

Immunologia e patologia

Elisa Nerli

16 settembre 2015

Indice

1	Immunità	4
1.1	Risposta infiammatoria	4
1.2	Immunità	5
1.2.1	Immunità innata	6
1.2.2	Immunità specifica	7
2	Immunità naturale	7
3	Immunità specifica o adattativa	8
3.1	Caratteristiche delle risposte immunitarie specifiche	10
3.2	Fasi della risposta immunitaria specifica	11
4	Struttura del sistema immunitario	12
4.1	Strutture anatomiche	12
4.2	Il sistema immunitario associato alla cute	14
4.3	Le proteine leganti l'antigene	15
4.4	Anticorpi	16
4.5	MHC	18
4.5.1	MHC di classe I	19
4.5.2	MHC di classe II	20
4.6	Cellule dendritiche	20
4.7	Struttura del TCR	21
4.7.1	Linfociti $\gamma \delta$	22
4.8	Molecole accessorie del linfocito T	22
4.9	Restrizione MHC dei linfociti T citotossici	23
5	Maturazione e funzione delle cellule del sistema immunitario	24
5.1	Maturazione linfociti T	27
6	Attivazione dei linfociti T	28
6.1	Ruolo della cellula APC nell'attivazione dei linfociti T	28
6.2	Declino delle risposte	29
6.3	Espressione dei costimolatori	30
7	Attivazione dei linfociti B	30
7.1	Interazioni T/B nella risposta immune	31
7.2	Ruolo delle citochine nella funzione B	31
7.3	Antigeni timo-indipendenti	32
7.4	Feedback anticorpale	32

8	Utilizzo degli anticorpi	32
8.1	Evidenze cristallografiche della specificità	32
8.2	Le reazioni antigene-anticorpo	35
8.3	Il Dot Blot ed il Western Blot	35
8.4	ELISA	36
9	Gruppi Sanguigni	37
9.1	Agglutinazione	38
9.1.1	Antigeni ABO	38
9.1.2	Antigene Rh	39
9.2	Test di Coombs	40
9.2.1	Test di Coombs diretto	40
9.2.2	Test di Coombs indiretto	41
10	Produzione di anticorpi	41
10.1	Purificazione per affinità	42
10.2	Anticorpi monoclonali	42
11	Le citochine	43
11.1	Azioni biologiche del TNF	45
11.2	Chemochine	45
11.3	Interleuchina 12	46
11.4	Interferoni di tipo I	46
11.5	IL-2	46
11.6	INF- γ	46

Aldo Paolicchi: aldo.paolicchi@med.unipi.it 050992212 (ufficio: edificio 43 ospedale santa chiara- ex fisiologia clinica)

1 Immunità

Ci sono due tipi di immunità:

- Naturale o innata: meccanismi di difesa preesistenti all'infezione e pronti a reagire con rapidità. I componenti sono le *barriere fisiche e chimiche*, le *cellule fagocitiche, dendritiche e natural killer (NK)*, le *proteine del sangue* e le *citochine*, che regolano e coordinano molte delle attività delle cellule dell'immunità innata.
- Specifica: aumenta in ampiezza e capacità difensiva a ogni successiva esposizione a un particolare agente infettivo. I principali componenti sono i *linfociti*, gli *anticorpi* e gli *antigeni*.

Il sistema immunitario (specifico) non è fatto per rispondere, ma solo per *riconoscere*. La sua normale attività è non rispondere. Chi gli dice di rispondere o no?

Il sistema dell'immunità naturale. I due sono un tutt'uno, un unico macchinario che ci consente di interagire con l'ambiente. Entrambe poggiano sulla risposta infiammatoria, una risposta generale. La natura della risposta è il fondamento dell'immunità.

1.1 Risposta infiammatoria

Di base, la barriera epiteliale è molto resistente all'attacco da parte dei microbi. Qualora il microbo riuscisse a penetrare, o si avesse una rottura delle superfici, ciò creerebbe problemi al nostro sistema immunitario. Quando ci feriamo, si interrompono le superfici e possono entrare batteri. Le ferite si arrossano, e le arteriole si dilatano sotto azione di mediatori chimici. Si dilatano anche gli sfinteri precapillari; di solito sono chiusi, ma ora i capillari si aprono tutti insieme. Si ha richiamo di *leucociti*, come i macrofagi, i neutrofilii e i monociti. Queste cellule, esprimendo recettori che riconoscono e promuovono la fagocitosi dei microbi e recettori che attivano la cellula stessa, una volta attivate iniziano a produrre dei composti tossici per i microbi (ossido nitrico, specie reattive dell'ossigeno ecc).

I microbi in grado di resistere entrano nel circolo sanguigno, dove vengono riconosciuti dalle proteine del complemento.

Il nostro sangue è il 5% della nostra massa corporea. Di questi litri, la metà sta nei capillari: il volume totale dei capillari può contenere 90 L di sangue (se fossero aperti tutti insieme!). Nello shock anafilattico, si aprono tutti insieme e si ha un crollo della pressione, che determina danneggiamento tissutale. I tessuti possono modificare il microcircolo: la risposta infiammatoria modifica il microcircolo e permette l'afflusso di sangue nel tessuto.

Serve *pressione* nei vasi. Nei capillari avvengono scambi per diffusione e scambi fisici: essendovi una differenza di pressione, lungo il capillare la pressione idrostatica discende, e quindi in fondo al capillare la pressione oncotica¹ è più forte e permette al liquido di rientrare. Nell'infiammazione, il tessuto risponde al danno aumentando la pressione dei capillari: si ha afflusso di liquido che permette di *diluire* un agente chimico, di trasportare sostanze che possono combattere l'agente patogeno. Nelle venule non cambia nulla, tranne l'endotelio che diventa *permeabile*: escono le proteine e ciò è importante perchè esse sono:

- tamponi
- conengono gli anticorpi, che si organizzano nel tessuto.

L'endotelio diventa anche adesivo per le piastrine e i leucociti, che escono (macrofagi e linfociti).

