

Cellule ad attività fagocitaria

I fagociti

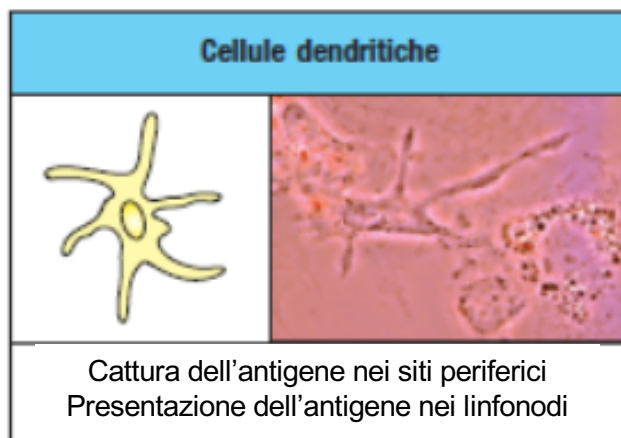
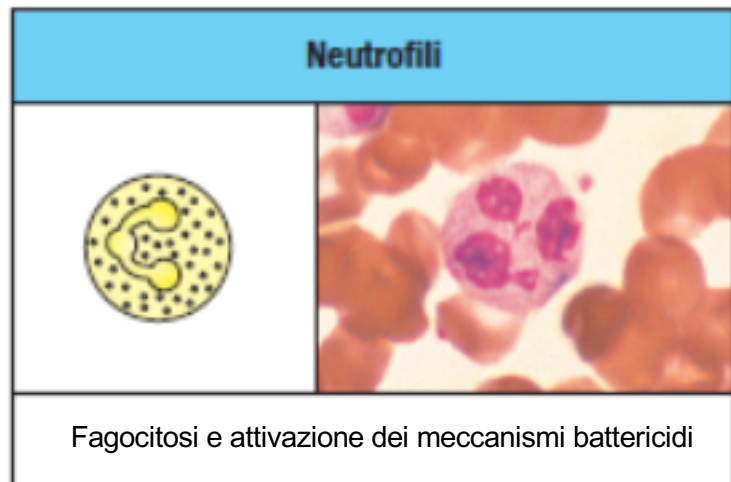
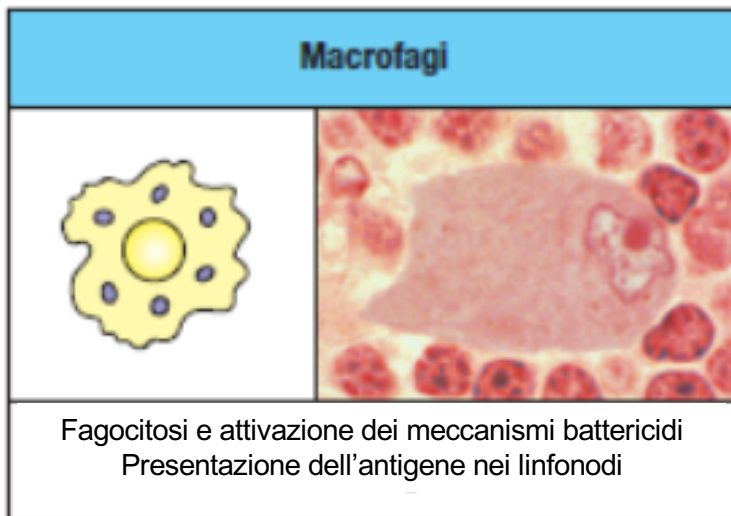
prima linea di difesa contro i microbi che oltrepassano la barriera epiteliale

I fagociti hanno la principale funzione di identificare, ingerire ed uccidere i microbi ed inoltre riconoscere e ingerire cellule danneggiate, morte e detriti cellulari.

- **Neutrofili**
- **Macrofagi**

- L'identificazione avviene tramite i recettori di membrana o intracitoplasmatici coinvolti nell'attivazione della risposta infiammatoria e/o anti-virale e nella fagocitosi del microbo in specifiche strutture chiamate fagolisosomi.
- L'uccisione avviene tramite molecole microbicide presenti nei fagolisosomi

Cellule Dendritiche sono cellule sentinella capaci di captare gli antigeni nei tessuti periferici (siti di infezione ed infiammazione) e dopo maturazione fungere da cellule presentanti l'antigene per i linfociti T.



Neutrofili

o Granulociti Polimorfonucleati

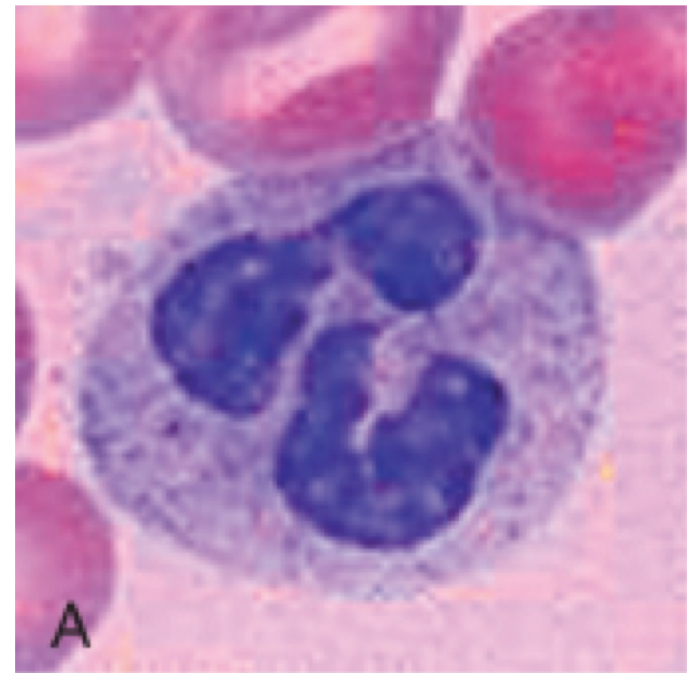
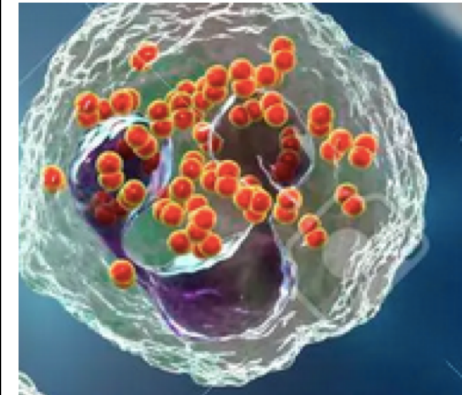
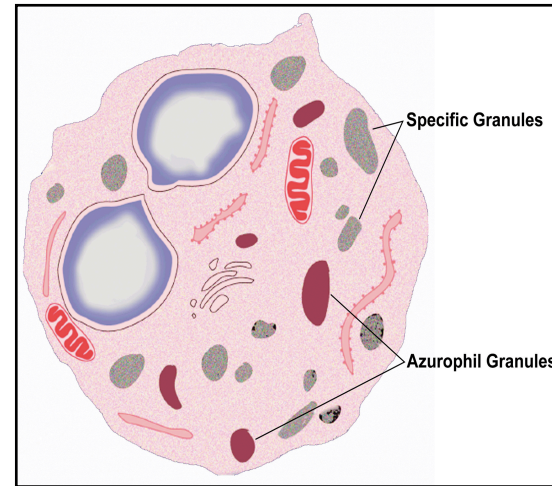
principali cellule leucocitarie coinvolte nelle reazioni di **infiammazione acuta**

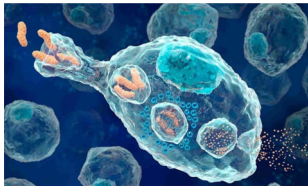
Granuli azzurrofilo o primari:

- Contengono sostanze basiche che si colorano con **eosina (acido)**.
- Sono più grandi (500 nm).
- **α -defensine, catelicidine (hCAP18), mieloperossidasi, proteasi neutre (catepsina), idrolasi**

Granuli specifici o secondari:

- Debole colorazione sia con **ematossilina (basico)** che con **eosina (acido)**.
- Sono più piccoli (200 nm).
- **Lisozima, lattoferrina, collagenasi, elastasi, componenti della NADPH ossidasi.**





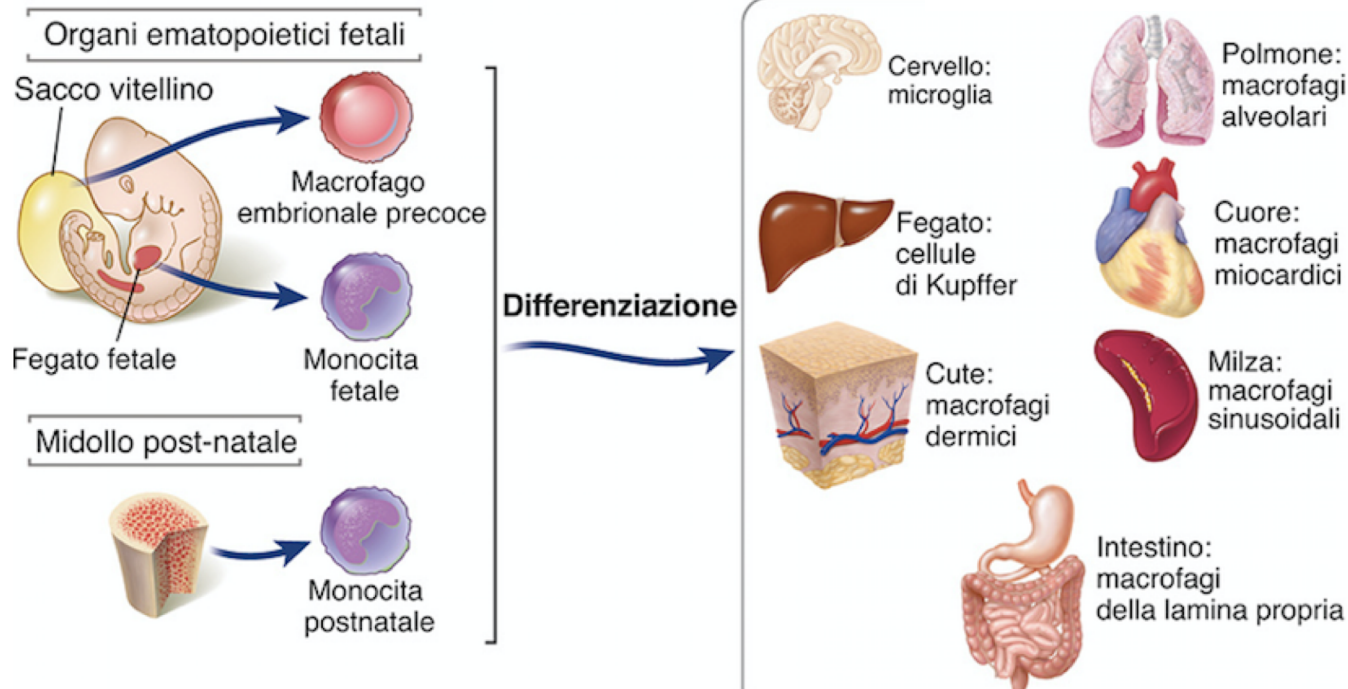
Macrofagi

Durante il primo sviluppo

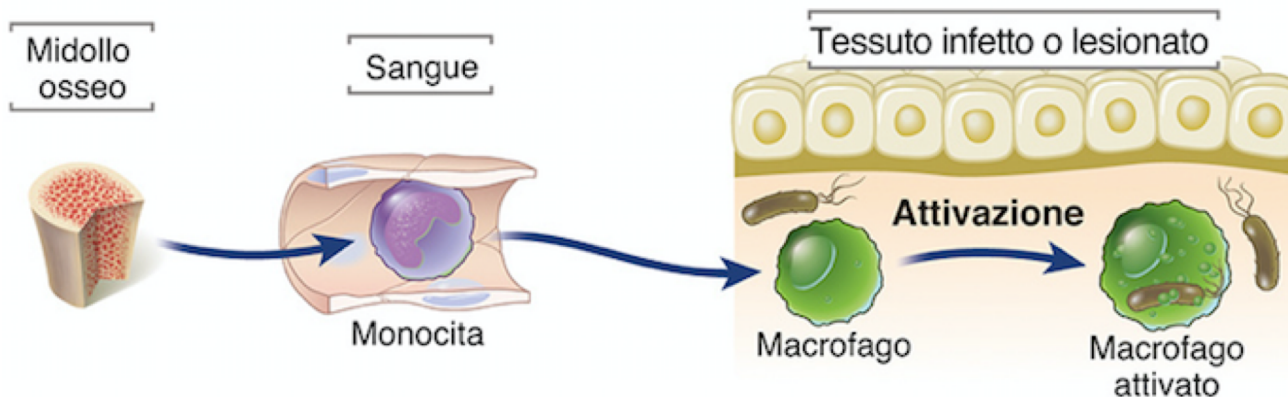
Precocemente durante lo sviluppo, ovvero nella **vita fetale**, i precursori presenti nel sacco vitellino e nel fegato fetale danno origine a cellule che colonizzano i tessuti per generare **macrofagi altamente specializzati residenti nei tessuti**.

Inoltre, in condizioni di omeostasi negli adulti e durante le **reazioni infiammatorie**, i precursori nel midollo osseo generano **monociti circolanti** che entrano nei tessuti periferici, differenziano in **macrofagi** e sono attivati localmente.

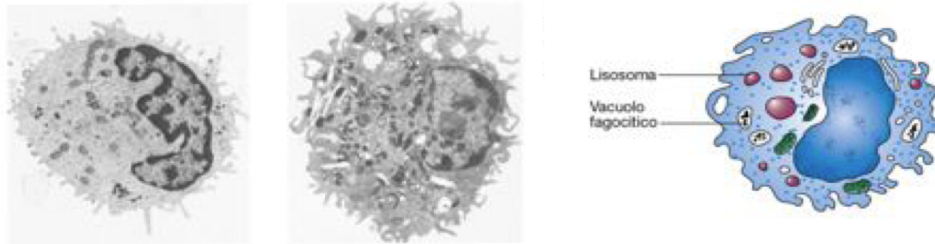
Macrofagi presenti nei tessuti in condizioni omeostatiche



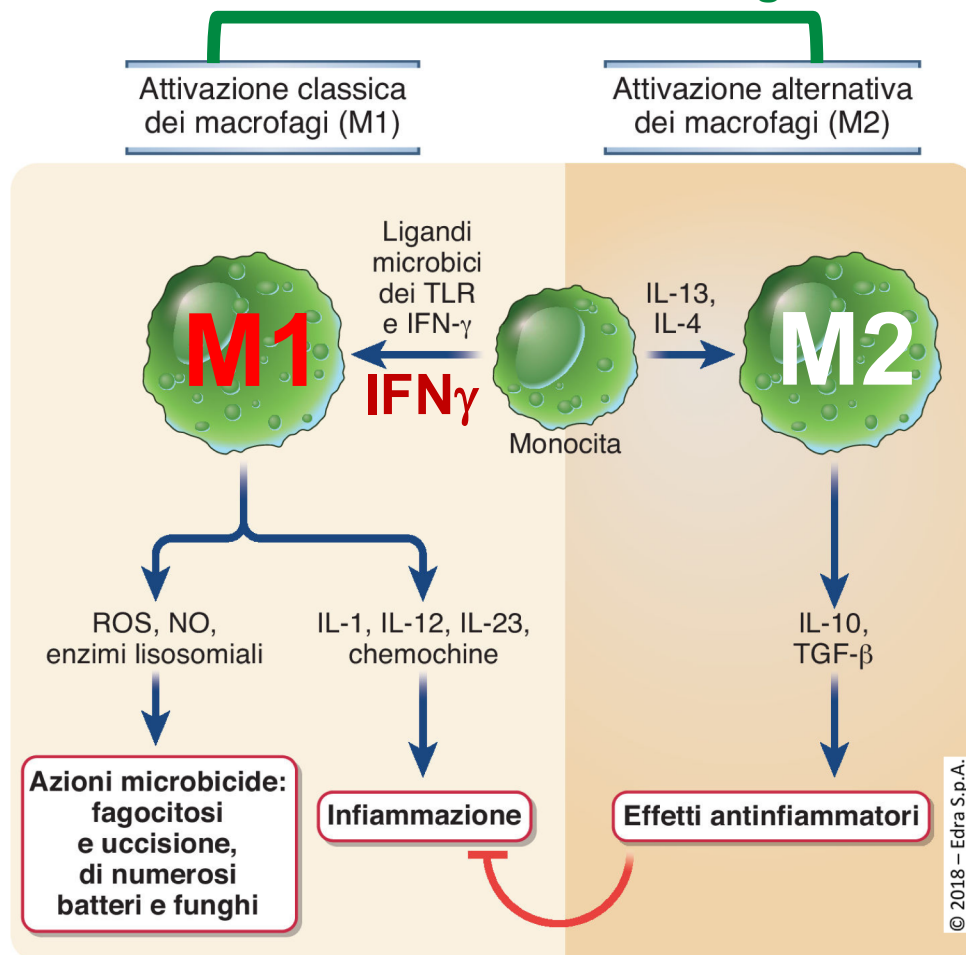
Macrofagi che originano da monociti circolanti nel corso di processi infiammatori



