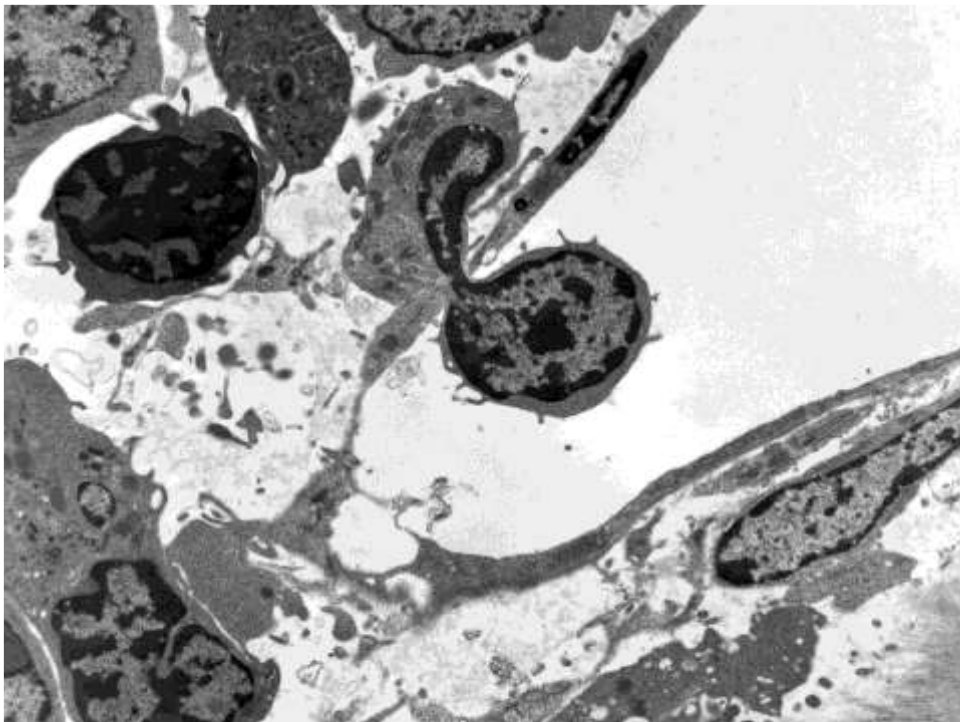


25. Novembre

La chemochina CXCL12 regola il crosstalk Neutrofilo-Endotelio

*Un uomo solo che guarda il muro è un uomo solo.
Due uomini che guardano il muro è il principio di un'evasione.*
Diego Cugia

Il reclutamento dei leucociti è un segno distintivo della risposta infiammatoria. I leucociti migratori violano l'*endotelio* insieme alla *membrana basale vascolare* e ai *periciti associati*. Per raggiungere i tessuti infiammati dalla circolazione, i **neutrofili** in particolare devono superare i vincoli fisici imposti dall'architettura del tessuto ed attraversare lo spazio interstiziale tridimensionale (3D).



Sebbene si sappia molto sulle interazioni tra *leucociti* e *cellule endoteliali*, i meccanismi e il ruolo dei **periciti** nello stravasamento sono poco conosciuti e il paradigma classico del reclutamento dei leucociti nella microvascolarizzazione raramente discute adeguatamente il coinvolgimento dei periciti.

Prove emergenti mostrano che i **periciti** sono attori essenziali nella regolazione dello stravasamento leucocitario oltre alle loro funzioni nella formazione dei vasi sanguigni e nel mantenimento della barriera emato-encefalica.

Geevarghese A & Herman I. del *Center for Innovations in Wound Healing Research, Tufts University School of Medicine, Boston.*

Nel report ***Pericyte-endothelial crosstalk: implications and opportunities for advanced cellular therapies*** hanno il crosstalk tra endotelio, periciti e neutrofili per realizzare la migrazione

Le giunzioni tra le cellule *endoteliali venulari* sono strettamente allineate con le regioni a bassa espressione della proteina della *matrice extracellulare (LER)* nella membrana basale, che a loro volta sono allineate con gli spazi tra i **periciti**.

