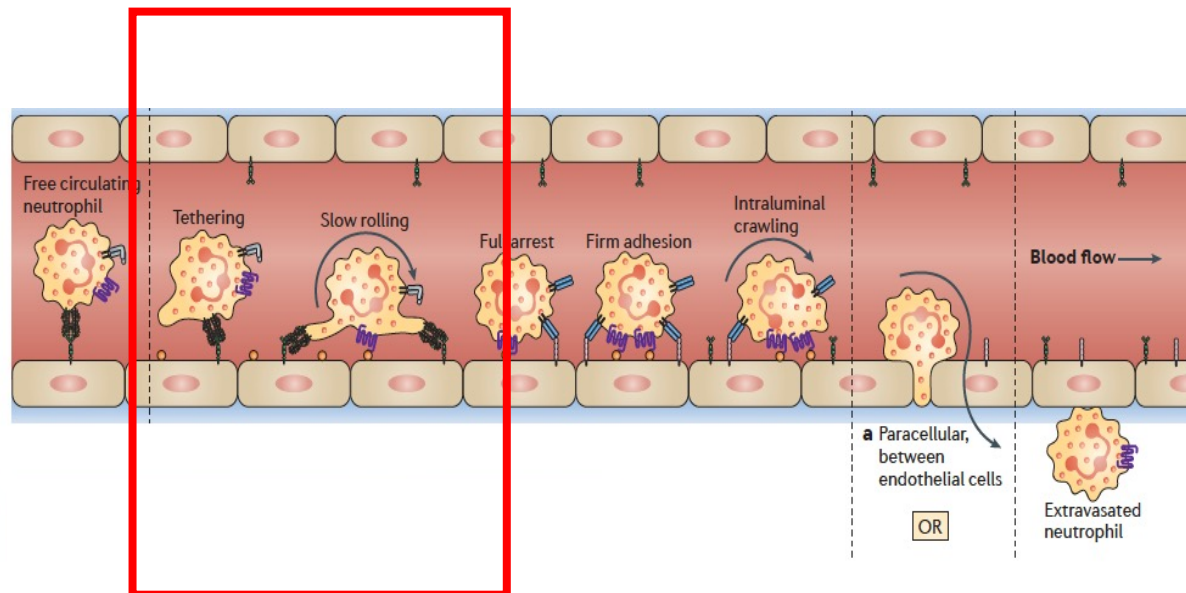
Il reclutamento dei neutrofili nel tessuto, è un processo multi-fasico in cui i neutrofili sono inizialmente catturati sulla superficie delle cellule endoteliali promuovendo il **rotolamento** dei neutrofili sull'endotelio. Successivamente la stimolazione dei neutrofili da parte delle chemochine presenti nel lume del vaso causa l'attivazione delle integrine favorendo l'adesione forte e l'arresto del neutrofilo sulla superficie dell'endotelio.

Tethering del leucocita all'endotelio

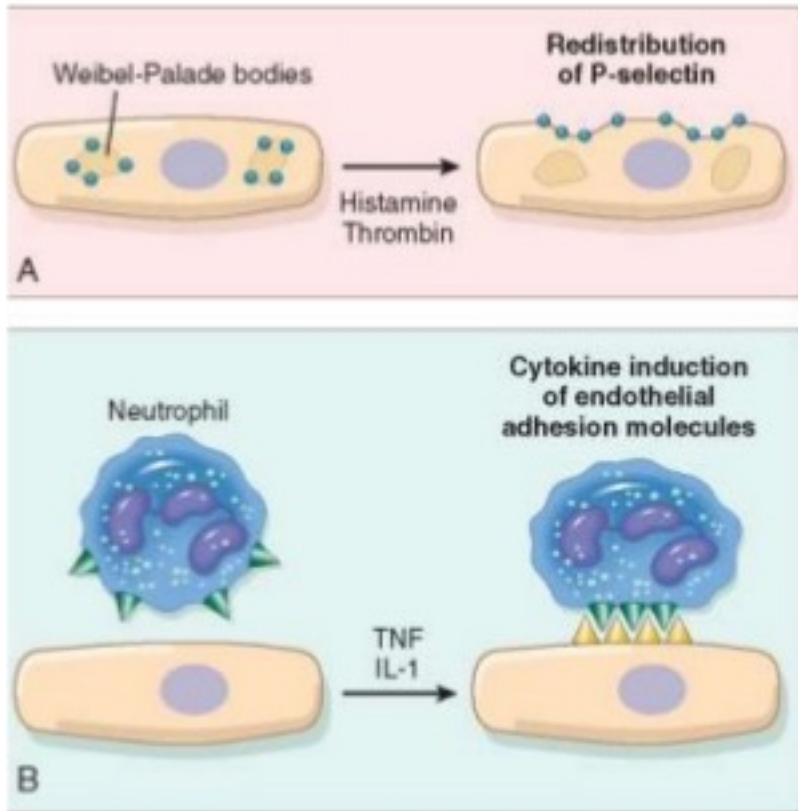


Il processo noto come cattura o “tethering” rappresenta il primo contatto di un leucocita con l’endotelio attivato. La cattura avviene dopo la marginazione che sposta il leucocita in una posizione vicina all’endotelio, lontano dal flusso ematico. Per iniziare la risposta infiammatoria, è necessaria **l’attivazione 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 (P-selectin glycoprotein ligand-1).



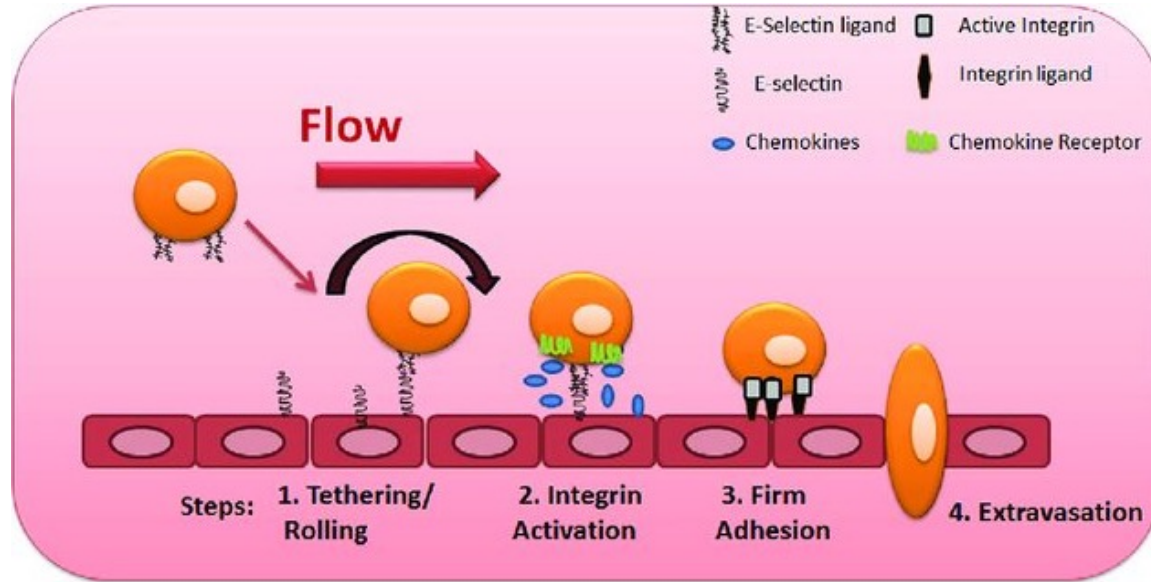
Il processo di extravasazione necessita dell'attivazione dell'endotelio



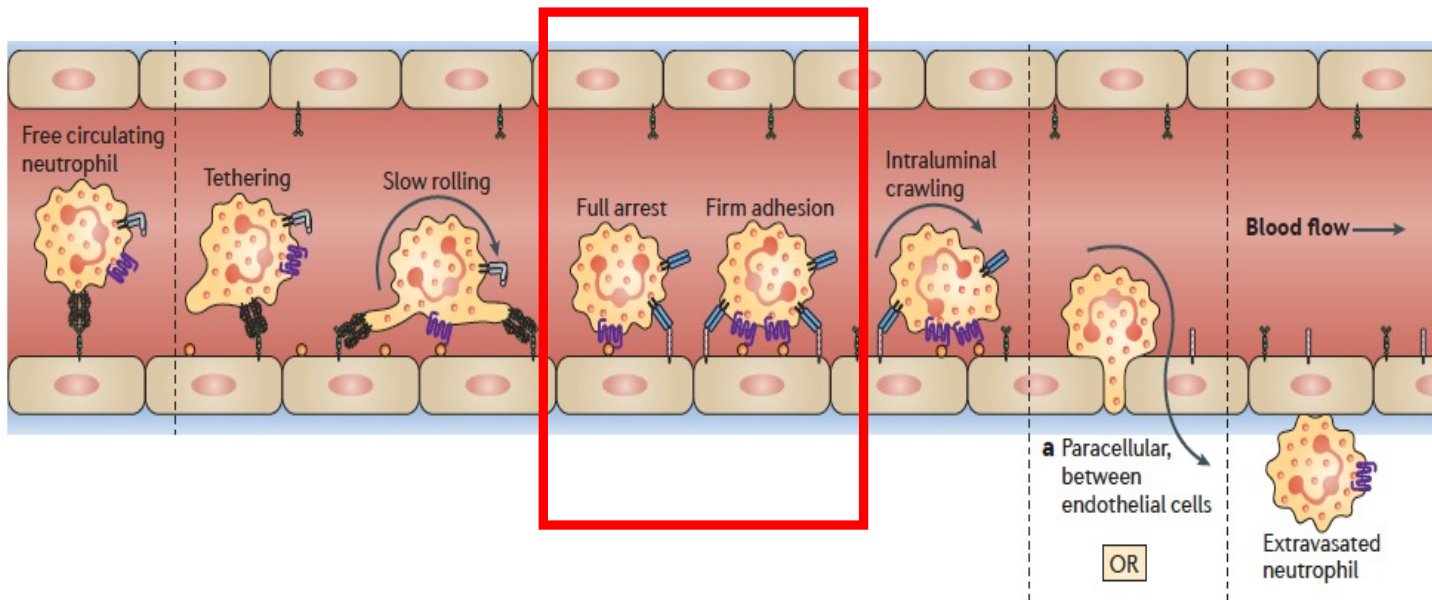
In seguito ad attivazione l'endotelio esprime le P- e le E-selettine.

