

- ❖ **ISOLAMENTO PBMCs DA SANGUE INTERO**
(conta delle cellule)
- ❖ **ISOLAMENTO LINFOCITI T CD8+ DA PBMCs**
- ❖ **IMMORTALIZZAZIONE LINFOCITI B CON EBV**
- ❖ **IMMUNOFLUORESCENZA SUI PBMCs ISOLATI**
- ❖ **SAGGIO DI PRODUZIONE DI IFN- γ**

Codice OPIS 2023-24

L88JNELD

MECCANISMI CELLULARI E MOLECOLARI
DELLA RISPOSTA IMMUNE (1047783)

SCIENZE BIOLOGICHE (30857)

ISOLAMENTO PBMCs (Peripheral Blood Mononuclear Cell) DA SANGUE INTERO



1. Raccolta del sangue in provette/sacche contenenti anti-coagulanti (processare i campioni entro massimo 32 ore dal prelievo e mantenerli a temperatura 10-25°C)

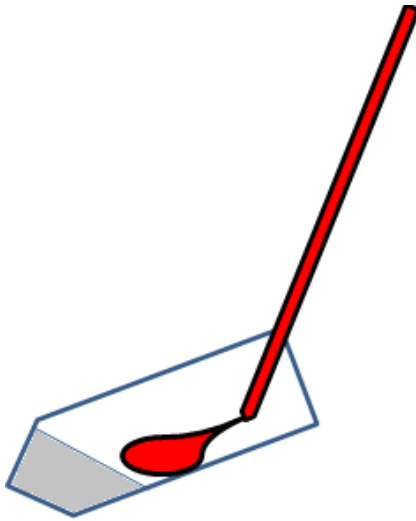


2. Il sangue viene trasferito in tubi da 50 ml e diluito 1:1 con una soluzione salina (PBS) a pH 7,4
Es: 15 ml SANGUE + 15 ml PBS
Mescolare bene con una pipetta

ISOLAMENTO PBMCs DA SANGUE INTERO

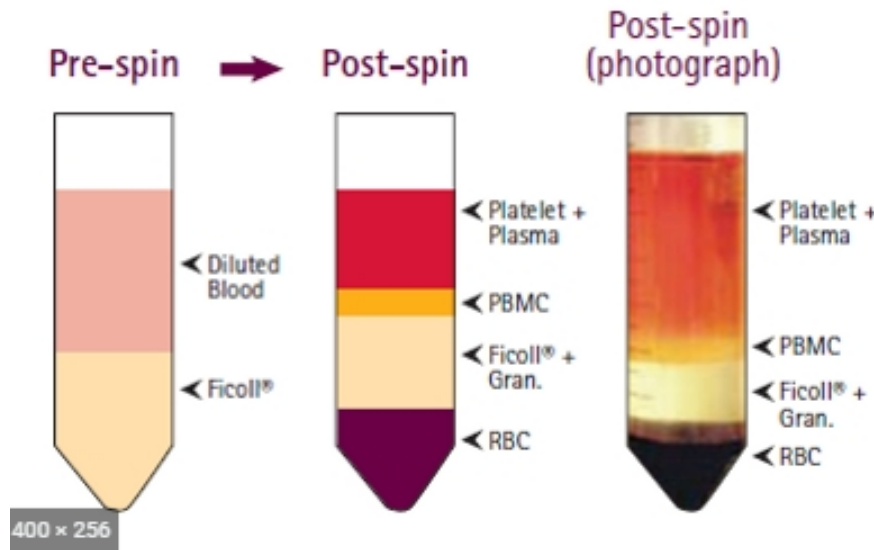


3. In un nuovo tubo da 50 ml mettere 15 ml di Lympholyte (medium di separazione a gradiente di densità)

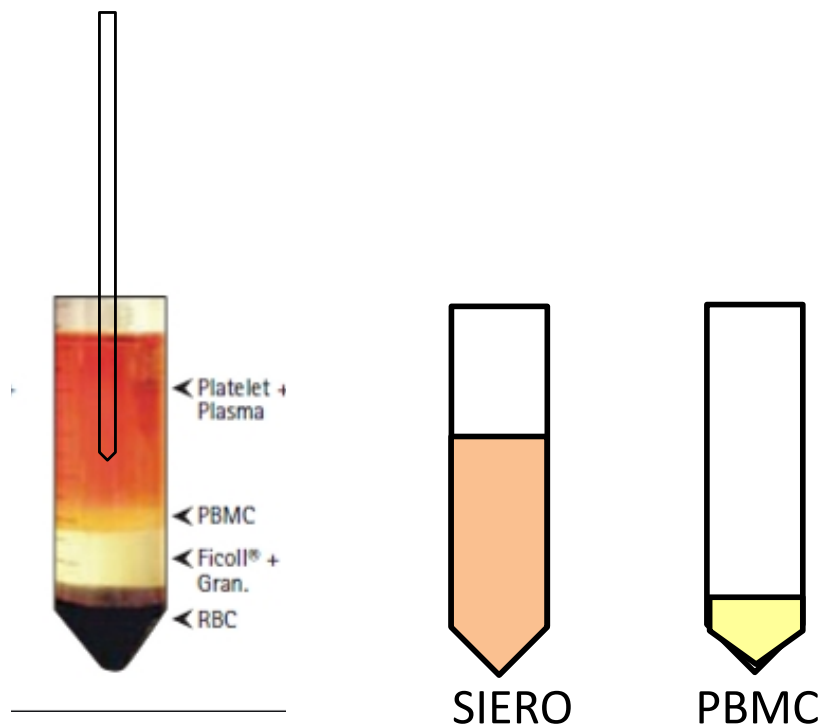


4. Con estrema cautela far scivolare il sangue sulla soluzione di Lympholyte evitando che le due fasi si mescolino

ISOLAMENTO PBMCs DA SANGUE INTERO



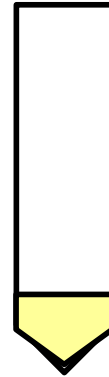
5. Centrifugare il tubo a 2000 rpm per 30' escludendo dalla centrifuga l'ACCELERAZIONE e il FRENO



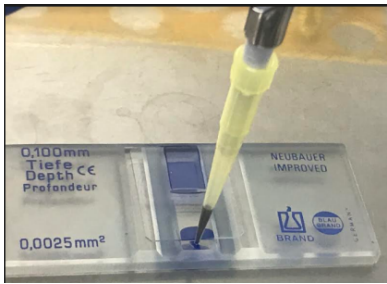
6. Con una pipetta prelevare il SIERO (+PBS) e conservarlo a -80°C; poi recuperare l'anello di PBMC e trasferirlo in un nuovo tubo da 50 ml
7. Aggiungere ai PBMC recuperati PBS fino a riempire il tubo e centrifugare due volte 1650 rpm 10'

ISOLAMENTO PBMCs DA SANGUE INTERO

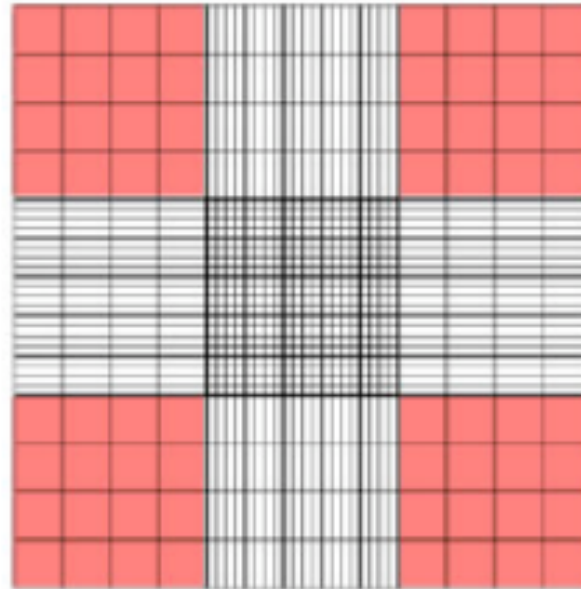
https://www.youtube.com/watch?v=8vuoU9_mEWg



PBMC

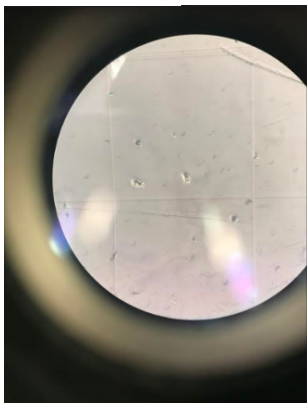


CONTA CELLULARE



- La camera di Neubauer è composta da 4 quadrati grandi (rossi) delimitati da linee triple, ognuno dei quali formato da ulteriori 16 quadrati più piccoli.
- La conta delle cellule viene effettuata con Trypan Blue, colorante che colora solo le cellule morte. Il volume di Trypan da aggiungere ad ogni soluzione cellulare è di 1:1.
- Si contano le cellule vive (non blue) contenute nei 4 quadrati grandi. Il numero di cellule totali sarà diviso per 4
- Il numero delle cellule sarà moltiplicato per 10^4 per ottenere il numero di cellule per mL presenti nella nostra coltura cellulare

PS: se la soluzione cellulare è molto concentrata possono essere fatte delle diluizioni. Il fattore di diluizione dovrà essere poi moltiplicato per il numero di cellule vive contate prima di moltiplicare tutto per 10^4



ES: Contiamo in totale 24 cellule (in un volume totale di 12 ml)

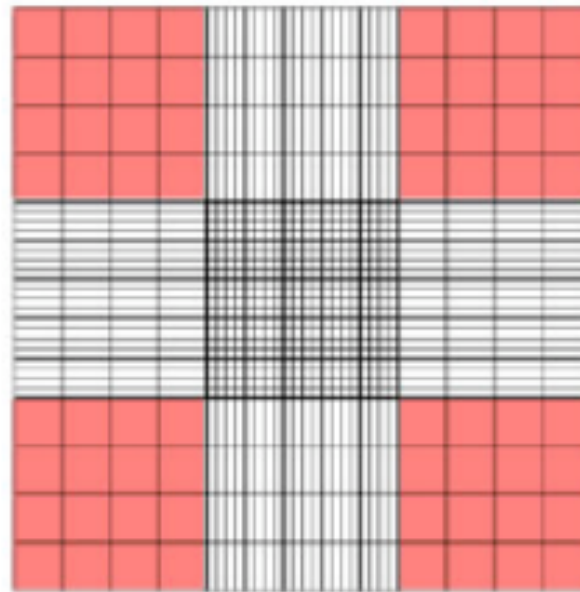
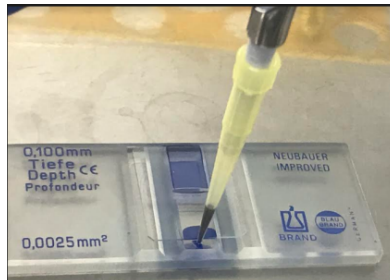
$$\text{N}^\circ \text{ cells/ml} = \left(\frac{24}{4}\right) \times 2 \times 10^4 = 12 \times 10^4/\text{ml}$$