Questo forma **percorsi preferenziali** per lo stravasamento dei leucociti.

La violazione dello strato formato dai *periciti* e dalla membrana basale comporta il *rimodellamento dei LER*, l'adesione dei leucociti ai *periciti*, la scansione dei leucociti sui processi dei *periciti* e l'allargamento degli spazi tra i *periciti* per formare canali per la migrazione dei leucociti.

Inoltre, i *periciti arteriolari* e capillari infiammati inducono la *migrazione chemiotattica dei leucociti* che escono dalle *venule postcapillari* e, attraverso il contatto diretto pericita-leucocita, inducono un'efficiente migrazione interstiziale per migliorare la capacità di immunosorveglianza dei leucociti.

Dato il loro ruolo di regolatori dello stravasamento leucocitario, la corretta funzione dei *periciti* è fondamentale nei contesti di malattie infiammatorie come la retinopatia diabetica e la sepsi.

Geevarghese A, Herman IM. Pericyte-endothelial crosstalk: implications and opportunities for advanced cellular therapies. Transl Res. 2014 Apr;163(4):296-306.

Lo spostamento dei leucociti tra il flusso sanguigno e i tessuti interstiziali comporta diverse strategie di locomozione che sono governate da segnali solubili e legati alle cellule presentati localmente. Recenti studi hanno approfondito la nostra comprensione del campo in rapido avanzamento della migrazione dei leucociti, in particolare per quanto riguarda gli eventi cellulari e subcellulari a livello della parete venulare.

Inoltre, i modelli cellulari emergenti stanno ora affrontando la transizione da una modalità aderente a uno stato non aderente, incorporando meccanismi che supportano un profilo migratorio efficiente dei leucociti nel tessuto interstiziale oltre la parete venulare.

Durante l'attraversamento della matrice extracellulare LER i neutrofili sono costretti a migrare attraverso spazi più piccoli del loro stesso diametro

Lena Lautschaman del *Biophysics Group del Dipartimento di fisica dell'Università di Erlangen-Nuremberg*



ha dimostrato che una bassa rigidità cellulare insieme all'azione di forze trazione e di adesione promuovono la migrazione cellulare attraverso spazi ristretti.

Per studiare la migrazione 3D in un ambiente rigido (1,77 MPa) ha progettato e costruito costruito matrici rigide, in polidimetilsilossano (PDMS) che contengono micro-canali lineari con una lunghezza di 20 µm, un'altezza di 3,7 µm e una larghezza decrescente da 11,2 a 1,7 µm.

Per studiare la migrazione 3D in un ambiente morbido (550 Pa), ha utilizzato reti di collagene autoassemblate con una dimensione media dei pori di 3 µm.

Ha misurato la capacità di *quattro diverse linee cellulari tumorali* di migrare attraverso queste matrici 3D ed ha correlato i risultati con le proprietà fisiche delle cellule tra cui contrattilità, adesività, rigidità cellulare e volume nucleare.

Inoltre, ha modulato l'adesione cellulare rivestendo le pareti del canale con diverse quantità di proteine di adesione e aumentato la rigidità cellulare mediante la sovraespressione della lamina proteica dell'involucro nucleare

Sebbene tutte le linee cellulari siano in grado di migrare attraverso i canali più piccoli di **1,7 μm** , esistono differenze significative nella velocità di migrazione. La migrazione cellulare è ostacolata nelle linee cellulari con nuclei più grandi, minore adesività e, in misura minore, anche nelle cellule con minore contrattilità e maggiore rigidità.

I risultati dimostravano chiaramente che il principale ostacolo alla migrazione attraverso spazi ristretti è legata alla deformabilità del nucleo.