MACROFAGI: regolatori della risposta infiammatoria e della sua risoluzione



Attivazione dei macrofagi



1. Ingestione e uccisione dei microbi

- Enzimi lisosomiali: **idrolasi acide, serin-proteasi, metalloproteasi (collagenasi)**
- **NADPH ossidasi (ossidasi fagocitica)**
→ produzione di specie reattive dell'ossigeno (**ROS**)
- **iNOS** per la produzione di **NO** (ossido nitrico)

2. Produzione mediatori primari

- Citochine pro-infiammatorie: **IL-1, TNF, IL-6**
- Prostaglandine e leucotrieni
- Chemochine (es. **IL8, MCP-1**)

3. Risoluzione processo infiammatorio

- Ingestione e degradazione cellule morte (es. neutrofili)
- Fagocitosi cellule apoptotiche prima che rilascino il loro contenuto

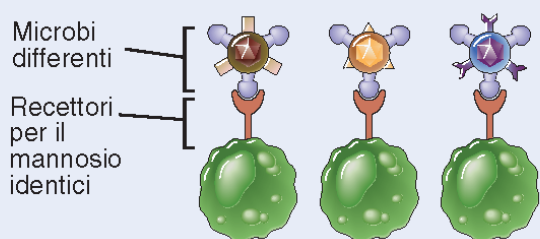
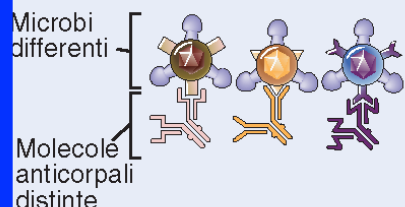
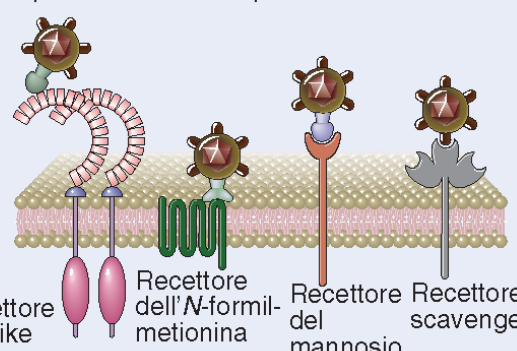
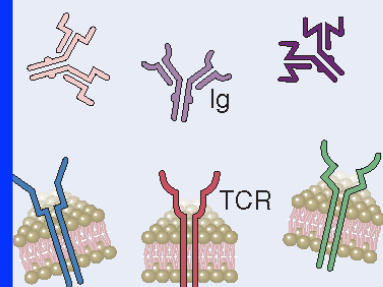
4. Riparazione dei tessuti

- Angiogenesi (**VEGF**)
- Stimolano i fibroblasti a produrre matrice extracellulare ricca di collagene (**fibrosi**)

5. Presentazione dell'antigene ai linfociti T effettori

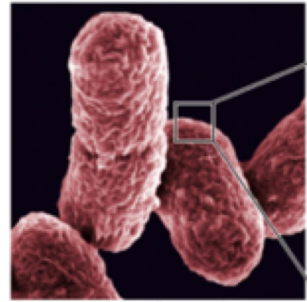
Recettori espressi dai fagociti

Riconoscono strutture specifiche ma **condivise** da diversi microrganismi definite
Profili molecolari associati ai patogeni (PAMP)

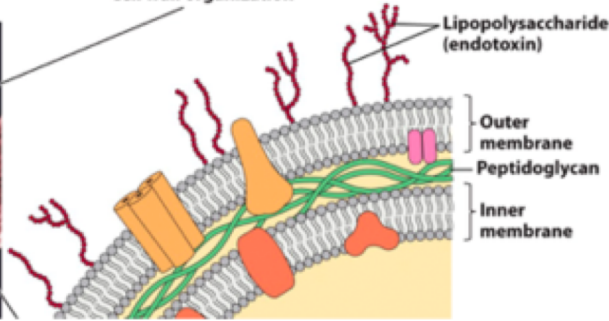
TABELLA 4-1 Specificità dell'immunità innata e specifica		
	Immunità innata	Immunità specifica
Specificità	<p>Per strutture condivise da microbi differenti (profili molecolari associati a patogeni)</p> <p>Microbi differenti</p> <p>Recettori per il mannosio identici</p> 	<p>Per elementi strutturali di molecole microbiche (antigeni); può riconoscere antigeni non microbici</p> <p>Microbi differenti</p> <p>Molecole anticorpali distinte</p> 
Recettori	<p>Codificati nella linea germinativa; diversità limitata (recettori per il riconoscimento di profili)</p>  <p>Recettore Toll-like</p> <p>Recettore dell'<i>N</i>-formil-metionina</p> <p>Recettore del mannosio</p> <p>Recettore scavenger</p>	<p>Codificati da geni prodotti per ricombinazione somatica; maggiore diversificazione</p>  <p>Ig</p> <p>TCR</p>
Distribuzione dei recettori	Non clonale: recettori identici su tutte le cellule della stessa linea	Clonale: cloni di linfociti con specificità distinte esprimono recettori differenti
Discriminazione tra il self e il non self	Si; le cellule sane dell'ospite non sono riconosciute o possono esprimere molecole che prevengono le reazioni dell'immunità innata	Si; basata sull'eliminazione o sull'inattivazione dei linfociti che reagiscono contro il self

IMPORTANTE: molti PAMP riconosciuti dall'immunità innata sono essenziali per il patogeno

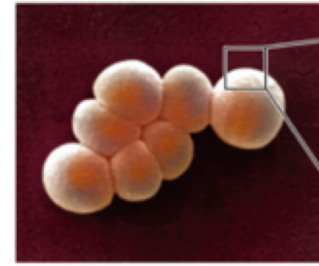
Gram negative bacteria
E. coli



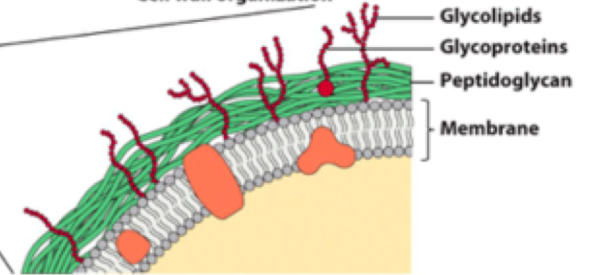
Cell wall organization



S. aureus



Cell wall organization



Gram positive bacteria

PAMPs

(Pathogen-Associated Molecular Patterns)

and

DAMPs

(Damage/Danger-Associated Molecular Patterns)

recognition by

PRRs

(Pattern Recognition Receptors)

PAMPs

Profili molecolari associati ai patogeni

DAMPs

Profili molecolari associati al danno

Profili molecolari associati ai patogeni

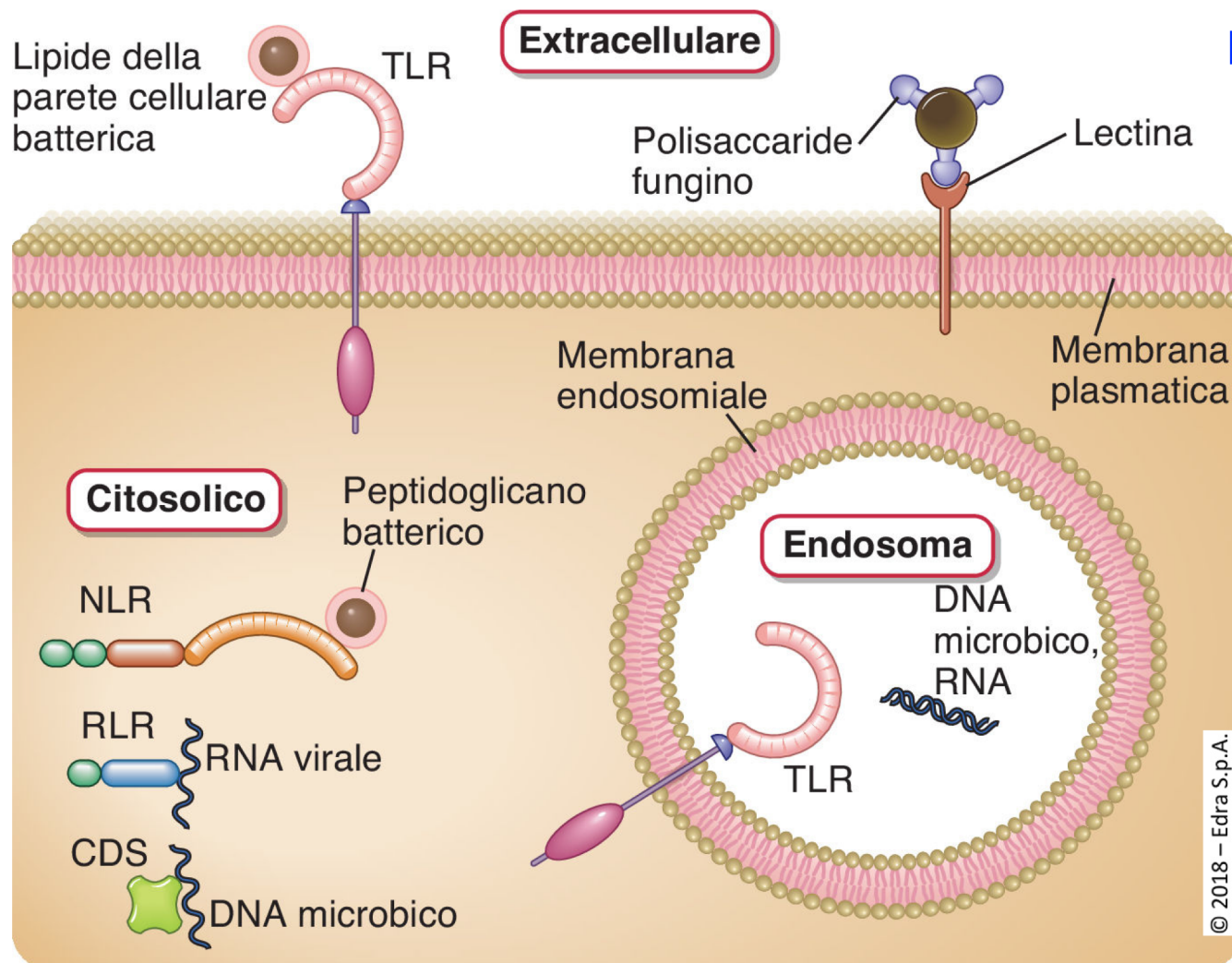
Acidi nucleici	ssRNA:	virus
	dsRNA:	virus
	CpG non metilate:	virus, batteri
Proteine	Pilina:	batteri
	Flagellina:	batteri
Lipidi della parete cellulare	LPS:	batteri Gram-negativi
	Acido lipoteicoico:	batteri Gram-positivi
Carboidrati	Mannano:	funghi, batteri
	Glucani:	funghi

Profili molecolari associati al danno cellulare

Proteine indotte da stress cellulare	HSP= heat shock proteins
Cristalli	Urato monosodico
Prodotti che derivano dalla matrice extracellulare	Peptidi di proteoglicani
Componenti mitocondriali (fuori dai mitocondri)	Peptidi formilati extracellulari e ATP
Proteine nucleari o acidi nucleici (fuori dal nucleo)	HMGB1 extracellulare, istoni, dsDNA

CpG (*Cytidine-Guanine Dinucleotide*), dinucleotide citidina-guanina; dsRNA (*Double-Stranded RNA*), RNA a doppia catena; HMGB1, *High-Mobility Group Box 1*; HSP (*Heat Shock Proteins*), proteine di shock; LPS, lipopolisaccaride; ssRNA (*Single-Stranded RNA*), RNA a singola catena.

Recettori dell'immunità innata



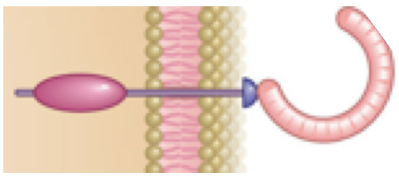
PRR (Pattern Recognition Receptors) recettori per profili molecolari

in configurazione germline:
riconoscono fino a 10^3 diversi PAMP/DAMP (mentre i recettori antigene specifici (TCR e BCR) riconoscono oltre 10^7 antigeni diversi)

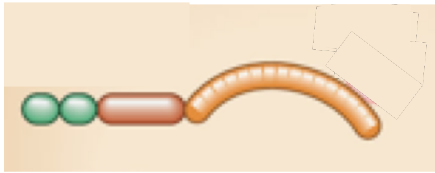
-espressi da fagociti, DC, NK, cellule endoteliali, cellule epiteliali e altre cellule

-su membrana plasmatica, endosomiale e nel citosol

Pattern recognition receptors (PRR)



Recettori Toll-like (TLR)= nell'uomo, TLR1-10 (lipopolisaccaride e peptidoglicani batterici, flagellina, DNA e RNA virale e batterico).



