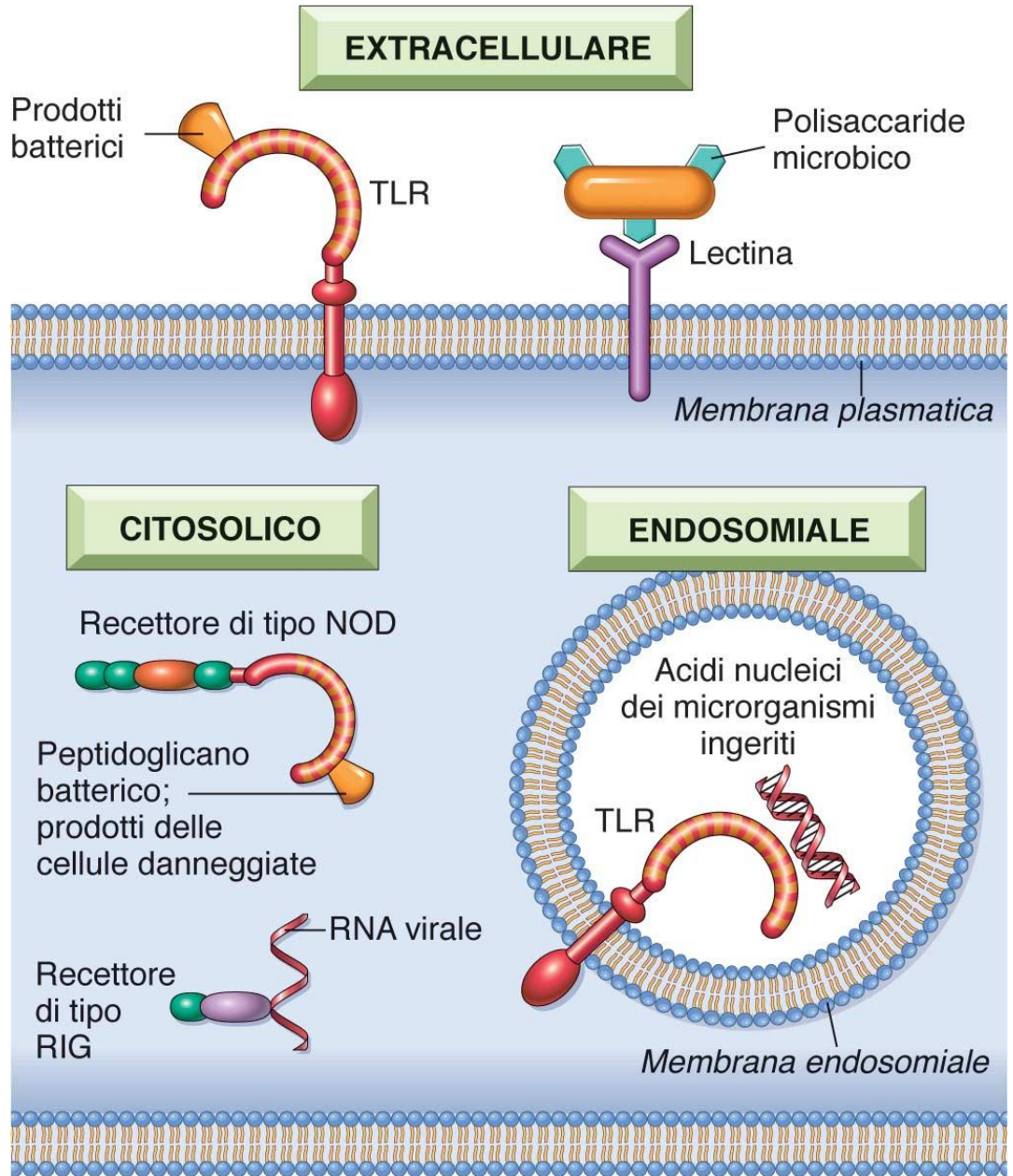


I recettori sulla membrana plasmatica individuano germi extracellulari, quelli endosomiali riconoscono i microrganismi fagocitati e i recettori citosolici si legano ai microrganismi contenuti nel citoplasma



I RECETTORI CITOPLASMATICI DELL'INFIAMMAZIONE

Recettori PAMPs (e DAMPs) intracellulari

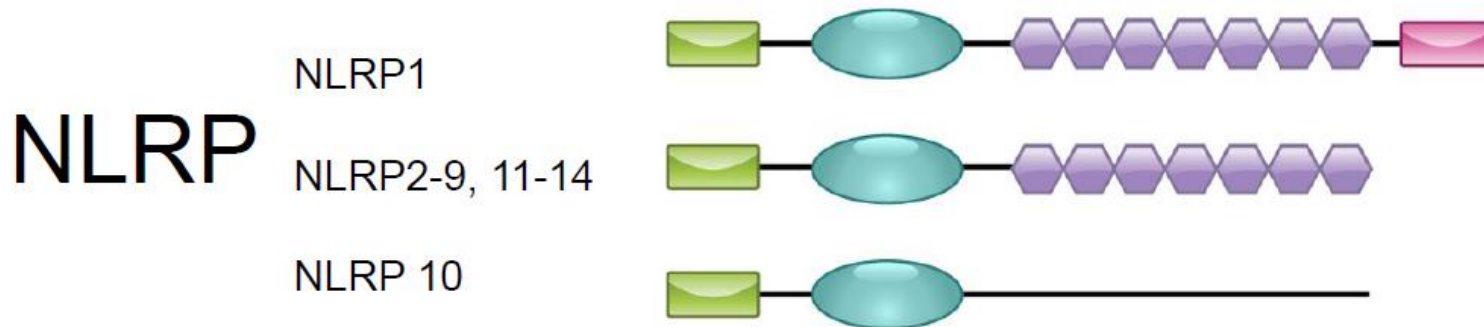
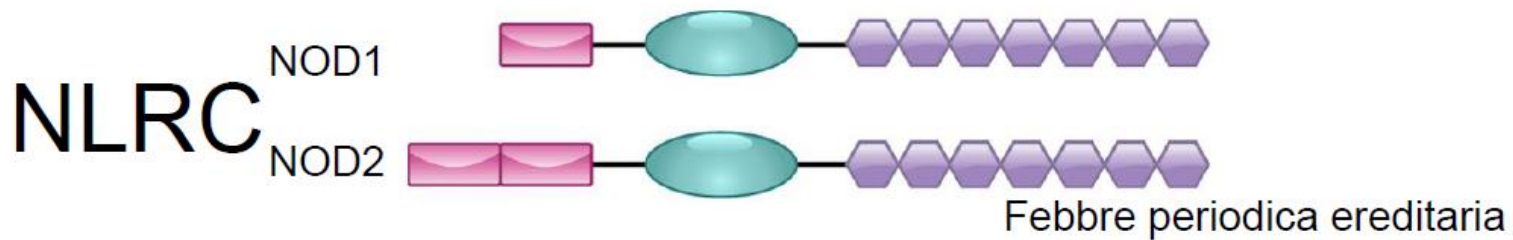
Recettori NOD-Like (NLRs)

- Nucleotide-binding Oligomerization Domain proteins, NODs

Una nuova classe di sensori di danno:
NLRs (NOD-LIKE RECEPTORS)
Nucleotide-binding oligomerization receptors

- Si tratta di proteine CITOPLASMATICHE coinvolte nel riconoscimento di PAMPs;
- Possono anche percepire segnali di danno endogeno o segnali di stress (Danger-Associated Molecular Patterns (**DAMPs**))
- Il sistema di recettori NLR comprende 22 proteine citoplasmatiche che comprendono 5 membri della sottofamiglia NOD, 14 membri NLRP, IPAF, NAIP e CIITA.

I NLR contengono un dominio NOD, un dominio LRR e un dominio variabile, o CARD o pirinico