MEDIA TRA I QUADRANTI
DILUIZIONE TRYPAN BLUE

$$\text{N}^\circ \text{ cells totale} = 12 \times 10^4 \times 12 \text{ ml} = 1,44 \times 10^6$$

CONTA CELLULARE

<https://www.youtube.com/watch?v=pP0xERLUhyc>




ISOLAMENTO LINFOCITI T CD8+ DA PBMCs (kit miltenyi: CD8 microbeads human)

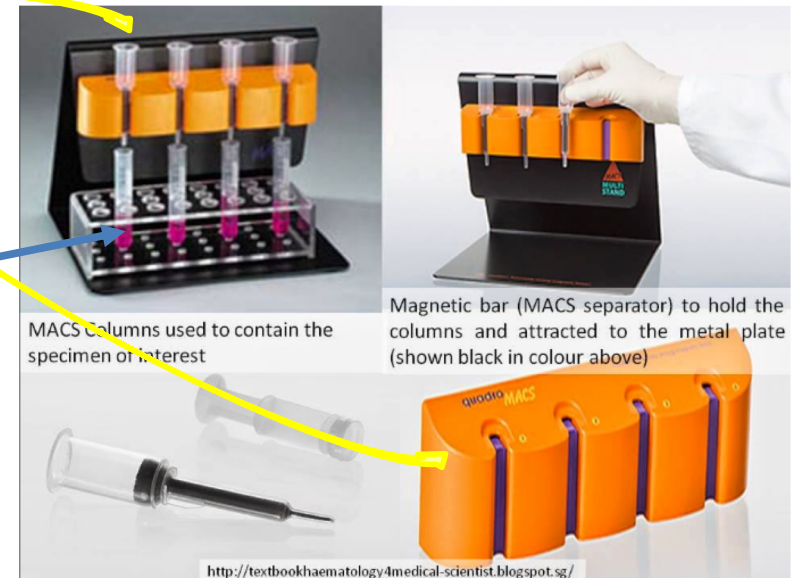


L'antigene CD8 forma un complesso con il recettore delle cellule T (TCR) e agisce come molecola accessoria nel riconoscimento dei complessi MHC classe I/peptide da parte dei linfociti T CD8+ citotossici-> tali cellule svolgono un ruolo importante nell'eliminazione delle cellule infettate da virus e tumorali.

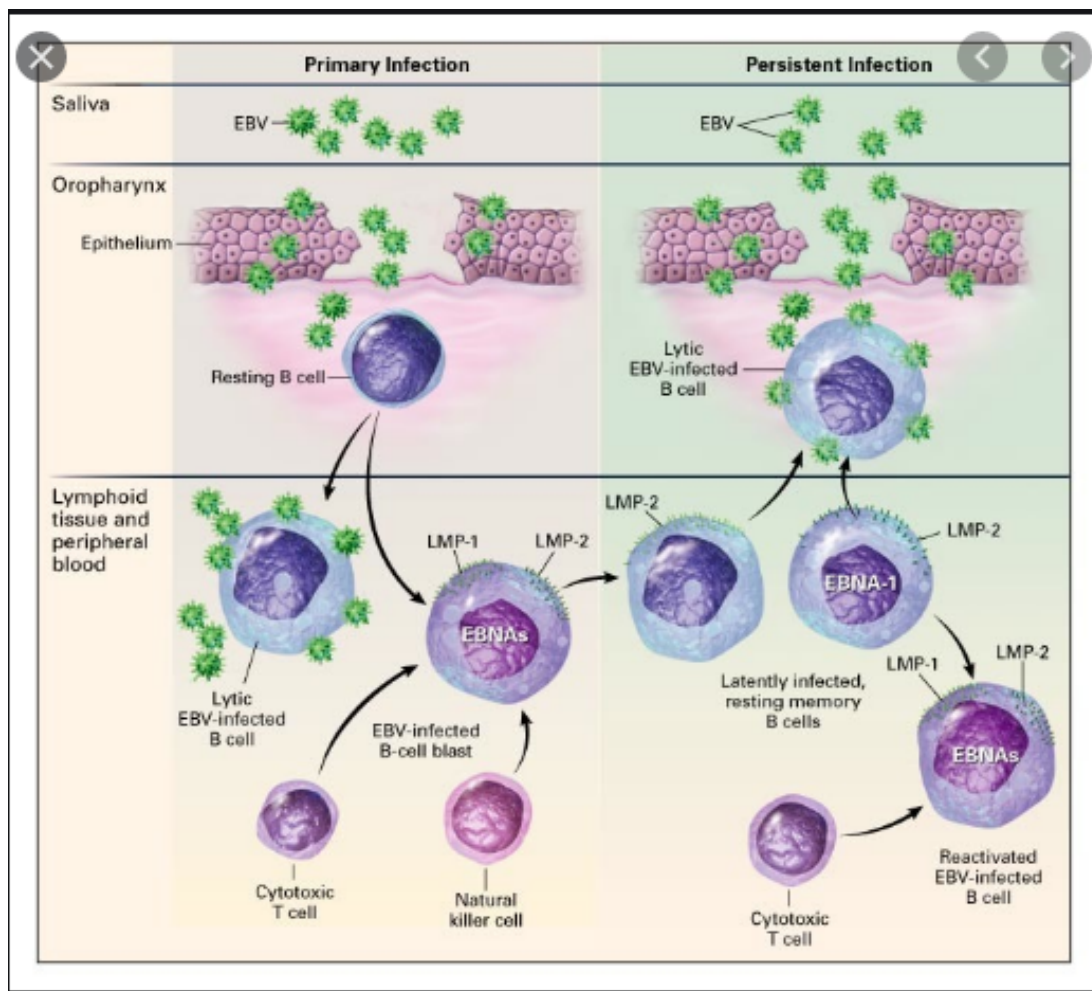
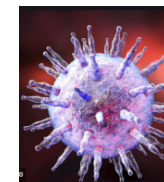
Le cellule CD8+ vengono legate da biglie magnetiche. La sospensione cellulare viene caricata su una colonna inserita su un supporto magnetico. Le cellule CD8+ legate alle biglie magnetiche vengono trattenute nella colonna, mentre la frazione CD8- passa attraverso la colonna. Una volta rimossa la Colonna dal support magnetico le cellule CD8+ possono essere eluite ed utilizzate negli esperimenti di interesse.

ISOLAMENTO LINFOCITI T CD8+ DA PBMCs (kit miltenyi: CD8 microbeads human)

- I PBMCs vengono risospesi nel Buffer (10% FBS, 2 mM EDTA, PBS 1X)
- Si aggiungono le biglie magnetiche che si attaccheranno in maniera specifica al CD8 (sono coniugate ad un anticorpo monoclonale specifico per il CD8 umano) 
- Le cellule vengono incubate in ghiaccio per 20'
- Si aggiungono 10 ml di Buffer e si centrifugano le cellule 10' @ 1100 rpm
- Si procede alla separazione della frazione di interesse
- Si mette la **sospensione cellulare** nella colonna, precedentemente attaccata ad un **supporto magnetico**
- Le cellule CD8+ rimangono nella colonna, quelle **CD8-** passano attraverso
- Togliendo la colonna dal supporto magnetico e mettendola su un tubo pulito, le cellule CD8+ verranno eluite



IMMORTALIZZAZIONE LINFOCITI B CON Epstein Barr Virus



- ❑ Virus a DNA appartenente alla famiglia degli Herpesvirus
- ❑ Le cellule bersaglio sono principalmente linfociti B

CICLO LITICO: il virus infetta il linfocita B, produce nuovi virioni che, una volta lisata la cellula, infetteranno le cellule vicine diffondendo l'infezione

CICLO LATENTE: il virus integra il proprio genoma in quello della cellula, non produce virioni, ma proteine (EBNA, LMP1-2A-2B) che modulano l'espressione di alcuni geni comportando la cosiddetta 'immortalizzazione' delle cellule

LMP1 del Virus di Epstein-Barr (EBV)

-**LMP1** è una molecola con 6 domini transmembrana che **mima un TNFR costitutivamente attivato** e quindi attiva in modo persistente il pathway di NF- κ B attraverso le proteine TRAF

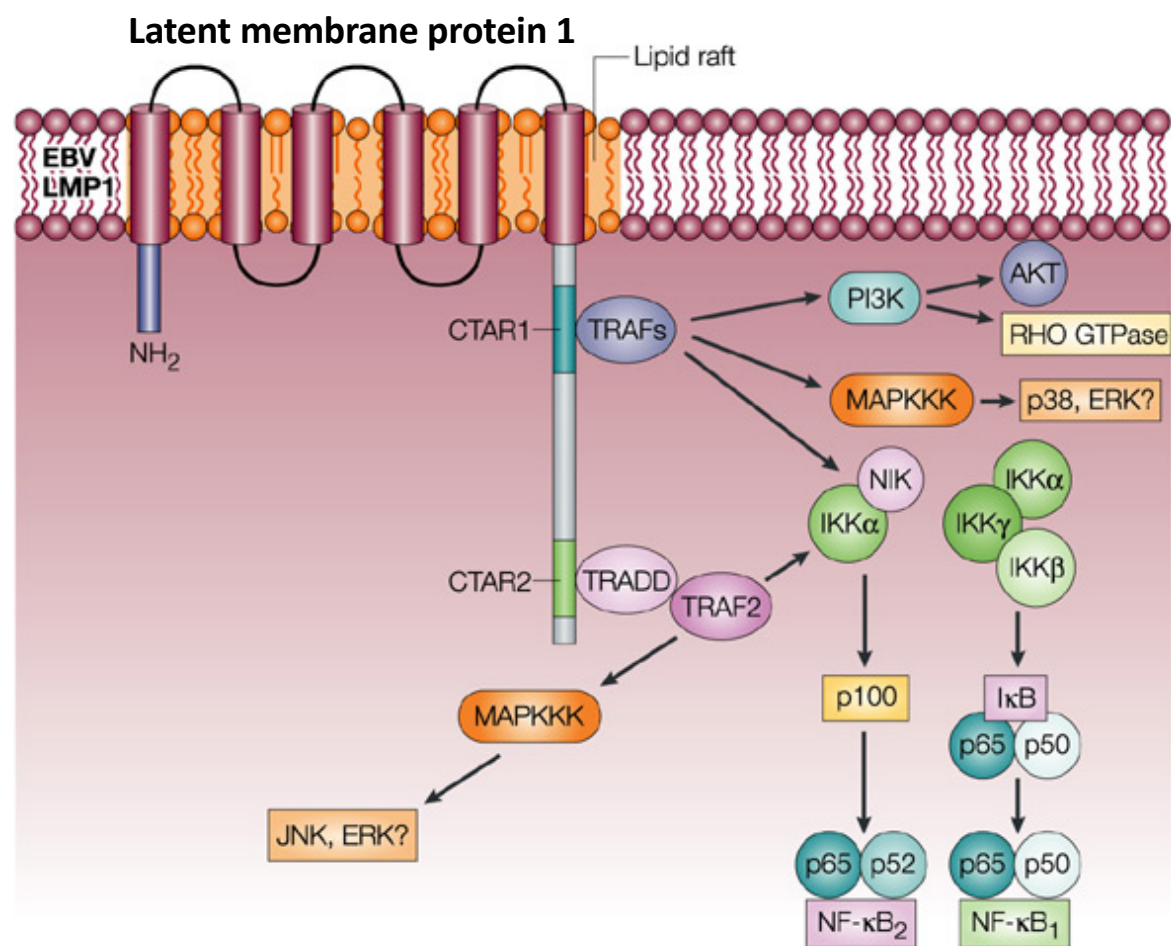
-La proteina latente di membrana 1 (LMP1) del virus Epstein-Barr (EBV) è fondamentale per la trasformazione/immortalizzazione delle cellule B indotta da EBV.