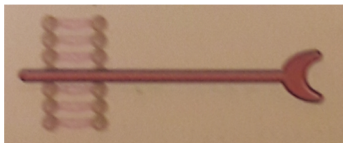
Recettori Nod-like (NLR)= più di 20 proteine espresse entro la cellula es NOD1/2 (peptidoglicani della parete batterica) e NLRP1-12 (molti PAMPs/DAMPs)



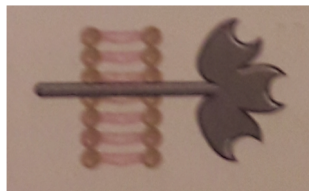
Recettori RIG-I-like (RLR)=RIG-1, MDA5 (RNA virale)



Sensori citosolici di DNA (CDS)= cGAS-STING, AIM2 (DNA batterico e virale)



Recettori lectinici di tipo C (CLR)=recettore del mannosio, dectine, DC-Sign (carboidrati con mannosio e fucosio; glucani)



Recettori Scavenger SR-A (componenti parete batterica), CD36 (acidi grassi a catena lunga)

Specificità e funzione dei PRR

Table 1. Pattern recognition receptors and microbial ligand recognition

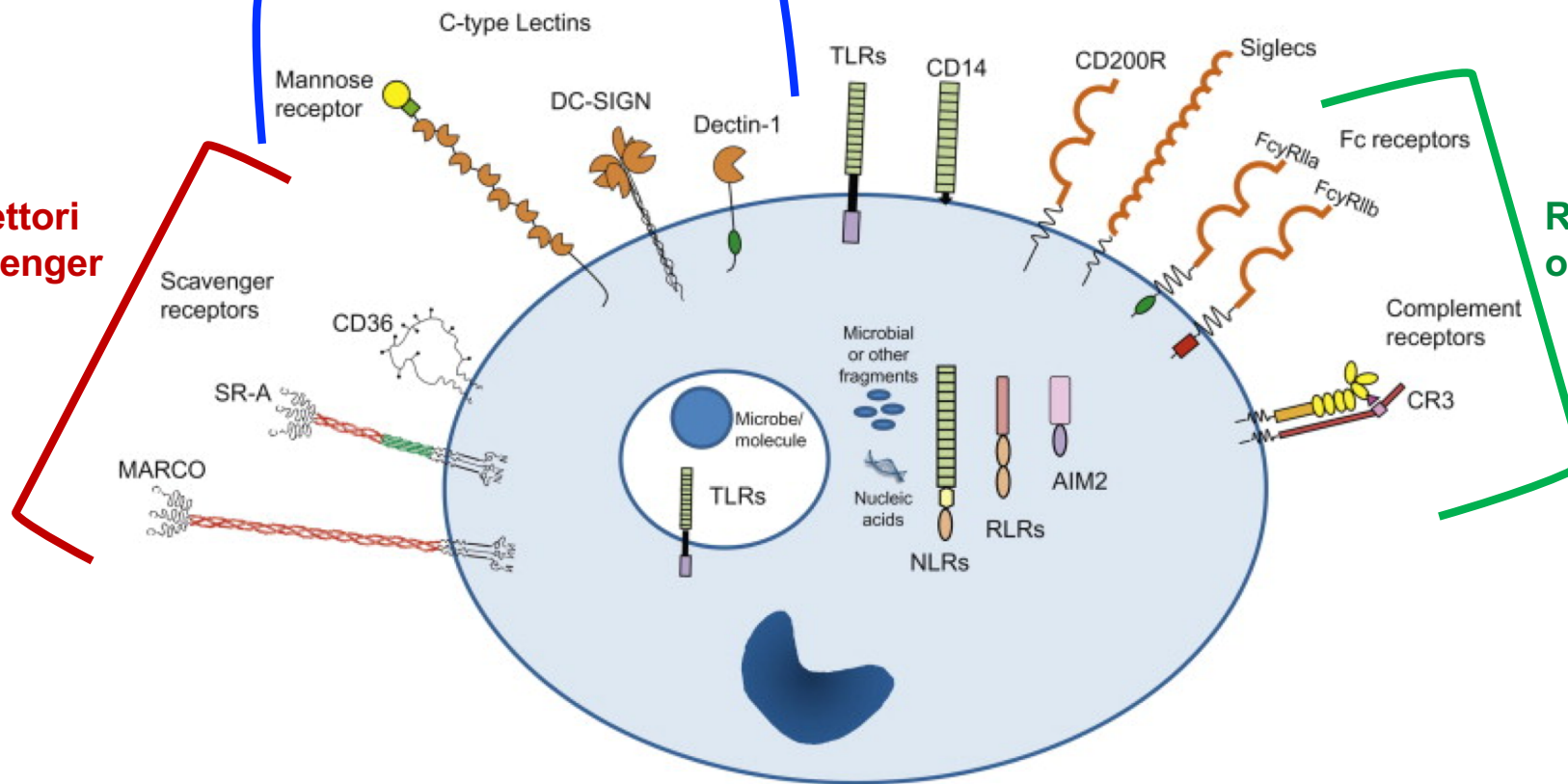
Pattern recognition receptor	Localization	Ligand	Ligand origin
uptake			
Scavenger receptors			
SR-A	Plasma membrane	LPS, LTA, CpG DNA, proteins	Bacteria
MARCO	Plasma membrane	LPS, proteins	Bacteria
CD36	Plasma membrane	Diacylated lipopeptide	Bacteria
LOX-1	Plasma membrane	Protein	Bacteria
SREC	Plasma membrane	Protein	Bacteria
C-type lectins			
DC-SIGN	Plasma membrane	LPS, ManLAM, CPS, CTL	Bacteria Virus Protozoa
Mannose receptor	Plasma membrane	LPS, CPS, ManLAM	Bacteria Virus Fungi Protozoa
Dectin-1	Plasma membrane	β -Glucan, mycobacterial ligand	Fungi
Dectin-2	Plasma membrane	β -Glucan, high mannose structures	Fungi
MINCLE	Plasma membrane	SAP 130	Fungi
sensing			
Toll-like receptors			
TLR1	Plasma membrane	Triacyl lipoprotein	Bacteria
TLR2	Plasma membrane	PGN, porins, lipoarabinomannan HA protein	Bacteria Viruses
TLR3	Endolysosome	tGPI-mucin dsRNA	Protozoa Virus
TLR4	Plasma membrane	LPS	Bacteria
TLR5	Plasma membrane	Envelope proteins	Viruses
TLR6	Plasma membrane	Flagellin Diacyl lipoprotein	Bacteria Viruses
TLR7 (human TLR8)	Endolysosome	ssRNA	Bacteria Viruses
TLR9	Endolysosome	CpG DNA DNA	Bacteria Viruses
TLR10	Endolysosome	Malaria hemozoin	Protozoa
TLR11	Plasma membrane	Unknown Profilin-like molecule	Unknown Protozoa
NOD-like receptors			
NOD1	Cytoplasm	iE-DAP	Bacteria
NOD2	Cytoplasm	MDP	Bacteria
NLRP1	Cytoplasm	MDP, Anthrax lethal toxin	Bacteria
NLRP3	Cytoplasm	RNA, LPS, LTA, MDP Viral RNA	Bacteria Viruses Protozoa Fungi

Recettori per la fagocitosi

Recettori scavenger

Recettori lectinici di tipo C

Recettori opsonici



Key to Domains			
	Collagenous domain		C-type lectin domain
	α helical coiled coil		Fibronectin Type II
	Cysteine rich domain		Cysteine-Rich domain
	ITAM		Leucine rich repeat
	ITIM		TIR domain
	CARD		Nucleotide binding site
	N-terminal repeats with β propeller structure		PYD
	I-domain		I-like domain
	Immunoglobulin domain		HIN200 domain

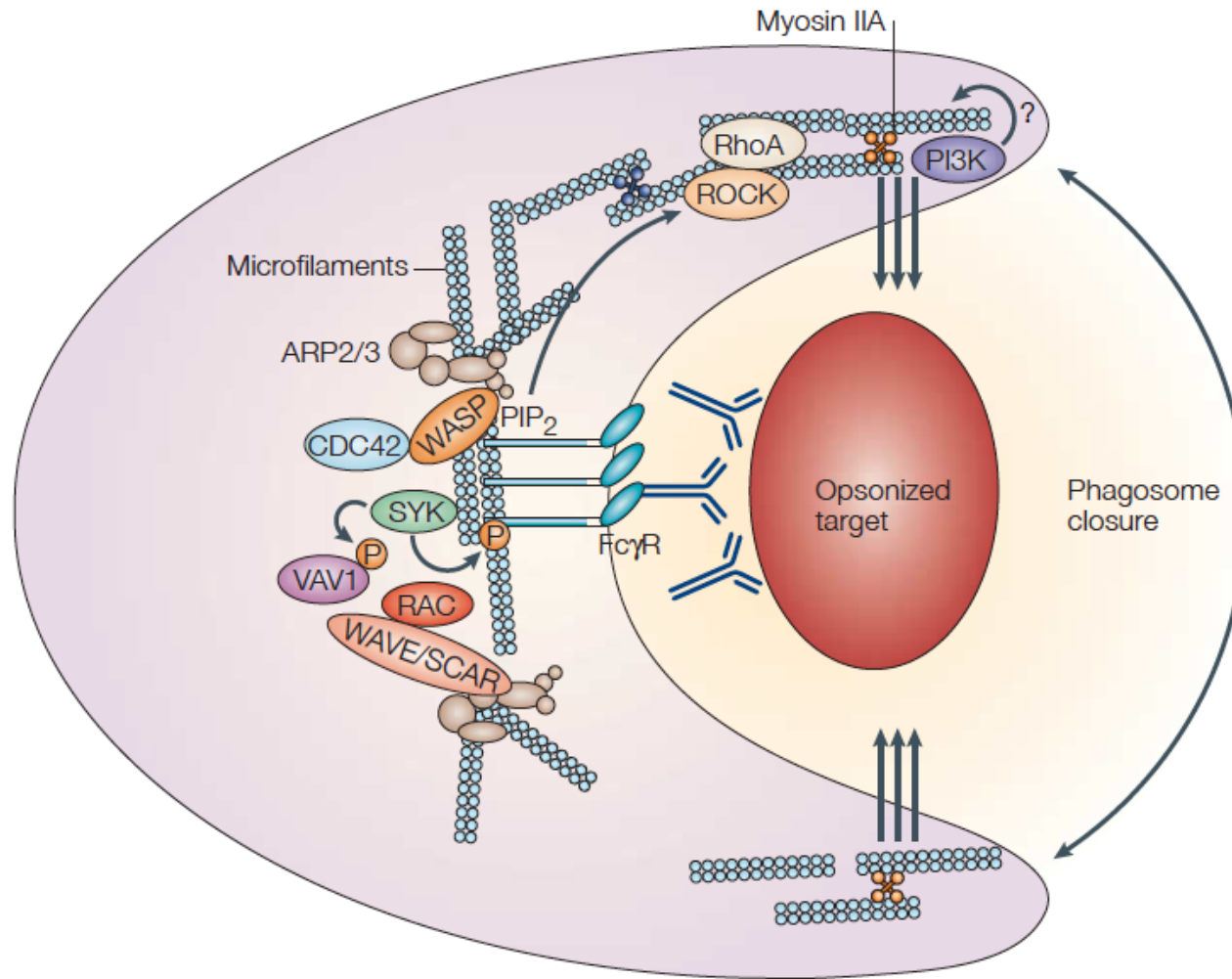
Fagocitosi non opsonica (PRR)

- **Recettori lectinici**
- **Recettori Scavenger o spazzino**

Fagocitosi opsonica

- Recettori per il **complemento**
- Recettori per il **frammento Fc** (frammento cristallizzabile degli anticorpi)

Fagocitosi mediata da Fc γ R

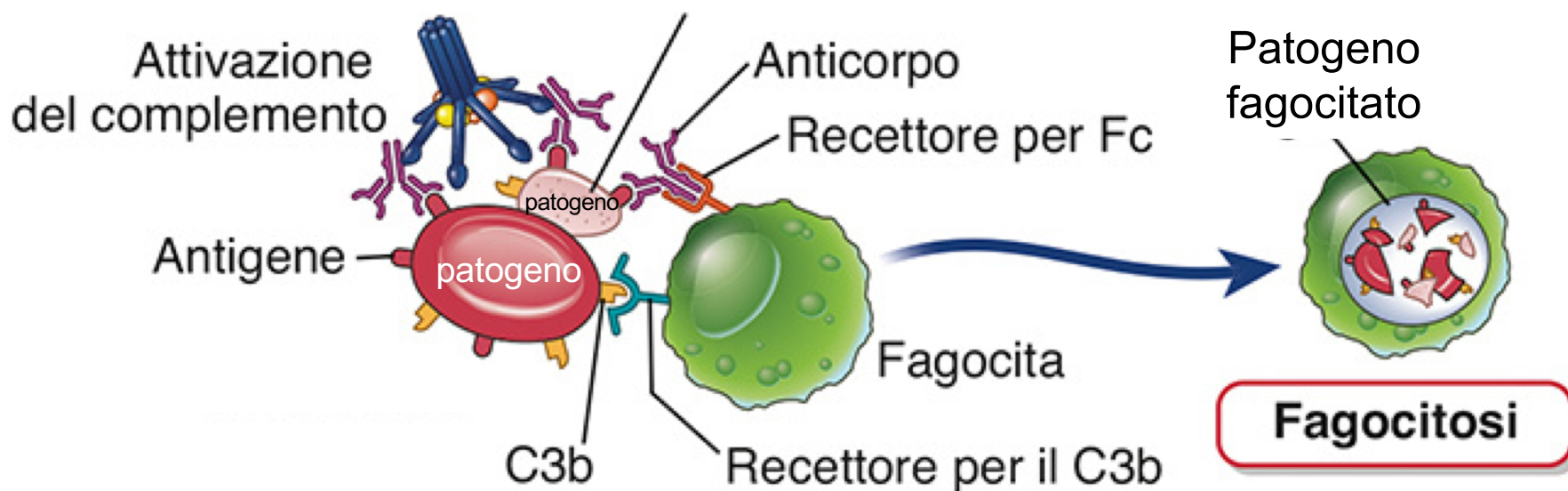


Il patogeno è stato opsonizzato da anticorpi IgG (opsonine).

L'opsonizzazione è il processo di fissazione delle opsonine sulla superficie microbica che favorisce la fagocitosi.

Sono opsonine: gli anticorpi IgG → riconosciuti dai recettori Fc γ
frammenti della proteina C3 → riconosciuti dai recettori del complemento

Opsonizzazione e fagocitosi

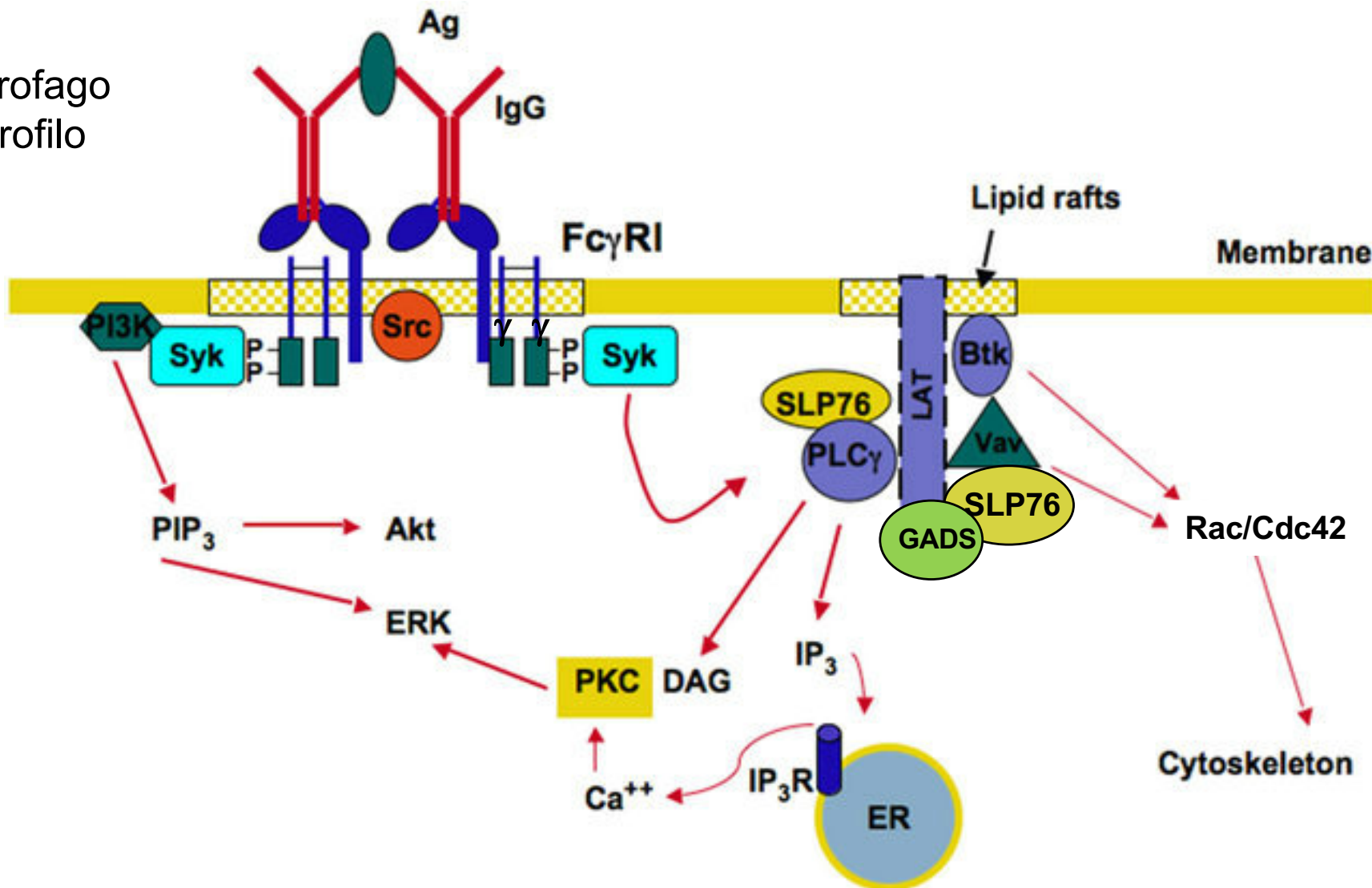


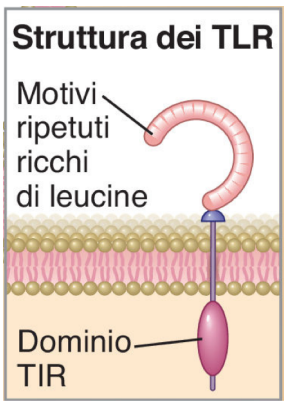
Le opsonine sono molecole che si fissano alla superficie di un microrganismo e sono riconosciute dai recettori di membrana dei neutrofili e macrofagi ed aumentano l'efficacia della fagocitosi.