Da Anne-Kathrin Claes et al. Physiology 2015;30:241-250, modificato



CARD



Pyrin



NOD



LRR

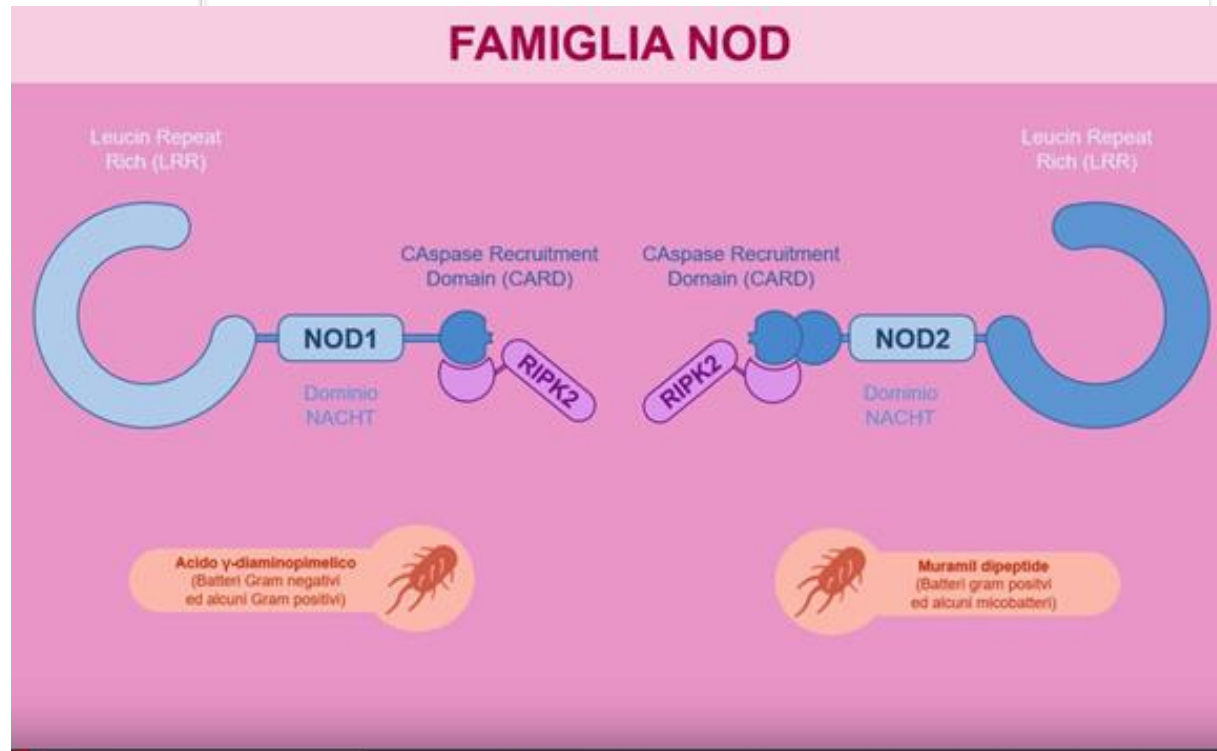
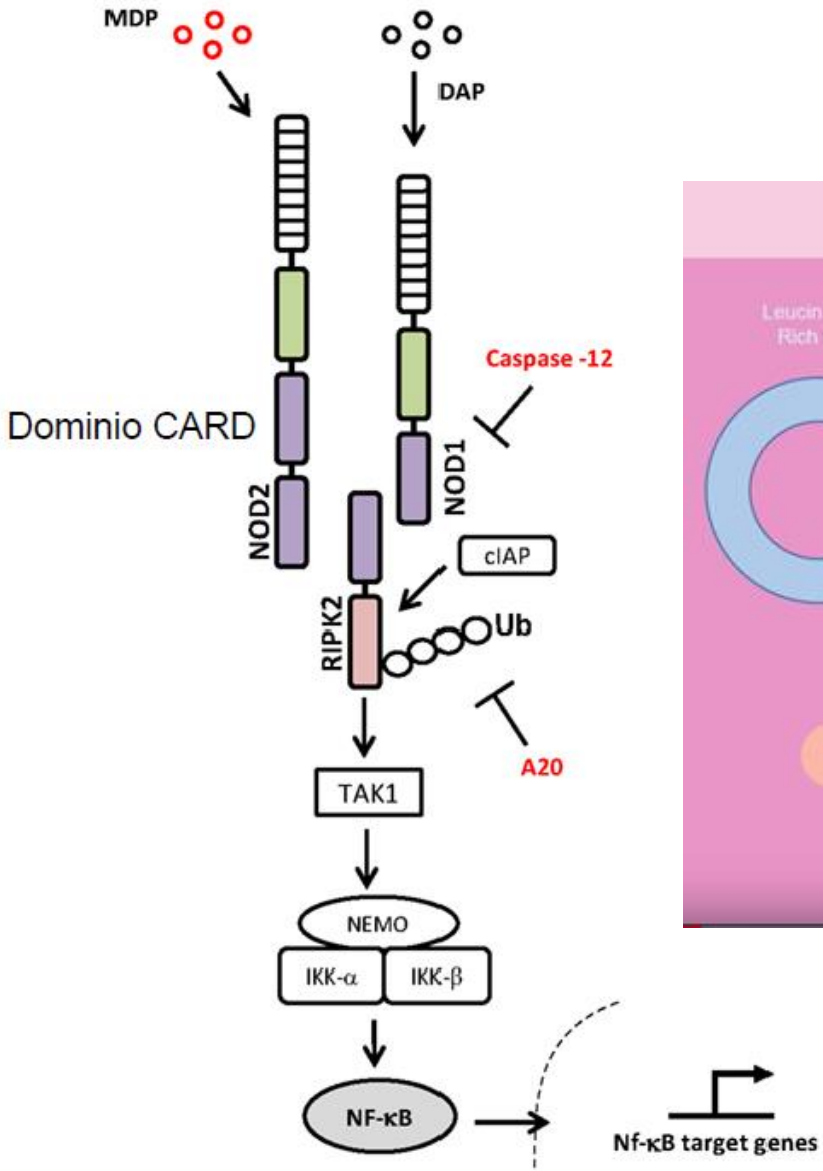
leucine-rich domain

caspase-recruitment domain (CARD) or pyrin domain

Via del segnale dei NLRs

- I NLRs legano PAMPs e DAMPs
- I NLRs possiedono **due funzioni:**
 - attivare la via del segnale di NF- κ B attraverso il reclutamento della proteina RIPK2, una chinasi che possiede un dominio CARD con cui interagisce con il dominio omotipico CARD dei NLRs
 - attivare l'inflammasoma

Attivazione dei NLRs ed effetti



Via del segnale dei NLRs

- I NLRs legano PAMPs e DAMPs
- I NLRs possiedono **due funzioni:**
 - attivare la via del segnale di NF- κ B attraverso il reclutamento della proteina RIPK2, una chinasi che possiede un dominio CARD con cui interagisce con il dominio omotipico CARD dei NLRs
 - attivare l'inflammasoma

Inflammasoma: la centrale di controllo che integra i segnali di PAMPs e DAMPs

- Perché Central Processing Unit? L'inflammasoma è una vera e propria centrale di controllo che integra tutte le informazioni derivate da PAMPs e DAMPs e le traduce in produzione di IL-1 β
- L'inflammasoma è una piattaforma molecolare che taglia la pro-IL-1 β immatura in IL-1 β matura.

Come viene regolato l'inflammasoma

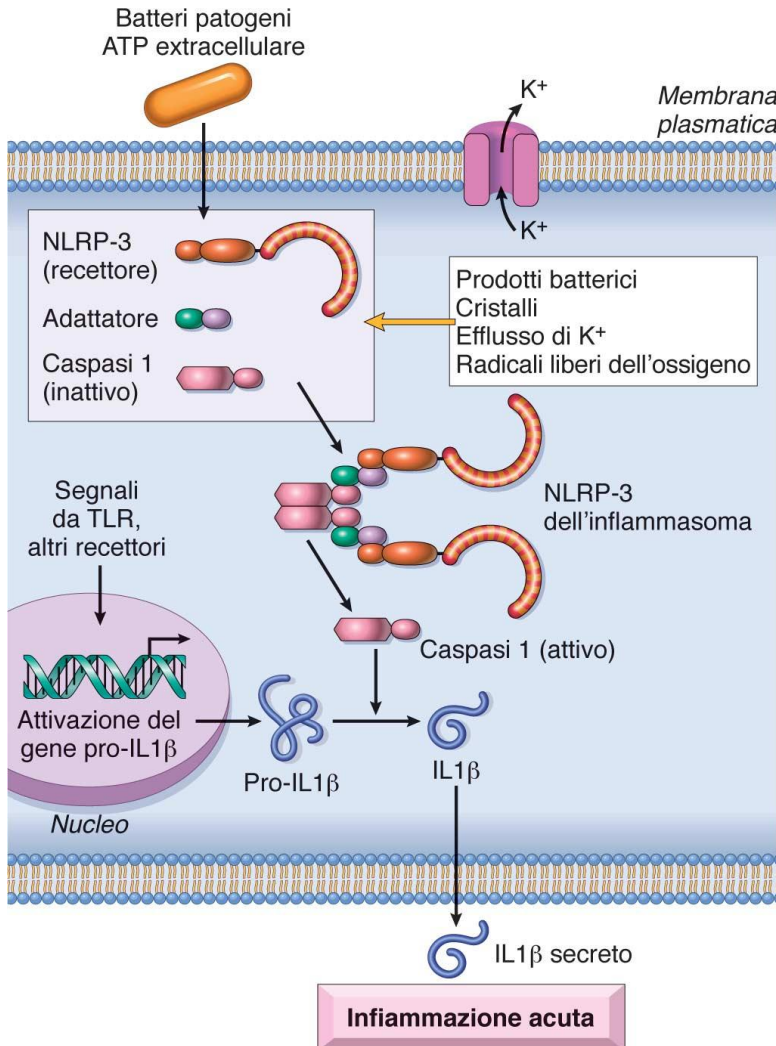
Meccanismo finemente controllato, a due step:

1° segnale, innesco. Inviato tramite PAMPs e DAMPs. Porta alla trascrizione dei geni proinfiammatori (IL-1 β , NLRP, ecc.)

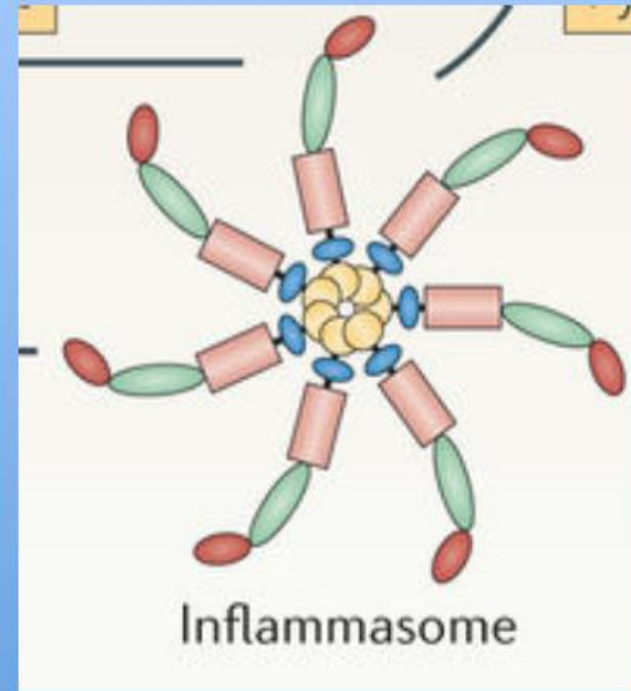
2° segnale, attivazione. Inviato tramite altri PAMPs e DAMPs che attivano NLRP. Poi, efflusso di K⁺, ingresso di Ca²⁺, distruzione di lisosomi, disfunzione mitocondriale, produzione di ROS, tossine, acidi nucleici virali, ecc. favoriscono l'oligomerizzazione.

L'inflammosoma è un complesso multiproteico citosolico che attiva la procaspasi 1 in caspasi 1 che a sua volta attiva la pro-IL-1beta in IL-1. L'IL-1 è un mediatore flogistico che recluta i leucociti e induce la febbre.