-È un omologo funzionale di CD40 che è un membro della famiglia del TNFR

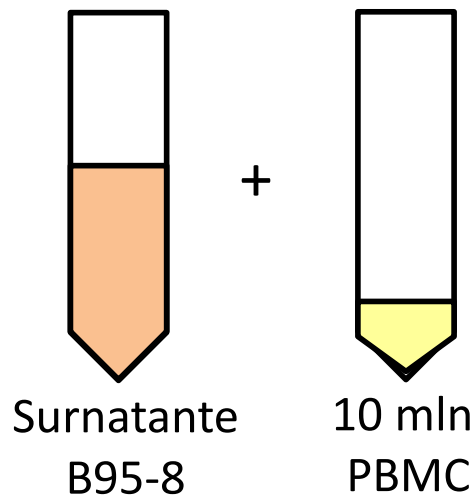
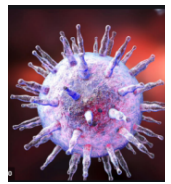
-Ha capacità di trasformare/immortalizzare i linfociti B

-Topi transgenici per LMP1 sviluppano linfomi

-La porzione carbossi-terminale di LMP1 recluta diversi membri della famiglia TRAF permettendo l'attivazione sia della via canonica che non canonica di NF κ B.

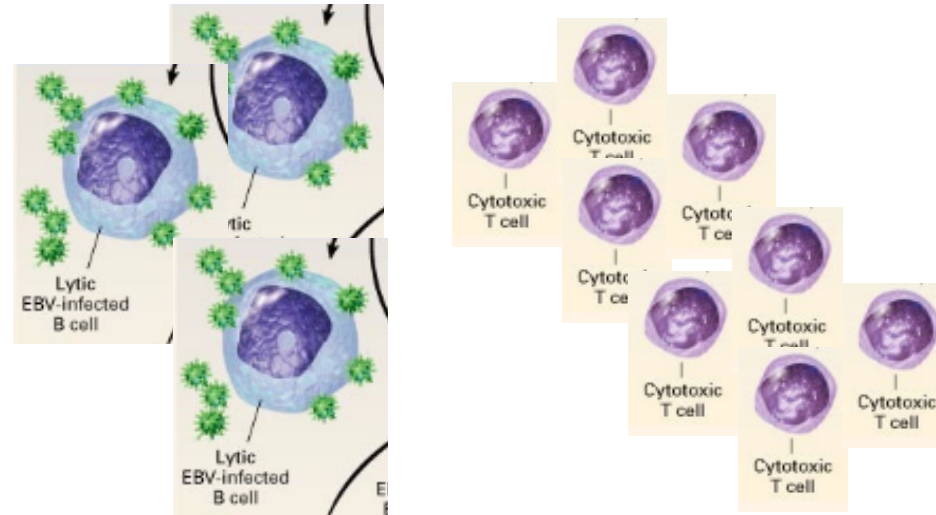


IMMORTALIZZAZIONE LINFOCITI B CON Epstein Barr Virus (BLC-L)



Le cellule **B95-8** sono linfociti B di scimmia, infettati con EBV in grado di rilasciare elevati livelli di virus nel surnatante

PROBLEMA!

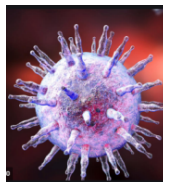


Come evitiamo la lisi dei Linfociti B mediata dai Linfociti T citotossici?????

Aggiungere **CICLOSPORINA**
1µg/ml
(24 h dopo)

Blocca fattori di trascrizione (NF-AT, NF-κB) necessari per la proliferazione dei linfociti T

IMMORTALIZZAZIONE LINFOCITI B CON Epstein Barr Virus (BLC-L)

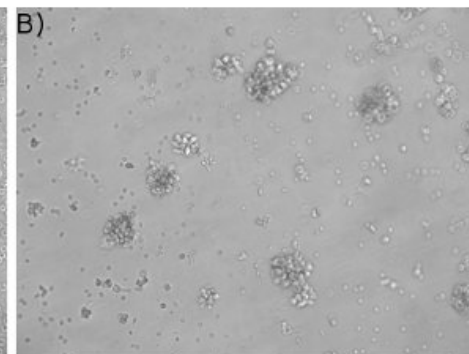


In coltura per ca 2-3 settimane (Terreno di coltura: 20% FBS RPMI)



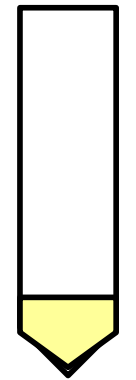
NO INFECTION

EBV INFECTION



Abbiamo una
linea
CONTINUA di
linfociti B

IMMUNOFLUORESCENZA SUI PBMC ISOLATI



PBMC

- Linfociti T (CD4+ e CD8+)
- Linfociti B
- Natural Killer (NK cells)
- Monociti

- 1. *Cos'è la Citofluorimetria?***
- 2. *Come funziona un citofluorimetro?***
- 3. *Ottica e fluidica***
- 4. *Fluorocromi***
- 5. *Applicazioni***

Cos'è la Citofluorimetria?

Misura delle caratteristiche fisico/chimiche di cellule o altre particelle biologiche, all'interno di una sospensione eterogenea.

PRINCIPIO BASE

1. Sangue intero, colture cellulari, tessuti dissociati, nuclei, batteri/lieviti/parassiti, alghe e plancton
2. Segnale delle singole particelle è registrato nel momento in cui sono colpite da un laser
3. I dati sono mostrati come eventi su un istogramma/dot plots

La citofluorimetria è multiparametrica

Tecnologia che permette di misurare simultaneamente, ad alta velocità, multipli parametri di singole cellule.

Dimensione relativa: Forward Scatter – FSC

Granulosità o Complessità interna: Side Scatter – SSC

Intensità di fluorescenza: FL1, FL2, FL3 ... avvalendosi di molecole fluorescenti utilizzate come sonde

1. *Cos'è la Citofluorimetria?*
2. **Come funziona un citofluorimetro?**
3. **Ottica e fluidica**
4. *Fluorocromi*
5. *Applicazioni*

Funzionamento di un Citofluorimetro

- Le particelle in sospensione sono portate in singola fila per essere intercettate
- da un laser il quale farà emettere un segnale di luce diffusa e fluorescenza che sarà filtrato e collezionato
- per poi essere digitalizzato e registrato in un file per la successiva analisi.