Le **opsonine** comprendono **anticorpi IgG** riconosciuti dai recettori Fc γ (Fc γ R) e **frammenti di proteine del complemento** (es. C3b) riconosciuti dai recettori per il complemento (CR1).

Fc γ R e fagocitosi

Macrofago
neutrofilo



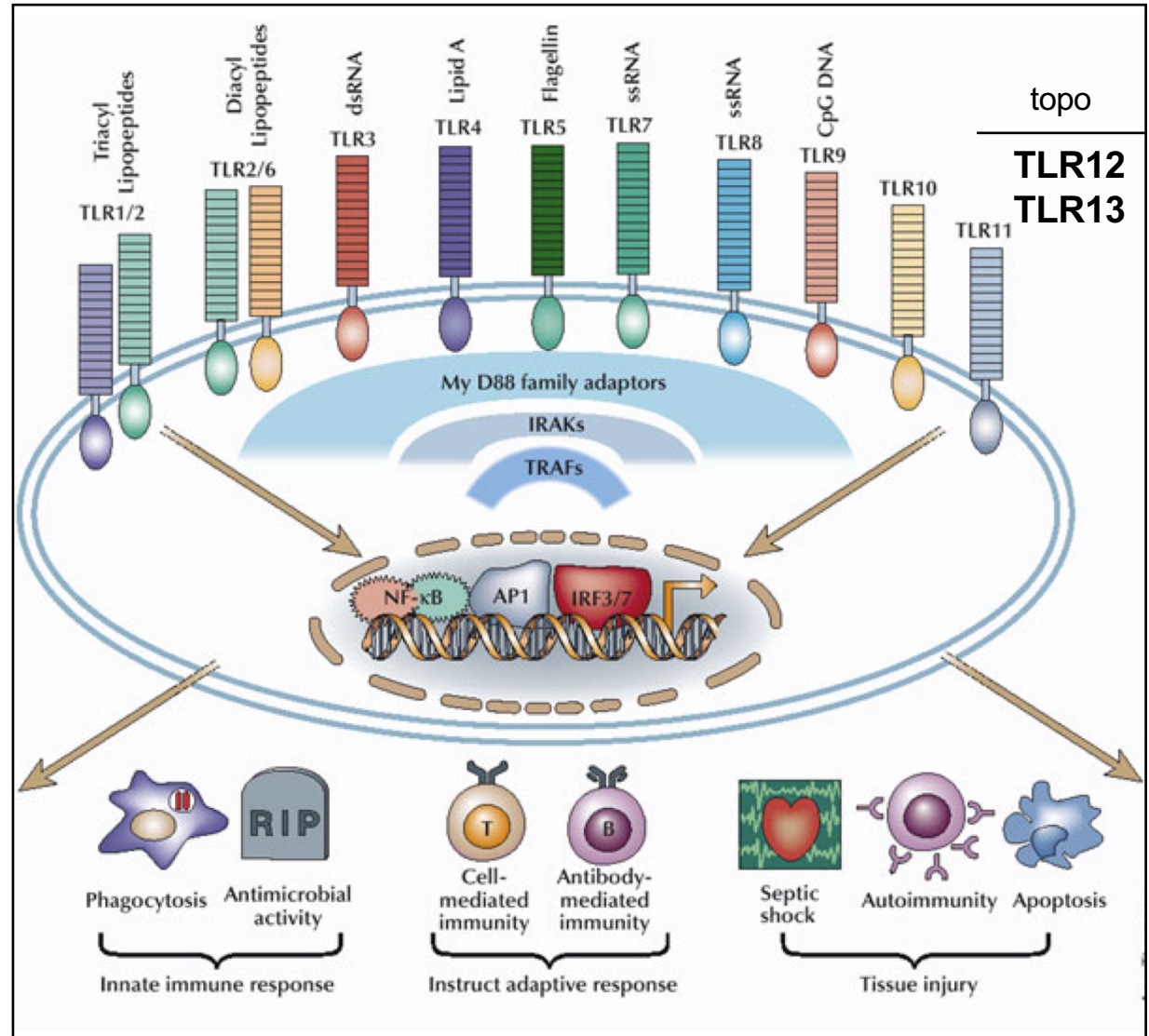


16-28 motivi
LxxLxLxxN

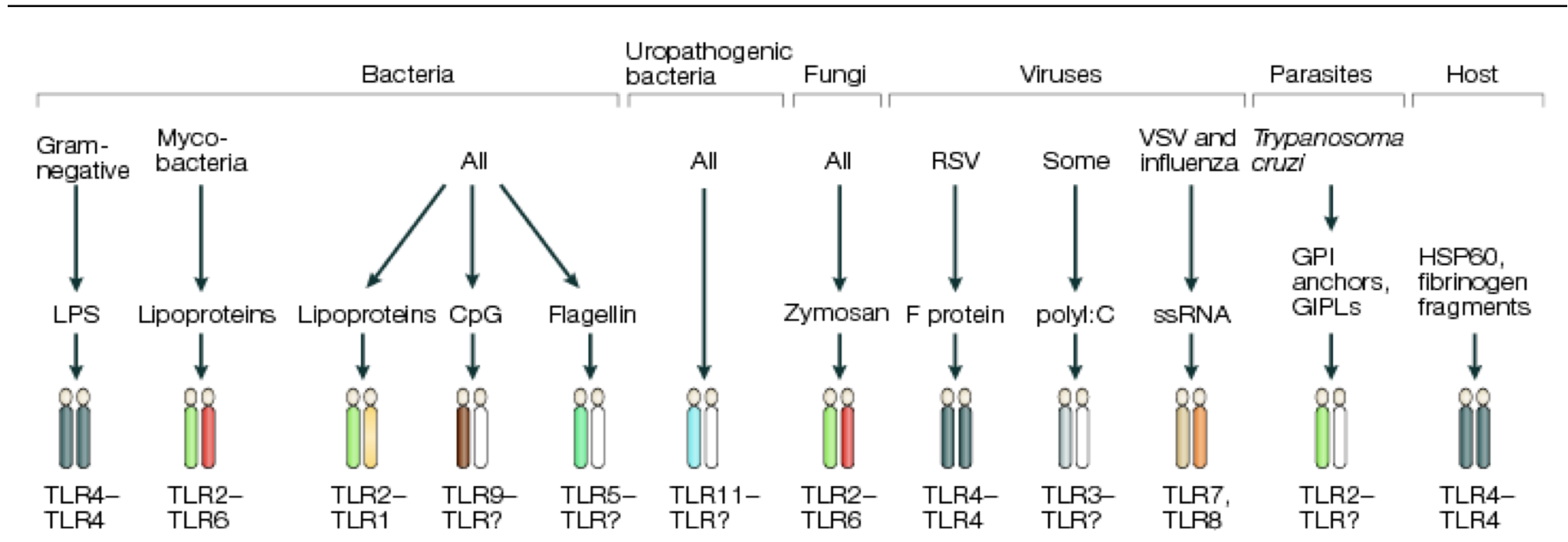
Toll-like receptors (TLRs)

Appartengono alla famiglia dei PRR (pattern recognition receptors)

- Glicoproteine integrali di membrana
- **10 TLRs** nell'uomo e 12 nel topo (TLR1-10 nell'uomo; TLR1-9 e TLR11-13 nel topo)
- Regione extracellulare con motivi ricchi in **Leu**
- Code citoplasmatiche dominio **TIR** (**Toll-IL-1 Receptor**)
- Attivazione risposta antimicrobica
- Alcuni sui linfociti T e B
- Stimolano risposta immune innata (e adattativa)



Ligandi dei TLR



Akira S. Cell 2006

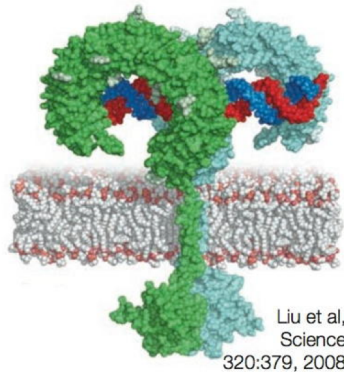
Membrana plasmatica

TLR1: triacil lipopeptidi
 TLR2: peptidoglicani, lipoproteine,
TLR4: LPS, HSP60, HMGB-1
TLR5: flagellina
 TLR6: diacil lipopeptidi, zymosan

Membrana endosomiale

TLR3: dsRNA
TLR7: ssRNA virale
TLR8: ssRNA virale
TLR9: CpG non metilate

Localizzazione dei TLR

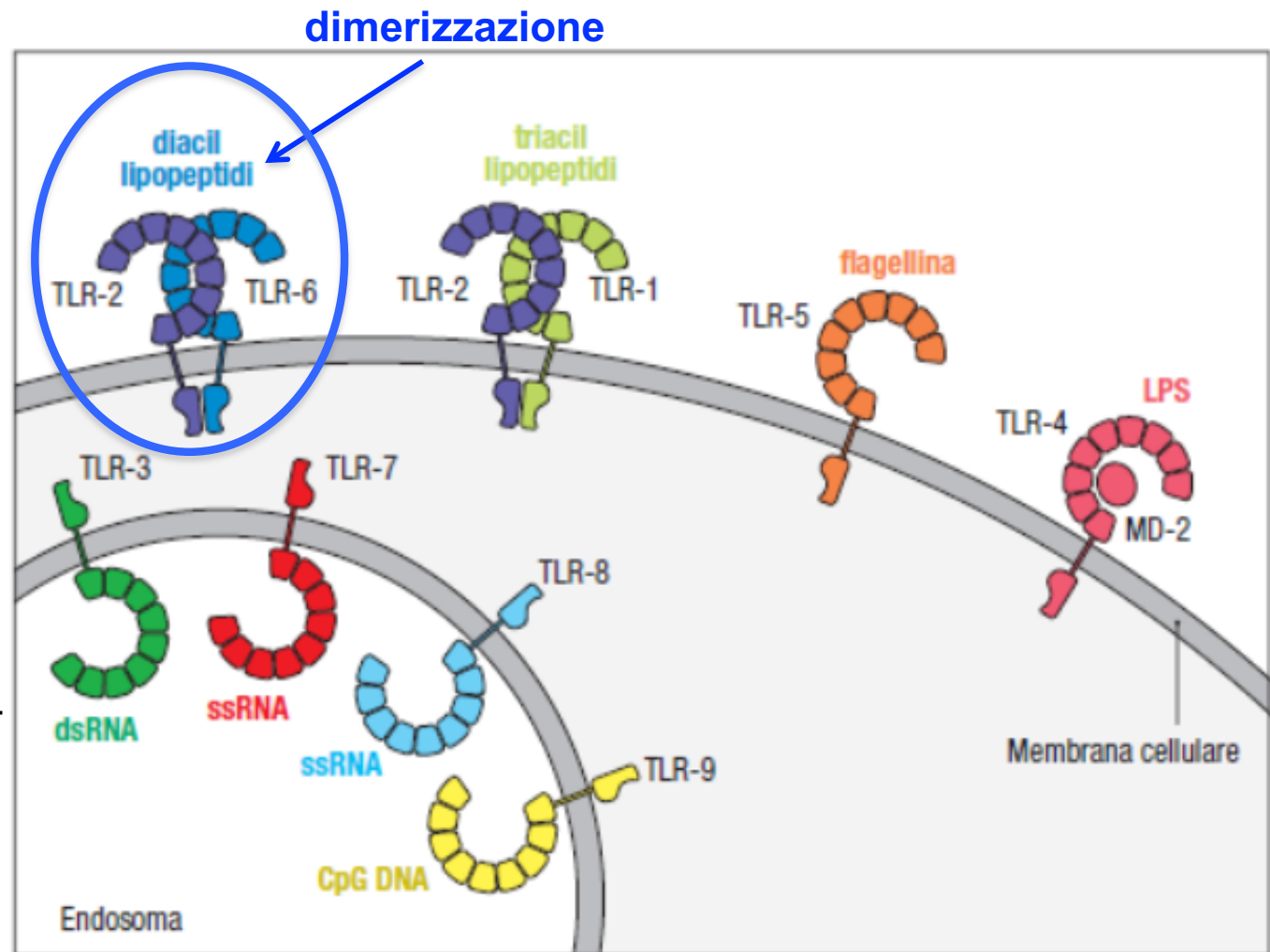


Espressi da:

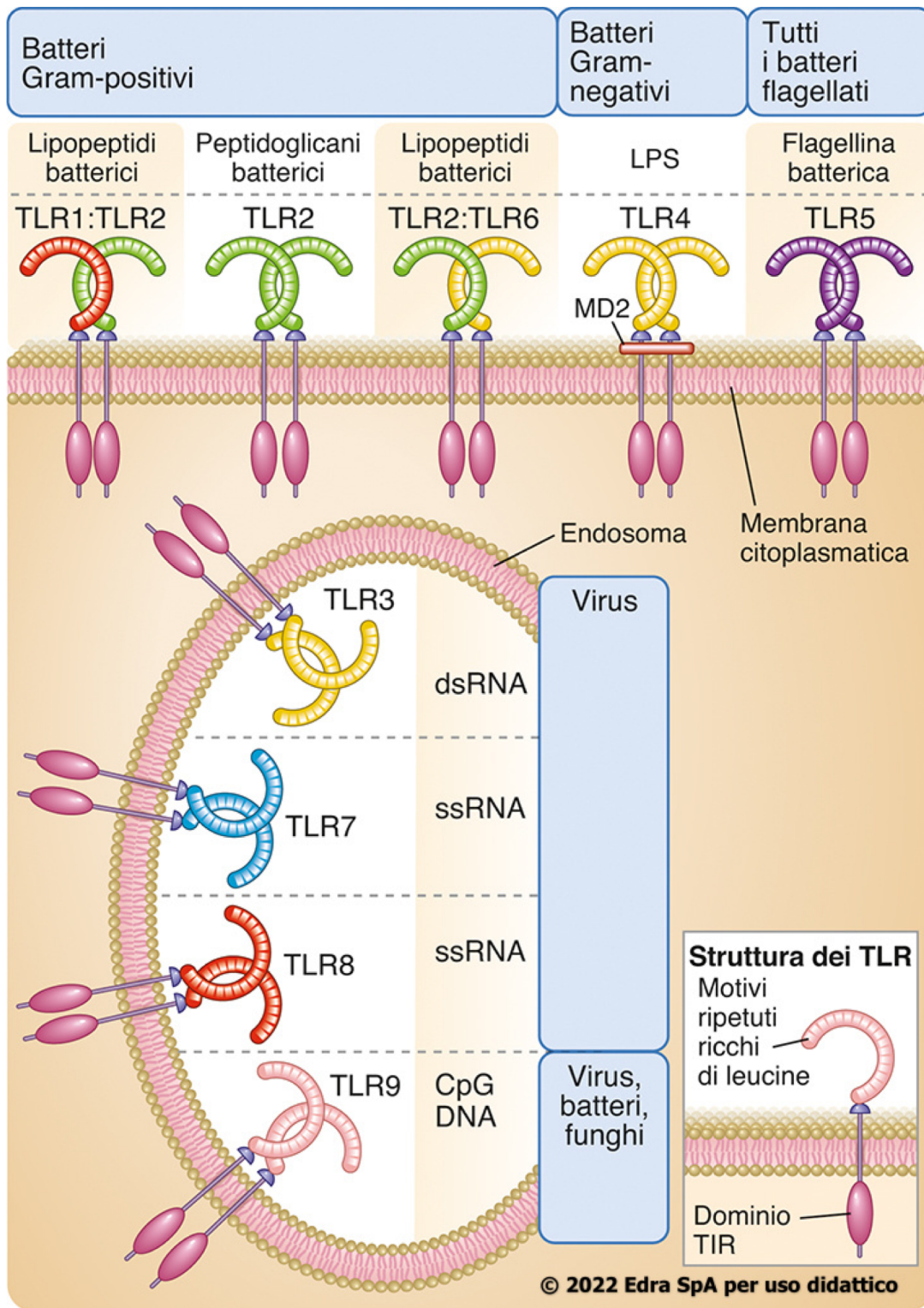
- macrofagi
- neutrofili
- DC
- cellule NK
- linfociti B
- mastociti
- Specifici subset di linfociti T