I linfonodi stanno in varie zone del corpo e drenano le superfici cutanee e dell'intestino. I vasi linfatici portano la linfa ai linfonodi, e questi convergono in un grande vaso che porta la linfa al sangue. Perchè? Perchè i liquidi che escono dai capillari e rientrano, non rientrano per intero. Nell'infiammazione il liquido esce di più e va nella linfa, dove viene drenato. Uscendo il liquido, aumenta la pressione nell'interstizio tra i tessuti e va ad agire sui vasi con pressione minore, le venule, che si chiudono. L'aumentata pressione rallenta il circolo sanguigno. Nei capillari NO. Le loro pareti sono fenestrate e con tratti di connettivo che li legano all'intestino: in questo modo si dilatano e si ha un enorme flusso di liquido dalle zone infiammate ai linfonodi.

1.2 Immunità

Immunità: protezione individuale nei confronti delle malattie infettive.

Sistema immunitario: insieme delle cellule e degli effettori responsabili dell'immunità, ha natura dinamica e le risposte sono anche articolate in tempi molto lunghi (fenomeni multifasici).

Funzioni dell'immunità:

¹è la pressione osmotica esercitata da soluzioni colloidali

- primaria: difendere l'organismo
- secondaria: eliminare sostanze estranee in parte indipendentemente dalla loro natura patogena.

Molecole che si presentano nel tessuto infiammato possono suscitare una risposta anche se sono molecole SELF (es malattie autoimmuni).

Applicazioni:

- Vaccini, trapianti (manipolazione della risposta immunitaria normale, rispettivamente induzione e soppressione)
- Correzione di difetti della risposta (immunodeficienze, malattie autoimmuni, allergie)
- Strumenti diagnostici basati sulle proprietà di riconoscimento degli anticorpi.

Istamina: vaso dilatatore che contrae i bronchi! L'antistaminico è una molecola che compete con l'istamina per il suo recettore: la reazione allergica c'è, ma non si manifesta.

1.2.1 Immunità innata

L'immunità innata, naturale (es. macrofagi) preesiste all'infezione, risponde immediatamente, ma si ripete sempre con le stesse caratteristiche indipendentemente dall'agente. Il sistema immunitario naturale è sempre lo stesso.

Il macrofago ha 200-300 recettori che riconoscono ciascuno strutture che devono:

- Essere ampiamente diffuse nel mondo dei patogeni (es. lipopolisaccaride batterico LPS)
- Essere indispensabili tutte contemporaneamente per i patogeni (i patogeni non possono rinunciarvi contemporaneamente, come la bici non può andare senza due ruote).

I macrofagi hanno anche recettori per i tessuti danneggiati. *Pochi recettori condivisi.* Il macrofago riconosce, fagocita e produce sostanze, le citochine, che inducono l'infiammazione. Ogni cellula ha tutti i recettori e tutti abbiamo gli stessi recettori.

1.2.2 Immunità specifica

L'immunità specifica entra in funzione solo dopo il *contatto*. Se un agente potenzialmente riconoscibile dall'immunità specifica entra nell'organismo, viene riconosciuto subito, ma la fase effettrice è separata da un grande intervallo di tempo. L'effetto del riconoscimento è l'innescamento della risposta, per la quale possono servire settimane! Riconosce macromolecole e si amplifica con un nuovo contatto con lo stesso agente: ci sono tanti cloni cellulari dei quali ciascuno riconosce una cosa (*un solo recettore per linfocita*, anche se tante copie), e si espandono di più quelli che più volte hanno incontrato l'antigene.

Antigene è tutto ciò che viene riconosciuto dal sistema specifico e che è complesso. Abbiamo 10^{11} linfociti tutti diversi fra loro.

Tutti i recettori sono proteine, quindi ogni linfocita attiva il gene corrispondente: ma noi abbiamo solo 20.000 geni, non 10^{11} ! Ci sono sistemi per sopprimere la risposta per le molecole che produciamo noi stessi. Nei **linfonodi** si incontrano antigeni e linfociti. I vasi permettono di portare i linfociti nei linfonodi. Passato il patogeno, i linfociti non muoiono, ma resta una popolazione di linfociti memoria.

2 Immunità naturale

Complessa, sebbene rudimentale nella capacità di riconoscimento. Fatta di:

- Barriere epiteliali: difese meccaniche, sono fatte di cellule che hanno varie funzioni: le cellule degli epiteli, sottoposte al danno, producono fattori ad attività antimicrobica e fattori di richiamo per i macrofagi. Anche il pH acido della pelle sfavorisce la crescita dei batteri
- Fagociti: hanno recettori per riconoscere i patogeni, attraverso un sistema di trasduzione dei segnali. L'atto di riconoscere attraverso i recettori, oltre a trasdurre il segnale, attiva anche l'espressione genica → la cellula che sta fagocitando si attiva metabolicamente e produce segnali che si diffondono nell'ambiente (es. citochine e lipochine, che mettono in moto la risposta infiammatoria)
- Neutrofili: cellule a vita molto breve, vanno nel sito dove c'è il patogeno, mangiano e muoiono (il macrofago invece vive)
- Cellule NK: se un patogeno riesce a nascondere tutti i suoi elementi di riconoscimento (es. una cellula tumorale), intervengono le cellule NK (natural killer). Esse uccidono chiunque non si faccia riconoscere: azione tossica, litica, sono intrinsecamente attive e devono essere inibite

da tutte le cellule che non vogliono farsi ammazzare. Le nostre cellule infatti hanno ligandi per i recettori della NK, e la inibiscono. Solo le cellule sane inibiscono le cellule NK. A differenza dei linfociti T citotossici, non hanno bisogno di *espansione clonale* per agire né di *differenziamento*

- Citochine: secrete dai macrofagi attivati, inducono modificazione delle cellule tissutali e diventano più resistenti agli attacchi dei patogeni. Attraverso questi segnali, i macrofagi coinvolgono altri tipi cellulari nel processo di difesa dell'organismo

3 Immunità specifica o adattativa

A carico dei **linfociti**, cellule fatte solo di un nucleo e della quantità minima di citoplasma che consente loro di sopravvivere. Si possono suddividere in tante famiglie in base alla loro funzione: le molecole diverse sulla superficie, CDn (cluster designation e numero), permettono di distinguere le diverse funzioni. Prima suddivisione:

- Linfociti B
- Linfociti T

Se mettevamo dei globuli rossi di pecora in presenza di entrambe i linfociti, una parte dei linfociti formava una rosetta intorno al globulo rosso, gli altri restavano staccati ; quelli che si attaccavano, se messi in presenza del globulo rosso da soli, non si attaccavano. Gli altri invece si. Quelli che formavano rosette originavano dal *timo* (linfociti T), gli altri dalla *borsa di fabrizio* [nell'uomo, dal midollo] (linfociti B).