Lautscham LA et al. Migration in Confined 3D Environments Is Determined by a Combination of Adhesiveness, Nuclear Volume, Contractility, and Cell Stiffness. Biophys J. 2015 Sep 1;109(5):900-13.

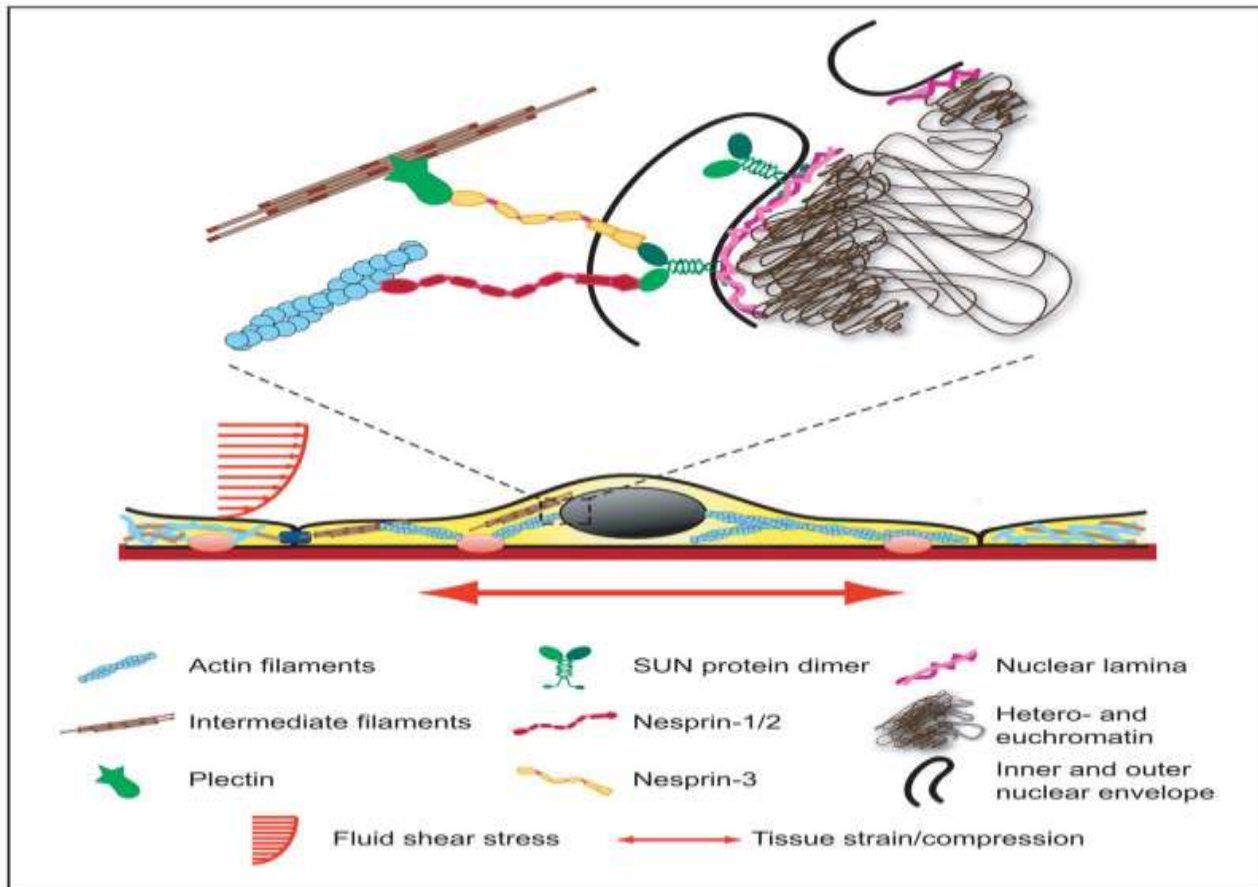
Durante la differenziazione, le cellule staminali embrionali modificano la composizione dell'involucro nucleare e la struttura della cromatina, risultando in nuclei più rigidi che riflettono una ridotta plasticità trascrizionale.