Cellule non immunitarie

- cellule epiteliali
- cellule endoteliali
- fibroblasti



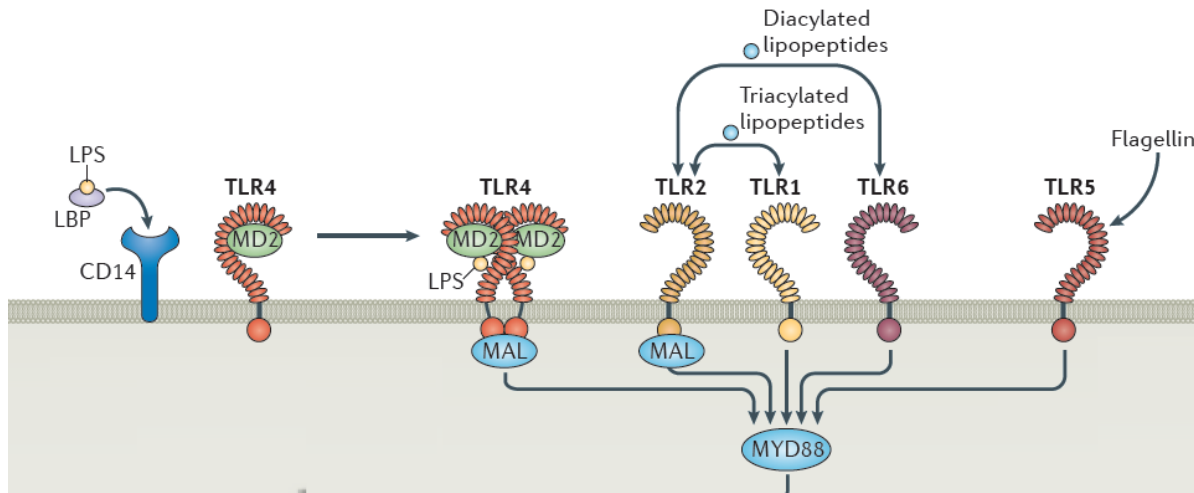
La loro espressione aumenta velocemente in presenza di citochine, patogeni e stimoli ambientali



Il ligando induce omo- o etero-dimerizzazione dei Toll Like Receptors

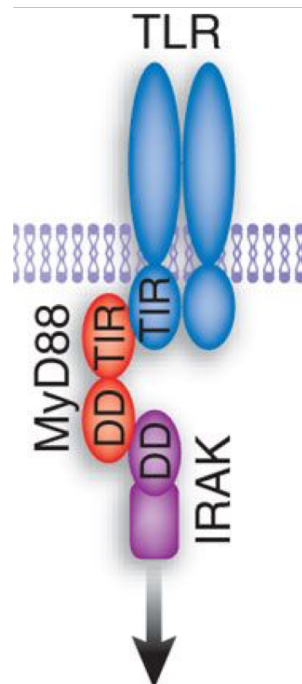
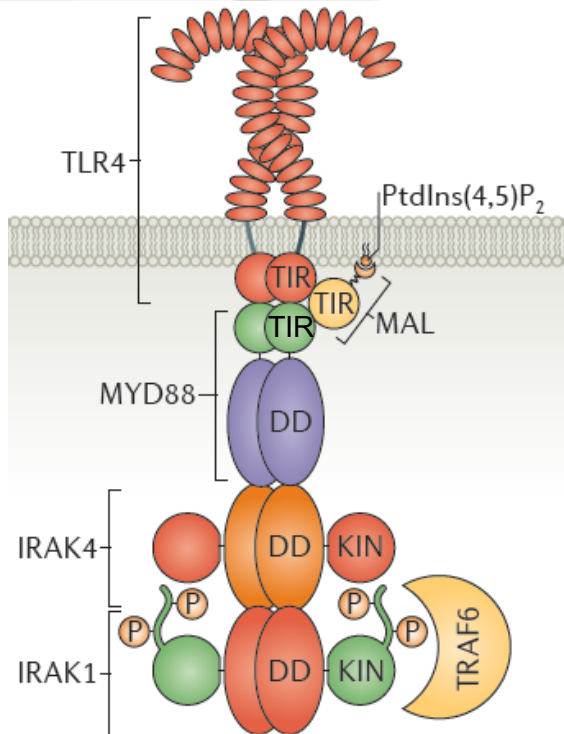
16-28 motivi LxxLxLxxN

TLR presenti sulla membrana plasmatica: TLR 1, 2, 4, 5, 6

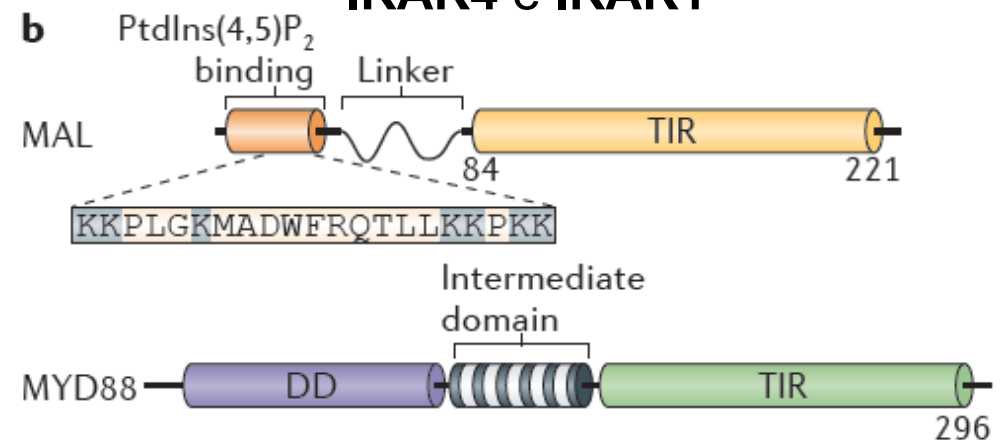


- I TLR sono monomerici ma formano omodimeri o eterodimeri attivi quando esposti ai PAMP.

- Il **dominio TIR** all'interno della coda citoplasmatica si lega all'adattatore MYD88 (e MAL)



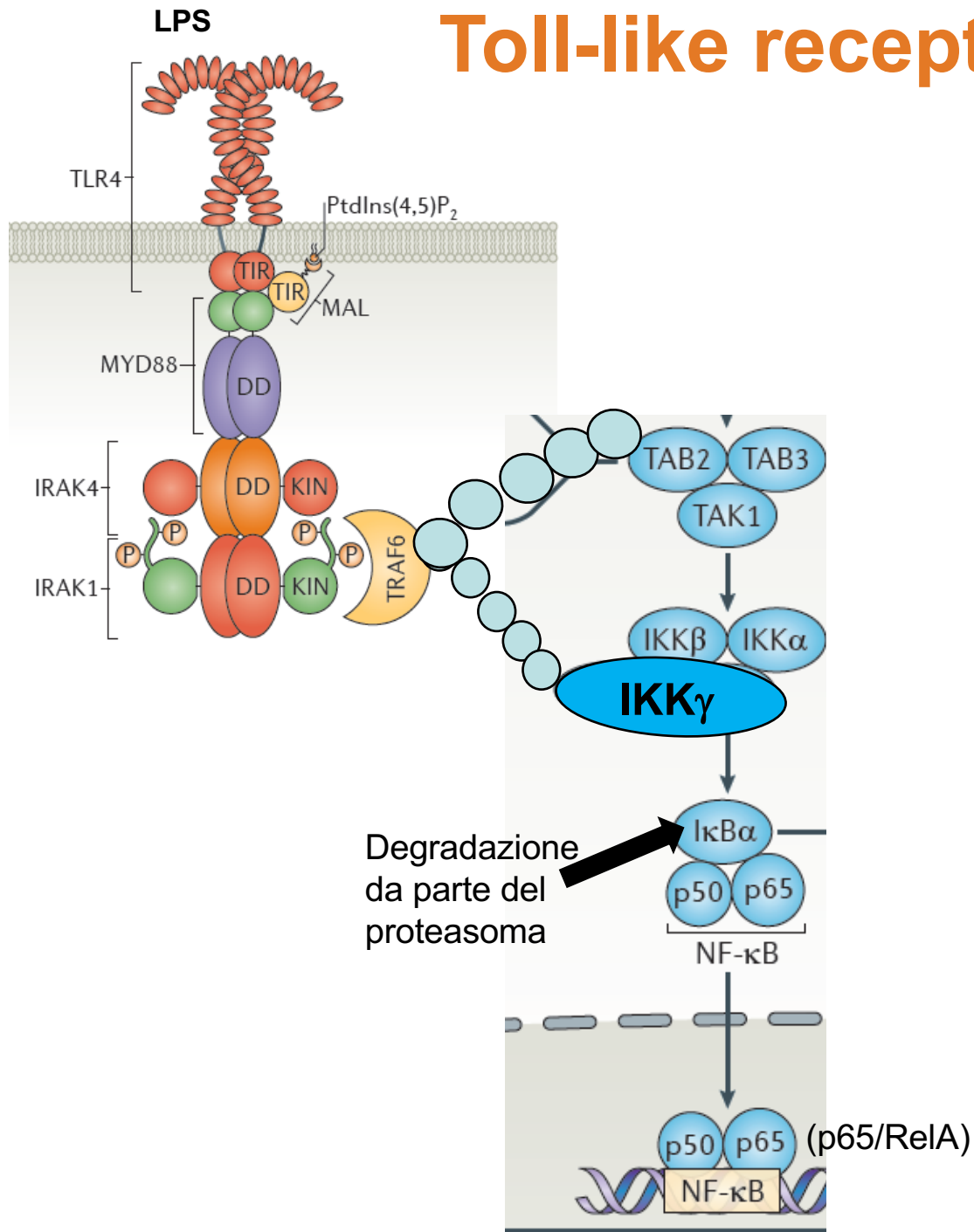
- **MyD88** collega il recettore a diverse vie di segnalazione a valle (p38MAPK, JNK, PI3K, NF- κ B) attraverso **IRAK4 e IRAK1**



Domini di interazione proteica presenti in varie molecole di segnalazione del sistema immunitario

Dominio	Proteine
TIR	MyD88, MAL, TRIF, TRAM, tutti i TLR
CARD	Caspasi 1, RIP2, RIG-I, MDA-5, MAVS, NODs, NLRC4, ASC, NLRP1
Pirina	AIM2, IFI16, ASC, NLRP1-14
DD (domino di morte)	MyD88, IRAK1, IRAK4, DR4, DR5, FADD, FAS,
DED (domino effettore di morte)	Caspasi 8, caspasi 10, FADD

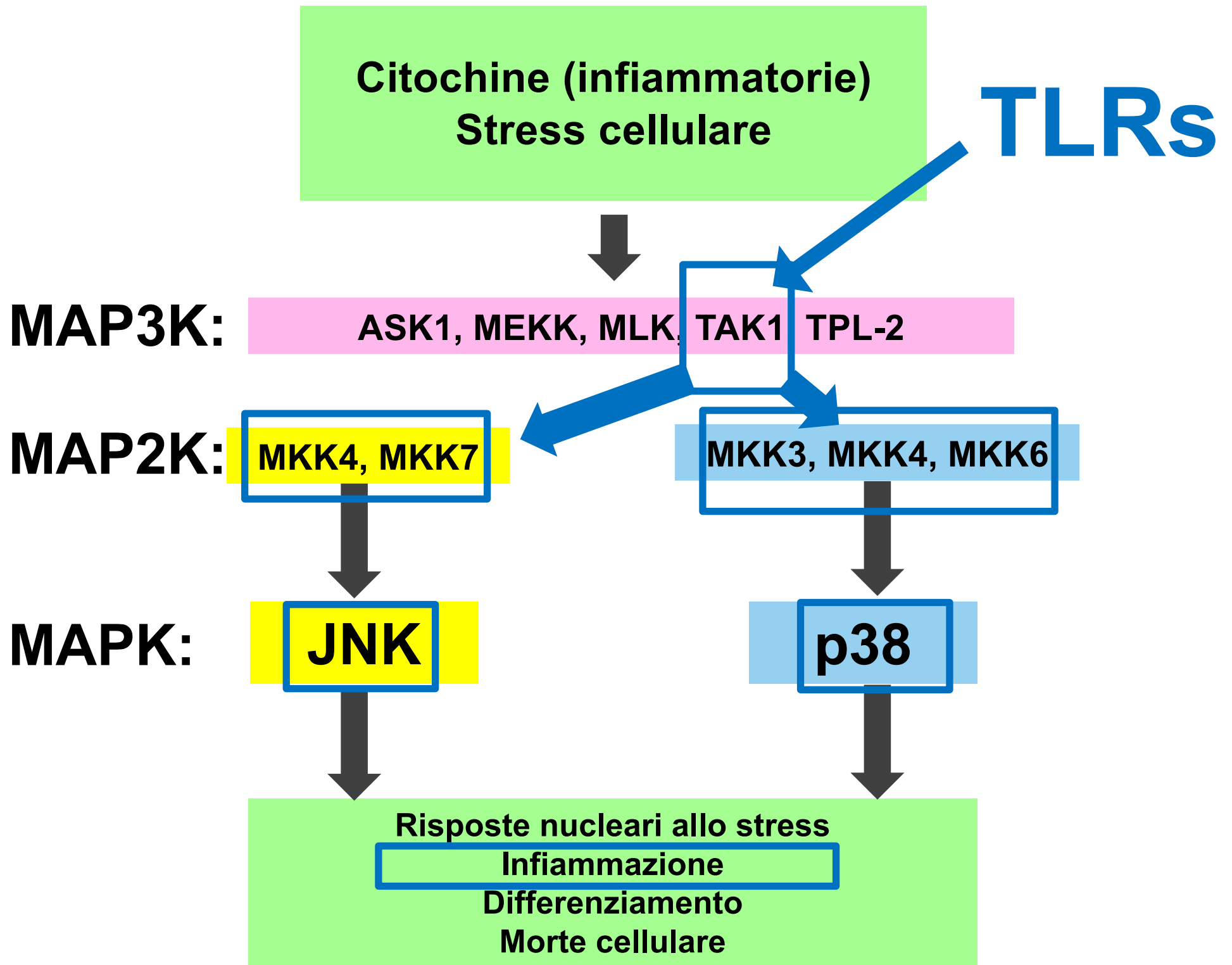
Toll-like receptors (TLR) e NF- κ B



Le **IRAK** fosforilano TRAF6 (E3 ubiquitina ligasi) che recluta e consente l'attivazione di **TAK1** (**MAP3K**) da parte di IRAK e poi di **IKK γ** attraverso meccanismi ubiquitina-dipendenti.

TAK1 fosforila **IKK β** che fosforila **I κ B α** inducendone la degradazione ubiquitina-dipendente. Segue la traslocazione nucleare di RelA/p50 e la trascrizione dei **geni pro-infiammatori**.

TAK1 fosforila anche MKK7, MKK4 o MEKK8 e attiva la cascata delle MAPK.