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

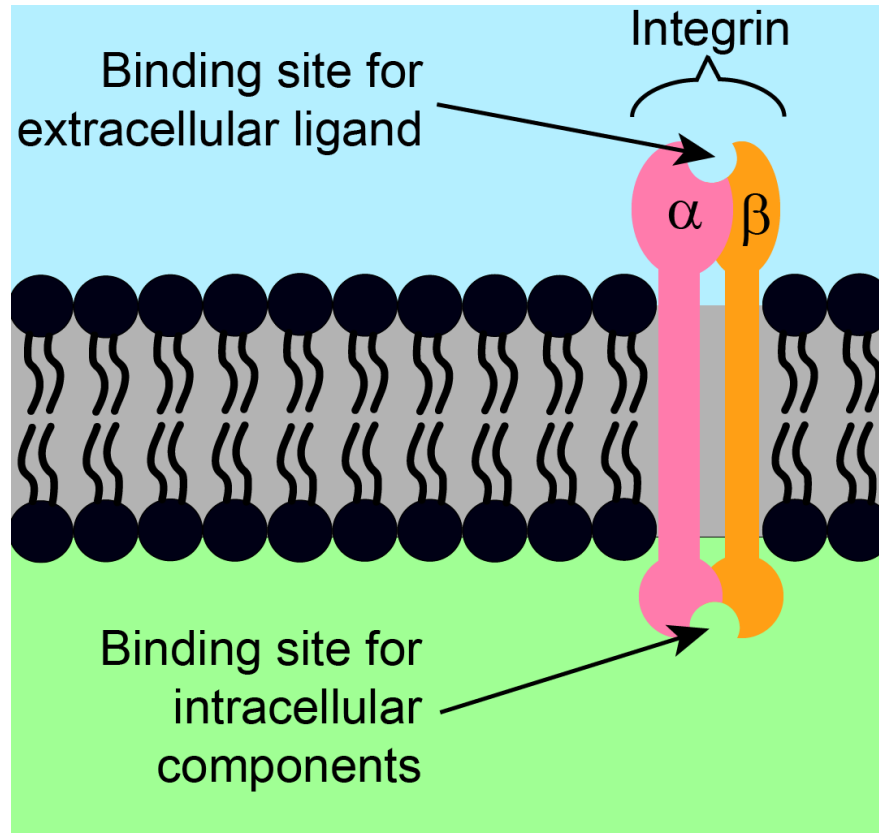
Arresto e adesione forte dei leucociti all'endotelio



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 8 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

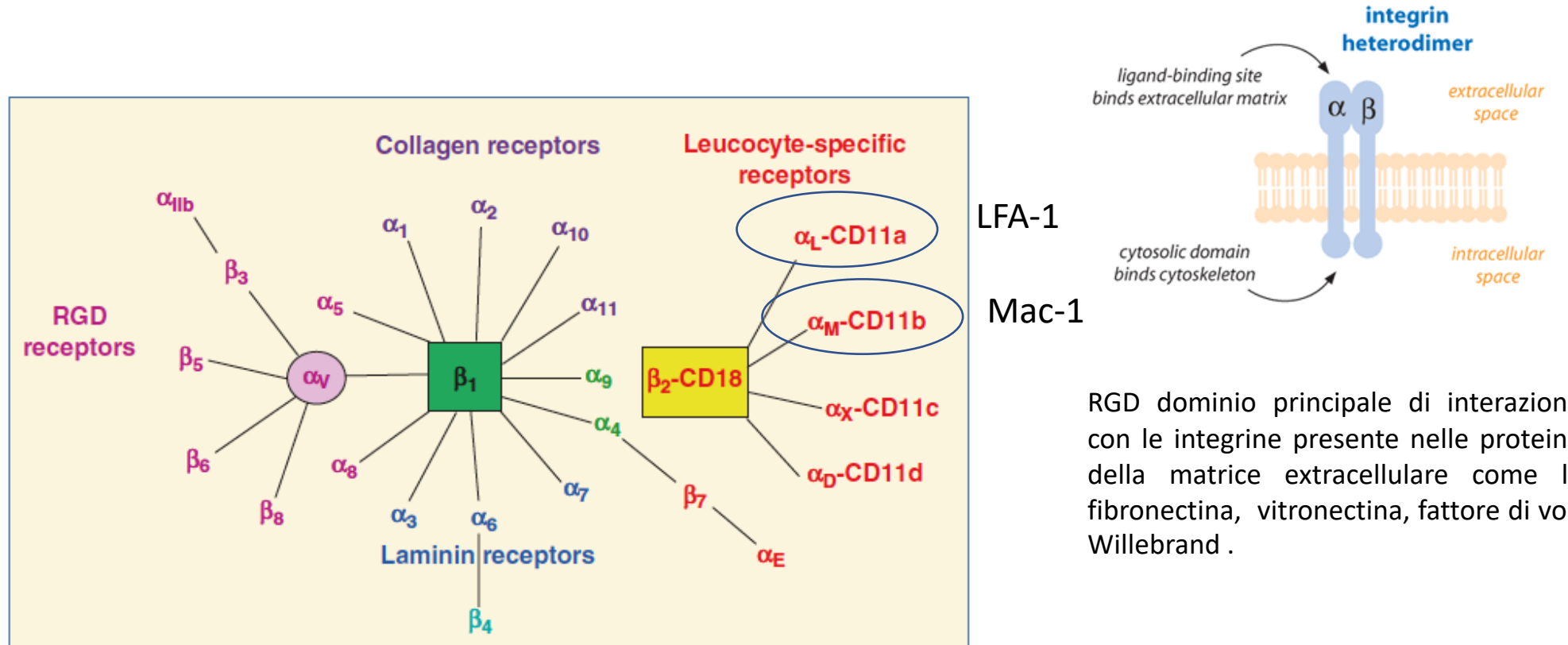


Fig. 1 Classification of integrin family. Integrin heterodimers consists of numerous combinations of α and β subunits. With respect to ligand specificity, integrins are generally classified as collagen-binding integrins ($\alpha_1\beta_1$, $\alpha_2\beta_1$, $\alpha_{10}\beta_1$, and $\alpha_{11}\beta_1$), 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.

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

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

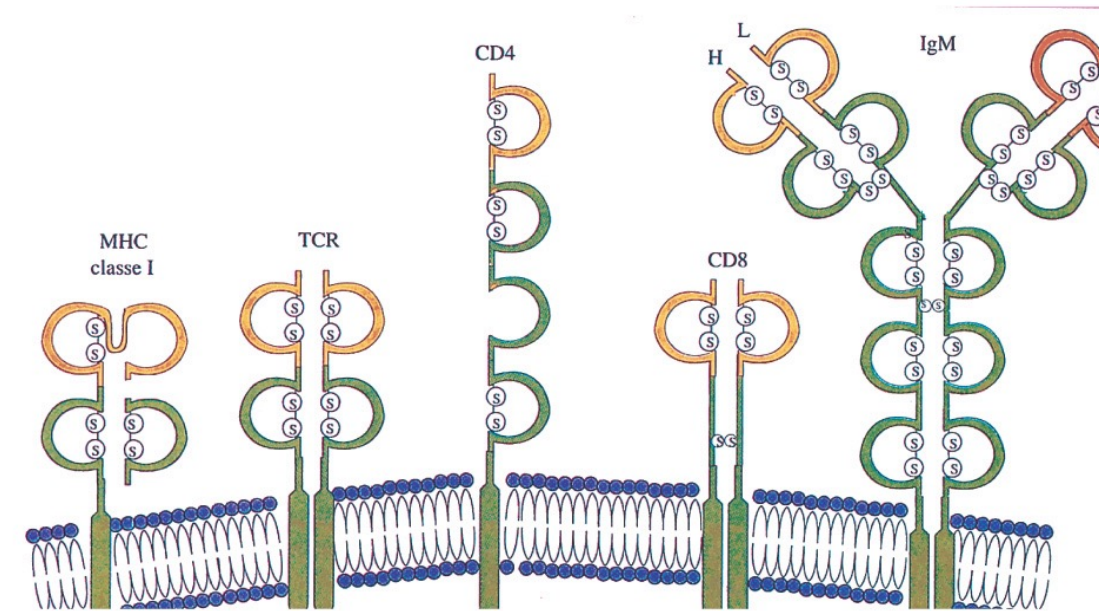
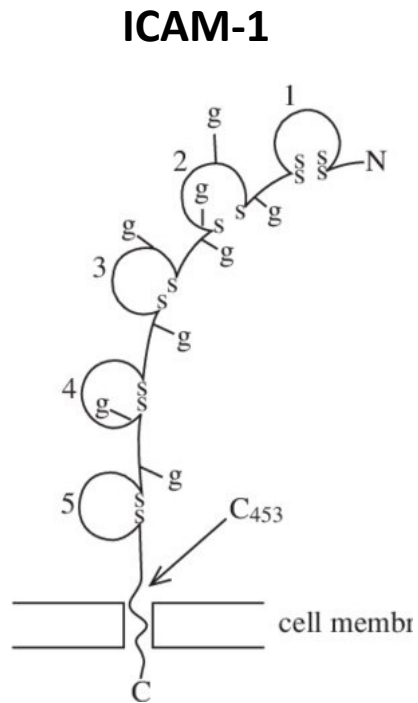