Al contrario, i **neutrofili** hanno sviluppato caratteristici nuclei lobulati che aumentano la loro plasticità fisica, consentendo il passaggio attraverso stretti spazi tissutali nella loro risposta all'infiammazione.

Jan Lammerding *meccanobiologo di Harvard*



ha dimostrato che questa deformabilità è assicurata da una serie componenti del citoscheletro capaci di modificare la deformabilità



Le proteine citoscheletriche coinvolte nella deformabilità nucleare

Lammerding J. *Mechanics of the nucleus*. *Compr Physiol*. 2011 Apr;1(2):783-807.

Il team del **Department of Immunology del Weizmann Institute** ha dimostrato che i microtubuli (MT) sono criticamente coinvolti nel trasporto di materiale all'interno delle cellule, ma i loro ruoli nella motilità dei leucociti chemiotattici e nelle funzioni effettrici sono ancora oscuri. I neutrofili a riposo contengono pochi MT assemblati in un centro di organizzazione MT (MTOC) dietro i loro nuclei multilobulari.

Utilizzando una sonda di polimerizzazione della tubulina in tempo reale, SiR-tubulina, hanno scoperto che i neutrofili hanno allungato i loro MT in pochi minuti in risposta ai segnali dei due peptidi chemiotattici prototipici, CXCL1 e fMLP.

È stato scoperto che il taxolo, un legame della beta-tubulina e un farmaco stabilizzante della MT, abolisce questa polimerizzazione della MT stimolata da CXCL1 e fMLP. Tuttavia, il trattamento con taxolo e l'interruzione delle MT esistenti e generate de novo non hanno compromesso la protrusione e la spremitura dei neutrofili attraverso monostrati endoteliali stimolati da IL-1 β mediati da CXCL1 depositato endotelialmente e CXCR2 neutrofilo.

In particolare, il TEM neutrofilo dipendente da CXCL1 non era associato alla polimerizzazione MT dei neutrofili. Anche la motilità dei neutrofili chemocinetici su CXCL1 immobilizzato non era associata alla polimerizzazione MT e il trattamento con taxolo non ha interferito con questa motilità.

Tuttavia, e coerente con la sua capacità di sopprimere la polimerizzazione MT indotta da CXCL1 solubile e fMLP, il trattamento con taxolo ha inibito la chemiotassi dei neutrofili verso entrambi i peptidi chemiotattici. Il trattamento con taxolo ha anche soppresso l'invasione dei neutrofili elastasi-dipendente innescata da CXCL1 e fMLP attraverso le barriere del collagene I.

Yadav SK et al. *Chemokine-triggered microtubule polymerization promotes neutrophil chemotaxis and invasion but not transendothelial migration.* J Leukoc Biol. 2019 Apr;105(4):755-766.

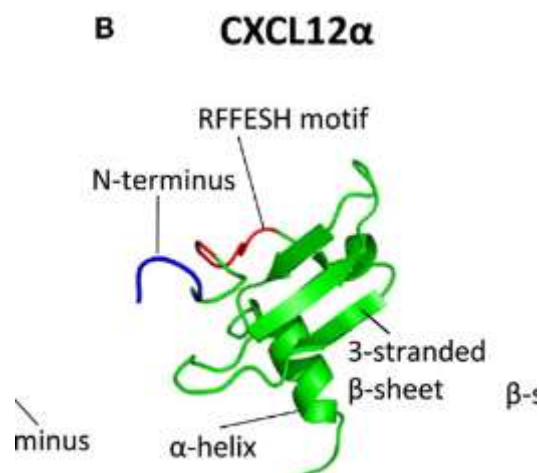
Un punto centrale è identificare i segnali chimici regolino la plasticità nucleare dei leucociti in migrazione per ottimizzare la loro motilità in microambienti ristretti.