Fluidica

Ottica

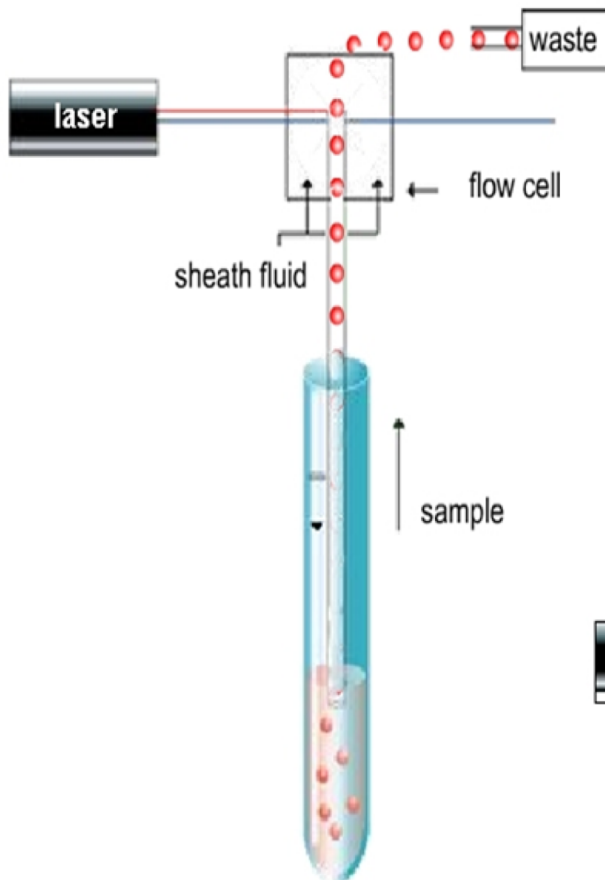
Elettronica

BD FACS Calibur

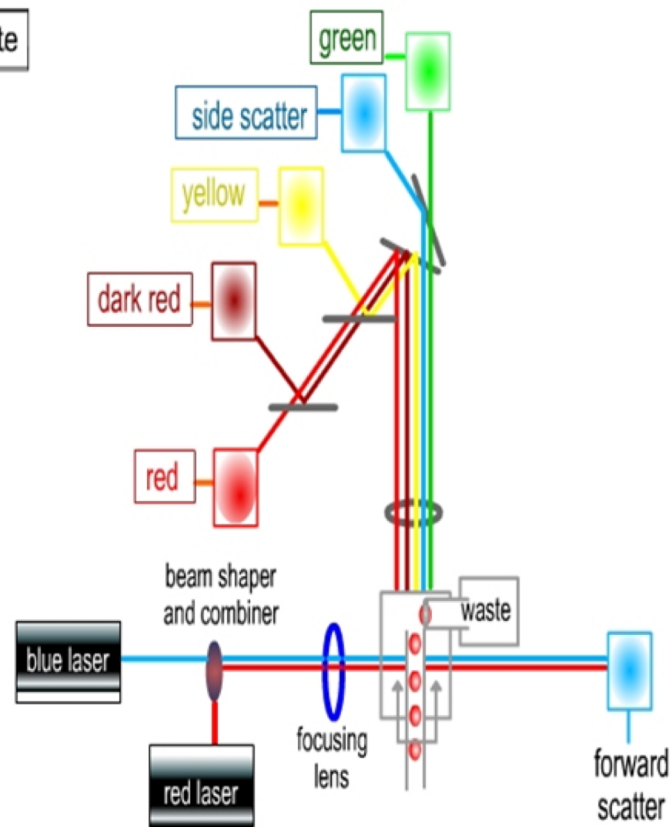


2 laser
4 colori

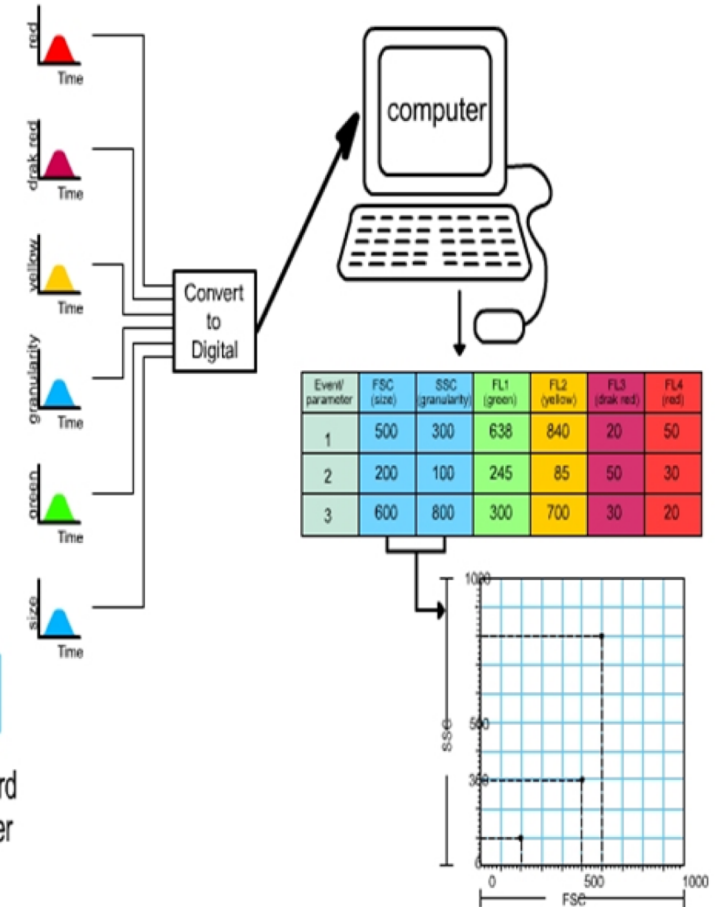
fluidics



optics



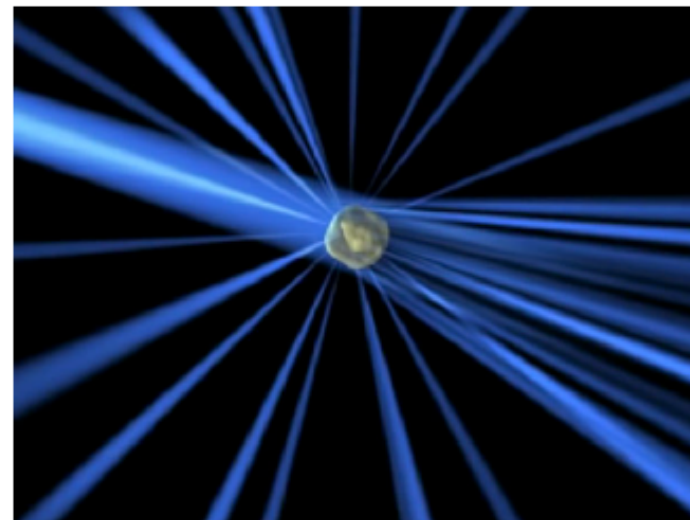
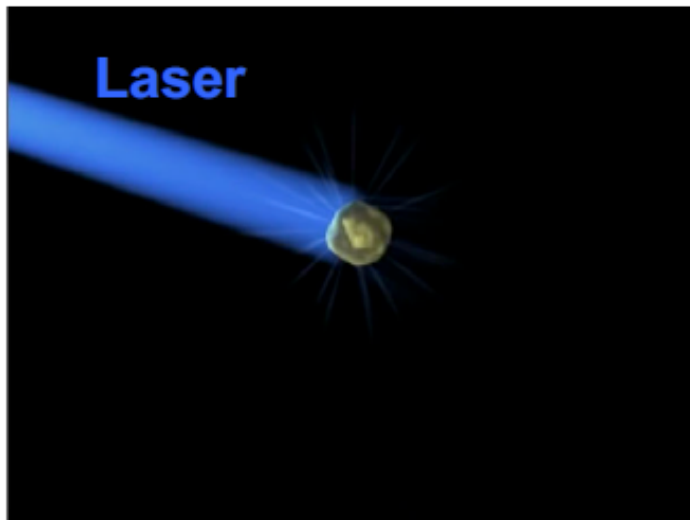
electronics



Diffusione della Luce

Light Scattering

- Quando la luce di un laser incide su una cellula, la cellula diffonderà la luce in tutte le direzioni.
- La luce diffusa sarà rilevata dal corrispondente detector.

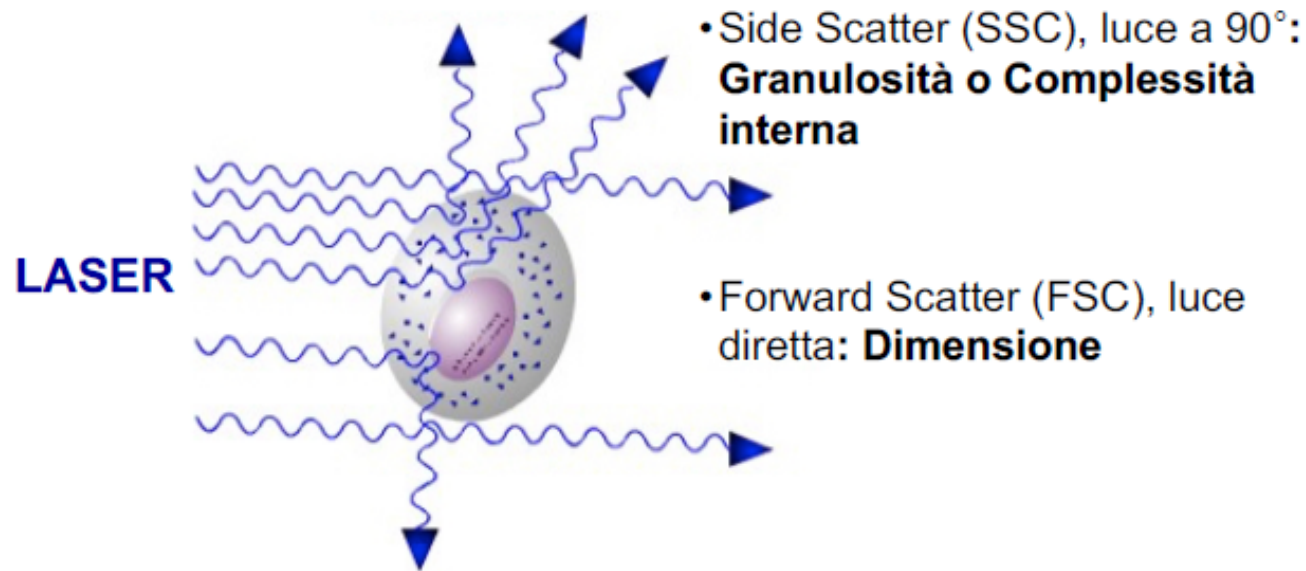


Diffusione della Luce

Light Scattering

La luce diffusa rilevata sarà quella:

- diretta (**Forward Scatter**)
- ortogonale (**Side Scatter**)

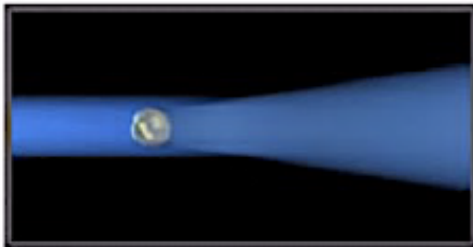


Scatter Frontale

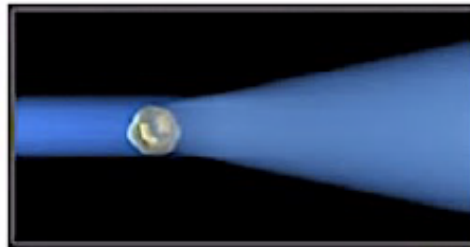
(Forward Angle Light Scatter, **FSC**)

Dimensione

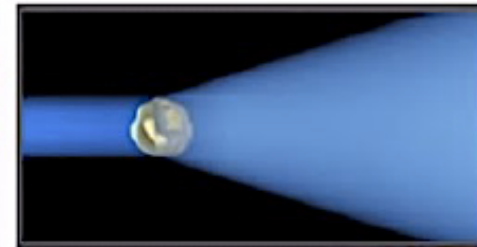
Piccola



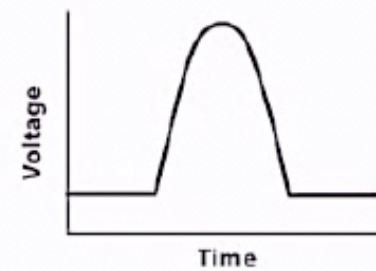
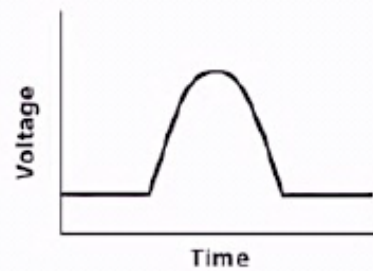
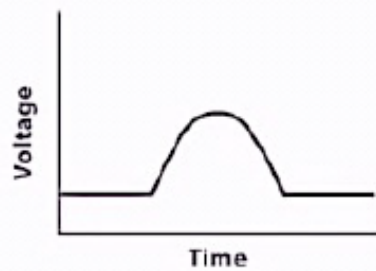
Media



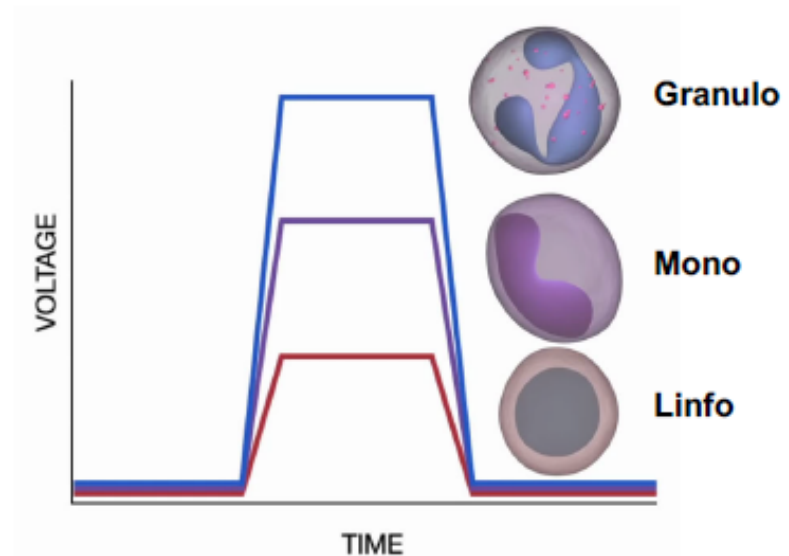
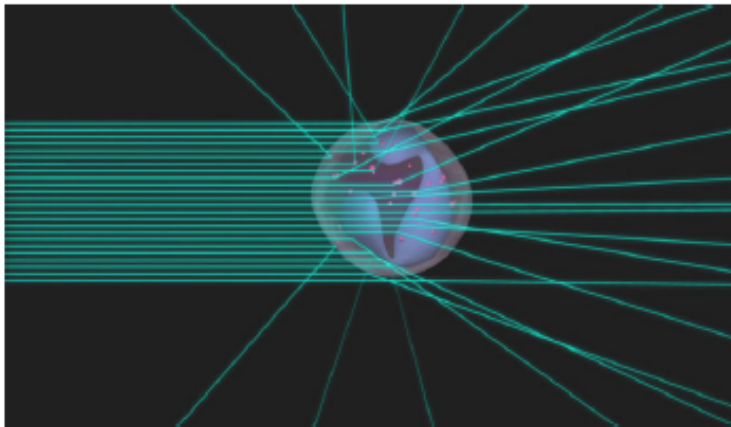
Grande