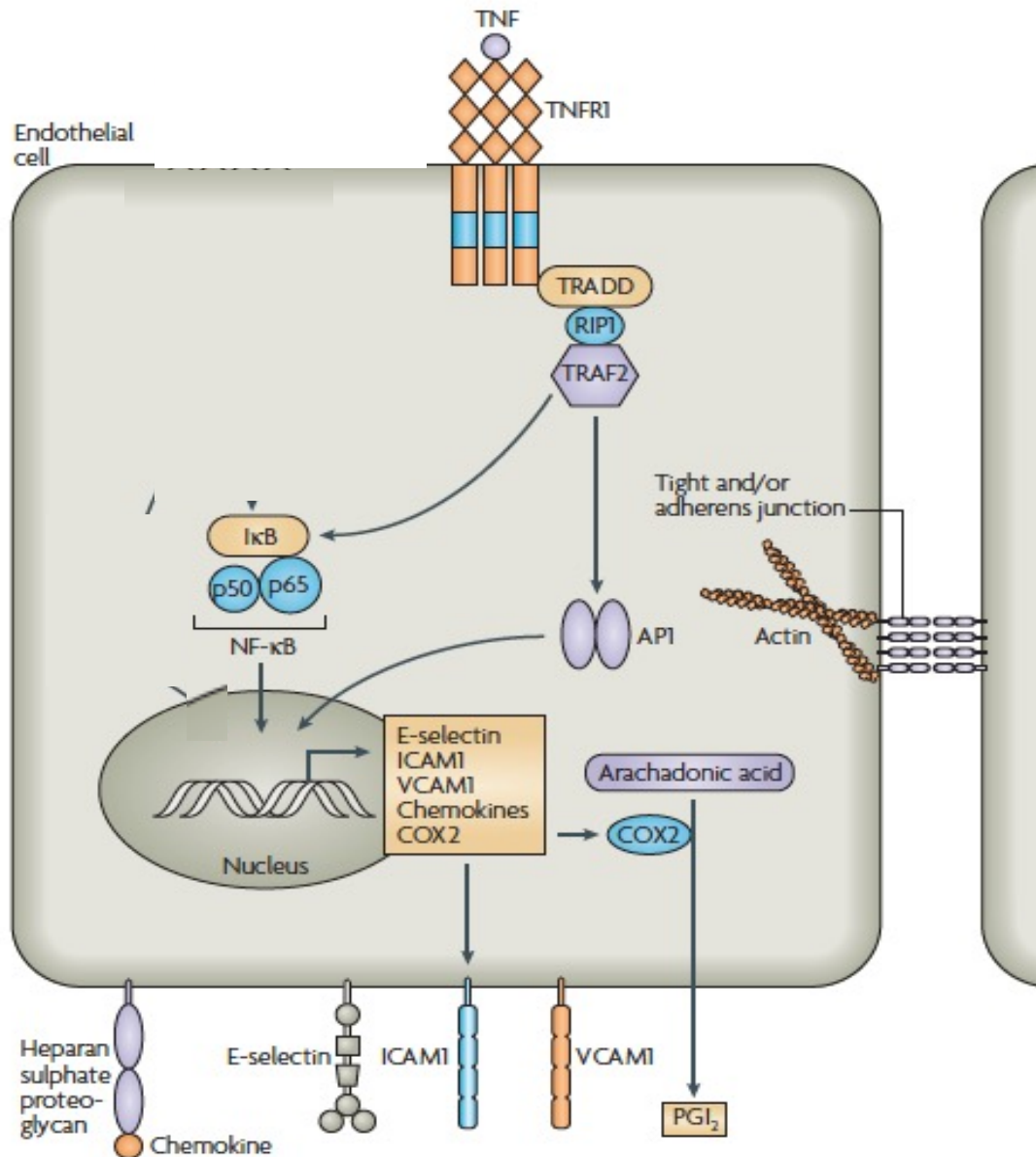
FIGURA 4-4. Somiglianza strutturale di base di alcune molecole della 'superfamiglia delle Immunoglobuline'. In giallo i domini variabili la cui diversità - nelle Ig e nel TCR - è il risultato del riarrangiamento dei rispettivi segmenti genici; in verde i domini e i segmenti polipeptidici costanti.

Le molecole di adesione ICAM-1 e ICAM-2 sono i ligandi delle integrine LFA1 e Mac-1 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 $TNF-\alpha$ e $IL-1\beta$. L'espressione di ICAM-2 è costitutiva sulle cellule endoteliali.

Attivazione dell'endotelio mediata dal TNF- α

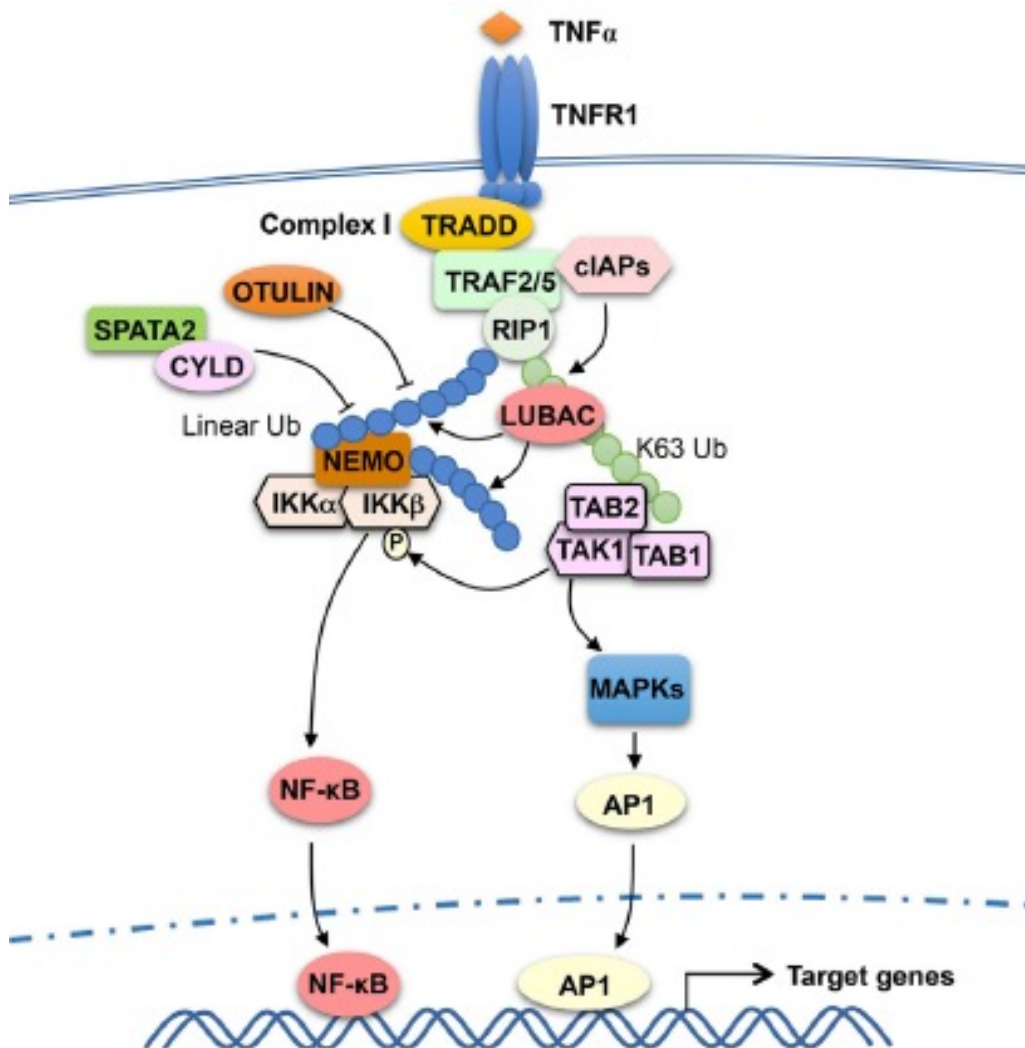


L'attivazione protratta nel tempo dell'endotelio richiede l'azione di citochine quali il TNF- α e l'IL-1 β .

Tali citochine inducono l'espressione di E-selettina, ICAM1, VCAM chemochine quali l'IL-8 e COX2. COX-2 media la sintesi delle prostaglandine. L'espressione di tali molecole dipende dai fattori trascrizionali NF- κ B e AP-1.