Alcuni giorni fa [Bianca Cali](#) e il team del *Department of Biomedical Sciences, dell'Università di Padova*

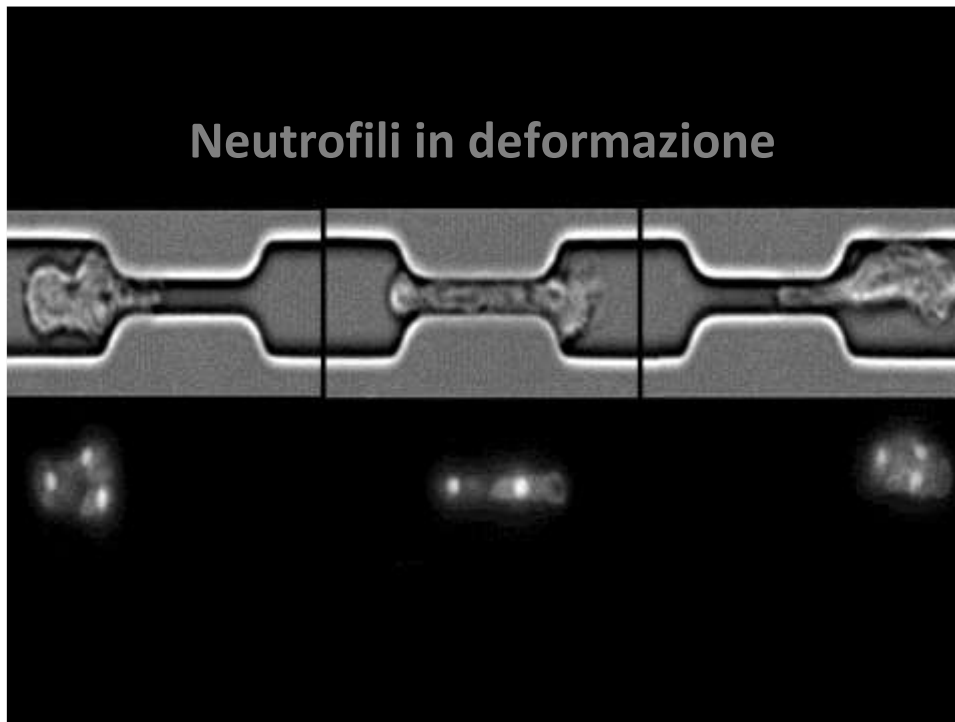


hanno pubblicato il report *Atypical CXCL12 signaling enhances neutrophil migration by modulating nuclear deformability*. finalmente dirimente per spiegare le modalità di migrazione dei neutrofili

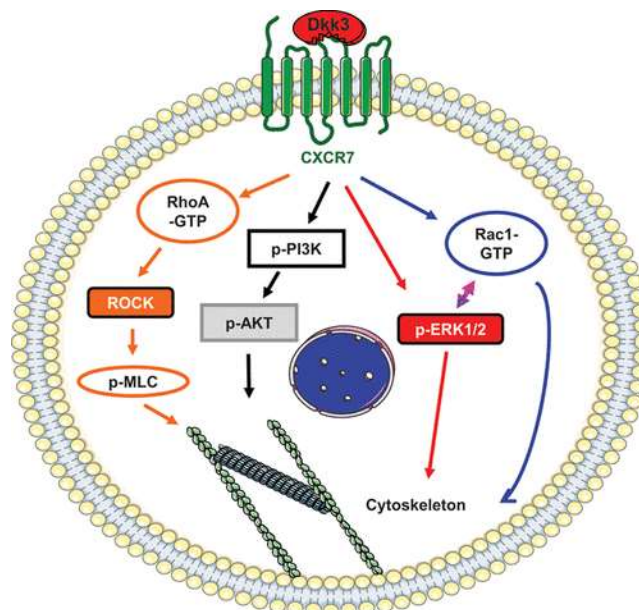
Sfruttando dispositivi microfabbricati, hanno dimostrato che la chemochina CXCL12



ha migliorato la flessibilità nucleare dei neutrofili derivati dal midollo osseo del topo per sostenere la loro migrazione in paesaggi 3D.