Segnale risultante

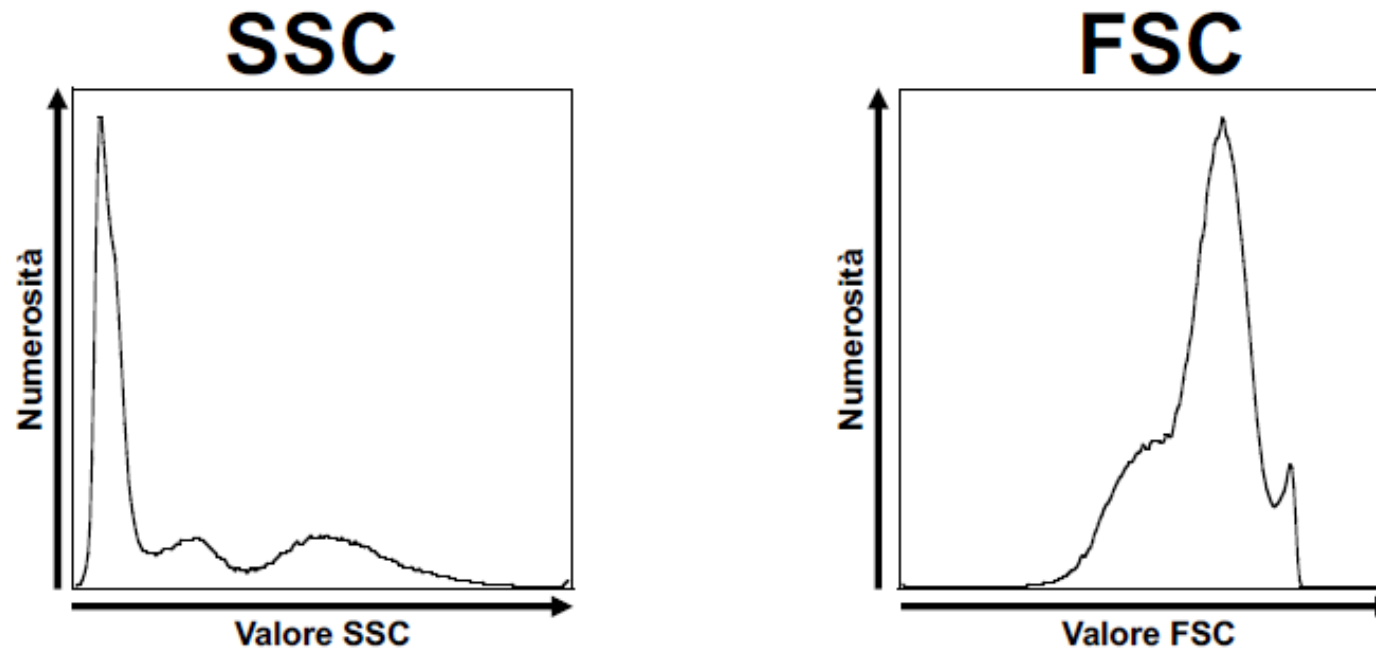


Scatter Laterale (Side Scatter, SSC)



La diffusione SSC risulta dalle inclusioni presenti all'interno della cellula e pertanto può essere **usato per distinguere** cellule **granulate** da quelle **non-granulate**.

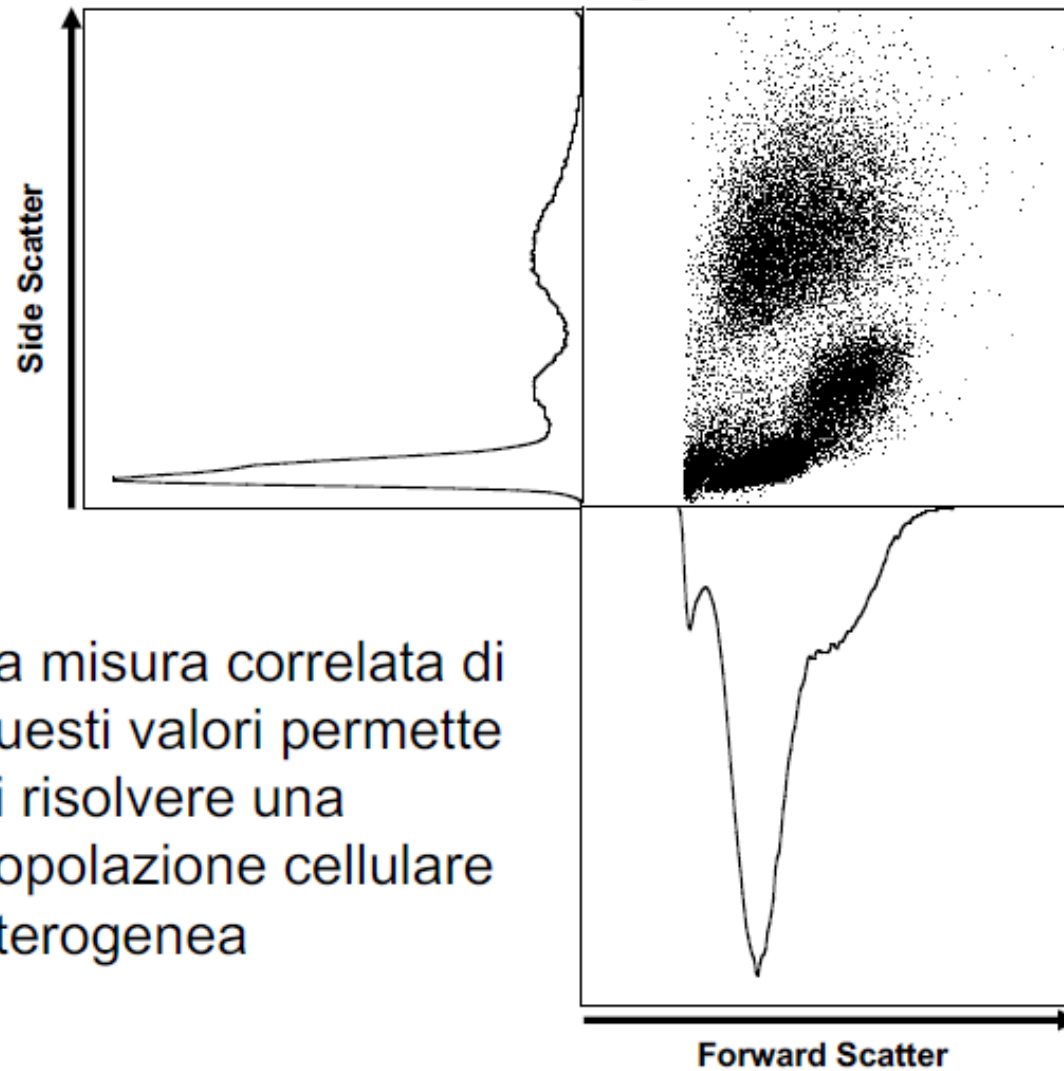
Istogramma di FSC, SSC di una popolazione eterogenea



Istogramma

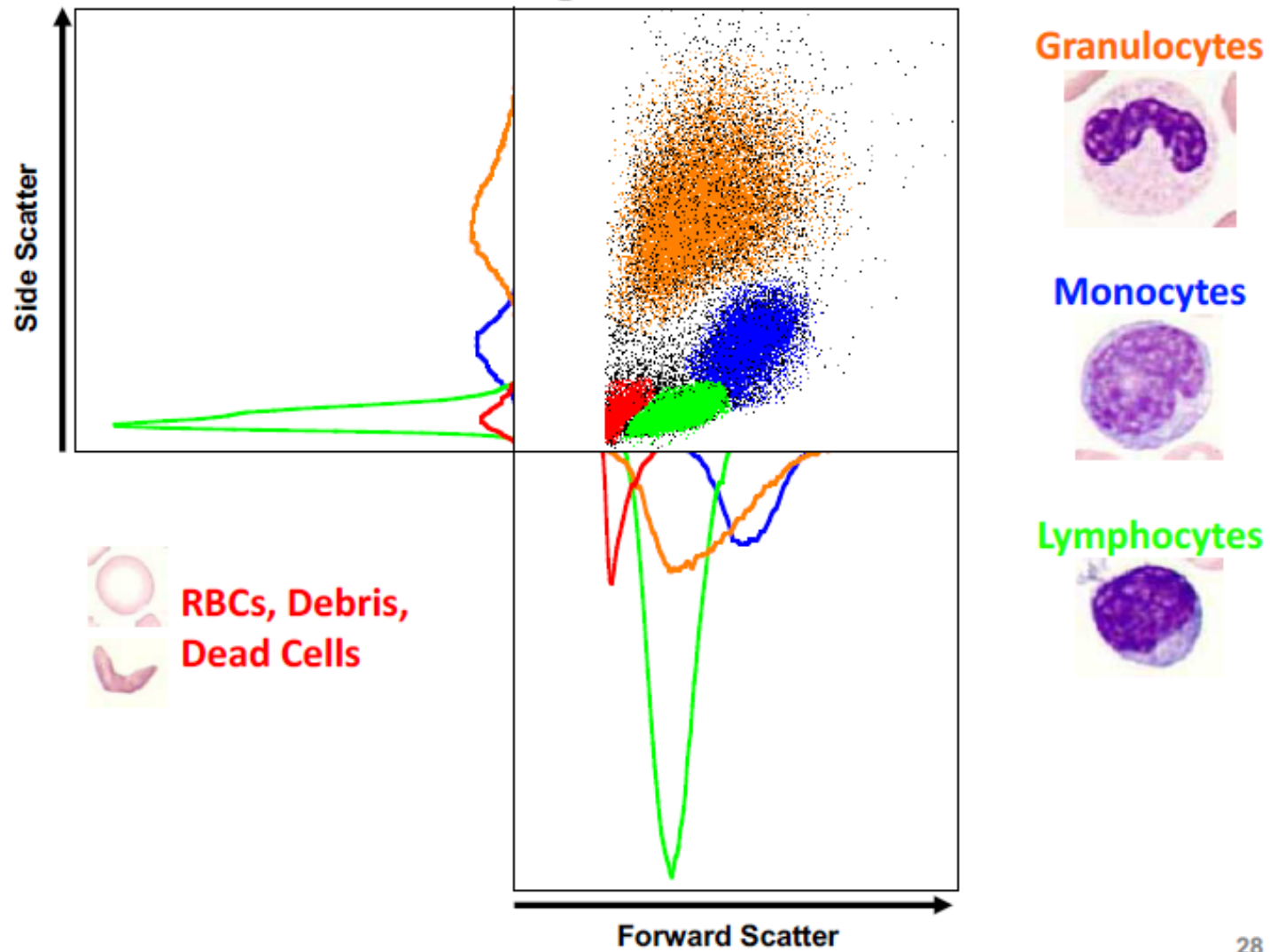
È la rappresentazione grafica (diagramma) della distribuzione di una variabile continua suddivisa in classi.