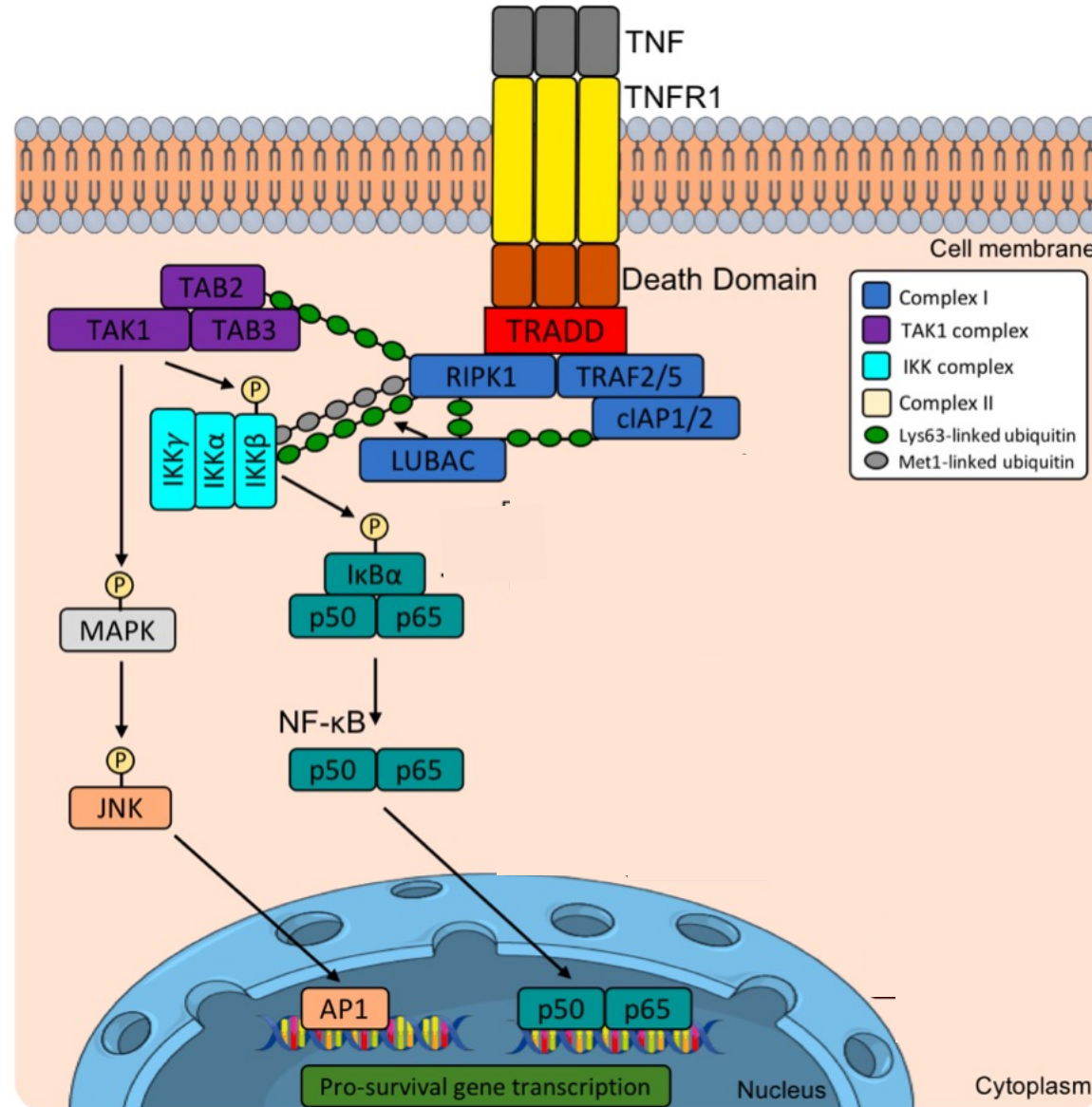
La segnalazione inviata dai recettori associati alle proteine G (es. recettore per l'istamina) ha una durata breve di circa 10-20 minuti).

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)

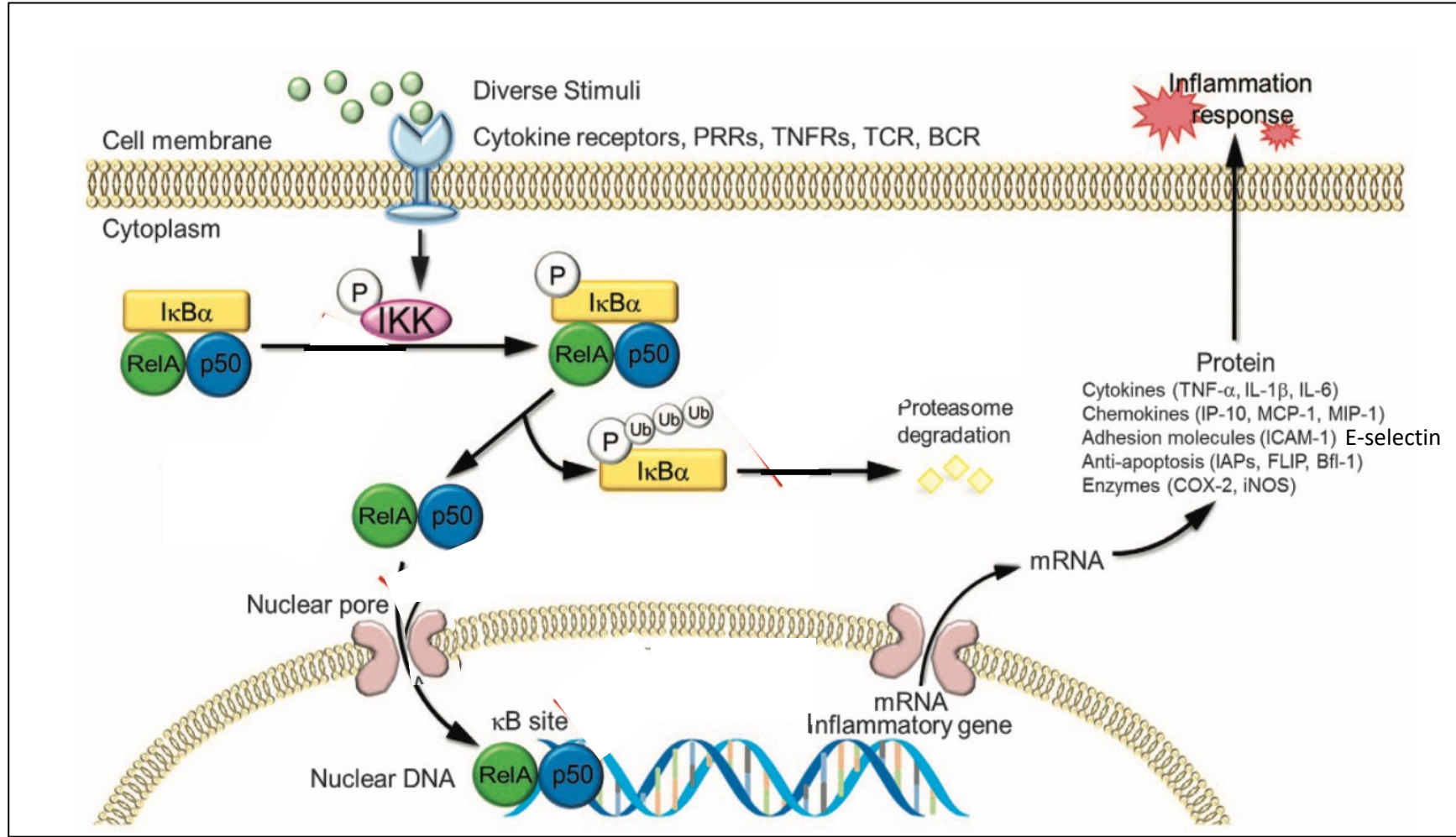


In seguito al legame con il TNF- α il recettore interagisce con l'adattatore TRADD che a sua volta forma un complesso con la chinasi RIPK1, le molecole associate a TRAF TRAF2/5 e le molecole cIAP (complesso I).

Le cIAP con LUBAC (linear ubiquitin chain assembly complex) ubiquitinano RIPK1 stabilizzandola.

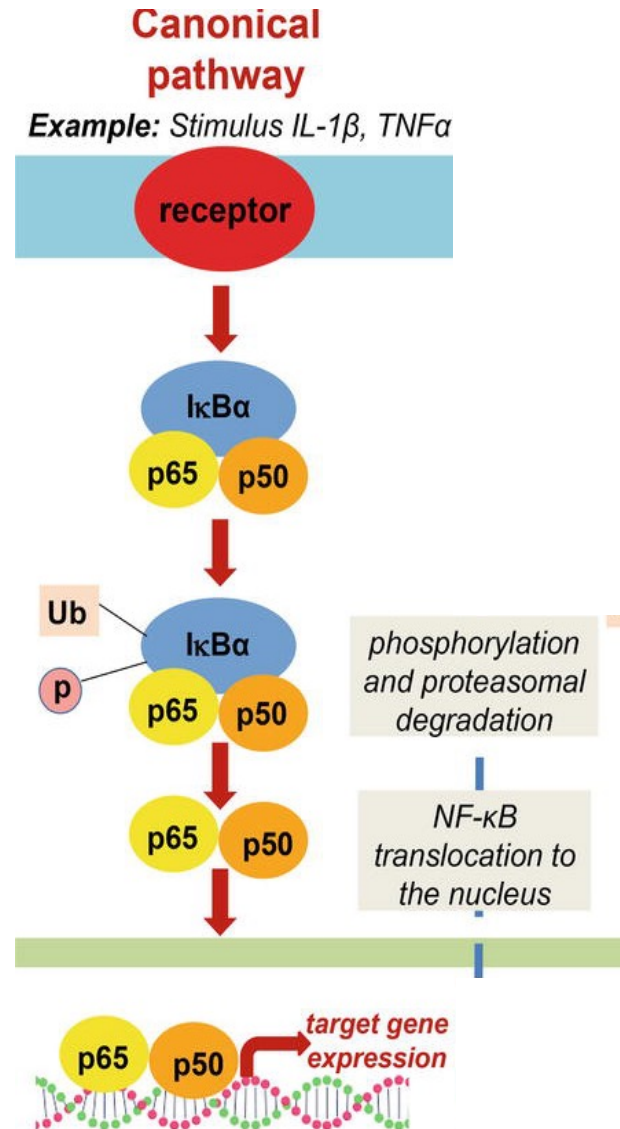
RIPK1 recluta la chinasi TAK1 (TGF-beta activated kinase 1) che attiva l'I κ B kinase complex (IKK) e la via delle MAP kinasi.