Questa funzione precedentemente non caratterizzata di CXCL12 è stata mediata dal recettore atipico delle chemochine ACKR3 (noto anche come CXCR7), ha richiesto l'attività della proteina chinasi A (PKA) e ha indotto la compattazione della cromatina, che ha portato a una migliore migrazione cellulare in 3D.



La figura illustra il meccanismo molecolare coinvolto nella migrazione del progenitore Sca-1 (antigene delle cellule staminali-1) + indotta dal legame di Dkk3 a CXCR7. Dkk3 presente nell'ambiente cellulare si lega a CXCR7 espresso sulla superficie dei progenitori Sca-1+.

All'attivazione di **CXCR7**, viene attivata la via di segnalazione ERK1/2 (extracellular signal-regulated kinases 1/2). ERK1/2 fosforilato attiva Rac1 (substrato 1 della tossina botulinica C3 correlata a Ras) o modula direttamente il riarrangiamento del citoscheletro per promuovere la migrazione cellulare. L'attivazione di Rac1 deriva anche dal legame di Dkk3 a CXCR7, che a sua volta regola direttamente la migrazione cellulare o stimola la fosforilazione di ERK. Rac1 e ERK1/2 sembrano funzionare in modo feedback. L'asse Dkk3/CXCR7 promuove la fosforilazione di AKT tramite PI3K (fosfatidilinositolo 3-chinasi), che porta al riarrangiamento del citoscheletro. Il livello di attivazione di RhoA (famiglia di geni omologhi di Ras, membro A) è aumentato in risposta al legame di Dkk3 a CXCR7, portando alla fosforilazione di MLC (catena leggera della miosina) direttamente o tramite l'attivazione di ROCK (proteina chinasi associata a Rho). L'attivazione di MLC provoca la contrazione dell'actomiosina necessaria per la migrazione cellulare.

Calì B et al. Atypical CXCL12 signaling enhances neutrophil migration by modulating nuclear deformability. Sci Signal. 2022 Nov 22;15(761):eabk2552.

Un anno fa... Baedeker/Replay del 25.Novembre

Un modello innovativo per comprendere il “mistero” del neurotropismo pandemico

Premessa: Sebbene SARS-CoV-2 colpisca principalmente il sistema respiratorio, alcuni pazienti con COVID-19 possono presentare anche sintomi extrarespiratori, comprese manifestazioni neurologiche come perdita dell'olfatto (anosmia) e del gusto (ageusia), mal di testa, affaticamento, disturbi della memoria, vomito, disturbi dell'andatura e disturbi della coscienza. Questi dati suggeriscono che SARS-CoV-2 può infettare la rete neuronale del cervello umano. Alcuni studi hanno riportato la presenza di SARS-CoV-2 nei neuroni sensoriali olfattivi (OSN) e in casi di COVID-19 casi fatali, interessare zone più profonde all'interno del sistema nervoso centrale (SNC). Tuttavia, il neurotropismo di SARS-CoV-2 e il suo ruolo diretto dell'infezione del SNC e nella patogenesi delle manifestazioni neurologiche rimane molto controverso ed in larga parte “misterioso”. Guilherme Dias de Melo del Unità di Epidemiologia e Neuropatologia del Lyssavirus, Institut Pasteur di Parigi ha dimostrato come la mucosa olfattiva di pazienti che mostravano una persistenza a lungo termine dell'anosmia associata a COVID-19 rivelava la presenza di trascritti virali e di cellule infette da SARS-CoV-2, insieme a un'inflammation estesa e prolungata (de Melo GD et al. 2021) .