Citogramma: trasposizione cartesiana di due istogrammi



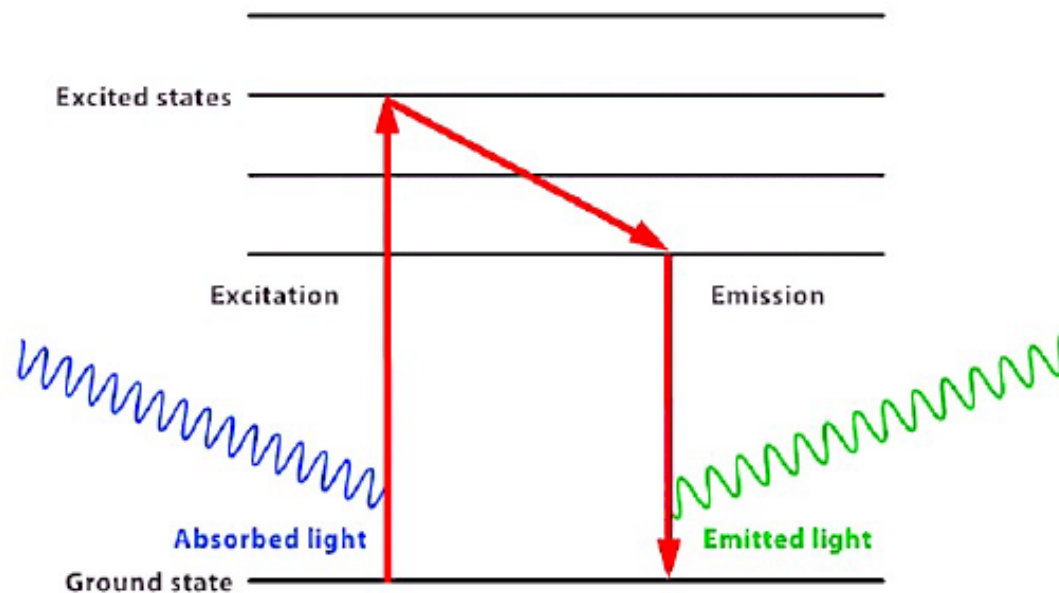
La misura correlata di questi valori permette di risolvere una popolazione cellulare eterogenea

Citogramma: trasposizione cartesiana di due istogrammi



Fluorocromi

- I fluorocromi sono sostanze che possono essere eccitate da una sorgente luminosa ed emettono un segnale di fluorescenza (STOKE SHIFT).
- I fluorocromi sono utilizzati da soli o in coniugazione con anticorpi monoclonali per individuare specificamente antigeni, marcatori e proprietà biochimiche cellulari.

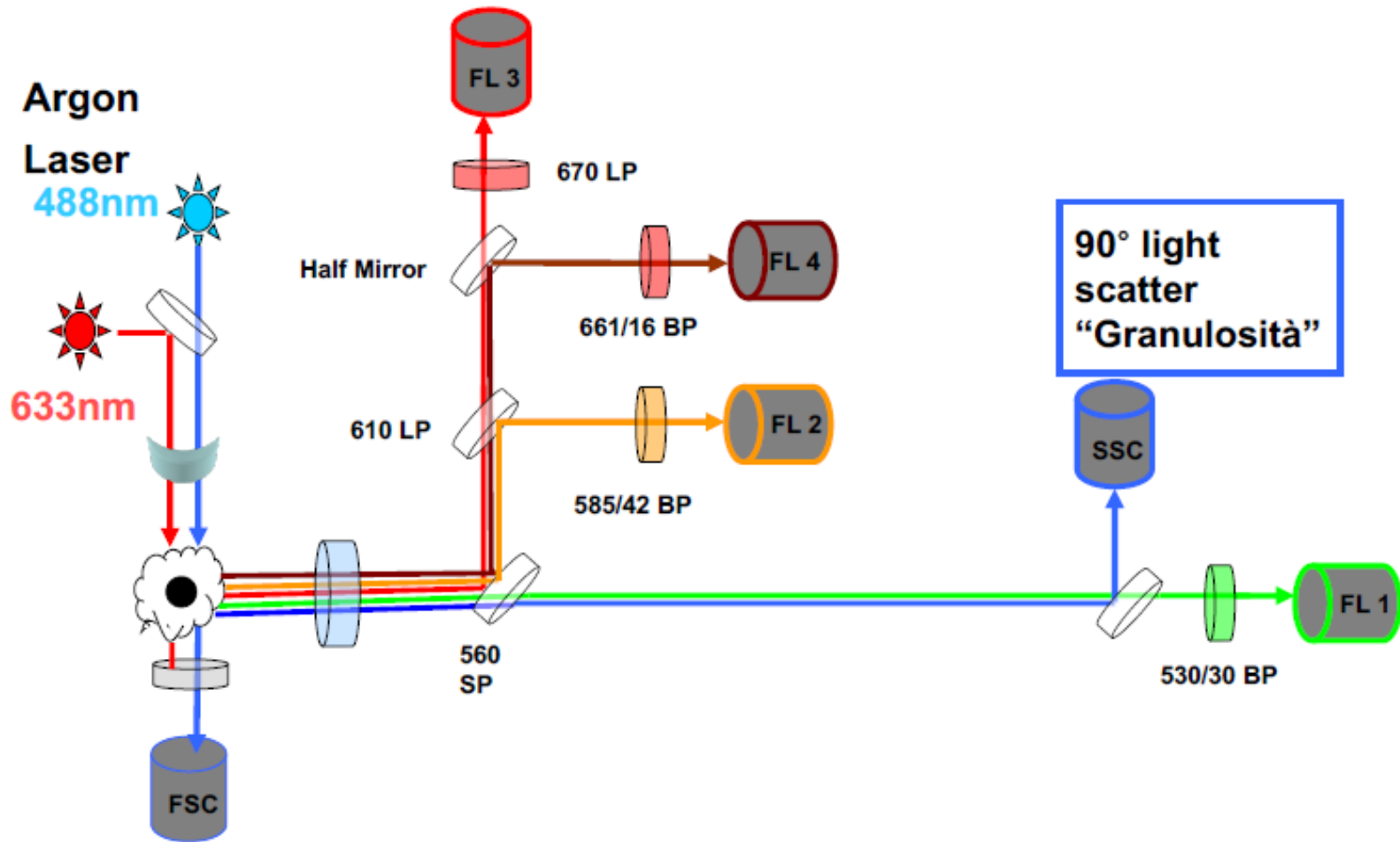


Caratteristiche dei fluorocromi comunemente utilizzati

Fluorocromi coniugati	Laser Eccitazione (nm)	Emissione (nm)
Fluoresceina FITC	488	530
Ficoeritrina PE	488	580
PE-Texas Red	488	615
PE-Cy5	488	670
PerCP	488	670
Allofococianina APC	633	670
APC-Cy7	633	767

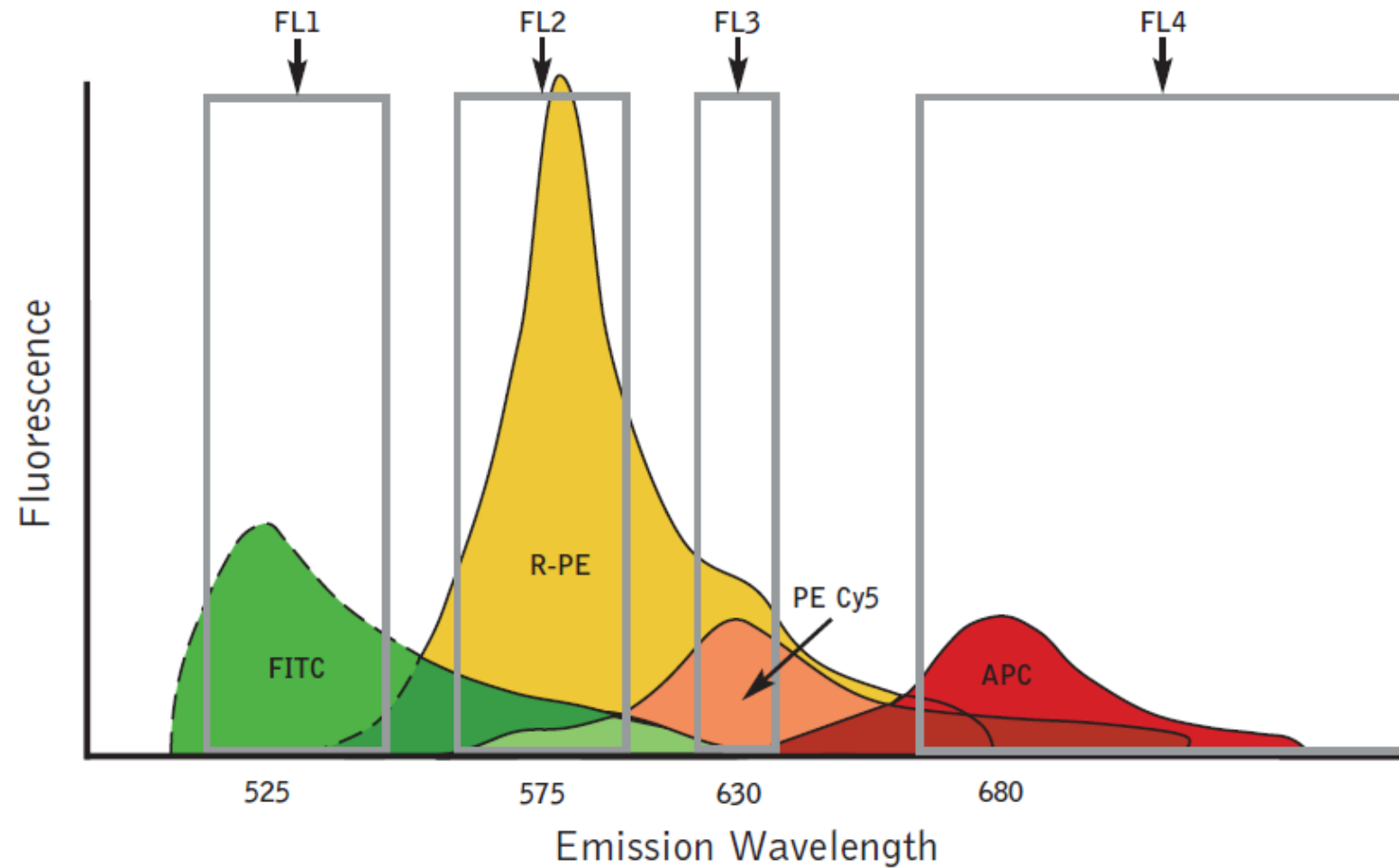
Sebbene alcuni di loro possono essere eccitati dalla stessa sorgente luminosa, emettono un differente colore. In questo modo possono essere utilizzati simultaneamente.