Linfociti B producono gli *anticorpi*, o immunoglobuline Ig. Essi sono recettori di superficie per il linfocito. Quando l'antigene attiva il linfocito, esso spara fuori i recettori, ovvero gli anticorpi. Per far ciò, il linfocito B deve modificarsi funzionalmente: mantiene il nucleo tondo, ma acquisisce un grande citoplasma pieno di RNA e proteine → si forma la **plasmacellula**, cellula a fiamma di candela con nucleo eccentrico. Ogni giorno produciamo vari grammi di immunoglobuline (anticorpi), che però dobbiamo smaltire.

Linfociti T sono più articolati all'interno. Si possono distinguere in base alle loro molecole di superficie in:

- T CD4+: i linfociti T HELPER, producono le citochine, regolano funzioni, determinano il differenziamento degli altri linfociti
- T CD8+: cellule effettrici in grado di uccidere altre cellule. Hanno attività *citotossica*.

Sono due classi di linfociti con funzioni diverse. Non hanno Ig sulla superficie.

I componenti dell'immunità specifica sono: *linfociti e immunoglobuline*.

L'immunità innata interviene in un arco temporale di *ore* dal contatto col patogeno, la specifica impiega *giorni* dal contatto con l'antigene (la prima volta che il patogeno viene incontrato).

Il sistema immunitario *sceglie* il tipo di risposta da effettuare.

1. Nei confronti di batteri extracellulari, si attiva il complemento (immunità naturale); l'immunità specifica produce anticorpi, che si legano al batterio e attivano il complemento se non è stato attivato prima
2. oppure il batterio viene fagocitato; se non viene riconosciuto, alcune classi di anticorpi legati sui batteri promuovono la fagocitosi: il macrofago ha infatti anche recettori per le Ig.
3. Se i patogeni sono all'interno del macrofago (batteri intracellulari), gli anticorpi non ci arrivano: sono infatti molto pesanti e non passano nella cellula → produzione di linfociti T CD4, che riconosce le componenti batteriche sulla superficie del macrofago
4. Se nella cellula c'è un virus, serve un linfocita T-CD8 che lisi la cellula. A volte questo sistema di scelta non funziona → immunopatologia

Sono state riconosciute due modalità di conseguimento dell'immunità:

- Attiva: consegue all'esposizione dell'organismo nei confronti di un patogeno. Viene prodotta una memoria immunologica
- Passiva: trasferimento di effettori dell'immunità, come Ig o linfociti T. A breve termine

Nel feto, le immunoglobuline materne arrivano attraversando la placenta, ma solo le IgG: questo perchè ad esempio non devono passare gli anticorpi dei gruppi sanguigni (IgM); con l'Rh i problemi esistono perchè sono IgG, che passano quindi la placenta.

L'immunità ha la capacità di sviluppare meccanismi di risposta articolati e specifici. Gli anticorpi per noi sono proteine poco smaltibili, per questo dobbiamo produrne pochi. Solo i linfociti che servono si applicano, gli altri

no. La quantità di Ig di un antigene A è sempre superiore dopo un nuovo contatto: gli anticorpi, la seconda volta, salgono a livello più elevato (vedi richiami per i vaccini). Questi anticorpi sono diversi, più specifici per l'antigene! Se somministro un altro antigene B, questo mi fa la risposta primaria come aveva fatto A al primo contatto.

3.1 Caratteristiche delle risposte immunitarie specifiche

1. Specificità: non c'è un clone per ogni antigene, ogni anticorpo vede una porzione molto ristretta del patogeno (es tossina difterica): nei confronti dello stesso antigene, tanti cloni entrano in funzione perchè ogni anticorpo riconosce una porzione diversa (EPITOPO) dell'antigene. Gli anticorpi monoclonali riconoscono un solo epitopo, gli anticorpi policlonali ne riconoscono di più.
2. Diversificazione: i cloni linfocitari sono 10^{11} ; sono diversi in ogni essere umano, per la diversa natura del riconoscimento delle Ig, un po' perchè le proteine dell'istocompatibilità sono i geni più POLIMORFI che abbiamo (MHC).
3. Memoria: ogni esposizione ad un antigene potenzia le risposte successive. Le risposte secondarie sono quindi *quantitativamente* e *qualitativamente* diverse dalla prima. C'è una soglia di stimolazione; il linfocito vergine o naive (che non ha mai incontrato l'antigene) ha una soglia più alta. Le cellule memoria invece sono più facili da attivare, perchè il sistema immunitario ha già verificato che non è una risposta autoreattiva
4. Specializzazione: il sistema immunitario risponde in modo differente ai diversi stimoli (vedi sopra)
5. Autolimitazione: gli effettori non sono sempre presenti allo stesso livello, ma la quantità è proporzionale alla quantità di antigene. Restano solo le cellule memoria (le altre vengono eliminate per apoptosi)
6. Non reattività verso il self: se così non fosse, il danno sarebbe incompatibile con la sopravvivenza. Aggredire solo agenti estranei o cellule che diventano estranee, come quelle tumorali

Il primo segnale al linfocita è un segnale di *morte*: solo se altri eventi accadono questo segnale viene inibito! Persino il linfocita che viene stimolato dall'antigene in modo appropriato, se lo incontra due volte nel giro di poche ore, il linfocita muore. Perchè? Perchè il linfocita, quando incontra tanto

non self, vuol dire che si sta sbagliando, perchè il patogeno è poco rispetto al self.

La febbre reumatica, malattia cardiaca, è dovuta al fatto che anticorpi diretti verso streptococchi riconoscono epitopi che ci sono anche nelle valvole cariache. L'anticorpo prodotto funziona quindi anche verso il cuore; negli individui non malati, quel clone linfocitario viene soppresso per il motivo suddetto, perchè insieme al non self c'è anche il self.