La necessità di un modello appropriato Nonostante la disponibilità di vaccini efficaci contro SARS-CoV-2, sappiamo ancora poco sulla patogenesi del COVID-19. La disponibilità di modelli animali “manipolabili” allo scopo di evidenziare aspetti virologici, immunologici e patogenetici dell'infezione da SARS-CoV-2 e dei futuri coronavirus umani potrebbero fornire informazioni preziose per comprendere il neurotropismo di Sars-cov-2.

Il ruolo dei topi transgenici I topi da laboratorio wild-type sono scarsamente suscettibili all'infezione da SARS-CoV-2 perché l'enzima di conversione dell'angiotensina (ACE 2) del topo non agisce come recettore cellulare per il virus. Tuttavia sono disponibili diversi lignaggi di topi transgenici che esprimono la versione umana del recettore SARS-CoV-2 (hACE2) e pertanto supportano la replicazione virale e riproponendo così alcune caratteristiche cliniche dell'infezione umana (Muñoz-Fontela C, 21) . Nel febbraio 2020, l'Organizzazione mondiale della sanità (OMS) ha riunito un gruppo di ricercatori internazionale per un progetto mirato a sviluppare modelli animali per COVID-19 nell'ottica di accelerare la sperimentazione di vaccini e sviluppare nuovi agenti terapeutici. In quella occasione è stata istituita una task force coordinata da César Muñoz-Fontela del Bernhard Nocht Institute for Tropical Medicine, di Amburgo , con l'obiettivo di ottimizzare la produzione di topi transgenici umanizzati. Il “modello” più studiato è il topo transgenico K18-

hACE2, che esprime hACE2 prevalentemente nelle cellule epiteliali la cui espressione è sotto il controllo del promotore della citocheratina 18 (KRT18). I topi K18-hACE2 sono in genere infettati mediante instillazione intranasale con sospensioni liquide di SARS-CoV-2 in anestesia profonda.(McCray PB Jr, et al 2007)

Una infezione “esagerata” Questo purtroppo determina una infezione del sistema nervoso centrale eccessiva e sproporzionata che portinevitabilmente alla formazione di una encefalite fatale , condizione che si verifica raramente nei pazienti con COVID-19. Questa “prorompente neuroinvasione” virale sostiene Pratima Kumari del Department of Biology, dell’Università di Atlanta limita gravemente l'utilizzo di questi modelli murini, ostacolando gli studi sulla patogenesi della malattia (comprese le conseguenze a lungo termine dell'infezione da SARS-CoV-2) e sulla sperimentazione farmacologia (Kumari P et al) Il team del San Raffaele di Milano coordinato da Valeria Fumagalli ha pubblicato ieri, 23 novembre 2021, su Science immunology il report: Administration of aerosolized SARS-CoV-2 to K18-hACE2 mice uncouples respiratory infection from fatal neuroinvasion che descrive una piattaforma COVID-19 alternativa, basata sull'esposizione controllata di aerosol a topi transgenici K18-hACE2 a SARS-CoV-2. I topi, infettati tramite aerosol, sviluppano una robusta infezione respiratoria, anosmia e segni di ostruzione delle vie aeree ma, contrariamente ai topi infettati per via intranasale, non danno una neuroinvasione fatale. (Fumagalli V et al 2021). Il lavoro dimostra molto elegantemente che l'inoculazione intranasale, ma non l'esposizione ad aerosol, di SARS-CoV-2 porta ad una neuroinvasione fatale nei topi transgenici K18-hACE2 mentre l'esposizione via aerosol a topi transgenici porta a un'efficace infezione respiratoria, anosmia e deposizione di fibrina nel polmone. COVID-19, in particolare nelle sue forme più gravi, è stato associato a fenomeni trombotici che comportano una aumentata attivazione piastrinica e relativa aggregazione, associata a depositi diffusi di fibrina negli alveoli polmonari. Il team del San Raffaele ha valutato la funzione piastrinica attraverso l'aggregometria a trasmissione luminosa del plasma ricco di piastrine (PRP) ottenuto da topi infetti. Mentre l'infezione da inoculo ha provocato un'aggregazione piastrinica significativamente ridotta, il PRP di topi infetti da aerosol hanno mostrato un'aggregazione normale o addirittura aumentata È interessante notare che questo è stato associato ad un aumento della deposizione di fibrina e ad aggregati piastrinici più grandi nei polmoni dei topi con infezione.