Raccolta del segnale



2° - 16° light scatter "Dimensione",
indice rifrattivo

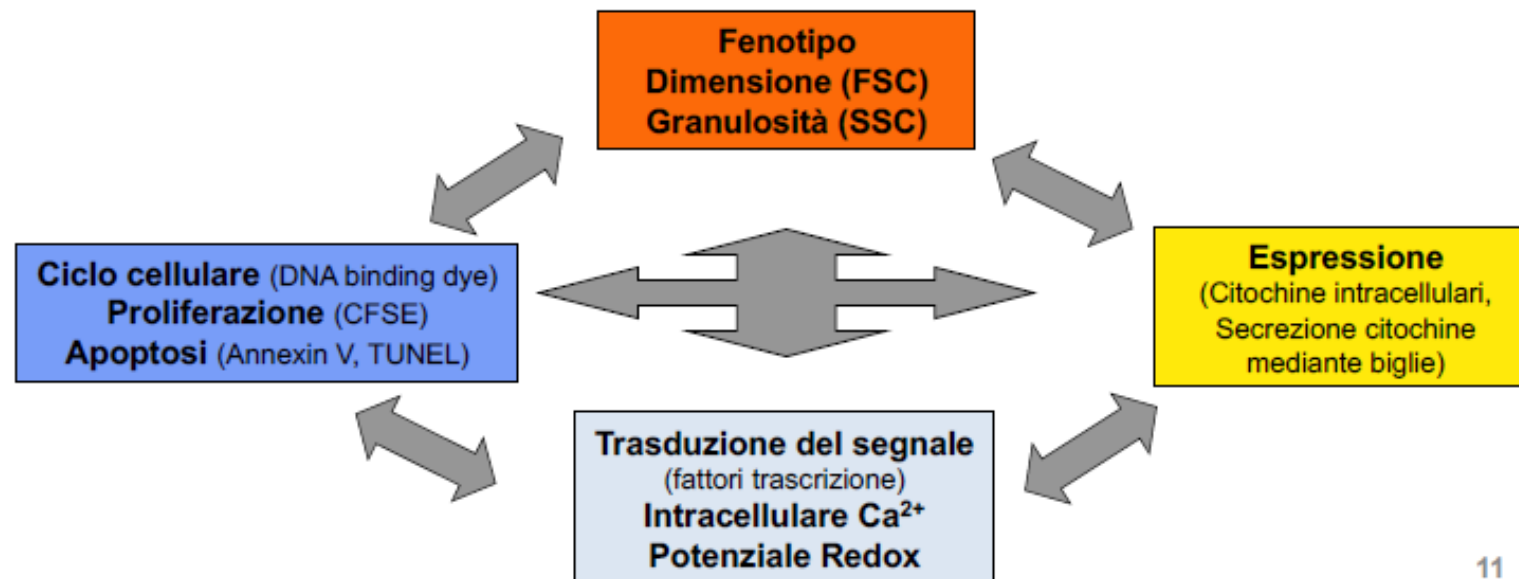
Spettro di emissione dei diversi fluorocromi



Citofluorimetria multiparametrica

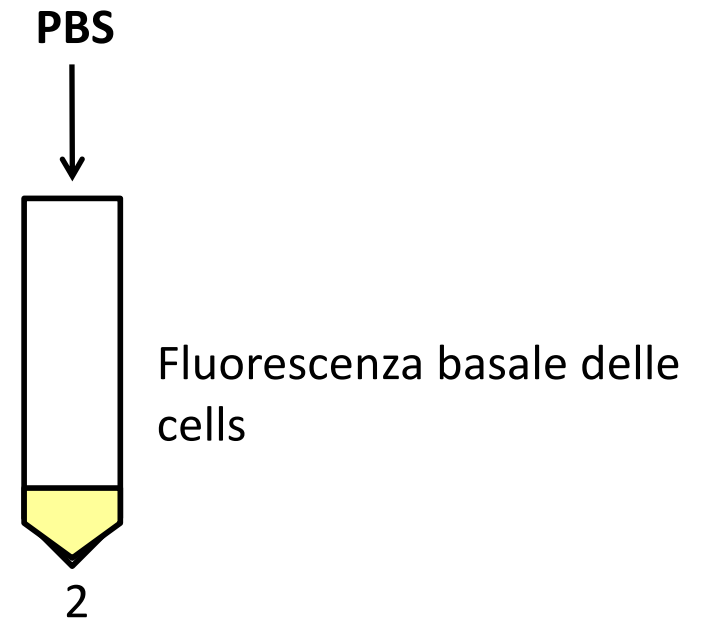
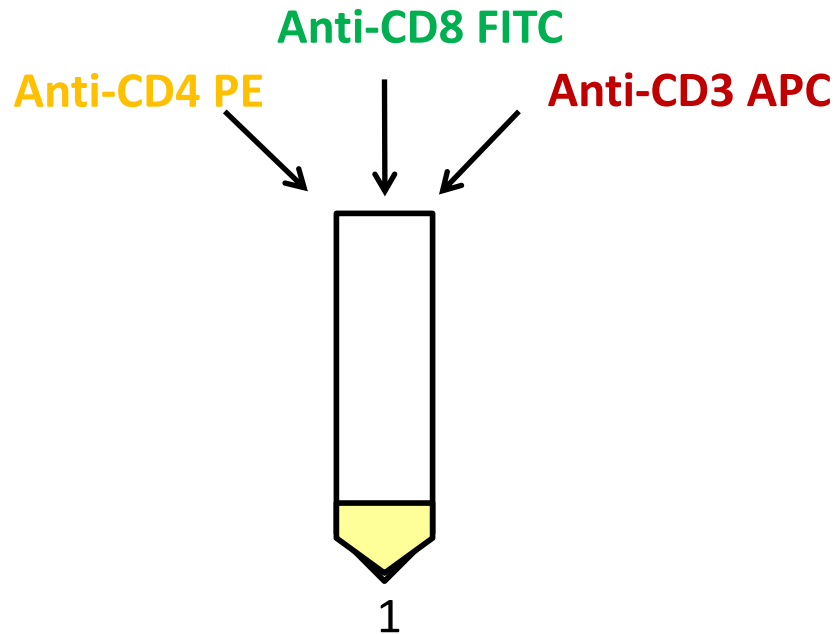
È possibile:

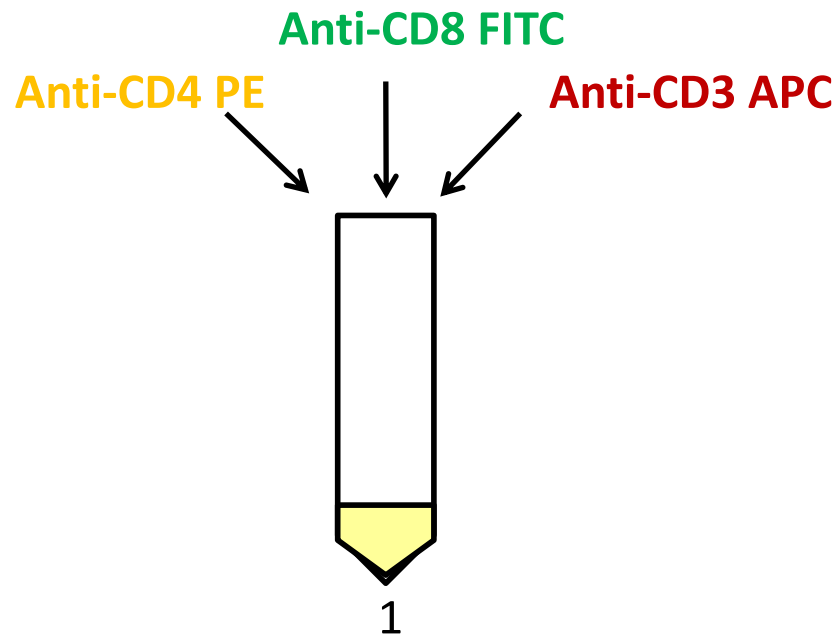
1. **Analisi dettagliata dei marker di differenziamento cellulare:**
in sistemi in sviluppo e in seguito a stimolazione antigenica
2. Valutare simultaneamente il fenotipo e la funzione
3. **Cell Sorting** (separare e recuperare le singole cellule)



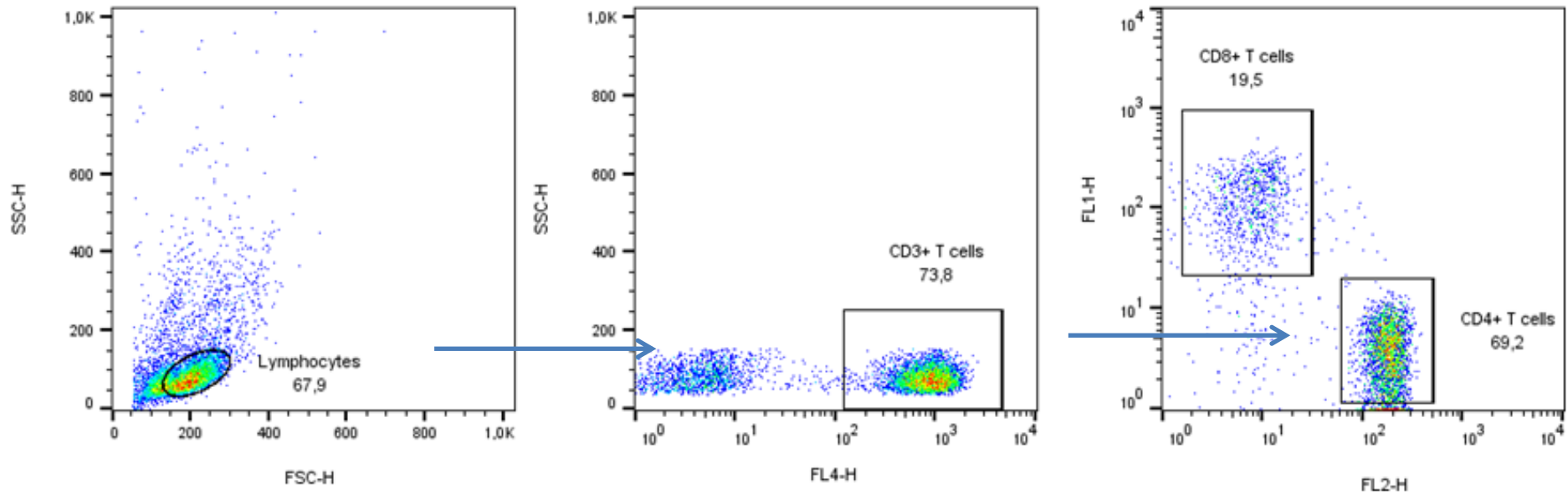
Es: ANALISI DI PBMC PER VALUTARE FREQUENZA LINFOCITI T CD4+ E/O CD8+

- ~ 250 000 cellule/condizione
- Lavare le cells in PBS e centrifugarle 1750 rpm 7'
- Aggiungere gli anticorpi di interesse:
 - **Anti-CD4 PE**
 - **Anti-CD8 FITC**
 - **Anti-CD3 APC** } Campione 1
- **UNSTAINED (nessun Ab, solo PBS)** Campione 2
- 20' a 4°C
- Lavare le cells in PBS e centrifugarle 1750 rpm 7'
- Risospendere in 250 µl di Formaldeide 2%
- Lettura al citofluorimetro