FORMAZIONE DELL'INFLAMMOSOMA → PRODUZIONE E SECREZIONE DI IL-1

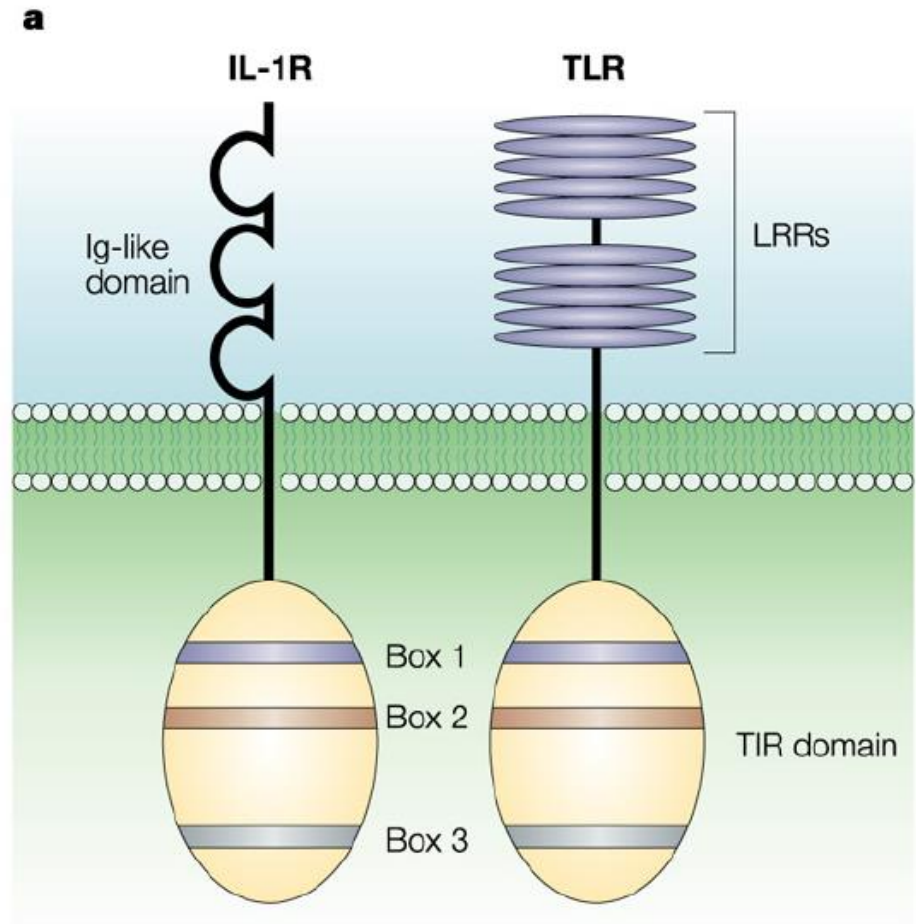


Gli NLRPs oligomerizzano e formano una struttura eptamerica: l'inflammasoma



Recettore di IL-1 β

- Recettore simile ai Toll. Contiene un dominio TIR
- Stimola la via di NF- κ B e la sua autoproduzione
- Stimola la trascrizione dei geni dell'inflammazone



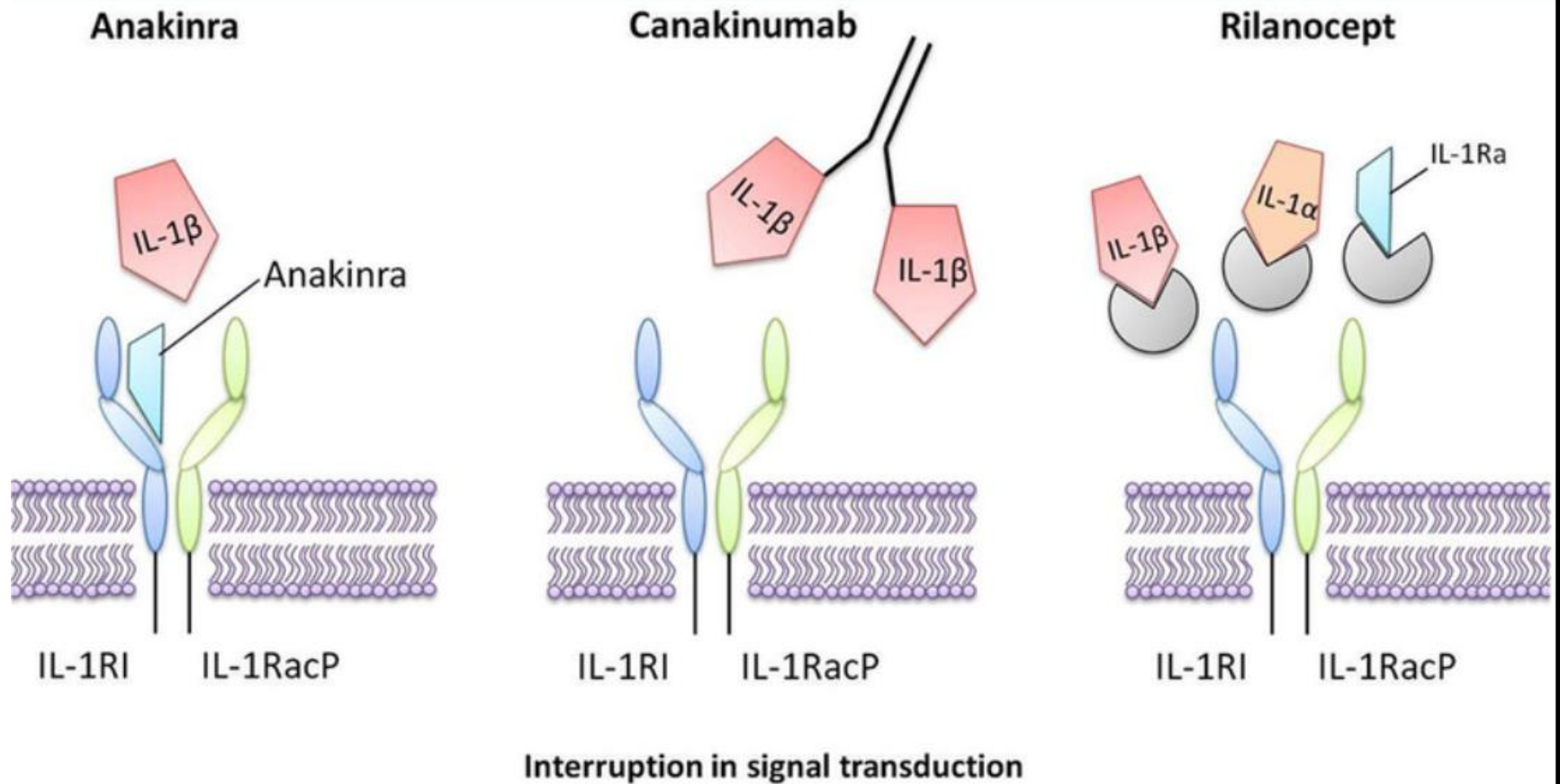
Le inflammasomopatie

Malattie auto-infiammatorie ereditarie

- Patologie rare, ad esordio precoce (entro 10 anni)
- Aberrante risposta infiammatoria secondaria ad alterazioni su base genetica di proteine dell'inflammasoma
- Patologie episodiche, scatenate da eventi esterni (es. infezioni, stress)

Caratteristiche cliniche

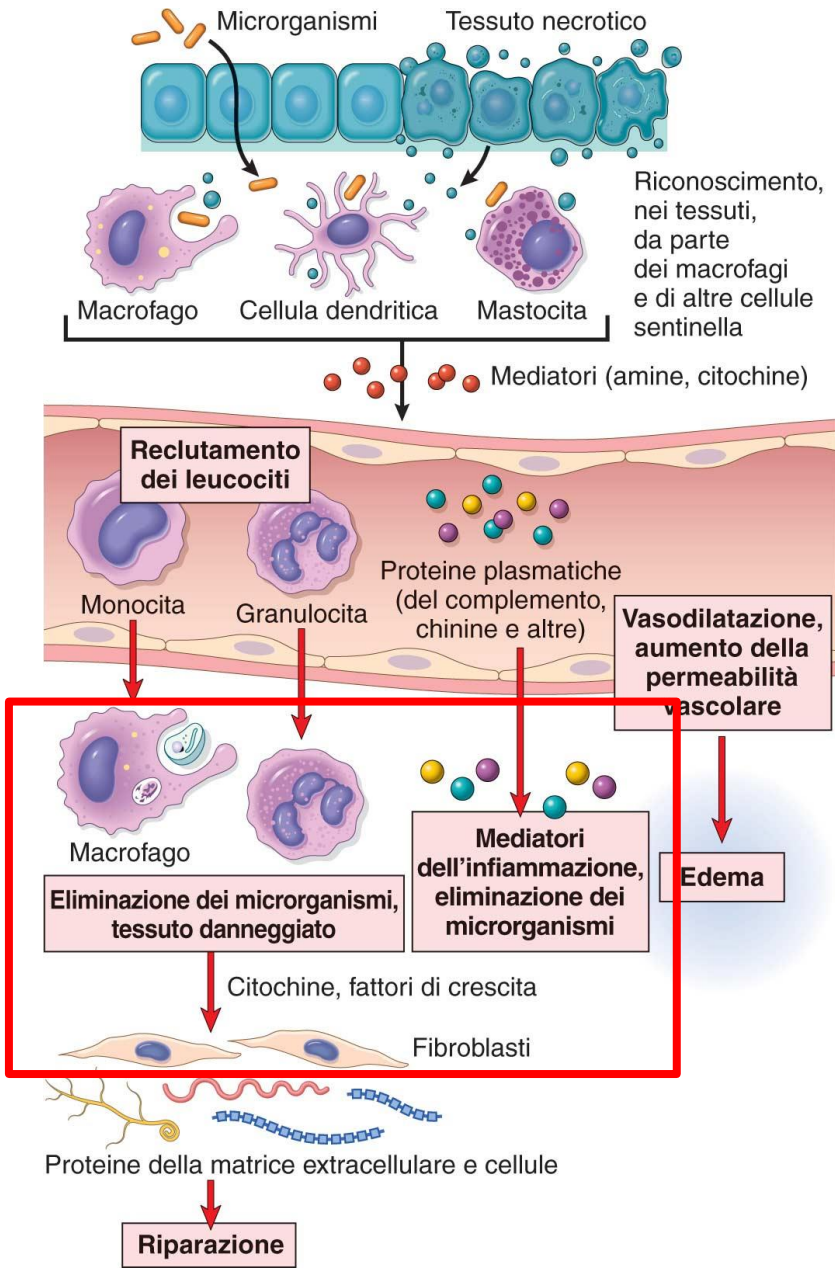
1. febbri ricorrenti
2. infiammazioni locali e/o diffuse con
 - rash cutanei
 - dolori articolari, artrite distruttiva
 - congiuntiviti



3 nuovi farmaci approvati da Food and Drug Administration:

- canakinumab, un anticorpo anti IL-1 β neutralizzante
- anakinra, un antagonista del recettore di IL-1 β
- rilonacept, un recettore decoy che si lega a IL-1 β