[Valutati complessivamente i dati indicano che l'esposizione ad aerosol di topi transgenici K18-hACE2 a SARS-CoV-2 si traduce in una robusta replicazione virale nel tratto respiratorio, anosmia, ostruzione delle vie aeree e aggregazione piastrinica con deposizione di fibrina nel polmone.](#)

L'osservazione che i topi infettati dall'esposizione ad aerosol sviluppano anosmia in assenza di neuroinvasione confermano i dati clinici del team di Carole Sudre della School of Biomedical Engineering & Imaging Sciences, King's College London, London, che dimostrano come la disfunzione olfattiva sia un sintomo forte e coerente associato a un test COVID-19 positivo nell'uomo (Sudre CH et al 2021) .

Una possibile patogenesi dell’ anosmia: le cellule sustentcolari La fisiopatologia dell'anosmia innescata da SARS-CoV-2 rimane poco chiara. Tuttavia, i dati disponibili supportano l'ipotesi che l'anosmia derivi dall'infezione delle cellule sustentcolari e/o delle ghiandole di Bowman piuttosto che dal coinvolgimento dei neuroni sensoriali olfattivi. Leon Fodouliau del Department of Genetics and Evolution, Faculty of Sciences, dell’Università di Ginevra ha dimostrato che le cellule sustentcolari e le ghiandole di Bowman sia nei topi transgenici K18-hACE2 che nell'uomo, esprimono alti livelli del recettore SARS-CoV-2 ACE2 e del potenziatore di internalizzazione TMPRSS2 (Fodouliau L 2020) Le cellule sustentcolari infette e/o le ghiandole di Bowman possono a loro volta produrre citochine pro-infiammatorie che alterano l’attività dei neuroni sensoriali

olfattivi. In alternativa, cellule sustentcolari danneggiate e/o ghiandole di Bowman possono portare a una disorganizzazione generale dell'epitelio olfattivo, determinando una trasduzione del segnale difettosa al bulbo olfattivo come descritto da Bertrand Briche dell' Université Paris-Saclay, INRAE, UVSQ, VIM di Parigi (Bryche B et al . 2020). La differenza nell'infiltrazione immunitaria nei polmoni tra infezione intranasale e aerosol (nonostante cariche virali simili) è ancora poco conosciuta. Christian Meisel del Department of Medical Immunology, Charité, Humboldt University, Berlin. ipotizza che una possibile spiegazione risiede nel danno al sistema nervoso centrale associato ad immunodeficienza. Allo stesso modo, le modifiche dell'aggregazione piastrinica potrebbe essere ricondotte ad un danno al sistema nervoso centrale.

Istillazione nasale versus aerosol Precedenti studi hanno esaminato come la via di inoculazione influenza la risposta immunitaria e l'esito della malattia in caso di infezione virale. Ad esempio, uno studio coordinato da Jenifer Smith del Department of Infectious Diseases, University of Georgia ha confrontato direttamente l'instillazione intranasale con l'inoculazione di aerosol di topi con virus dell'influenza e ha concluso che la somministrazione di aerosol ha provocato un'infezione più robusta, con relativa infiltrazione e infiammazione delle cellule polmonari alveolari ed una accentuata morbilità (Smith J 2010)

Conclusioni:...

(per continuare vai all'originale)