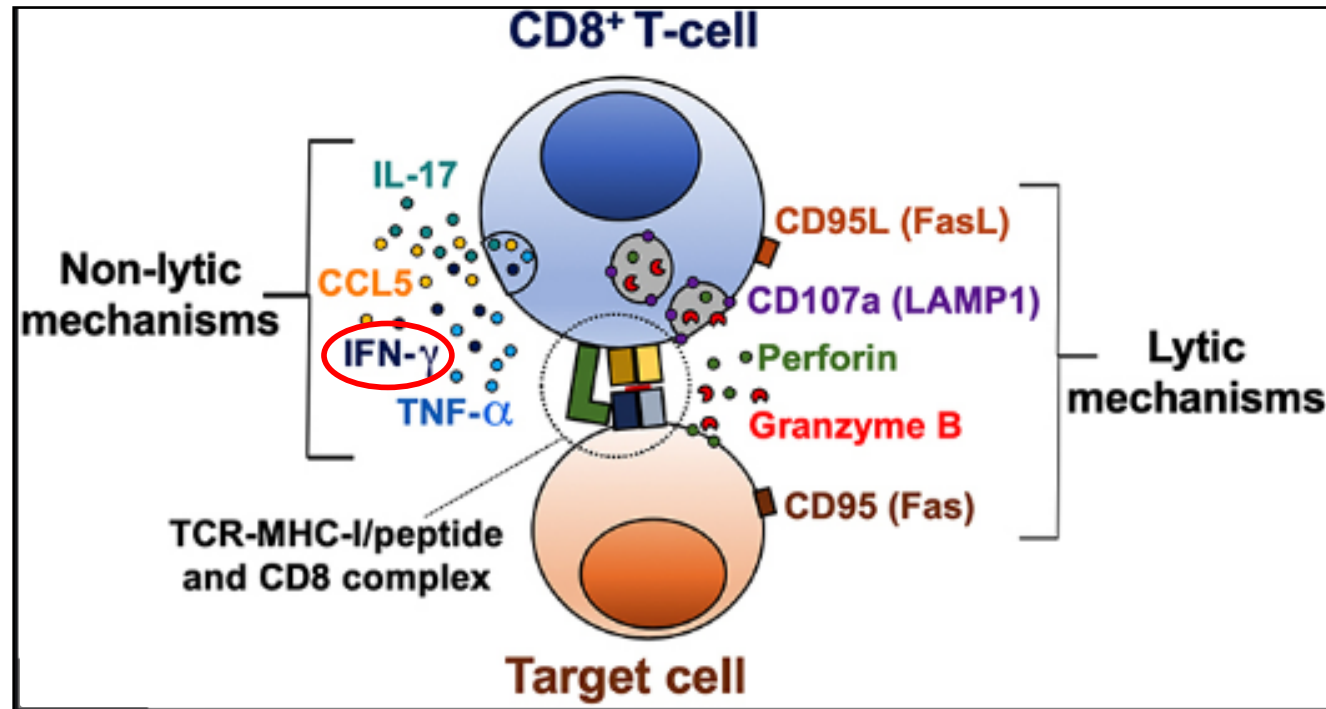




Human PBMCs	Frequency (%)
Monocytes	10-30%
Lymphocytes	70-90%
Total T cells (CD3+)	45-70%
CD4+ T cells	25-60% of total CD3
CD8+ T cells	5-30% of total CD3
Total B cells	5-15%
NK cells	5-10%
Dendritic cells	1-2%
Stem cells	0.1-0.2%



SAGGIO DI PRODUZIONE DI IFN γ



SAGGIO DI PRODUZIONE DI IFN γ



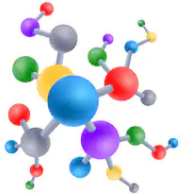
DAY 1

10 mln di PBMC in coltura (5 mln/ml) in un terreno (RPMI) contenente:

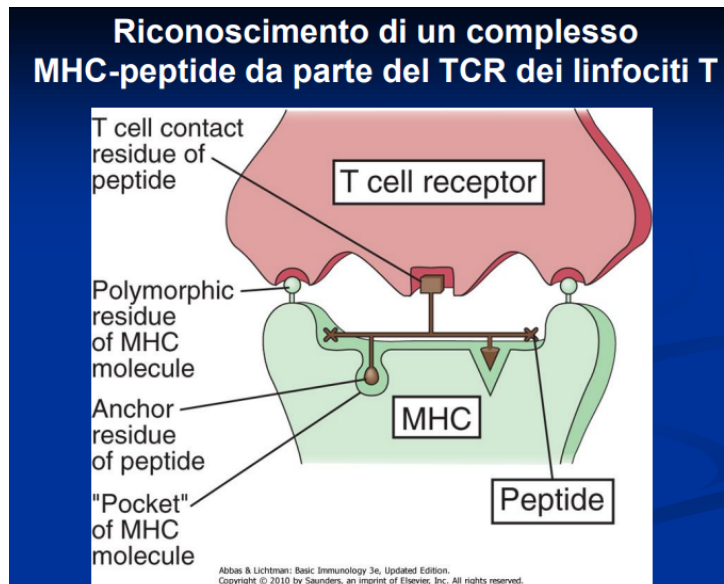
- ✓ 5% FBS (Fetal Bovine Serum)
- ✓ Antibiotici (Pen/Strep)
- ✓ Antifungini

+

PEPTIDES



- ✓ Stimolare le cellule con un peptide di interesse (peptide sintetico di 9 aa)
Es: derivante da una proteina virale (CMV, EBV, Covid-19, Influenza)

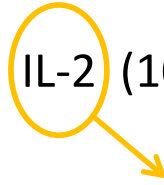


Lunghezza ottimale per il caricamento su HLA di classe I e riconoscimento da parte del TCR

SAGGIO DI PRODUZIONE DI IFN γ

DAY 2

✓ Lavare le cells e aggiungere IL-2 (10U/ml)



Stimolo proliferativo



Tenere in coltura le cellule per 14 gg; ogni 2 gg rimpiazzare metà del terreno con del terreno fresco con l'aggiunta di IL-2

SAGGIO DI PRODUZIONE DI IFN γ

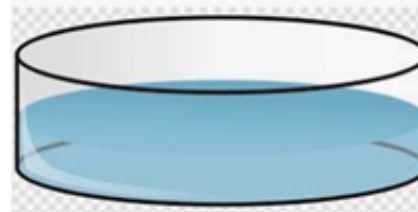


La stimolazione con il peptide permette la ri-attivazione di linfociti T CD8+ che 'conoscono' già l'antigene (memoria) -> se l'individuo da cui abbiamo estratto i PBMC ha già avuto contatto con il virus da cui deriva il peptide (es CMV, EBV, Covid-19, Influenza) dovremmo ritrovare nel pool di linfociti T CD8+ quelli che, in seguito alla ri-esposizione all'antigene (derivante ad es da un virus), si attiveranno con conseguente produzione di IFN- γ

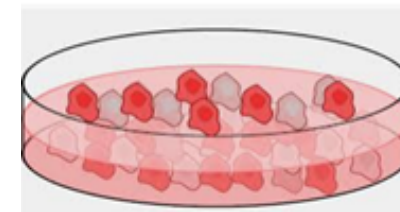
DAY 13

- ✓ Incubiamo le APC (es: BLC-L autologhe) con:
 - Nulla !!! (UNTREATED)
 - Il peptide che abbiamo selezionato (20 μ M)(p-TREATED)
- e le lasciamo ON nell'incubatore

UNTREATED





p-TREATED

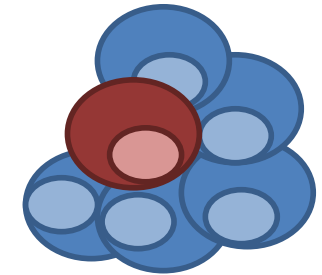
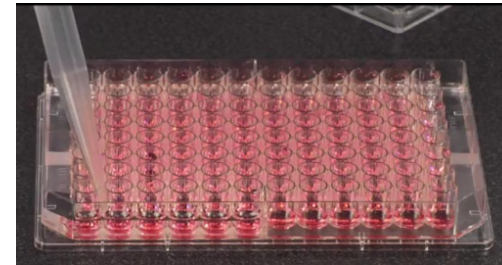


SAGGIO DI PRODUZIONE DI IFN γ

DAY 14

✓ In una piastra da 96 pozzetti piastriamo:

250 000 PBMC		Rapporto PBMC:APC	5
+		:	
50 000 APC			1



- ✓ I PBMC stimolati per 14 gg con il peptide di interesse verranno ri-stimolati con
 - APC untreated
 - APC p-treated

✓ Dopo 1 h dal contatto PBMC/APC viene aggiunta la **BREFELDINA A** (10 $\mu\text{g/ml}$)



La **BREFELDINA A** blocca il trasporto proteico verso il complesso del Golgi promuovendo l'accumulo dell'IFN- γ a livello del Reticolo Endoplasmatico

✓ PBMC e APC vengono lasciate 16-18 h in coltura

SAGGIO DI PRODUZIONE DI IFN γ

DAY 15: Immunofluorescenza di membrana e intracellulare (CD8/IFN- γ)

Qual è la frequenza dei linfociti T CD8+ che si attivano (produzione di IFN- γ) in seguito alla ri-stimolazione con il peptide selezionato??????

- ✓ Lavare le cellule in PBS 1750 rpm 7'
- ✓ Anticorpo specifico per il CD8 (immunofluorescenza di membrana) coniugato con un fluoroforo (Es FITC)
- ✓ 20' a 4°C
- ✓ Lavare le cellule in PBS 1750 rpm 7'
- ✓ Fissare (paraformaldeide 2%) e permeabilizzare (saponina 1%) le cellule
- ✓ Anticorpo specifico per IFN- γ (immunofluorescenza intracellulare) coniugato con un fluoroforo DIVERSO da quello del CD8 (Es APC)
- ✓ 30' RT
- ✓ Lavare le cellule in PBS 1750 rpm 7'
- ✓ Risospendere le cells in 250 μ l di paraformaldeide 2%
- ✓ Leggere i campioni al CITOFLUORIMETRO

SAGGIO DI PRODUZIONE DI IFN γ