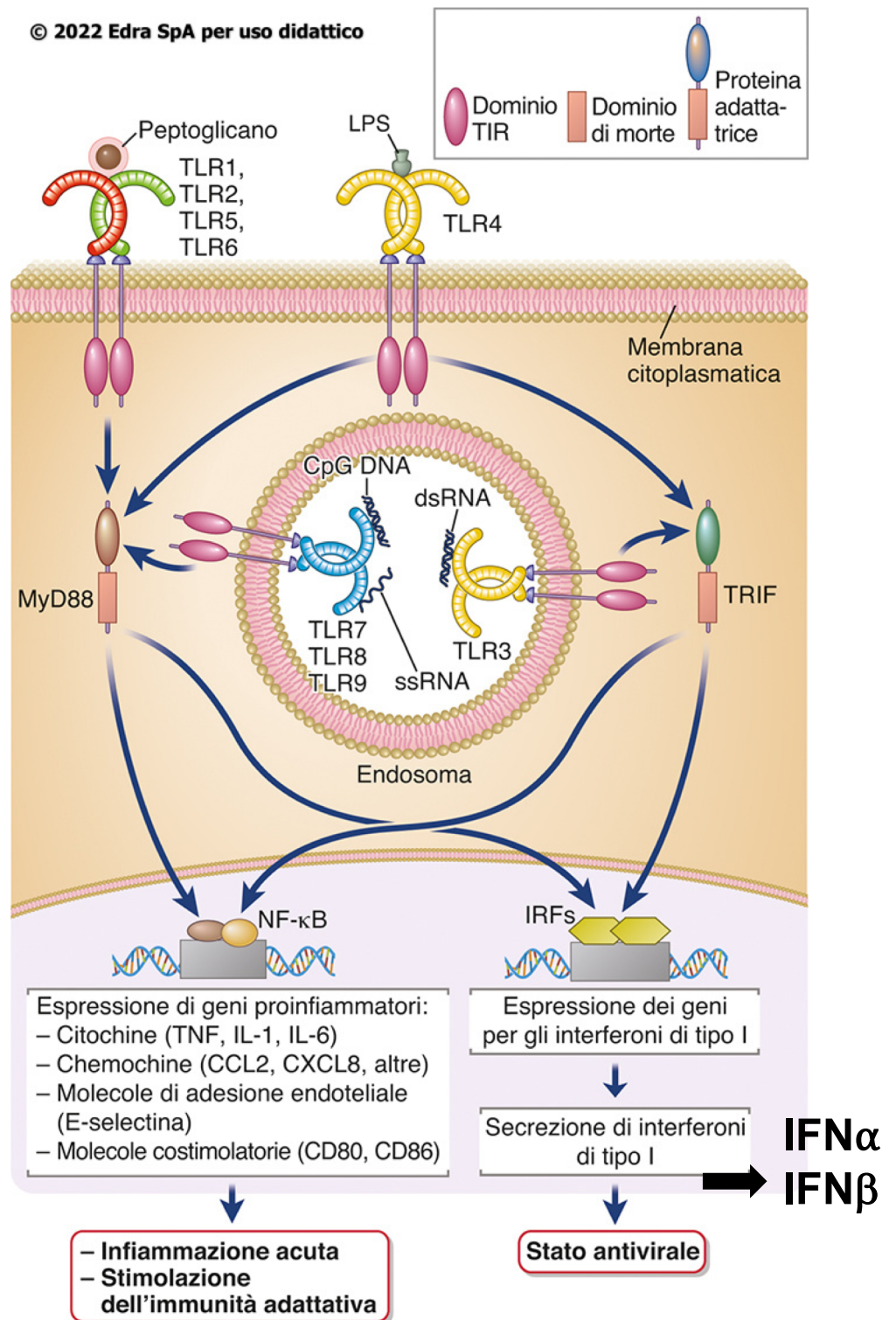


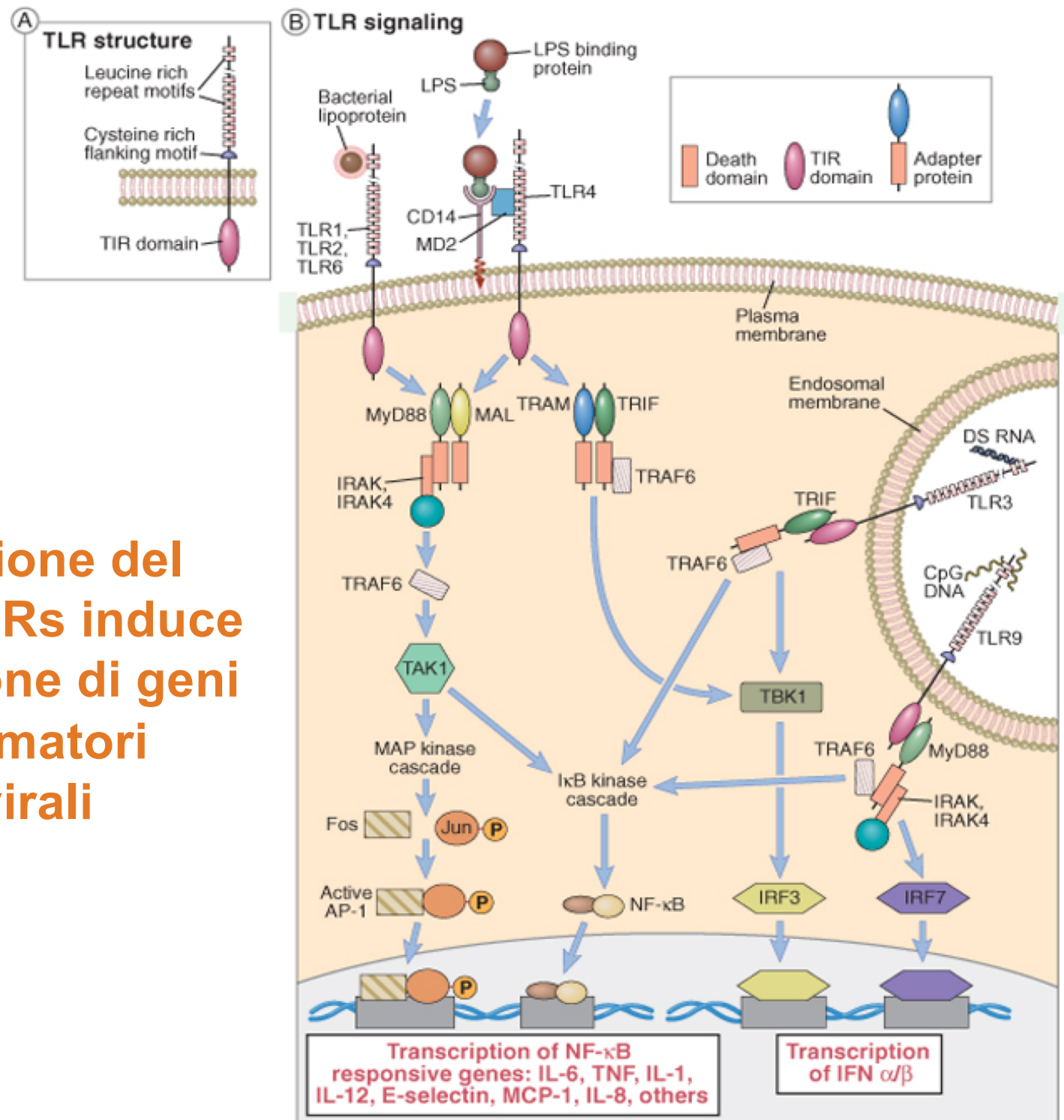
La trasmissione del segnale dei TLRs induce l'espressione di geni per:

- la risposta infiammatoria
- stimolare la risposta adattativa
- geni per lo stato antivirale

Fattori di trascrizione attivati:

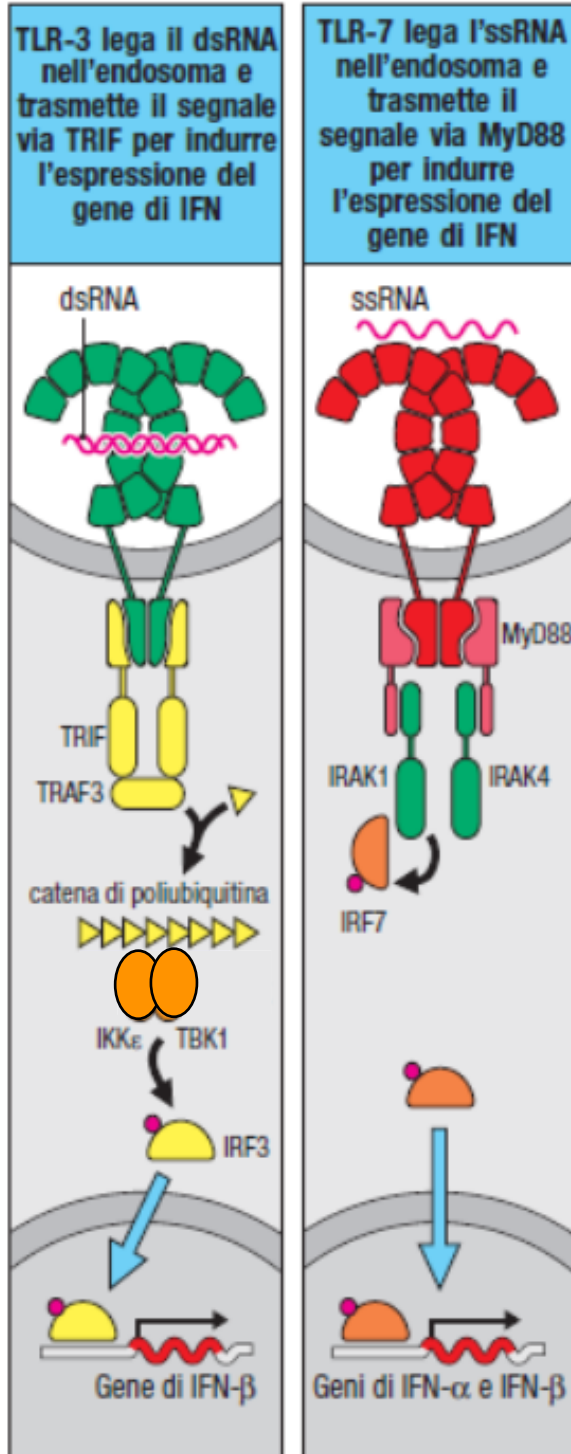
- NFκB
- AP1
- IRF3 (interferon Regulatory Factor 3) → produzione IFN tipo I (IFNβ)
- IRF7 (interferon Regulatory Factor 7) → produzione IFN tipo I (IFNα)





La trasmissione del segnale dei TLRs induce sia l'espressione di geni pro-infiammatori sia antivirali

TLR e stato anti-virale



TLR3 (endosomiale):

Riconosce l'RNA a doppio filamento virale (dsRNA) e recluta **TRIF**.

TRIF interagisce con **TRAF3** (E3 ubiquitina ligasi) che genera uno scaffold di poliubiquitina reclutando il complesso **IKK ϵ /TBK1** che fosforila **IRF3** → attivazione e traslocazione nucleare

- IRF3 induce la trascrizione di **IFN β** che media la risposta anti-virale.

(TLR3 promuove anche l'infiammazione attivando NF κ B)

Gli altri TLR endosomiali:

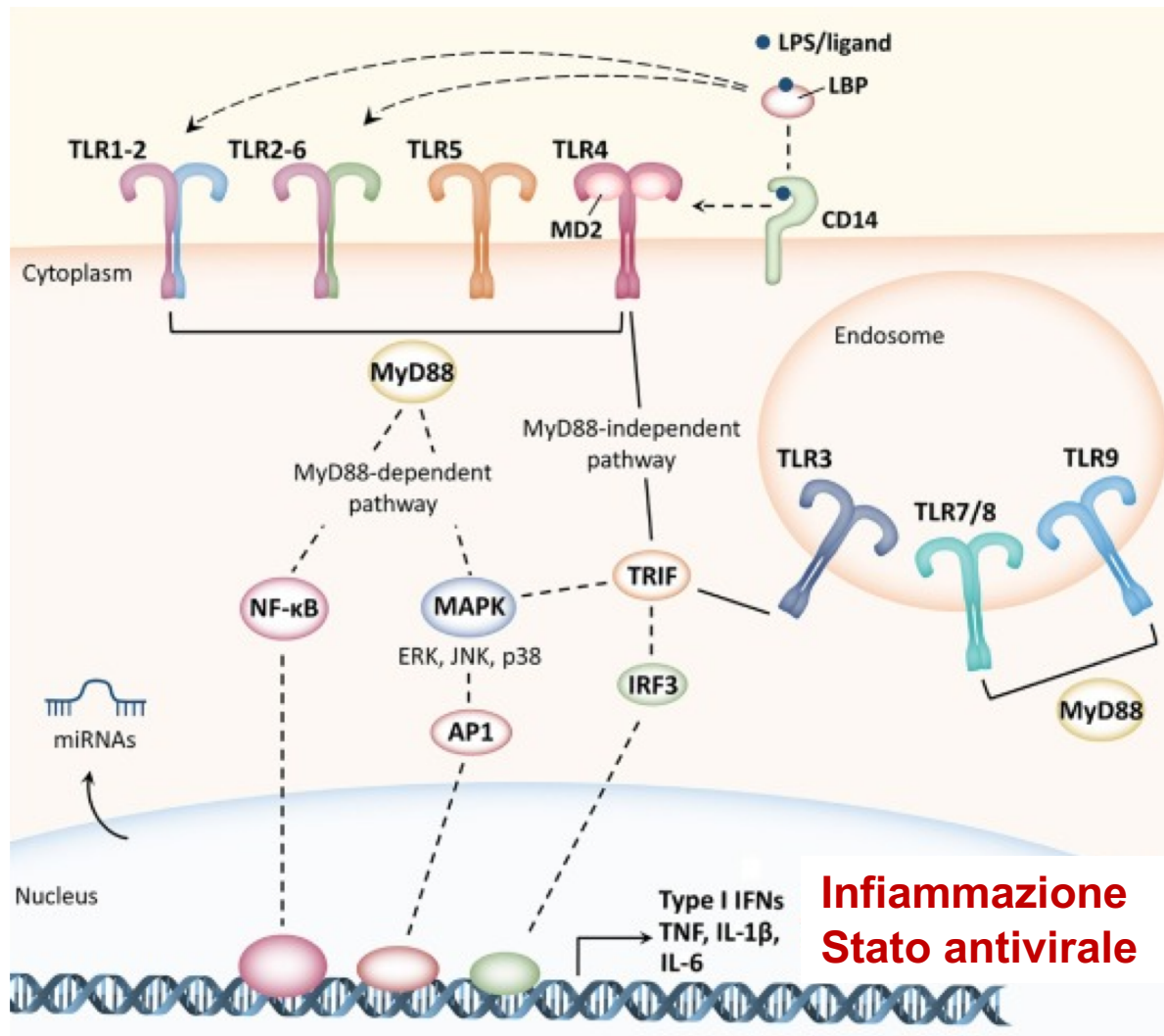
-**TLR 7 e 8** (legano ssRNA ovvero RNA a singolo filamento virali)

-**TLR 9** (lega CpG non metilati del DNA microbico)

Agiscono tramite MyD88 e **inducono sia infiammazione sia produzione di IFN di tipo I** (soprattutto IFN α)