Attivazione canonica di NF- κ B



Il fattore nucleare- κ B (NF- κ B) rappresenta una famiglia di fattori di trascrizione inducibili (p50, p52, p65, RelB e c-Rel) che regolano geni coinvolti nella risposta infiammatoria. 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



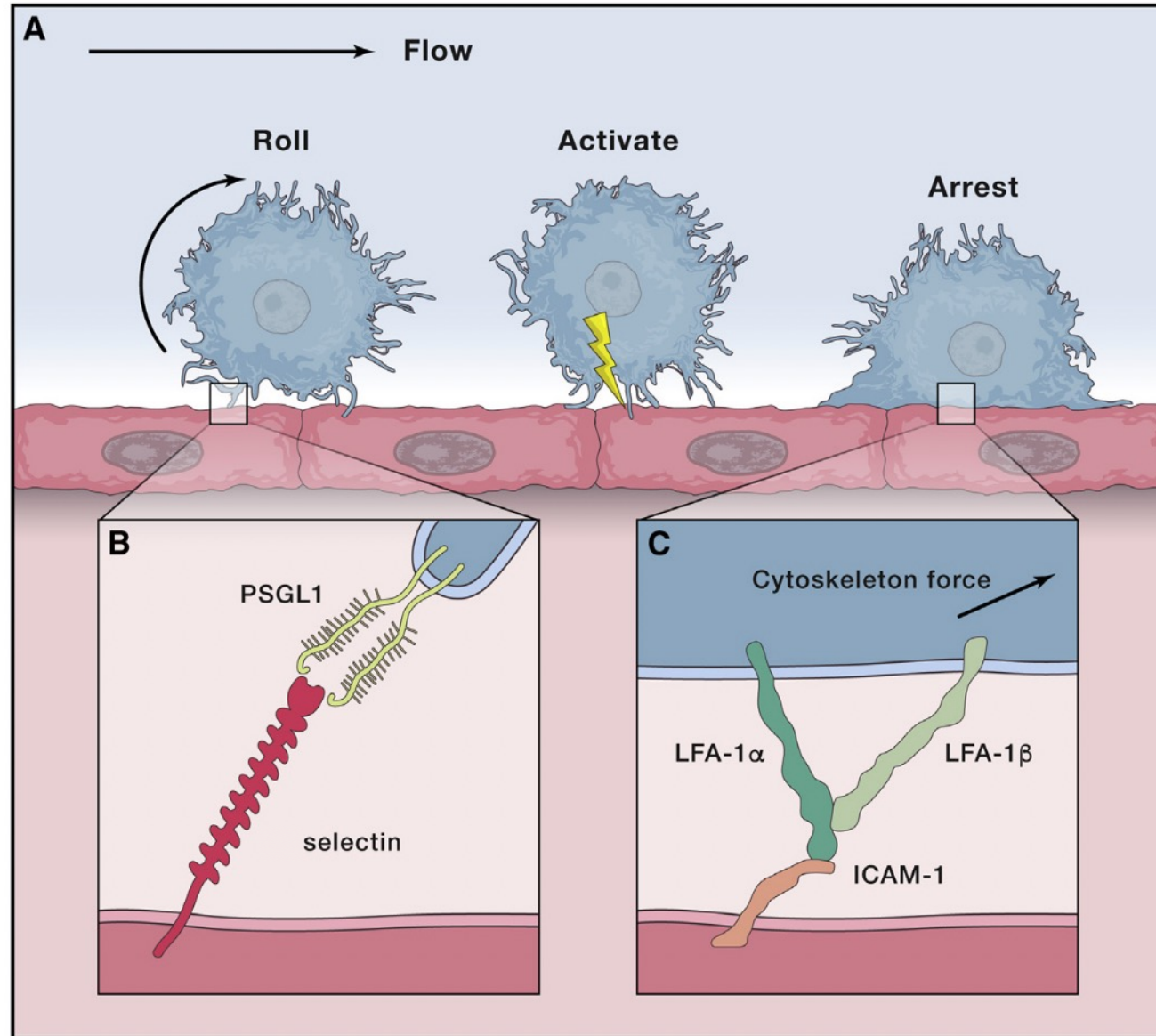
Il complesso IKK è costituito da due subunità catalitiche, le chinasi IKK α e IKK β e da una subunità a funzione regolatoria IKK γ (NEMO).

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.

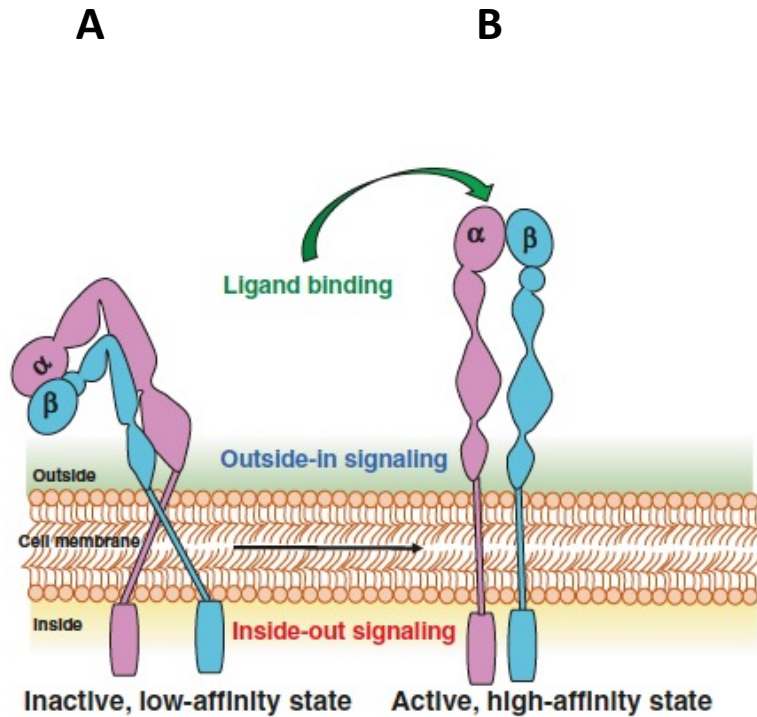
Tabella 3.3 Molecole di adesione endoteliale e leucocitaria

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)

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



Attivazione delle integrine

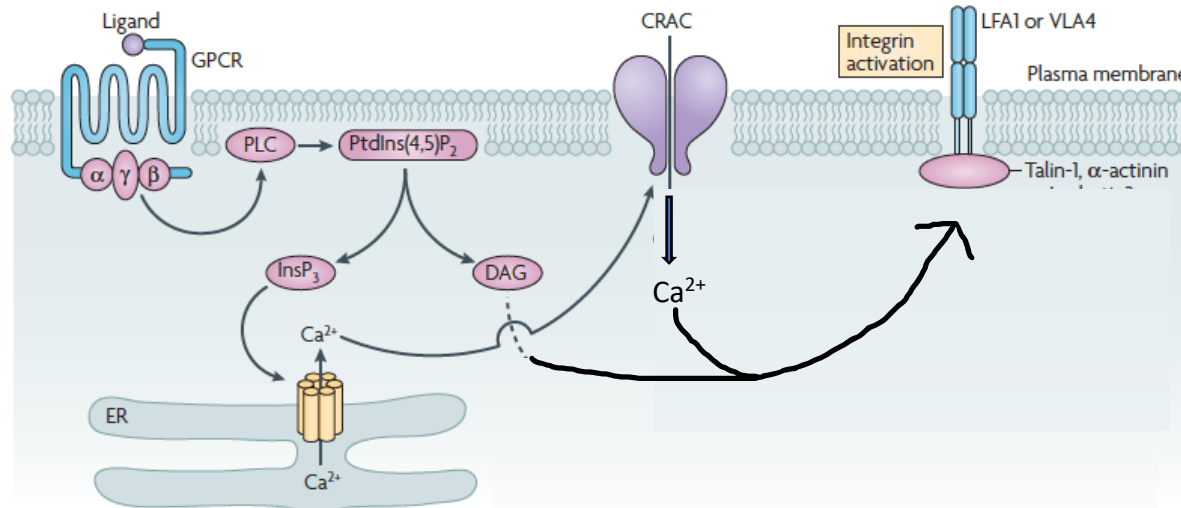
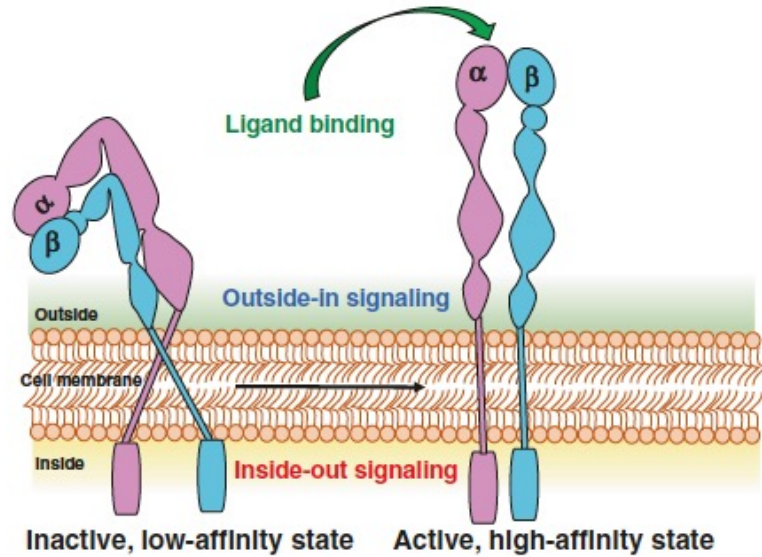


Le integrine nel leucocita non attivato sono presenti in una forma in grado di legare con bassa affinità i loro ligandi (low affinity state).