N.B. I linfociti T non vedono l'antigene! I B invece hanno recettori che vedono direttamente gli antigeni come oggetti interi. Le cellule T vedono l'antigene sotto forma di frammento esposto dalle proteine del complesso maggiore di istocompatibilità (MHC). I T possono vedere solo quello che sta dentro queste proteine, che a loro volta espongono proteine: possono vedere quindi solo *proteine*, e solo se presentati dalle cellule che hanno le proteine dell'MHC. Le proteine viste dagli helper (classe 1) sono diverse da quelle possedute da ogni altra cellula. Ogni tipo di linfocito helper secerne citochine diverse.

3.2 Fasi della risposta immunitaria specifica

1. Riconoscimento antigene. Affinchè si abbia il riconoscimento dell'antigene, il linfocito deve entrarci in contatto: le cellule dendritiche, che sono cellule APC, riconoscono e sequestrano gli antigeni, portandoli nelle strutture anatomiche dove si trovano i linfociti B e t, rispettivamente nel midollo osseo e nel timo. In questo modo aumenta la probabilità che il linfocito riconosca l'antigene corrispondente. I linfociti B fanno un riconoscimento diverso dai linfociti T. In questa fase ci interessano le cose in comune alle due risposte: il riconoscimento è fatto di almeno 2 SEGNALI:

- (a) Antigene
- (b) Proteine solubili o di membrana - il linfocito che riconosce un antigene ha bisogno di vedere un antigene ed un segnale che gli dice che quello è un antigene che deve essere riconosciuto → segnale di *morte*

Nei linfociti B, è il complemento che gli dice che c'è il segnale dell'antigene: è quindi il secondo segnale. Il solo riconoscimento dell'antigene non farebbe nessuna risposta. L'interazione con l'antigene è l'INNESCO della risposta: c'è una fase di attivazione prima della risposta → il linfocito cresce in numero.

2. Attivazione.

La quantità di antigene cresce e cresce anche la quantità di linfociti effettori. È in questa fase che si generano gli effettori memoria: i linfociti memoria nascono subito insieme alle cellule effettrici, che poi daranno luogo alla risposta.

Durante questa fase vengono prodotte citochine, recettori per citochine e proteine implicate nella trascrizione genica.

3. Risposta.

Declinano sia i patogeni, sia gli effettori della risposta: *autolimitazione*. Calano linfociti ed anticorpi perchè manca l'antigene, fino a che le plasmacellule ed i linfociti T declinano per apoptosi e tornano al livello precedente; il clone linfocitario responsabile della risposta sarà però aumentato e queste cellule non saranno più linfociti vergini, ma linfociti memoria. I linfociti T, per rispondere, necessitano sia dell'antigene che dei *costimolatori*, molecole espresse dalle cellule dendritiche (cellule APC) in presenza di un agente microbico. Questi costimolatori assicurano che il linfocito T risponda solo ai microrganismi che hanno stimolato la secrezione dei costimolatori, e non a sostanze innocue.

4. Declino della risposta.

I linfociti memoria hanno vita molto lunga!

4 Struttura del sistema immunitario

4.1 Strutture anatomiche

Tutto ciò, per poter funzionare, ha bisogno di strutture anatomiche:

- per cui gli antigeni si concentrino dove ci sono i linfociti
- che attivino risposte appropriate per intensità e durata.

Di base, gli *organi linfoidi secondari* concentrano gli antigeni (come i linfonodi); i linfociti vergini vanno solo lì a cercare gli antigeni, i linfociti effettori e memoria vanno in giro per l'organismo in perlustrazione: sono di più e hanno vita più lunga. Il sistema immunitario è composto di moltissime cellule: solo una minima parte la vediamo in circolo! Il numero di queste cellule varia da uomo-donna, durante le varie epoche (sono fattori ambientali, non genetici! Per questo c'è questo tipo di fluttuazione).

Dalla *branca linfoide* originano i linfociti: la branca T matura nel Timo, la B nel Midollo. Da questa branca si originano anche i linfociti Natural Killer.

Dalla *branca mieloide* si originano megacariociti, eritrociti, mieloblasti (neutrofilo, basofilo, monociti).

Il monocito è il precursore del macrofago. Diventa tale quando entra nei tessuti e lì può differenziarsi in tanti tipi cellulari diversi, come le cellule di Kupffer del fegato, gli osteoclasti, la microglia, le cellule di Langhans dell'epidermide. Dall'incontro della famiglia dei monociti e dei linfociti, scaturisce la risposta immunitaria.

Nel sangue: linfociti B < linfociti T (70-80%).

Nei linfonodi e milza: linfociti B aumentano (ma sempre inferiori ai T). Dei linfociti T, la branca quantitativamente più importante è quella degli Helper.

Plasmacellule: hanno tanto apparato di Golgi perché gli anticorpi hanno bisogno di essere glicosilati (sono glicoproteine) (il Golgi non si colora con i normali coloranti). Hanno il nucleo a ruota di carro.

Il monocito ha un citoplasma vuoto, il macrofago lo ha pieno di organuli. Le cellule dendritiche originano dai monociti.

Gli organi che fanno funzionare il sistema immunitario sono:

Timo Dove si differenziano i linfociti T. Sta tra il cuore e lo sterno, nel mediastino. Il timo però non nasce lì ma ci va! È un organo epiteliale, ma non origina dall'endoderma: origina dall'epitelio degli archi branchiali. I geni che controllano questo movimento stanno sul cromosoma 22. Il linfocito può maturare soltanto perché esiste il timo! Se non ci fosse, non maturerebbe. Deve esserci un'interazione con le cellule del timo. Nel timo avviene la prima eliminazione dei linfociti autoreattivi, mandandoli nel corpo di Hassel.

Midollo osseo Vi troviamo i linfociti B.

Timo + midollo osseo	→	organi immunitari primari
Linfonodi	→	organi linfoidi secondari

Linfonodi Capsula fibrosa forata da una quantità di vasi linfatici afferenti, che vengono o dall'interstizio o da altri linfonodi. Questi vasi hanno valvole che impediscono il reflusso all'indietro della linfa, che scorre lentamente ed è mossa dalla pressione dell'interstizio che si crea quando, alla fine del capillare, non tutto il liquido viene assorbito. La linfa porta:

- Liquido
- Drenaggio interstizio
- Cellule dendritiche che vengono dalla superficie e che attiveranno i linfociti vergini;
- Linfociti effettori e memoria, che perlustrano il tessuto. Portano i linfociti T, perchè i B non vanno a giro.