IMPIEGO crescente, nonostante i costi



Le funzioni dei leucociti

- Fagocitare patogeni e detriti cellulari
- Produrre mediatori chimici dell'infiammazione per amplificare la risposta infiammatoria

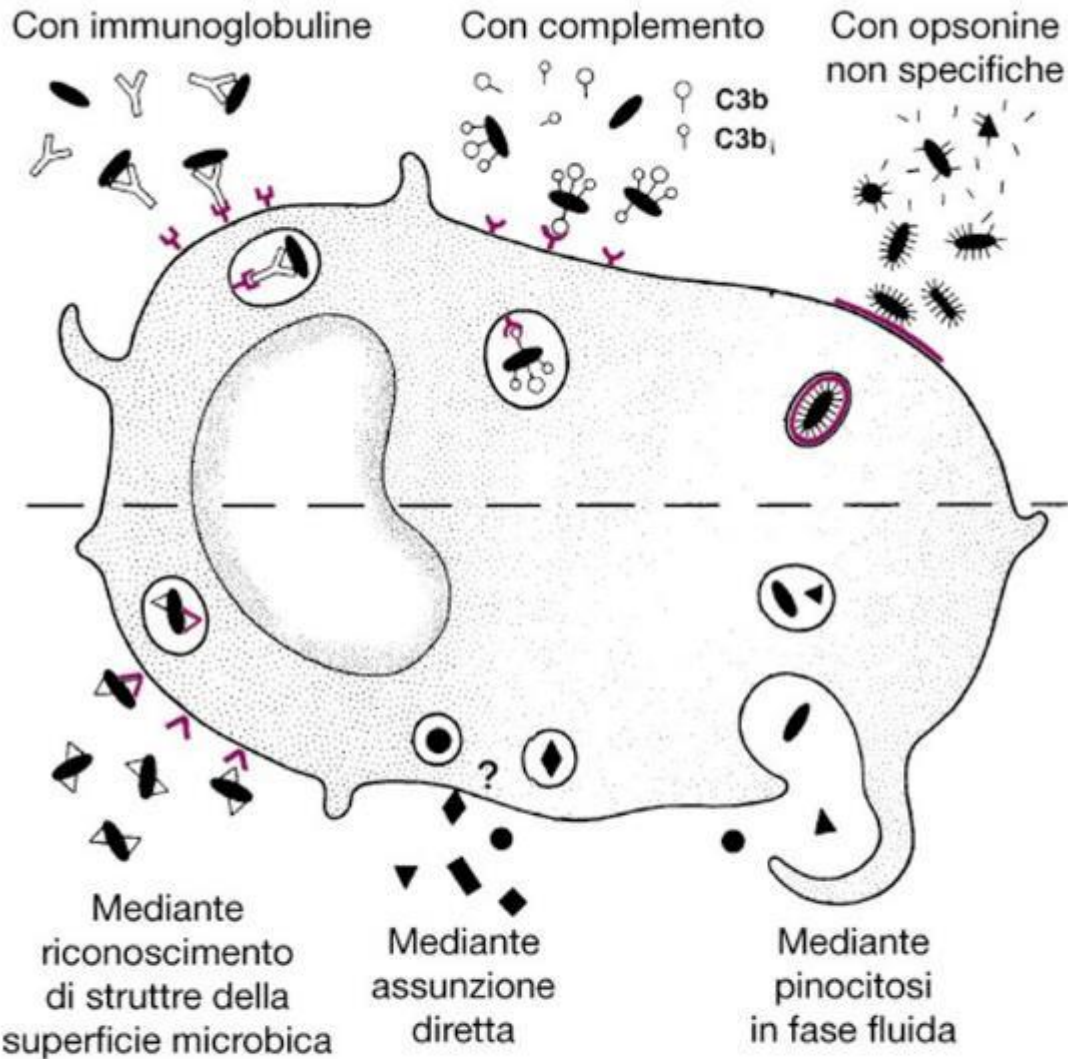
La fagocitosi

La capacità posseduta da diverse cellule di ingerire, digerire e neutralizzare materiali estranei e cellule danneggiate. Essa è svolta da:

Fagociti professionali: leucociti polimorfonucleati, monociti, macrofagi e cellule dendritiche

Fagociti facoltativi: fibroblasti, mastociti, endotelioцитi e altre cellule.

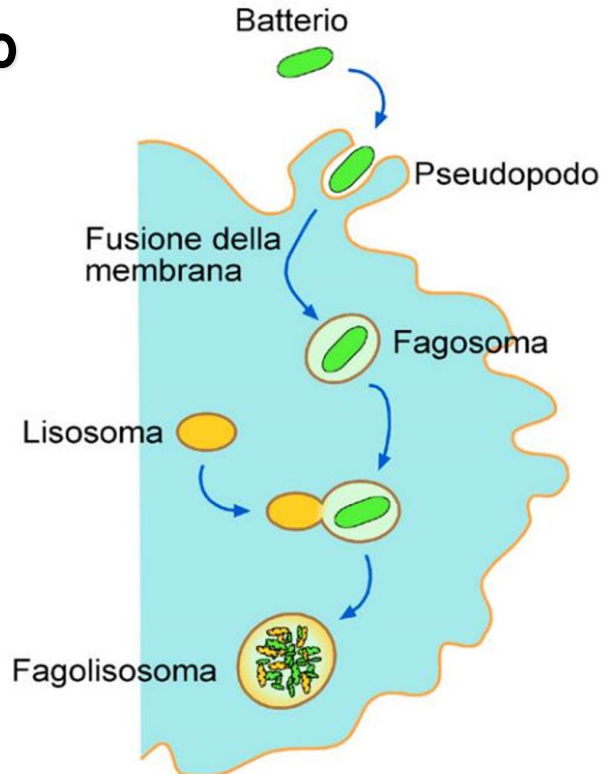
FAGOCITOSI CON OPSONIZZAZIONE



FAGOCITOSI SENZA OPSONIZZAZIONE

FAGOCITOSI

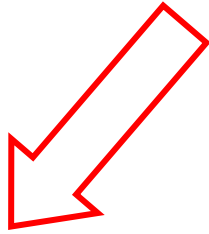
- Riconoscimento ed adesione del fagocita all' agente estraneo
- Formazione del fagosoma
- Acidificazione del fagosoma
- Fusione della membrana lisosomiale con quella del fagosoma ed attivazione degli enzimi lisosomiali a pH acido (idrolasi acide)
- Digestione del materiale inglobato



L'ingaggio delle opsonine con i loro recettori:

1. Permette l'adesione salda con il patogeno
2. Trasmette un segnale intracellulare che:
 - Induce la fusione dei granuli con il fagosoma
 - Causa l'assemblaggio della NADPH-ox
 - Promuove la trascrizione genica

MECCANISMI DI DISTRUZIONE



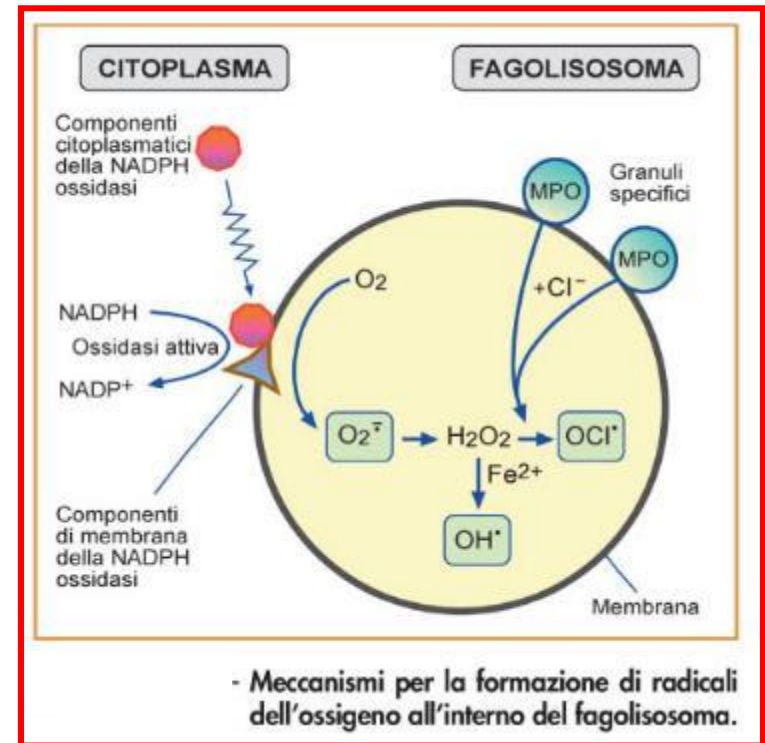
Ossigeno-Indipendenti

Enzimi contenuti nei GRANULI di 2 tipi: PRIMARI (lisosomi contenenti difensine e proteasi) e SECONDARI (contenenti lisozima e proteine chelanti cofattori batterici)



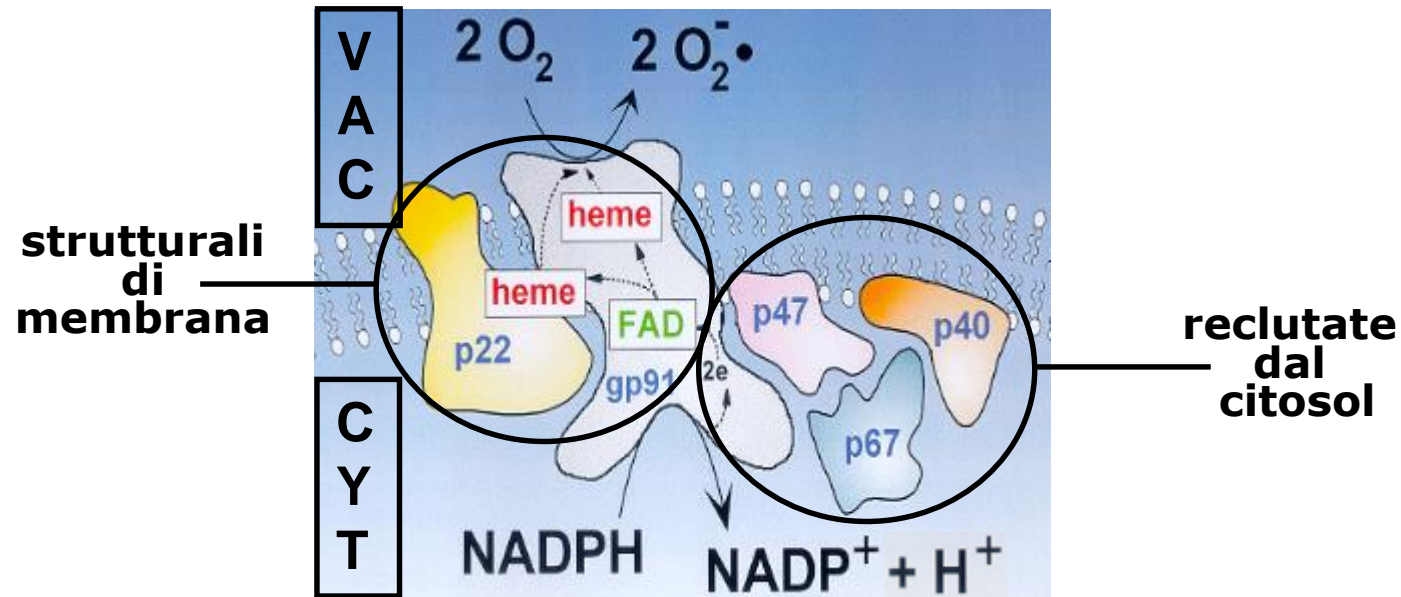
Ossigeno-Dipendenti

MECCANISMI OSSIDATIVI ad opera di NADPH-ossidasi che riduce l' O_2 ad anione superossido (granuli specifici)