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

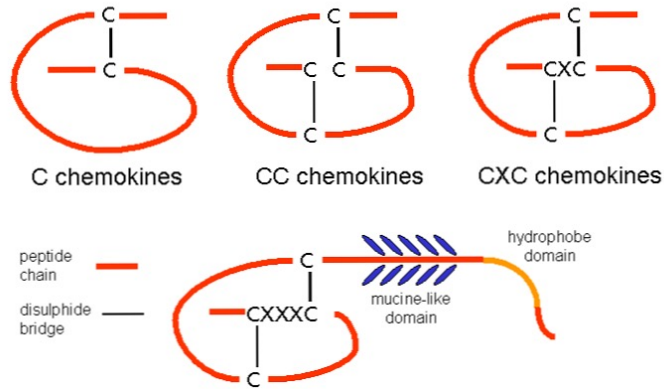


L'interazione delle **chemochine** con il recettore espresso dal leucocita induce un rapido cambiamento di conformazione dell'integrina definito attivazione dell'integrina «inside-out»

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



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

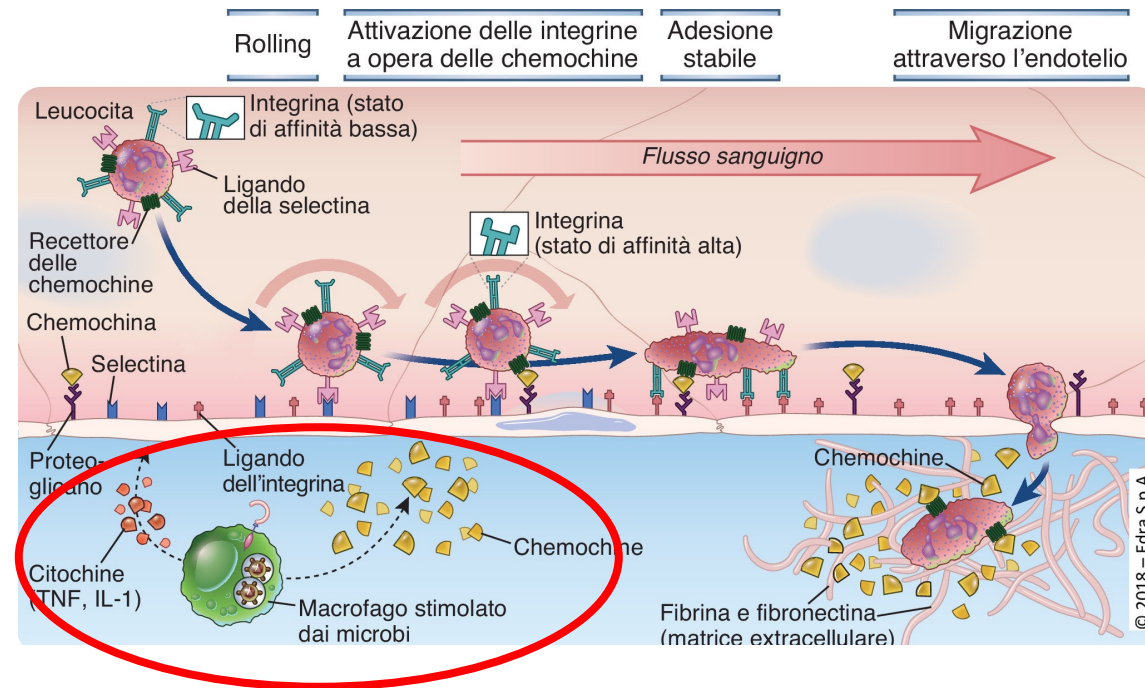
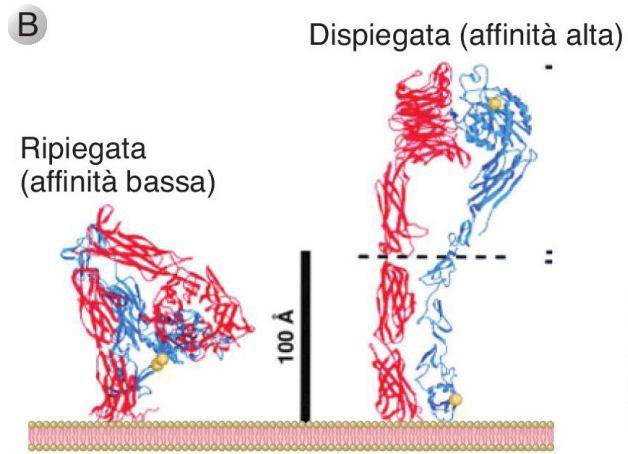
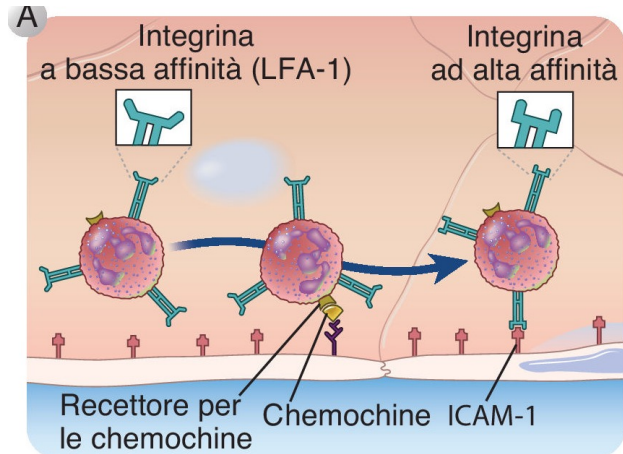
Sono state identificate circa 40 chemochine suddivise in 4 gruppi sulla base del numero e della posizione delle cisteine all'estremità N-terminale.

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.

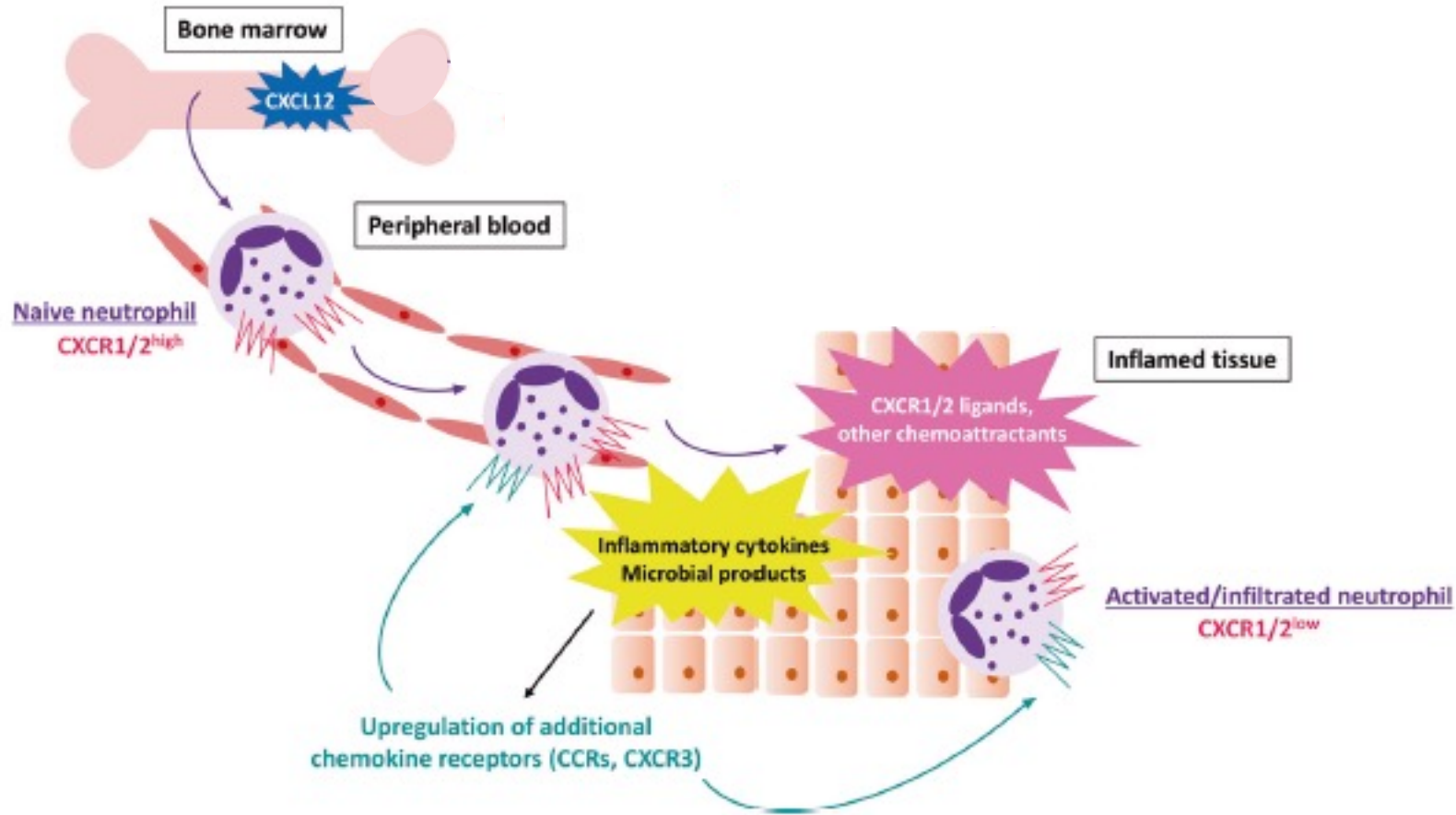
Subfamily	Old nomenclature	New nomenclature	Receptor(s) bound	
CXC	GRO- α , KC ^{a,b} , MIP-2 ^{a,b}	CXCL1	CXCR2	
	GRO- β	CXCL2	CXCR2	
	GRO- γ	CXCL4	CXCR2	
	ENA-78	CXCL5	CXCR1, CXCR2	
	IL-8; CINC ^b	CXCL8	CXCR1, CXCR2	
	Mig	CXCL9	CXCR3	
	IP-10; Crg-2 ^b	CXCL10	CXCR3	
	I-TAC	CXCL11	CXCR3	
	SDF-1	CXCL12	CXCR4	
	MCP-1	CCL2	CCR2	
	MIP-1 α	CCL3	CCR1, CCR5	
	MIP-1 β	CCL4	CCR1, CCR5	
	RANTES	CCL5	CCR1, CCR3, CCR5	
	CC	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