I linfociti circolano dal seno capsulare alla regione corticale dentro la parte esterna del linfonodo, che è pieno di cellule T tranne nei FOLLICOLI: scuri, possono contenere il centro germinativo (zona chiara) e ospitano i linfociti B. Il linfonodo è vascolarizzato, per cui vi entra un'arteriola ed esce una venula: circondano i follicoli. Le venule che circondano i follicoli, venule ad endotelio alto, hanno proprietà particolari: molecole di adesione sull'endotelio, in grado di catturare i linfociti (chiedi a ricevimento). Ma a che serve, se essi arrivano con la linfa e dal sangue vanno nel tessuto?

Con la linfa arrivano linfociti effettori e memoria; da queste venule arrivano linfociti vergini! Il linfocito vergine può:

- Trovare l'antigene e rispondere, restando nel linfonodo;
- Andare nella linfa e raggiungere il prossimo linfonodo.

Milza È fatta di *polpa rossa* (sinusoidi nei quali i globuli rossi sono sottoposti a stress e quelli vecchi vengono rimossi, recuperando il ferro) e di *polpa bianca* (tessuto linfatico, articolato in regioni T e B come nei linfonodi). C'è un manicotto di cellule T e dentro un follicolo di cellule B.

4.2 Il sistema immunitario associato alla cute

Il *sistema immunitario delle mucose* è fatto di linfociti T epiteliali e da sistema linfatico articolato, fatto di una quantità di strutture, delle quali le più rappresentative sono le placche del Peyer, inserite nella sottomucosa (es le tonsille: sono strutture di tolleranza insieme al sistema linfatico). Al di sopra delle placche del peyer troviamo strutture per rispondere ai patogeni: le cellule linfatiche infatti stanno sotto l'epitelio e il patogeno dovrebbe entrare; le *cellule M* pompano gli antigeni al di sotto della mucosa per farli vedere ai linfociti, in modo tale che essi possano produrre anticorpi (IgA, attraversano le mucose) per patogeni che non hanno ancora attraversato la superficie mucosa.

4.3 Le proteine leganti l'antigene

In comune hanno che riconoscono gli antigeni, ma nel dettaglio fanno cose diverse.

1. Immunoglobuline : o anticorpi, riconoscono antigeni. Sito di legame dell'antigene formato da 3 alpha-eliche affiancate: 4 catene, lega 2 antigeni. Il legame con l'antigene è dato dalla complementarità di forma, ma questa deve essere perfetta, perchè le forze che regolano questo legame sono interazione deboli e dipendenti da potenze elevate della distanza. La forma che dà complementarità è quella dell'antigene. Riconoscendo l'oggetto, possono riconoscere anche antigeni che si formano dall'avvolgimento di una proteina: quella proteina, denaturata, perde l'epitopo, poichè esso esiste solo a causa dell'avvolgimento. La forza con la quale gli anticorpi si legano agli antigeni è molto superiore rispetto a quella di legame tra proteina e THC → alta affinità di legame, che aumenta ogni volta che si reincontra l'antigene (i linfociti B imparano).
2. MHC classe 1 : non riconoscono antigeni, ma li portano legandoli ed esponendoli sulla superficie . Ogni protenina MHC lega tanti antigeni diversi. Presentano piccoli peptidi (10-20 aa). Grande molecola con una tasca: il peptide va nella tasca e il TCR vede sia il peptide che la canoa.
3. MHC classe 2 : non riconoscono antigeni, ma li portano legandoli ed esponendoli sulla superficie . Ogni protenina MHC lega tanti antigeni diversi. Presentano piccoli peptidi (10-20 aa). Grande molecola con una tasca: il peptide va nella tasca e il TCR vede sia il peptide che la canoa.
4. TCR : recettore dei linfociti T, riconoscono antigeni. Sito di legame dell'antigene formato da 3 alpha-eliche affiancate: 2 catene, lega 1 antigene. Il TCR è un braccio dell'immunoglobuline. Il legame con l'antigene è dato dalla complementarità di forma, ma questa deve essere perfetta, perchè le forze che regolano questo legame sono interazione deboli e dipendenti da potenze elevate dell'inverso della distanza. A distanze molto piccole, aumenta tantissimo la forza! La forma che dà complementarità non è quella dell'antigene, perchè il TCR non vede gli antigeni: le 6 dita (o CDR) che nelle Ig toccano l'antigene, qui due toccano l'antigene, le altre 4 toccano la proteina MHC. Il TCR vede gli antigeni solo se questi sono dentro un'MHC. I linfociti CD4+ (helper) possono vedere solo antigeni presentanti nel contesto delle MHC di

classe 2, mentre i linfociti CD8+ possono vedere solo l'MHC di classe 1. Riconosce solo peptidi linearizzati (nella tasca dell'MHC), che esistono solo dopo la processazione della proteina che, da nativa, potrebbe posarli in posizione nascosta. Bassa affinità di legame. I linfociti T non imparano!

4.4 Anticorpi

Nascono come recettori di superficie: l'interazione del linfocito B con l'antigene ha come effetto la secrezione del recettore. Il legame antigene-anticorpo ha effetti biologici estremamente variabili, a seconda della natura dell'anticorpo che è stato prodotto. Gli anticorpi sono diffusamente presenti nell'organismo:

- nel siero (più che altro nel plasma)
- nelle secrezioni mucose (prodotte dal sistema immunitario associato alle mucose) (tanti!)
- nel fluido interstiziale (pochi, tranne nei punti in cui c'è una risposta al patogeno)
- nei linfociti B: li troviamo come proteine transmembrana con associate proteine che formano il complesso di trasduzione
- in altre cellule, che hanno un recettore di membrana che lega la parte FC delle Ig e le tiene fisse sulla superficie: questo recettore trasduce il segnale. Ce ne sono tanti per ciascuna classe di Ig. (es. allergie atopiche dovute al fatto che i mastociti e i basofili hanno recettori per le FC delle IgE). I recettori hanno anche diversa affinità.

2g al giorno di Ig rilasciate nelle mucose, 1g al giorno nel siero → la prima conseguenza della malnutrizione e denutrizione è un'immunodepressione.