MECCANISMI ANTIBATTERICI OSSIGENO-INDIPENDENTI

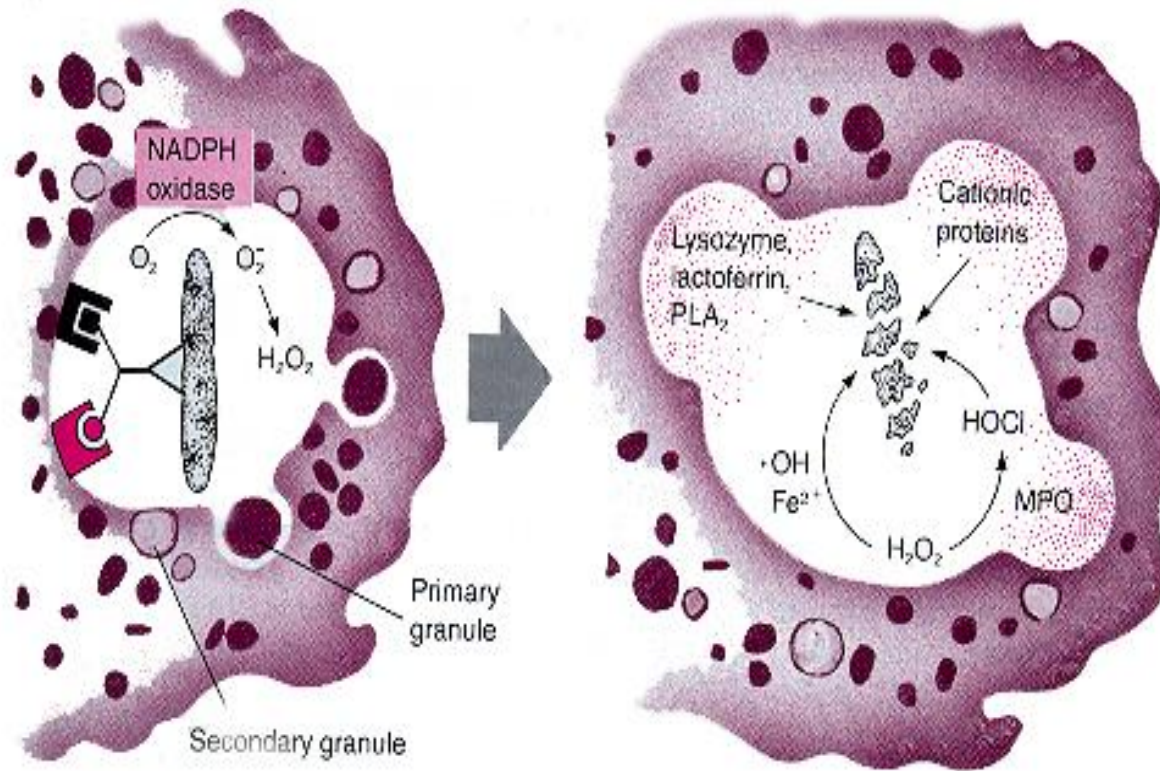
Il complesso enzimatico della NADPH ossidasi



L'attivazione di un neutrofilo si associa ad un improvviso picco di consumo di O_2 ("respiratory burst"), determinato dall'attivazione del complesso enzimatico della NADPH ossidasi.

Il complesso enzimatico è costituito dalle proteine *Phox* (per *phagocyte oxidase*). Di queste, 2 sono componenti costitutivi della membrana (p22 e gp91, che insieme definiscono il citocromo b558), mentre 3 vengono reclutate dal citosol solo dopo attivazione cellulare (p47, p40, p67).

L'attivazione cellulare consente l'aggregazione del complesso enzimatico e la generazione di anione superossido ($O_2^{\bullet -}$), che è poi convertito nel fagolisosoma in altre forme reattive dell'ossigeno (ROS) con il coinvolgimento di altri enzimi derivati dai granuli.



Esplosione ossidativa

L'esplosione del consumo dell'ossigeno e la glicogenolisi genera i metaboliti reattivi dell'ossigeno:

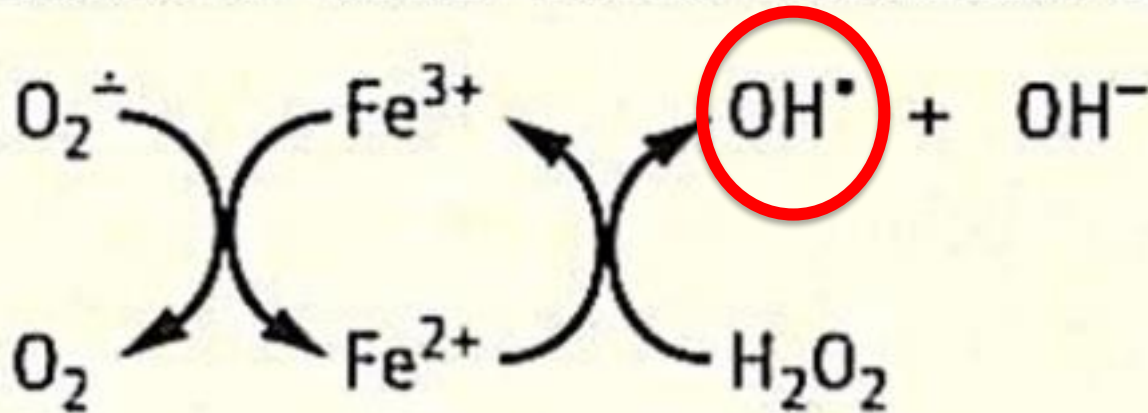
Anione superossido, perossido di idrogeno (acqua ossigenata), radicali liberi che hanno attività battericida:

La Mieloperossidasi (MPO) in presenza di Cloro trasforma H_2O_2 in $HOCl$ che uccide i batteri per reazioni di alogenazione

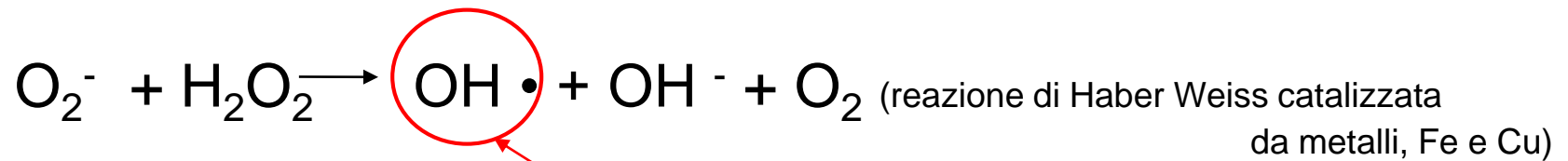
H_2O_2 e O_2^- non sono molto efficienti nell'uccidere i batteri, tuttavia:

(in presenza di metalli)

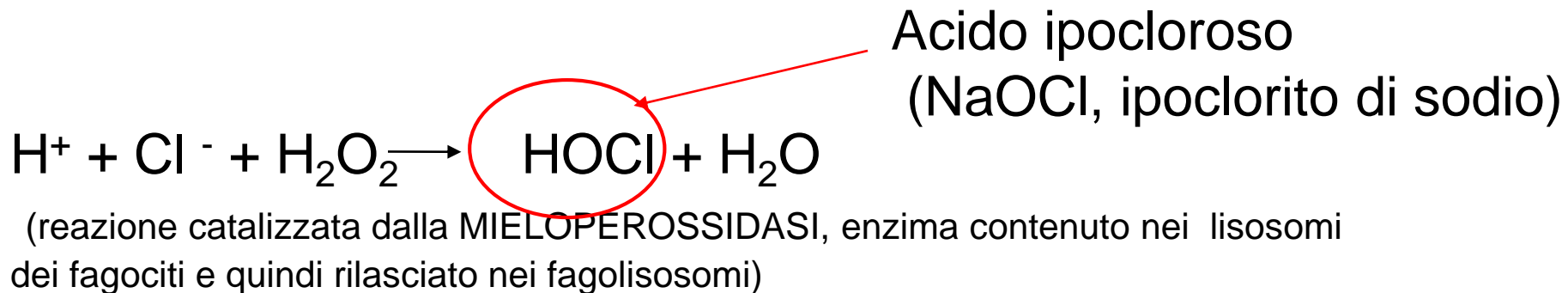
Reazione di Heber-Weiss catalizzata da metalli