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

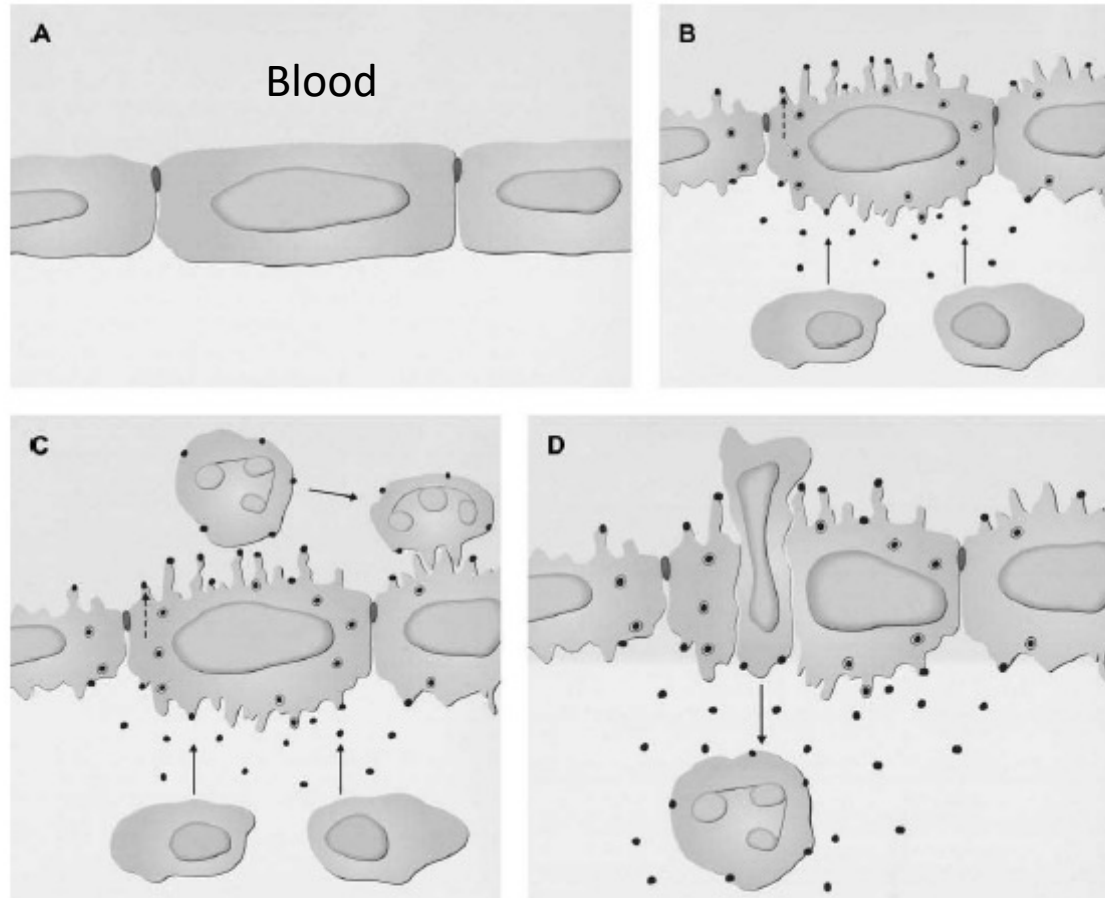


I neutrofili esprimono elevati livelli di CXCR1 e CXCR2 che legano l'IL-8 che rappresenta la principale chemochina coinvolta nel traffico dei neutrofili. L'esposizione prolungata alla chemochina induce la down regolazione del recettore.

Le cellule endoteliali espongono le chemochine prodotte nello spazio extracellulare

Tessuto non infiammato

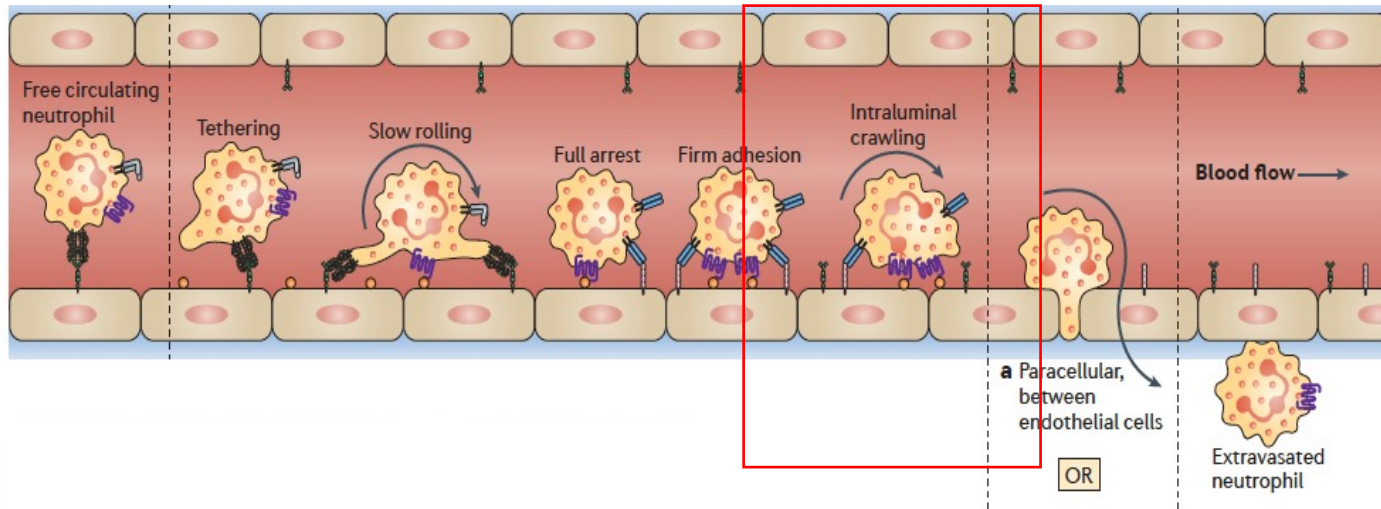
Tessuto infiammato



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.

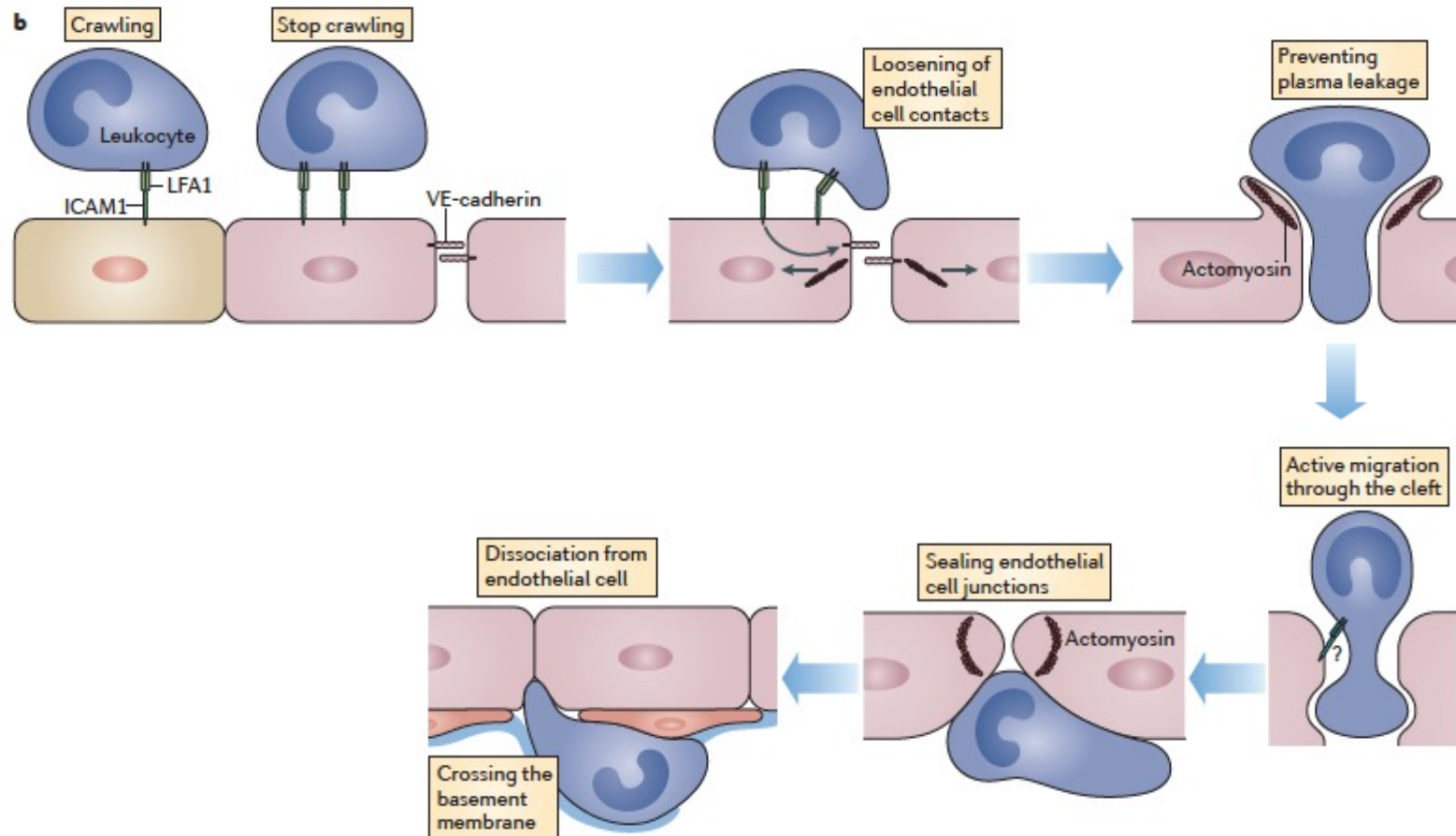
Figure 1. Subcellular events in the endothelium during chemokine-directed leukocyte extravasation. (A) Noninflamed tissue. (B) Inflamed tissue. Release of chemokines from extravascular cells in the tissue occurs (---), and there is wrinkling of the endothelial cell surface. Chemokines are taken up at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