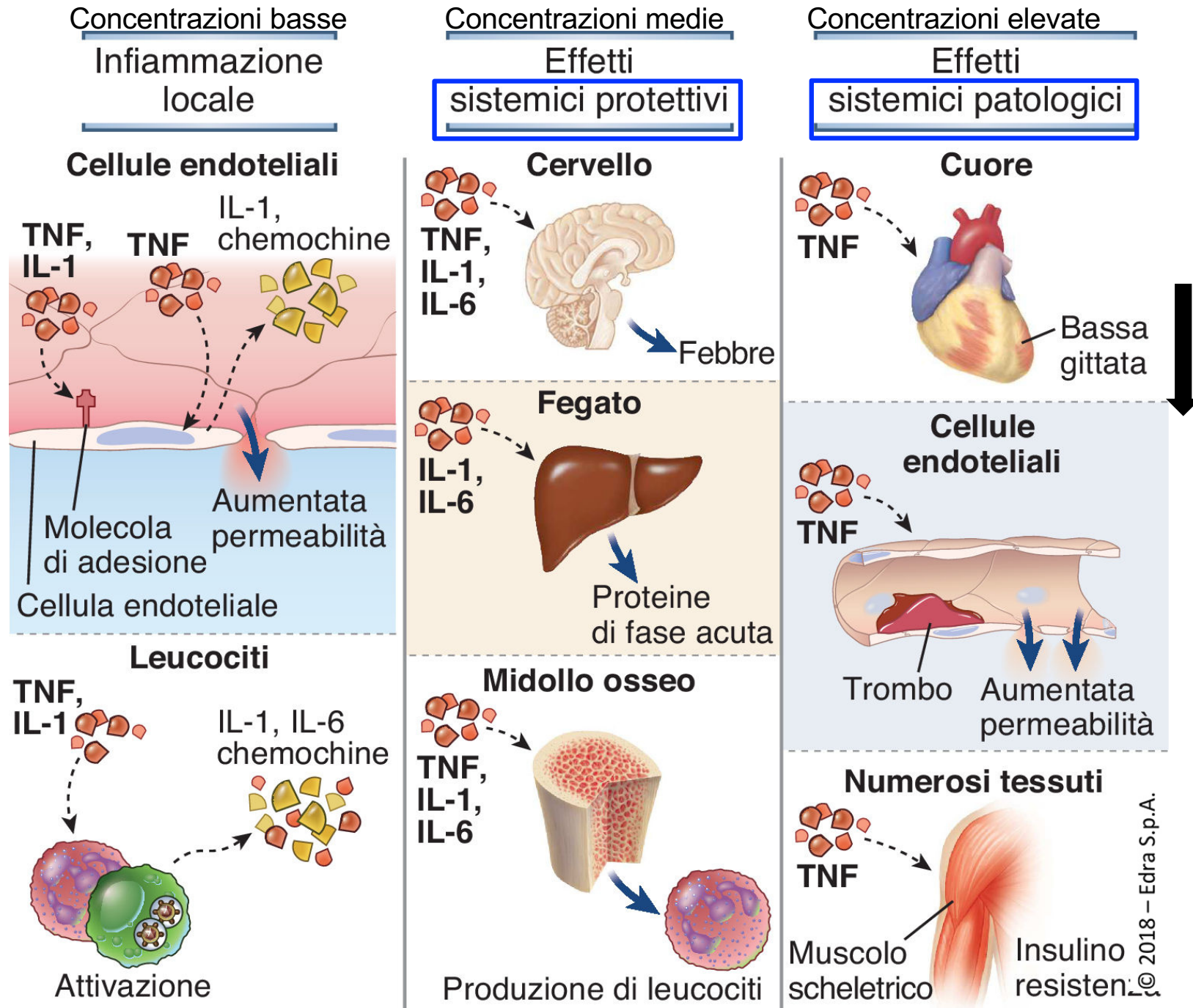
Anche il **TLR4** (presente sulla membrana plasmatica riconosce LPS) può indurre la trascrizione degli interferoni di tipo I

Pathways molecolari attivati dai TLRs



La trasmissione del segnale a partire dai TLRs induce sia l'espressione di geni pro-infiammatori ($\text{TNF}\alpha$, $\text{IL1}\beta$, IL6) che geni antivirali ($\text{IFN}\alpha$ e $\text{IFN}\beta$)

Effetti delle citochine proinfiammatorie: $TNF\alpha$, IL1 e IL6



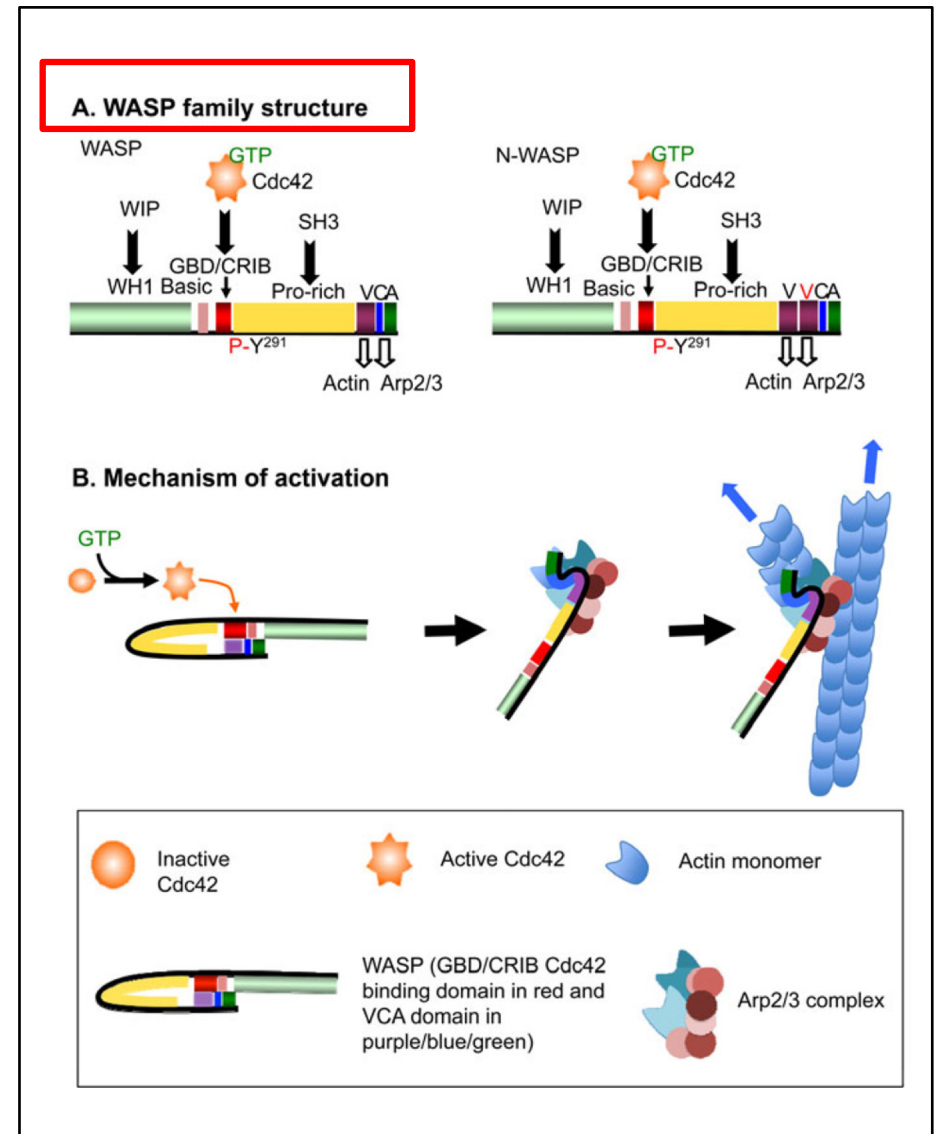
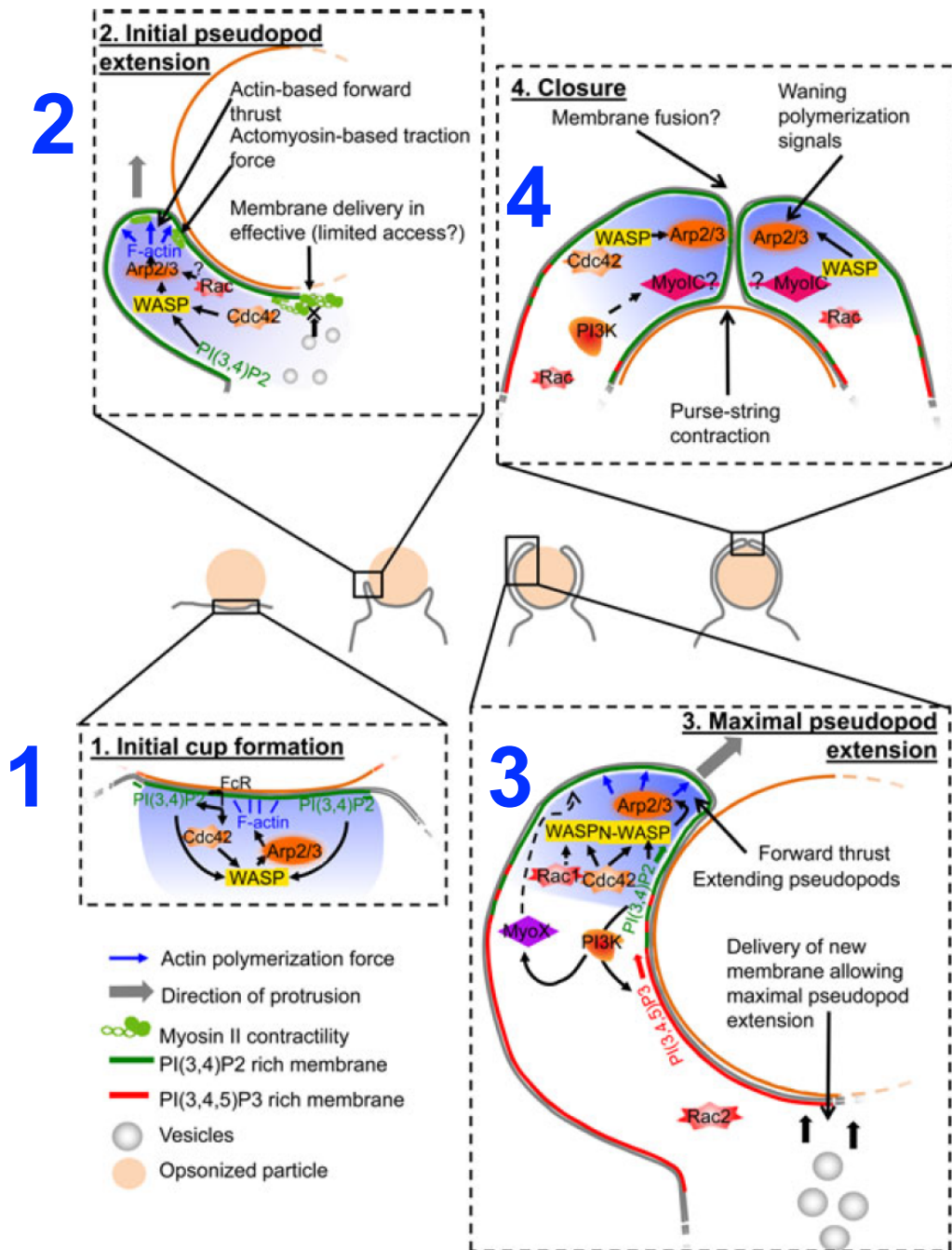
Attività biologiche del TNF α

Reclutamento monociti e neutrofilii nel sito infiammatorio e attivazione (favorisce infiammazione locale):

- Induce espressione molecole adesione sull'endotelio (**Selectine** e ligandi delle integrine **ICAM e VCAM**)
- Induce aumento produzione di **chemochine (CXCL8; CCL2)** e citochine (IL1) e attività microbica nei leucociti
- **Azione sistemica:**
 - ❖ Induce produzione prostaglandine nelle cellule dell'ipotalamo → **febbre**
 - ❖ Stimola la produzione delle proteine di fase acuta nel fegato (**PCR, fibrinogeno, SAP**)
 - ❖ **Danno muscolare:** cachessia → **catabolismo sia del muscolo sia del grasso** → **deperimento fisico**
 - ❖ Alte concentrazione ($> 10^{-7}$ M) > inibizione contrattilità vascolare e miocardica → **calo pressione arteriosa e shock**
 - ❖ **Trombosi vascolare:** stimolazione produzione **fattore tissutale** che attiva la coagulazione ed inibizione **trombomodulina** (inibitore della coagulazione)

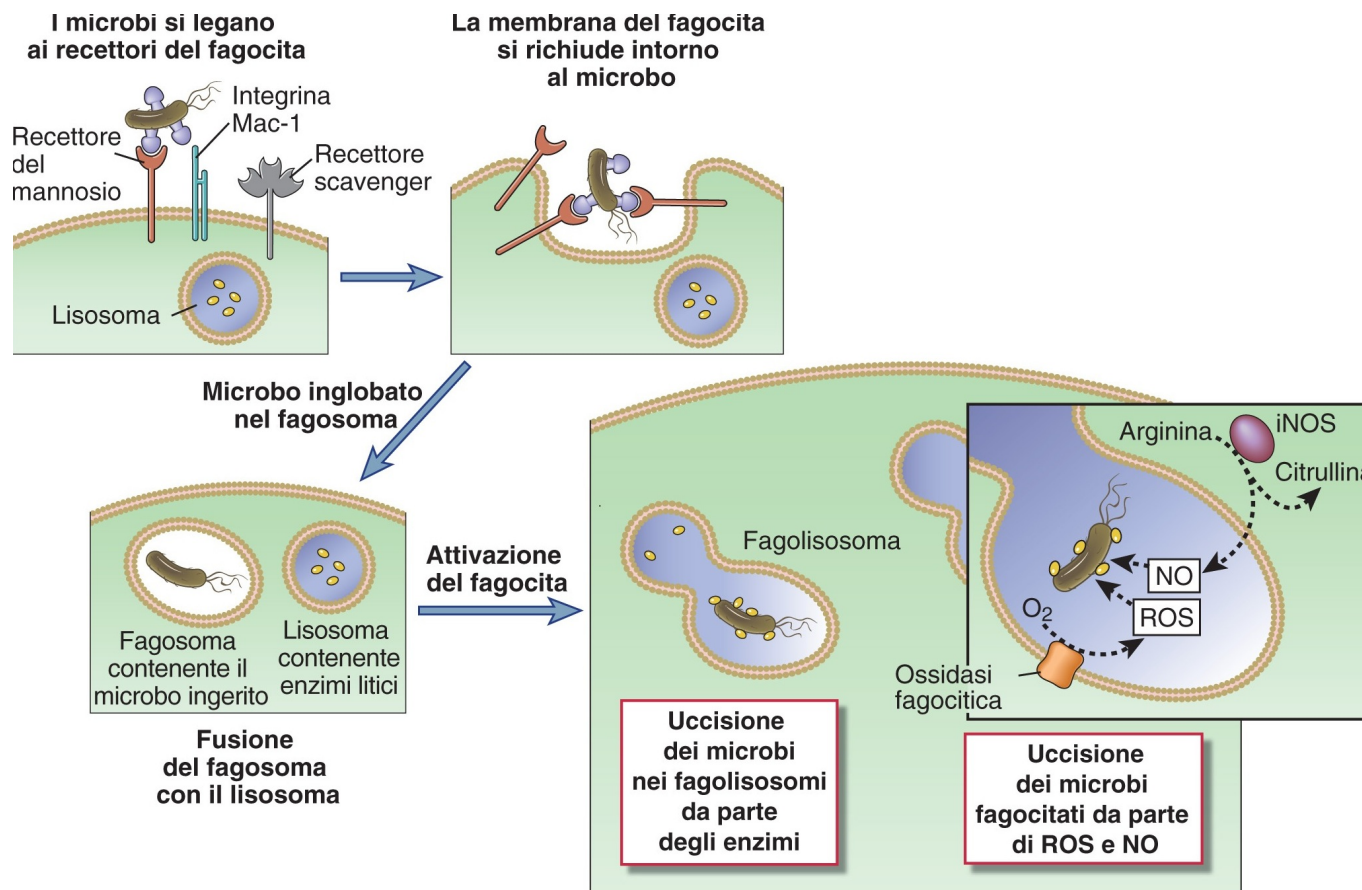
Nello Shock settico (stato di sepsi o setticemia → livelli molto elevati di TNF α):
collasso cardiocircolatorio, coagulazione intravascolare disseminata e danno multiorgano

Fagocitosi



Endocitosi e formazione del fagolisosoma

- Induzione di protrusioni di membrana chiamate **pseudopodi** che avvolgono il microbo.
- Fusione degli pseudopodi permette l'inglobamento del microbo in una struttura chiamata fagosoma.
- Fusione del fagosoma con il lisosoma e formazione di un fagolisosoma
- Uccisione dei microbi fagocitati.