Radicale
ossidrilico



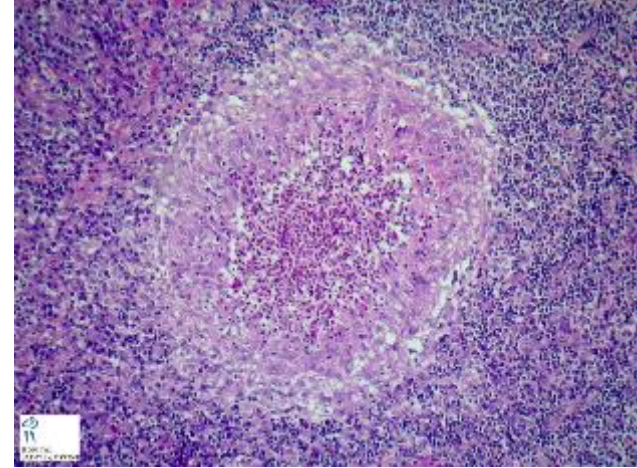
Radicale ossidrile



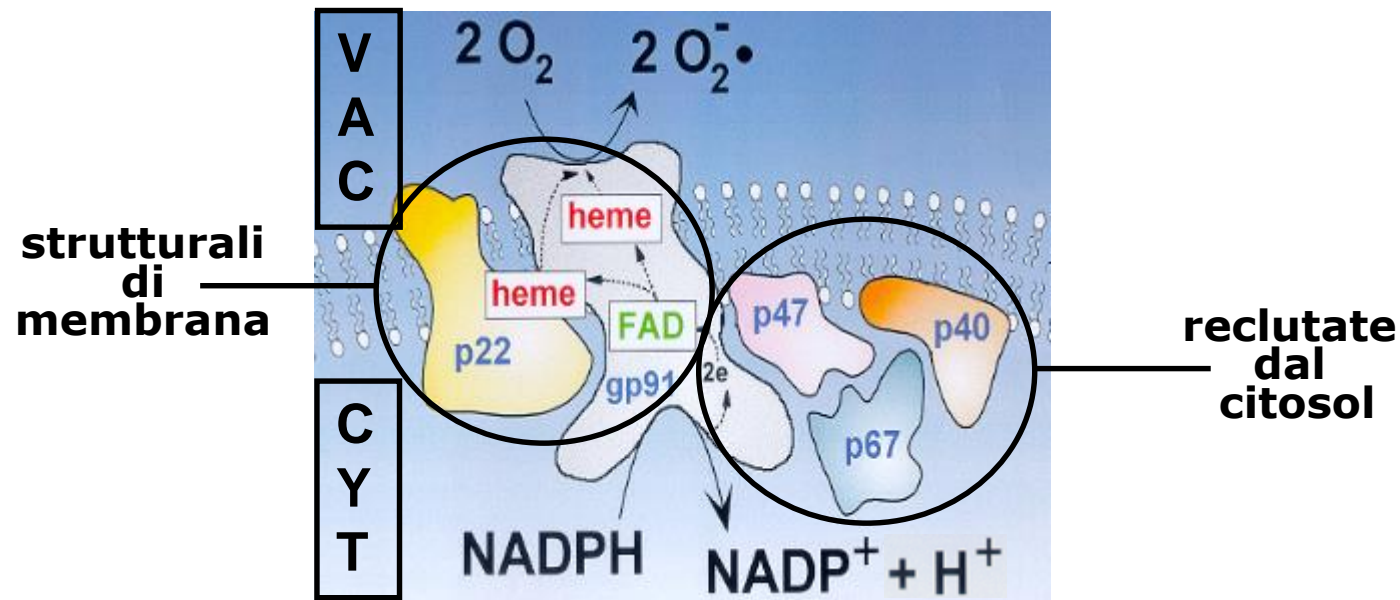
Radicale ossidrile e ipoclorito sono antisettici molto efficaci

Malattia granulomatosa cronica (CGD)

- patologia pediatrica su base genetica, rara (1:200.000/250.000)
- infezioni batteriche ricorrenti (coliti, polmoniti); candida e aspergillus
- difettiva produzione di anione superossido in neutrofili e macrofagi
- causata da un difetto di funzione del complesso della NADPH ossidasi
- formazione di granulomi nei siti di infezione
- spesso fatale, anche in presenza di copertura antibiotica aggressiva (età media 16 anni)



Malattia Granulomatosa Cronica (CGD)



Due terzi dei casi è legata al cromosoma X, dove si trova il gene per $\text{gp91}^{\text{PHOX}}$

Le altre forme sono autosomiche recessive:

5% dei casi di CGD con difetti in p67^{PHOX} e p22^{PHOX}

30% in p47^{PHOX}

I mediatori chimici dell'infiammazione acuta

RUOLO DEI MEDIATORI CHIMICI

Una volta avvenuto il riconoscimento, è necessario amplificare la risposta infiammatoria e modularla, mediante la produzione dei mediatori.

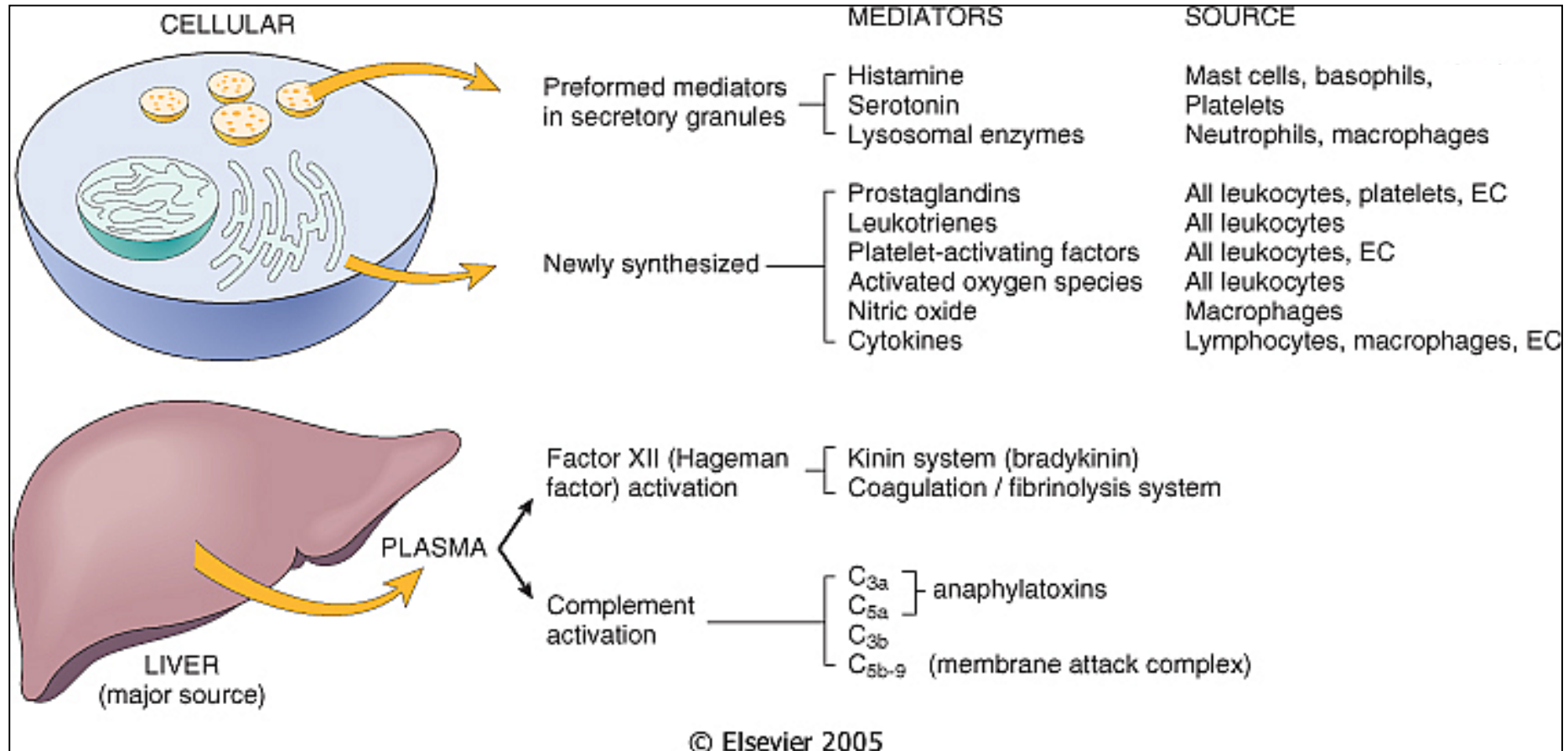
Il loro ruolo è:

- INnescare, AMPLIFICARE, CONTROLLARE SPAZIALMENTE E TEMPORALMENTE la RISPOSTA INFIAMMATORIA
- STIMOLARE RISPOSTE SISTEMICHE
- FAVORIRE LO SPEGNIMENTO della RISPOSTA INFIAMMATORIA

PROPRIETA' DEI MEDIATORI CHIMICI

- Hanno natura chimica diversa
- La maggioranza dei mediatori funziona da ligando (recettore)
- Possono stimolare cellule bersaglio a produrre mediatori secondari con attività sia agonista sia antagonista
- La maggior parte ha una emivita breve
- Effetto pleiotropico su molte cellule diverse
- Alcuni di loro hanno effetto sia locale che sistemico
- Il pattern di mediatori che viene attivato dipende dalla causa dell'infiammazione
- Effetto ridondante garantisce l'efficienza del sistema