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

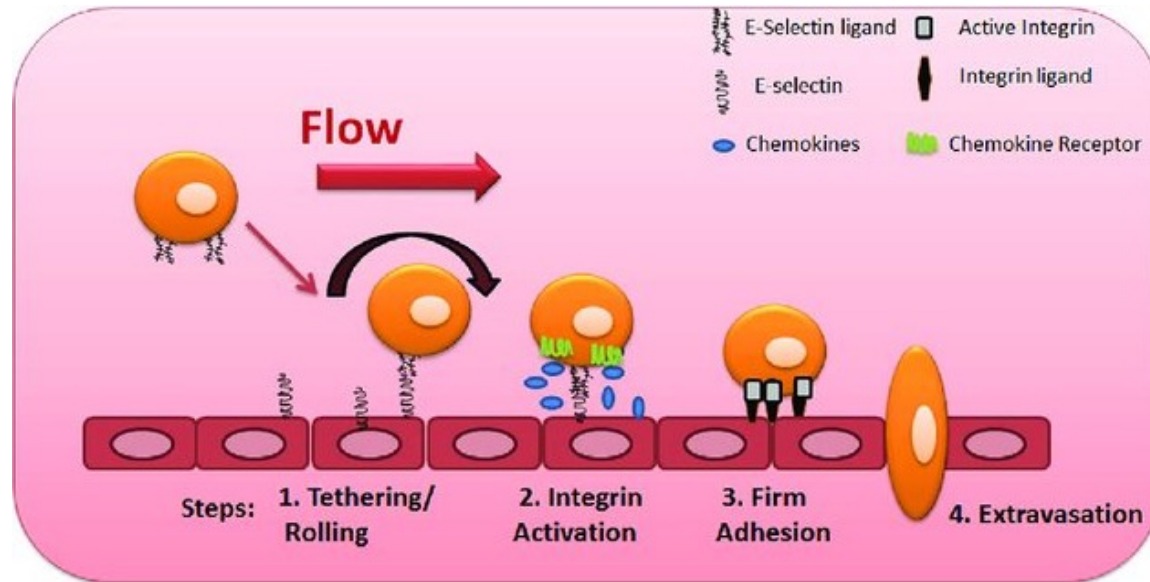
Migrazione dei leucociti nel tessuto



La trasmigrazione 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 espresse dal leucocita.

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)

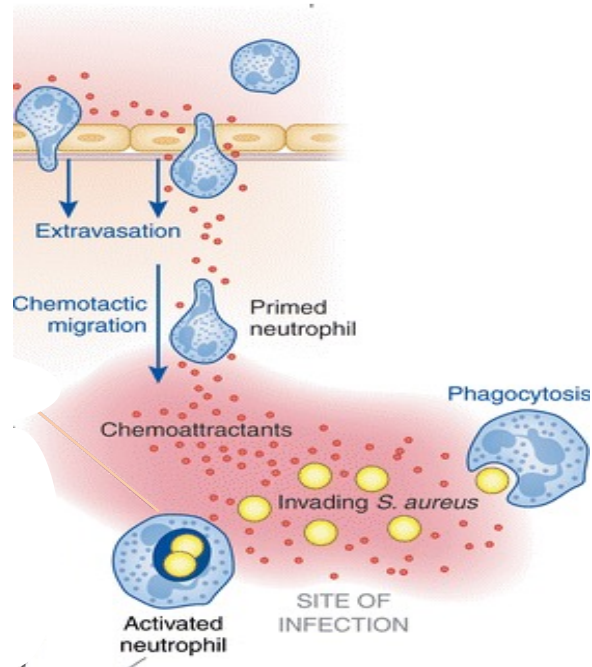
Chemiotassi

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 :

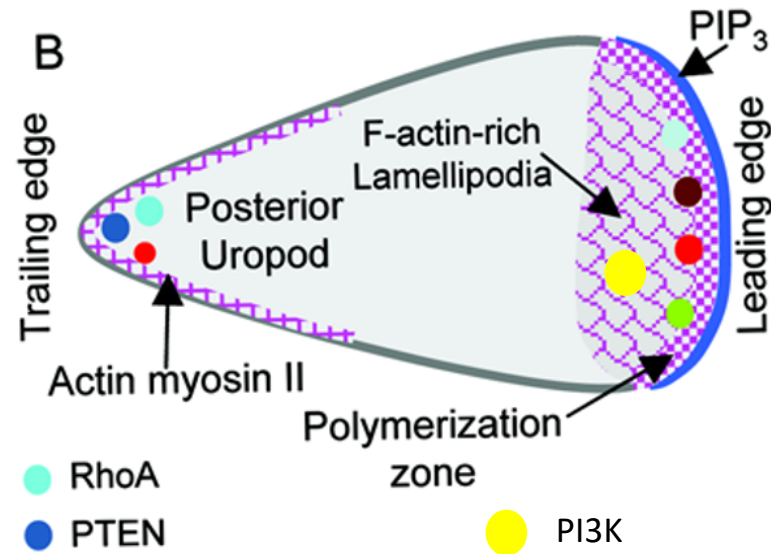
- Chemochine
- Prodotti batterici (peptidi con N-formil metionina)
- Leucotriene B4
- Componenti del sistema del complemento (C5a)



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 (estroflessioni della membrana plasmatica) è caratterizzato dalla costante generazione di reti di F-actina che spingono il movimento della cellula in avanti.

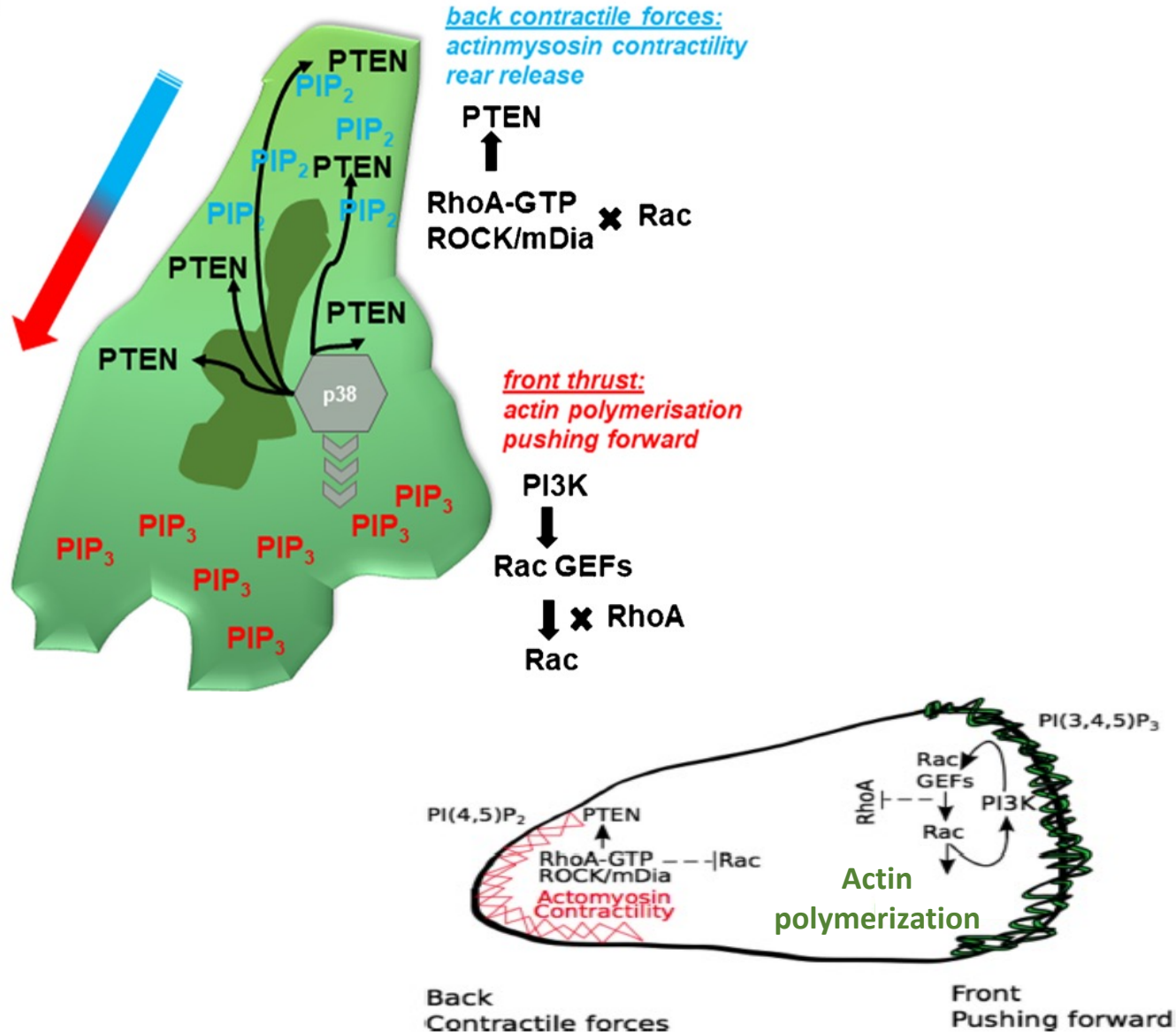
Nella regione posteriore l'adesione della cellula al substrato è dissolta permettendo la traslocazione della cellula.

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 (PIP_3). 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.