La struttura degli anticorpi è semplice: forma ad Y. Sono presenti domini immunoglobulinici, fatti da alcuni foglietti-beta impaccati in senso antiparallelo (grazie ad α -eliche che permettono il legame con l'antigene). Siti di legame descritti come Vl, Cl, Ch e Vh:

V → dominio variabile C → dominio costante.

La catena leggera è formata da un dominio variabile e un dominio costante; la catena pesante sono le α -eliche che permettono le interazioni degli anticorpi, i foglietti beta servono a dare struttura costante: gli anticorpi sono infatti molto stabili → struttura così solida da essere INDIGERIBILE, difficilmente eliminabile! Molte malattie derivano dal fatto che una produzione eccessiva di queste proteine causa un accumulo nei tessuti, che è tossico per

la cellula. I tre frammenti della Y possono essere separati tramite digestione con papaina: i due FAB non sono cristallizzabili, l'FC si →le IgG sono tutte diverse e quindi non possono essere cristallizzate, ma l'FC è il frammento cristallizzabile. I due bracci della Y si chiamano FAB (frammento che lega l'antigene). L'FC, il gambo della Y, esiste in diverse versioni che distinguono le varie Ig (superfamiglia delle immunoglobuline):

- IgG
- TCR
- MHC
- CD4
- CD3

L'immunità è in generale dipendente dagli elementi di questa famiglia; anche le molecole di adesione, il movimento delle cellule dell'immunità nell'organsimo.

Nel *dominio variabile* (la sequenza amminoacidica varia) ci sono zone che variano di più rispetto ad altre: le zone CDR1, CDR2 e CDR3, ovvero le regioni delle alpha-eliche, in particolare la CDR3, che è quella che più estesamente prende contatto con l'antigene. Nel TCR, che con un dito tocca l'antigene e con due i bordi, CDR3 tocca il peptide, il resto lega i bordi dell'MHC. La diversa produzione di anticorpi nel corso della vita del linfocito si riflette nella natura dell'FC: il linfocito origina da una cellula staminale che non produce anticorpi; poi inizia a differenziarsi, e quindi deve iniziare a produrre le Ig, a partire dalla catena pesante μ dell'IgM. Il linfocito vergine ha sempre come recettore le IgM e IgD, solo dopo l'attivazione possono scegliere la classe di Ig.

Le immunoglobuline legano l'antigene. APTENE: immunogeno solo se legato a carrier, perchè è troppo piccolo di norma. L'antigene deve essere grande! Un antigene piccolo non funziona. E per i farmaci? Le allergie ai farmaci non sono contro il farmaco in sé, ma contro il complesso formato dal farmaco e dalla proteina che lo trasporta nell'organismo. EPITOPO: costituito da pochi residui amminoacidici. Ogni antigene viene riconosciuto da un particolare epitopo →risposta policlonale.

Alcuni antigeni si formano come conseguenza di modificazioni della proteina, come la proteolisi. Nella determinazioni dei gruppi sanguigni, ci sono spesso risposte trasfusionali diverse da quelle che vediamo saggiando il siero del donatore e i globuli rossi del ricevente. Non si ha agglutinazione! se modificati gli antigeni →agglutinazione.

La forza di un anticorpo dipende dalla forza di legame tra antigene ed anticorpo: se l'anticorpo si lega con un solo sito di legame, la forza finale è la metà di quella sviluppata se si legano entrambe i siti. L'AFFINITÀ deriva dalla forza di interazione di un solo sito; L'AVIDITÀ deriva dalla forza di interazione di tutto il complesso legante l'antigene. Non è però sempre necessario formare complessi per avere un'elevata forza: il linfocito B ad esempio, ogni volta che incontra l'antigene, modifica la sequenza di aa delle regioni variabili ed AUMENTA L'AFFINITÀ. Quindi il complesso può essere necessario solo la prima volta! Fare un monomero è molto meno dispendioso in termini di energia rispetto ad un pentamero. Il legame anticorpo-antigene è un evento fisico: si forma una molecola grande. L'antigene ha tanti epitopi, quindi legherà gli anticorpi: ogni Ig potrà trovare 2 volte lo stesso epitopo sull'antigene, ma se ci sono altre strutture antigeniche può legarsi con un sito di legame su un antigene e con l'altro sito su un altro antigene. Si forma un complessone in cui tutti gli antigeni sono legati da tutti gli anticorpi!!! Se invece ho un eccesso di anticorpi, si possono solo formare complessi 1:1 e alcuni anticorpi non legheranno niente.

Quanto possono essere diverse la superficie di anticorpo e antigene? Uso il meta-azobenzene solfonato, lo incubo con il siero di un animale e vedo che il legame è efficace più che altro in posizione meta del gruppo solfonato; in posizione orto o para è molto meno efficiente.

4.5 MHC

Proteine della superficie cellulare. Servono per la ISTOCOMPATIBILITÀ. È un effetto non voluto del meccanismo di funzionamento del sistema immunitario: esse sono in grado di presentare gli antigeni proteici e solo frammenti di proteine. In questo modo, tutte le cellule nucleate, con la loro superficie sono in grado di interagire con i linfociti T che cercano gli antigeni. Al contrario del TCR che è straordinariamente specifico per riconoscere gli antigeni, le MHC devono presentare tutto il mondo degli antigeni proteici, sebbene esse siano poche (nell'ordine della decina): sono quindi proteine che devono legare peptidi. Se io prendo una proteina antigenica grande e la spezzetto, non tutti i peptidi potranno legarsi sulla MHC: si ha una scelta dei peptidi da presentare → tramite le MHC ciascuno di noi identifica l'antigene verso il quale può rispondere e quello verso il quale non può rispondere. Queste MHC sono straordinariamente POLIMORFE: l'evoluzione ha sacrificato l'individuo a vantaggio della popolazione. Ognuno ha i suoi MHC. La proteina MHC lega alcuni residui amminoacidici sul fondo della tasca dove c'è l'antigene: ognuno di noi ha tasche diverse, quindi diversi aa possono andarci. Il TCR

vede l'altra faccia e vede contemporaneamente il peptide (con CDR3) e i bordi della proteina (CDR1 e CDR2).