Mediatori chimici dell'infiammazione



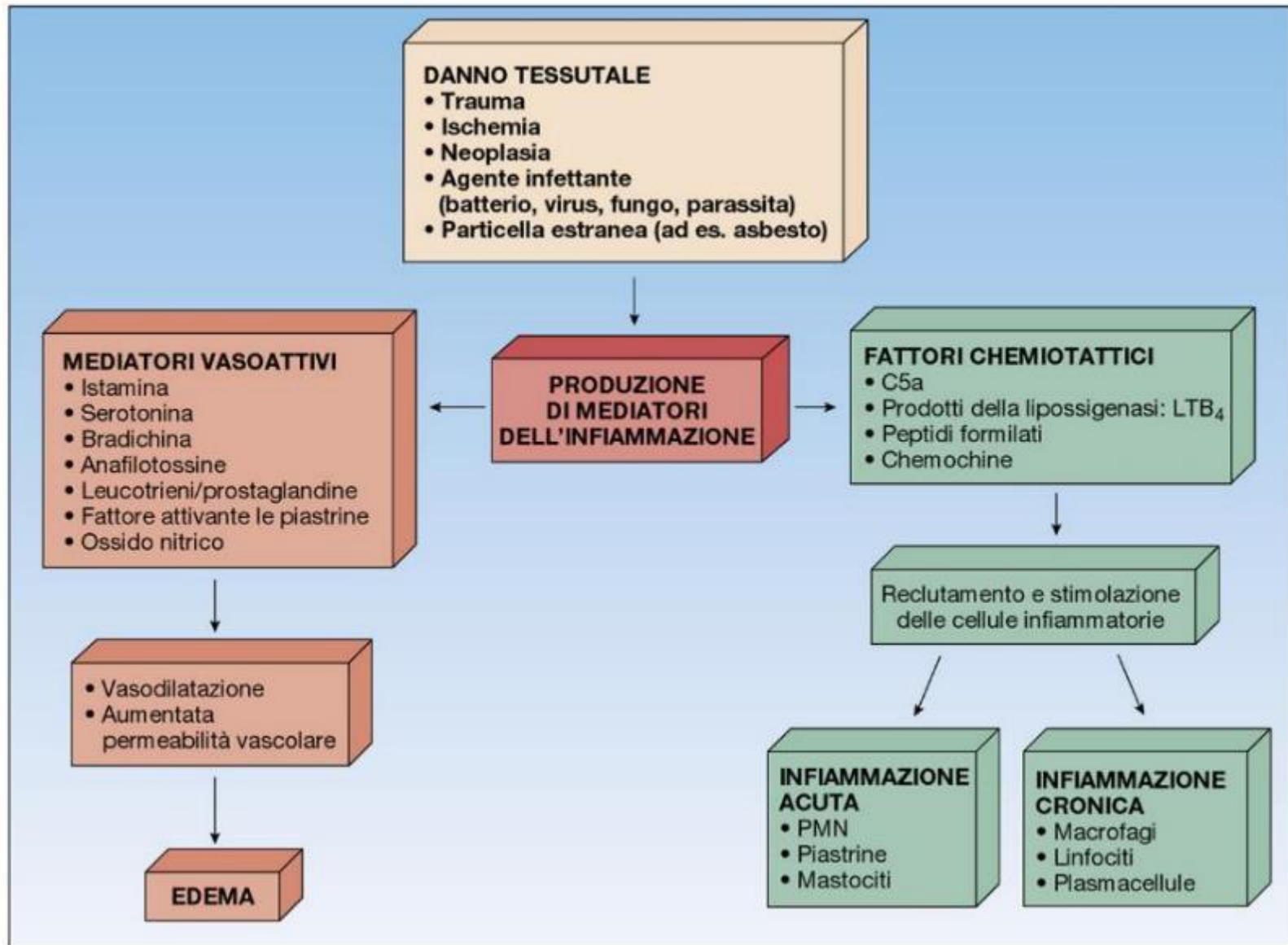
EC = endothelial cells.

Mediatori chimici dell' infiammazione: classificazione

E' importante classificare i mediatori chimici non solo sulla base della loro sorgente, ma anche in base a:

- Natura chimica
- Funzione nell' infiammazione
- Cinetica (attivati rapidamente, attivati tardivamente, a rapida azione, ad azione lenta ecc).

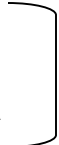
CLASSIFICAZIONE BASATA SULLA FUNZIONE



MEDIATORI DI ORIGINE CELLULARE

di natura NON proteica

1) ISTAMINA
2) SEROTONINA



AMINE VASOATTIVE

3) OSSIDO NITRICO

4) ACIDO ARACHIDONICO
5) FATTORE ATTIVANTE LE PIASTRINE



FOSFOLIPIDI DI MEMBRANA

di natura PROTEICA

1) CITOCHINE

AMINE VASOATTIVE

Istamina **Mastociti, basofili, piastrine**

Serotonina **Piastrine**

- Sono preformate e immagazzinate nella cellula → sono tra i primi mediatori ad essere rilasciati durante l'infiammazione
- **Inducono vasodilatazione ed aumentano la permeabilità vascolare**

Istamina: amina vasoattiva

Contenuta nei granuli delle **mastcellule** e dei **basofili** come molecola preformata

Liberata in risposta ad una ampia varietà di stimoli:

- **Agenti fisici - per esempio traumi, compressione, calore**
- **Agenti chimici**
- **Danno diretto provocato da microrganismi**

- Reazioni di ipersensibilità IgE-mediate

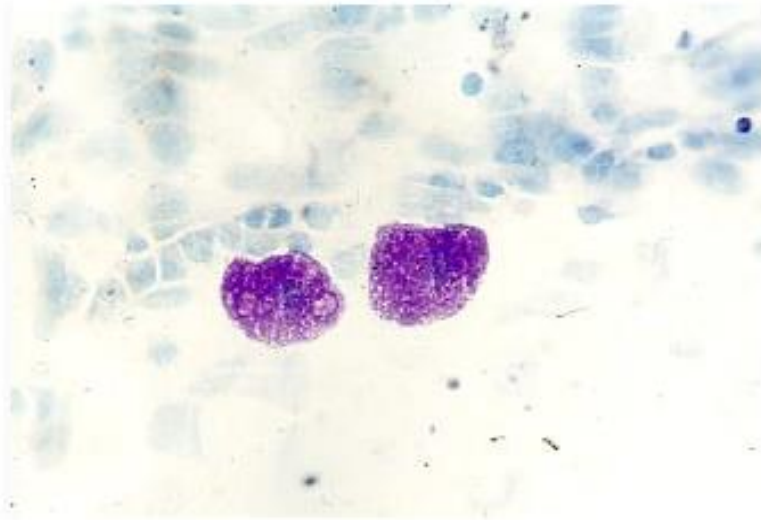
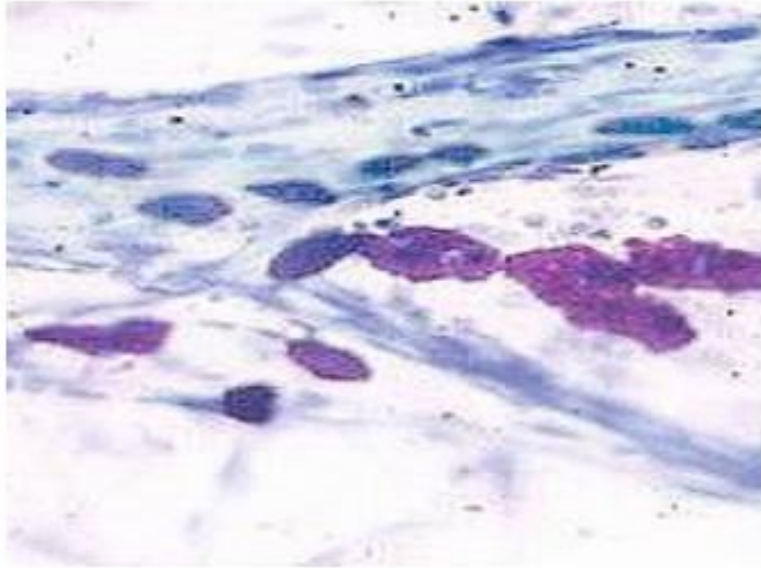
MASTCELLULE

1. Sono cellule dei tessuti, NON circolanti
2. Si trovano spesso vicino ai vasi
3. Contengono granuli ricchi di istamina, producono anche NO e leucotrieni
4. Legano le IgE

Intervengono:

1. Nelle prime fasi di qualsiasi risposta infiammatoria (in questo caso NO coinvolgimento di IgE)
2. Nelle reazioni allergiche (ipersensibilità di I tipo secondo classificazione di Coombs, coinvolgimento di IgE)

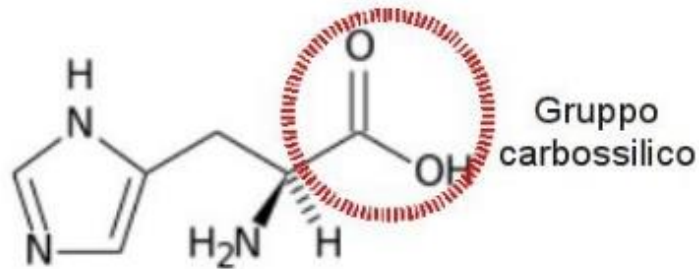




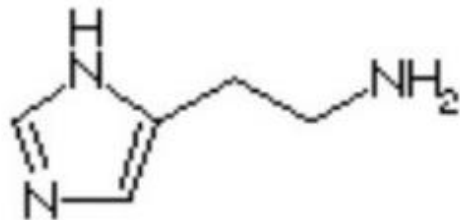
Il bersaglio dell'istamina rilasciata dal mastocita è **la cellula endoteliale**, per questo i mastociti si localizzano nel connettivo in prossimità dei vasi e soprattutto nei connettivi localizzati subito al di sotto degli epitelii esposti al potenziale attacco di patogeni: cute (derma), vie aeree (spazi alveolari), tratto gastrointestinale (intestino tenue), mucosa nasale, quindi le vie attraverso le quali ci infettiamo più facilmente.

Istamina

Deriva dalla decarbossilazione dell'istidina



ISTIDINA



ISTAMINA

E' accumulata a concentrazioni elevatissime nei granuli delle mast cellule del connettivo e dei basofili circolanti insieme ad ATP ed eparina.

Importante in allergie, prurito, infiammazione.

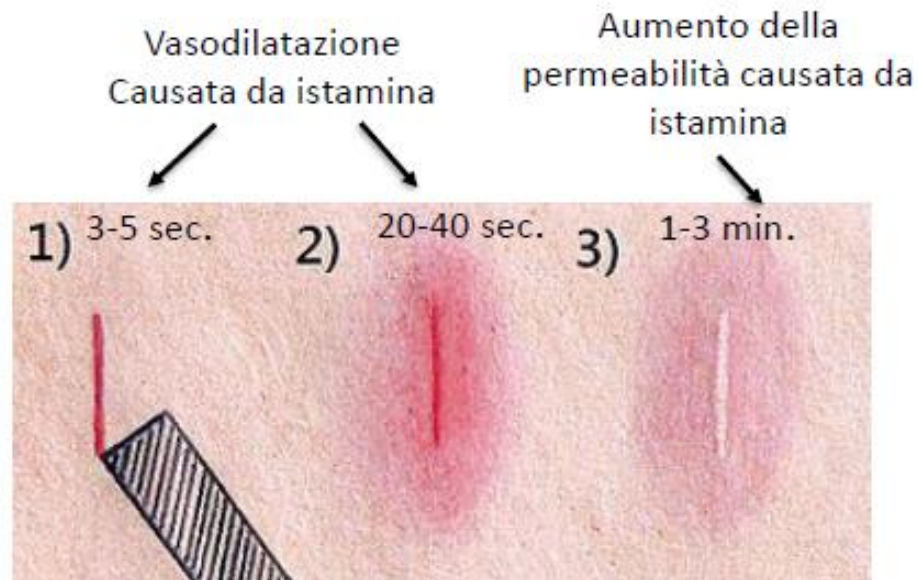
Causa Vasodilatazione Arteriolare e Aumento di Permeabilita'

L'istamina esplica principalmente 3 azioni:

1. Media la vasodilatazione
2. favorisce l'aumento permeabilità
3. media l'adesione neutrofili.

Ha però un effetto particolare, cioè stimola le terminazioni nervose generando prurito.
L'effetto mediato dall'istamina ha una durata molto breve perché l'istamina è degradata dall'**istaminasi** presente nei **neutrofili** e **eosinofili**.