Enzimi lisosomiali

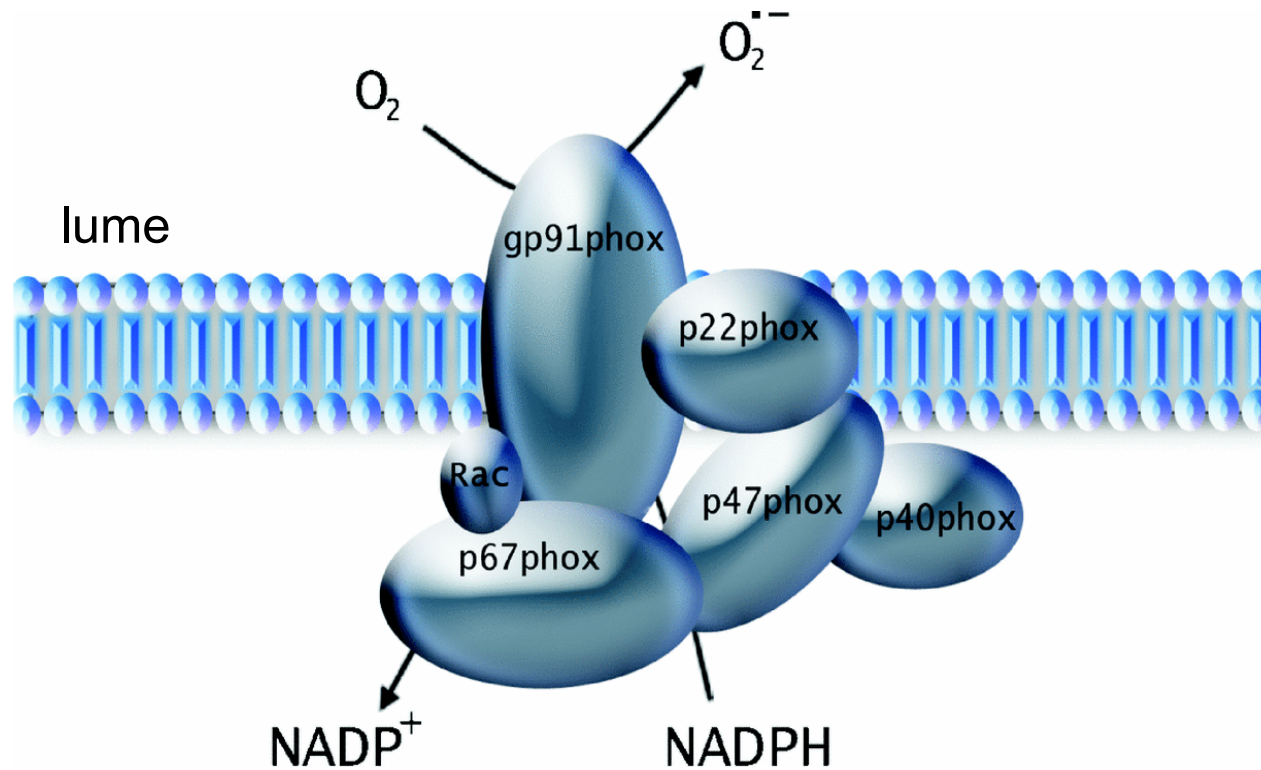
- Lisozima
- Defensine
- Mieloperossidasi
- Idrolasi e proteasi acide: (elastasi, catepsina G)
- Collagenasi, gelatinasi
- Lattoferrina
- Fosfatasi alcalina
- Attivatore del plasminogeno

Burst respiratorio:

- **ROS** (specie reattive dell'ossigeno)
- **RNS** (specie reattive dell'azoto)

Struttura della NADPH ossidasi

o ossidasi fagocitica

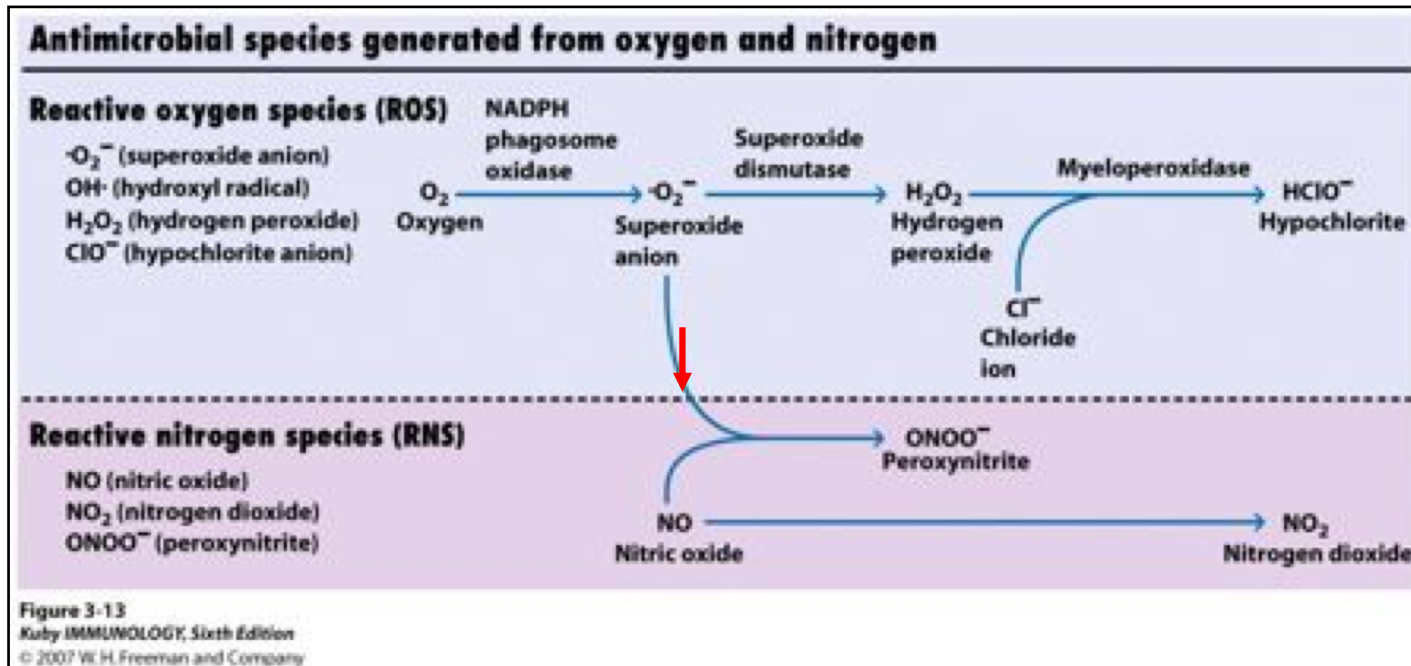


NADPH Ossidasi



- gp91-phox e p22-phox sono membranarie
- p67-phox, p40-phox e p47-phox sono citosolici
- Assemblaggio del complesso nella membrana del fagosoma
- Il complesso è attivato da **IFN γ** e dai **ligandi dei TLRs**

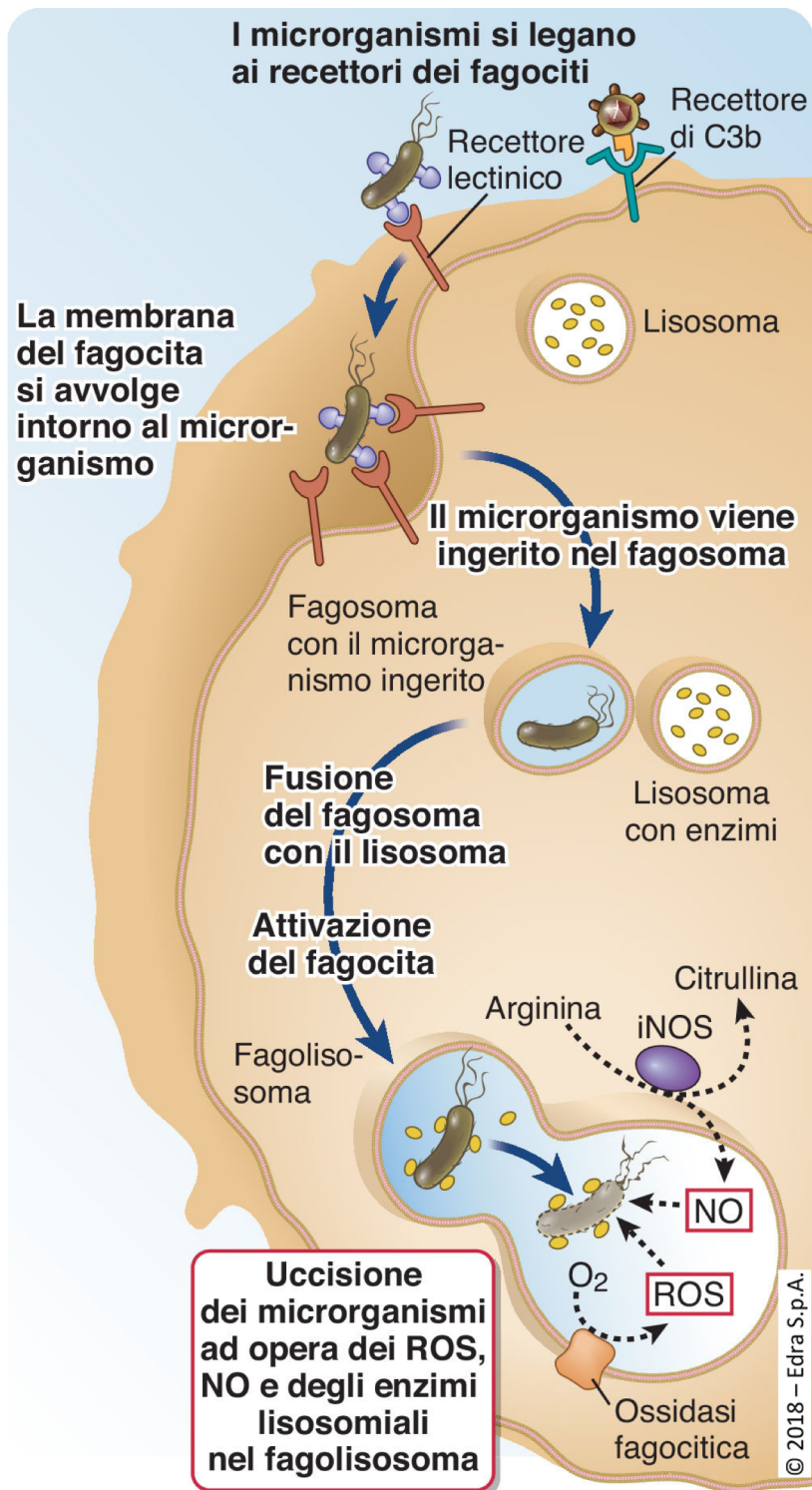
Esplosione respiratoria



iNOS → converte arginina in citrullina producendo NO

Sintasi inducibile dell'ossido nitrico

L'esposizione respiratoria si ha soprattutto nei neutrofili attivati e in minor misura nei macrofagi



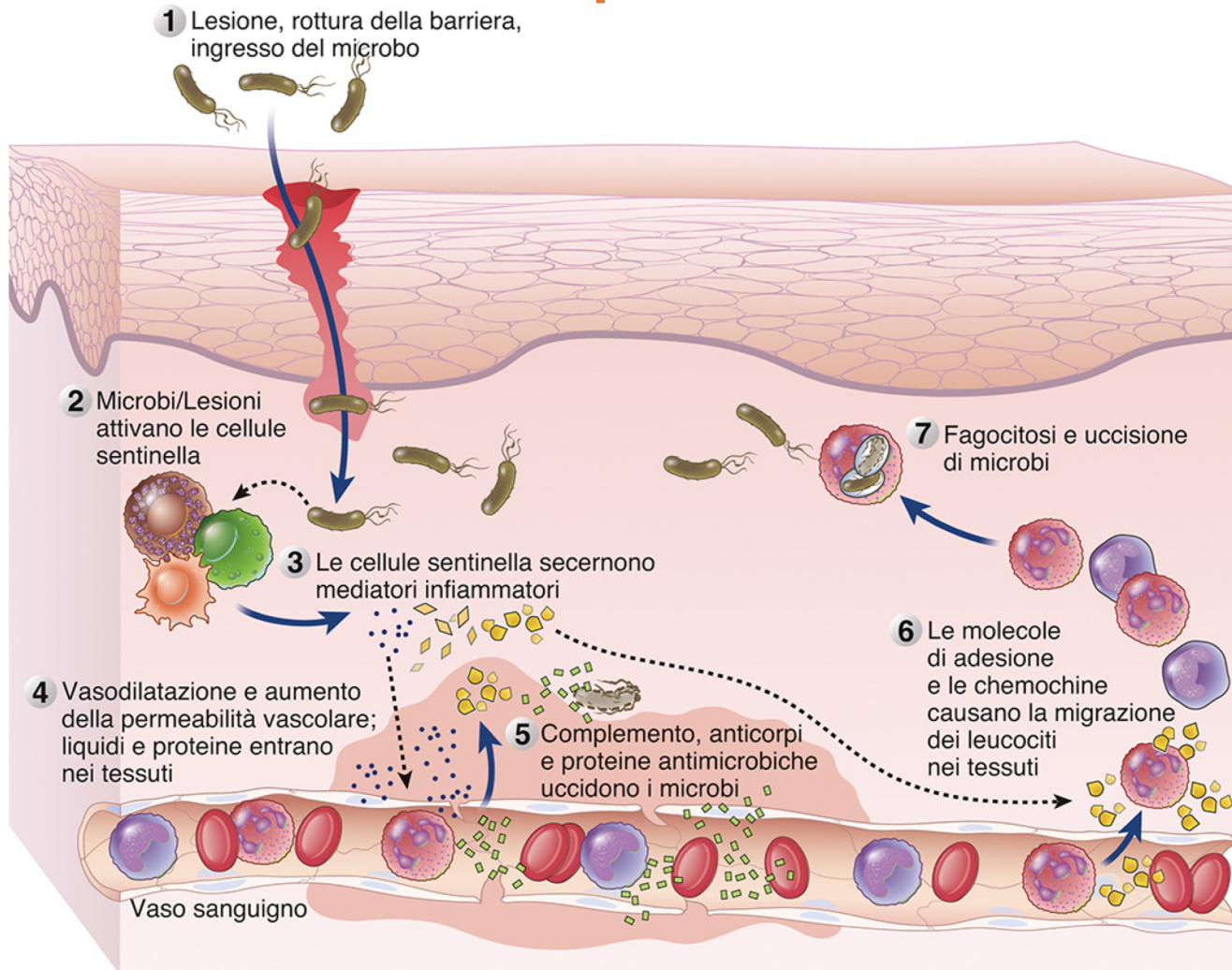
Fagocitosi ed eliminazione intracellulare di patogeni

Molti recettori permettono l'ingestione dei microrganismi.

Alcuni legano direttamente il microbo altri legano i microrganismi opsonizzati.

I microrganismi vengono internalizzati nei fagosomi che si fondono con i lisosomi a formare i fagolisosomi in cui i microbi sono uccisi dalle specie reattive dell'ossigeno, dell'azoto e dagli enzimi lisosomiali.

Risposta infiammatoria acuta



Le cellule dell'immunità innata contrastano le infezioni ed il danno tissutale attraverso l'infiammazione grazie alla quale nel sito infettato o danneggiato si accumulano leucociti, proteine plasmatiche e fluidi.

Principali citochine dell'immunità innata:

- **TNF α**
- **IL-1**
- IL-12
- IFN di tipo I
- IL10
- **IL6**
- IL15
- IL18
- IL23
- IL27

Le risposte infiammatorie acute iniziano quando microbi superano le barriere epiteliali o quando il tessuto è danneggiato (1). Successivamente i **PAMP** e i **DAMP** attivano le cellule sentinella, come **macrofagi**, cellule dendritiche, mastociti (2) inducendo secrezione di citochine e altri mediatori (3). Alcuni di questi mediatori per esempio (istamina, prostaglandine) aumentano la permeabilità dei capillari (4) portando all'ingresso di proteine plasmatiche (per esempio proteine del complemento) nei tessuti (5). Altri mediatori (**IL1**, **TNF α**) aumentano l'espressione delle molecole di adesione endoteliale e, infine, le **chemochine** promuovono il movimento dei leucociti dalle venule post-capillari nei tessuti (6) dove i leucociti eliminano i microbi e le cellule danneggiate (7), amplificano l'infiammazione e promuovono i processi di riparazione