Le due classi di MHC sono diverse:

- MHC di classe 1: dominio immunoglobulinico + regione simile ma che non lo è e che costituisce un fondo di foglietti beta antiparalleli e i bordi di alpha-elica (specie di barchetta). Ogni gene di classe 1 fa MHC di classe 1.
- MHC di classe 2: nelle cellule (dendritiche) che presentano l'antigene. 2 catene simmetriche per cui la tasca dove va il peptide è data dalla giustapposizione della catena alpha e della catena beta: questa tasca è aperta e il peptide può scorrere avanti e indietro per adattarsi → maggiore capacità di legare il peptide. Per fare le due catene possono combinarsi geni diversi → molte più possibili catene α - β .

Gli anticorpi hanno una specificità elevata; le MHC invece presentano tanti peptidi che hanno in comune i residui amminoacidici che guardano la proteina MHC. Ogni proteina MHC contiene *una sola tasca* di legame per l'antigene e due domini, uno transmembrana e uno intracitoplasmatico, e una parte Ig polimorfa e costante che lega il co-recettore (CD4 o CD8). I residui amminoacidici polimorfi si occupano della specificità di legame e della restrizione MHC, perchè sono ciò che il PCR vede; si trovano dentro o vicino alla tasca dell'antigene. Dominio α 3 → dominio immunoglobulinico. Il peptide si sdraia e lega i suoi residui sui foglietti β .

4.5.1 MHC di classe I

Le proteine MHC di classe I:

- sono eterotrimeri
- la catena α forma da sola la tasca dell'antigene
- i residui polimorfici sono contenuti nei domini α 1 e α 2

L'MHC di classe I non esiste come tale: non esiste una molecola vuota, è un eterotrimerico che include un *peptide antigenico*, senza il quale la proteina non può essere espressa sulla membrana (viene comunque creato libero e dopo prende il peptide). La cellula è tutta rivestita di MHC che presenta peptidi antigenici! È un espositore di ciò che contiene, delle proteine che esprime e sintetizza.

4.5.2 MHC di classe II

La tasca del peptide è composta da due diverse proteine, un piano di foglietti β con due α -eliche ai lati; la tasca è aperta alle estremità e ciò permette un'ottima capacità di presentazione di vari peptidi.

- può presentare peptidi grandi (fino a 30 aa)
- non è mai vuota, nemmeno all'origine: viene costruito come eterotrimerico α , β e i (invariante).

Le cellule dendritiche presentano queste molecole: come si fa ad impedire che un peptide endogeno finisca nel MHC di classe II? Esso viene costruito come un trimero in cui il peptide invariante ha alta affinità per la tasca di legame \rightarrow MHC chiuso! Quando è stato assemblato, va in vescicole che attendono il momento dell'utilizzo, ovvero quando il macrofago fagocita qualcosa: si forma il *fagolisosoma*. La vescicola con l'MHC II si fonde col lisosoma: gli enzimi idrolitici del lisosoma degradano tutto il peptide i , tranne la parte che si trova nella tasca. A questo punto l'ultimo frammento di i ha un'elevatissima affinità per una proteina MHC invariante, che strappa il peptide dall'MHC di classe II; i peptidi del fagolisosoma competono per legarsi \rightarrow essi saranno esposti ai linfociti!

Sulla membrana ci sta solo come eterotrimerico col peptide: se va via il peptide antigenico, va via l'MHC. I peptidi che si legano alle MHC (di entrambe le classi) possono anche essere endogeni.

I linfociti devono dire cosa c'è dentro una cellula, è per questo che la cellula deve far vedere il proprio catalogo antigenico (MHC di classe I). Le cellule MHC di classe 2 invece si trovano solo nelle cellule dendritiche, i macrofagi e i linfociti B, oltre alle cellule endoteliali (l'endotelio non riveste solo i vasi, ma è la faccia con la quale il tessuto si presenta ai linfociti circolanti). L'espressione delle MHC è potenziata dalle **citochine**. Sebbene il peptide stabilizzi la proteina MHC, la quantità di MHC presentata dipende dalla quantità di espressione genica, ovvero da quanto le citochine stimolano le cellule a produrre MHC, non dalla disponibilità di peptidi.

4.6 Cellule dendritiche

Hanno un ruolo nella captazione e presentazione dell'antigene ai linfociti T (cellule APC). Permettono infatti l'attivazione dei linfociti naive.

Le cellule fenotipicamente immature, che non funzionano e non possono presentare antigeni, quando arriva l'antigene e si ha lo stimolo infiammatorio migrano negli organi linfoidi; la cellula dendritica fa parte della linea differenziativa mieloide ed è considerata un macrofago, grazie ai suoi recettori

che permettono la fagocitosi dei microbi che sono stati internalizzati. La fagocitosi è quindi accompagnata da segnali di infiammazione con rilascio di citochine: i segnali vanno al tessuto. La cellula dendritica fagocita l'antigene e perde la capacità di adesione al sito in cui si trova, e matura recettori per segnali chemiotattici → inizia a muoversi, si stacca dall'epidermide, attraversa la membrana basale e viene trascinata via dalla linfa.

Ciò fa sì che la cellula dendritica esprima più MHC di classe II e contemporaneamente esprima altre proteine di membrana che sono segnali per i linfociti vergini. La cellula dendritica fagocita l'antigene, lo spezzetta, il fagolisosoma si fonde con la vescicola che contiene il peptide invariante ecc...

La classe I prende i peptidi dal citosol, ma essa si trova nel RE: anche lei seleziona i peptidi che passano nel RE perché sono trasportati dal trasportatore TAP.

Il patogeno viene fagocitato, frammentato in vari peptidi → procede verso il fagolisosoma; nel RE sintetizzate catene α , β e i . Si assembla l'eterotrimerico e solo dopo la digestione di parte della catena i , la catena DM riesce a rimuovere CLIP e a liberare l'MHC di classe II; dopo viene portato sulla superficie ed esposto ai linfociti. DM riesce a rimuovere CLIP perché ha una elevata affinità per essa, ma la vede solo dopo la digestione di i .

L'energia di legame tra TCR ed MHC è modesta: un solo MHC non può legarsi ad un TCR, servono molte altre proteine, alcune con funzione di legame e trasduzione del segnale, altre con funzione esclusivamente di legame. Tutte queste proteine non sono distribuite omogeneamente sulla superficie cellulare, ma riescono a muoversi sulla membrana e danno il fenomeno di CAPPING nel punto dove le due cellule si toccano.