Causa la "triplice risposta" di Lewis



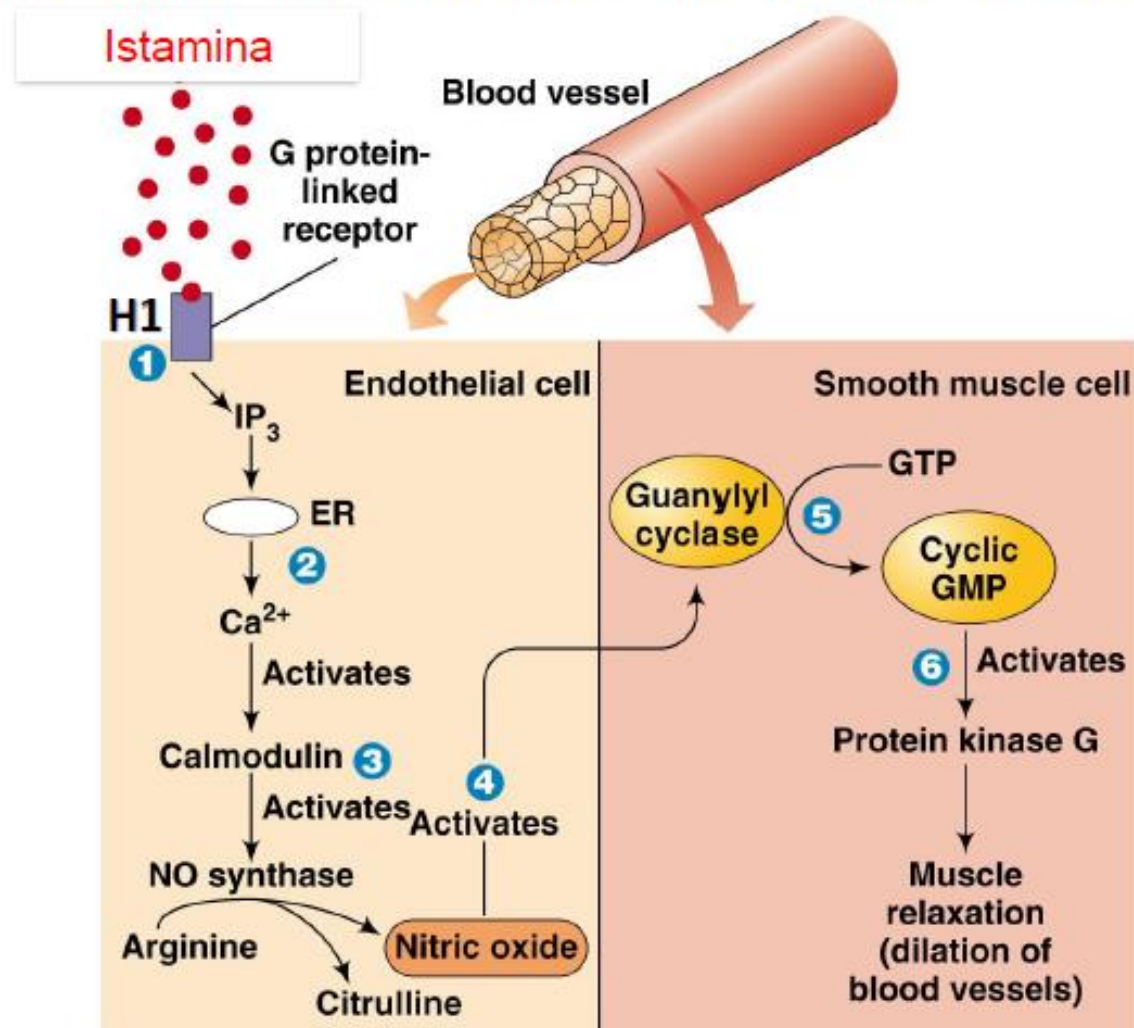
I recettori dell' istamina

Interagisce con recettori a sette domini transmembrana legati a proteine G (H1, H2, H3, H4).

Receptor Type	Major Tissue Locations	Major Biologic Effects
Gq H ₁	smooth muscle, endothelial cells	acute allergic responses
Gs H ₂	gastric parietal cells	secretion of gastric acid
Gi H ₃	central nervous system	modulating neurotransmission
Gi H ₄	mast cells, eosinophils, T cells, dendritic cells	regulating immune responses

MECCANISMO MOLECOLARE DELLA VASODILATAZIONE INDOTTA DA ISTAMINA

Per quanto riguarda l'infiammazione, il recettore più importante è l'**H1**, posto **sulle cellule endoteliali**. Si tratta di un recettore a 7 domini transmembrana accoppiato a proteine Gq ed agisce con un aumento del calcio intracellulare tramite attivazione della fosfolipasi C.

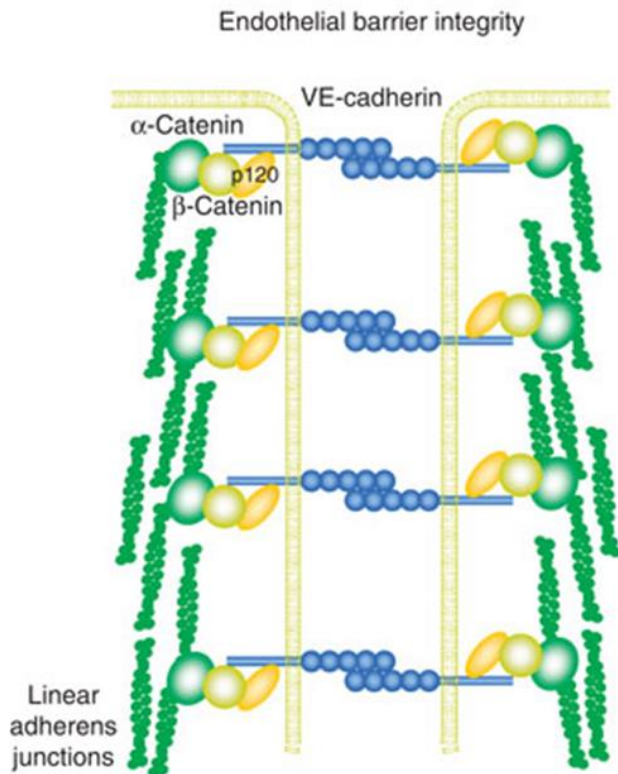


MECCANISMO MOLECOLARE DI AUMENTO DELLA PERMEABILITA' VASALE INDOTTA DA ISTAMINA

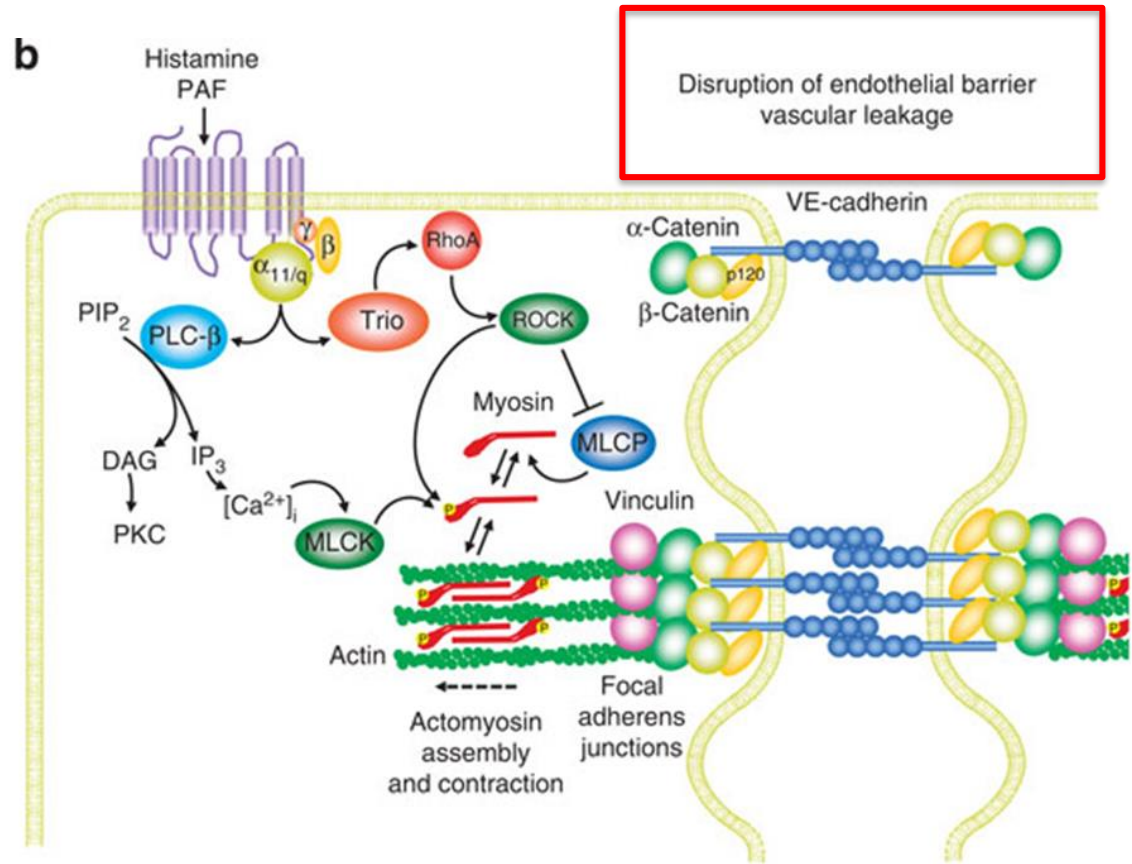
RhoA and ROCK mediate histamine-induced vascular leakage and anaphylactic shock

Nat Commun., 2010 6: 6725.

a



b



Sulla muscolatura liscia bronchiale l'effetto dell'istamina è diverso

Il legame di istamina ai Recettori H1 sulle cellule muscolari lisce della parete bronchiale induce contrazione

ASMA BRONCHIALE