4.7 Struttura del TCR

Il TCR non esiste nella forma secreta, è solo di membrana. È fatto come un pezzo di anticorpo: una porzione transmembrana e due catene (α e β) che contengono un dominio variabile N-terminale e uno costante.

Sebbene la struttura come dimensioni sia uguale alla catena leggera dell'anticorpo, la struttura α le somiglia, quella β somiglia alla parte ad essa corrispondente della catena pesante delle Ig, privata dell'FC.

Le due catene α e β sono unite da un ponte disolfuro tra cisteine extracellulari.

In analogia con BCR, nemmeno il TCR trasduce segnali. Nel dominio variabile abbiamo foglietti β antiparalleli e 3 α eliche: CDR1-2² legano l'MHC, CDR3 lega il peptide antigenico. Questa parte è quella responsabile

²CDR sono regioni che determinano la complementarità

del riconoscimento specifico dei complessi MHC-peptide (il TCR vede solo i peptidi di solito).

L'affinità del TCR nei confronti di MHC-peptide è minore di quella delle Ig nei confronti degli antigeni: l'Ig deve togliere l'antigene e quello deve restarci ben attaccato, quindi il legame deve essere solido; il TCR deve solo *riconoscere*, se lega tanto fa dei guai, perchè lega l'MHC, e se avesse la capacità di legare con affinità elevata, non servirebbe il peptide dentro per scatenare la risposta, risponderebbe da solo! Il TCR è una proteina che *riconosce l'MHC self debolmente*; l'affinità aumenta solo quando nella tasca c'è il peptide antigenico specifico: due delle α eliche legano debolmente.

Il suo complesso di trasduzione del segnale è composto da una catena ζ e dalle proteine CD3, fatte da catene ϵ , δ e γ , associate agli eterotrimeri α e β in modo non covalente. Esse contengono un dominio Ig nella regione N-terminale extracellulare, dunque appartengono alla superfamiglia delle Ig. Se queste proteine non vengono espresse, il TCR non viene esposto sulla membrana.

Ogni complesso del TCR è quindi costituito da un dimero $\alpha\beta$ associato ad un eterodimero CD3 $\delta\epsilon$, un eterodimero CD3 $\gamma\epsilon$ e un omodimero $\zeta\zeta$, quest'ultimo stabilizzato da un ponte disolfuro.

4.7.1 Linfociti $\gamma\delta$

Hanno il TCR fatto di due catene, ma non esprimono CD4 e CD8. Stanno nella cute e nelle mucose. Non guardano gli MHC di classe 1 o 2, ma guardano un MHC non polimorfo, CD1. Trasducono lo stesso segnale nello stesso modo, ma riconoscono solo molecole presentati dal CD1, che non essendo polimorfo presenta sempre la stessa cosa.

4.8 Molecole accessorie del linfocito T

Nell'ACP:

- MHC di classe 1 o 2
- Molecole di adesione o ligandi di molecole di adesione
- Segnale accessorio B7, è il costimolatore. Se non c'è stato evento infiammatorio, esso non viene presentato e il linfocito muore

Nel LINFOCITO:

- Molecole di adesione

- Costimolatore
- Complesso della trasduzione del segnale

La cellula APC (macrofago, cellula dendritica ecc) è molto più grande del linfocito. Il CD3 rappresenta il contorno del linfocito, ma lo segna ad intensità diverse: la massima è nella zona dove c'è il TCR, perchè il CD3 è il complesso di trasduzione del segnale. L'LFA-1 è una molecola di adesione e si trova solo in due bande a cavallo del CD3 (lo circonda). Ciò permette adesione per il tempo necessario per la stimolazione del linfocito vergine da parte dell'APC.

4.9 Restrizione MHC dei linfociti T citotossici

Esperimento: topo di un ceppo inbred (stesso MHC) infettato con coriomeningite linfocitaria. Esso svilupperà linfociti CD8 citotossici → distruzione della cellule infettate dal virus, perchè vedono gli antigeni sulle MHC di classe 1. L'antigene virale è un peptide immunodominante: i citotossici però riconoscono il complesso MHC-peptide. Se prendo due topi e ottengo cellule somatiche, le infetto col virus: una linea cellulare dallo stesso ceppo, l'altra da un ceppi diverso → entrambe gli MHC esprimono peptidi virali. Se ci metto i linfociti CD8, essi uccidono solo le cellule che espongono il peptide dello stesso ceppo: l'altro no, perchè non si ha riconoscimento peptide-MHC (RESTRIZIONE MHC funziona solo col self!).

Per i linfociti CD4 invece non funziona così.

Integrine stanno nella membrana e mediano l'adesione forte, ad alta affinità → sono integrali di membrana, aderiscono direttamente al citoscheletro. La parte intracitoplasmatica riceve segnali che porta a modificazione della parte extracellulare. la cellula le utilizza quando legge segnali chemiotattici da parte delle CHEMOCHINE, citochine con azione chemiotattica. L'integrina passa allo stadio ad alta affinità e legano le cellule che fanno da maniglie (CAM); le integrine sono modulate da segnali di chemoattrazione, ma esse stesse trasmettono segnali alle FAC per cui comunica alla cellula che è legata.

CD28 e CTLA-4 sono i recettori per il linfocito T. Il CD28 sta sui linfociti T CD4+ e lega B71 e B72, il CTLA-4 sta sui linfociti T attivati e lega B7-1 e B7-2: essi sono i *costimolatori*. Le conseguenze della costimolazione sono diverse a seconda del ligando:

- CD28 : sta sui linfociti che devono essere attivati, e quando legge i costimolatori fa partire la via di attivazione attraverso CTR. Il linfocito

attivato esprime ora CtlA-4. Causa l'espressione di proteine antiapoptotiche →significa che di per sé il riconoscimento dell'antigene porta all'apoptosi: la risposta procede solo se ci sono questi segnali apoptotici (sistema di sicurezza: non si ha risposta autoimmunitaria)

- CTLA-4 : fa morire la cellula. L'antigene non deve più disturbare il linfocito. Se invece l'antigene si presenta molte volte, significa che è self e quindi il linfocito muore
- CD28 : è espresso sui timociti. Il suo legando è B7

Selectine importanti, sono molecole di adesione ma mediano un legame transiente, instabile. La selectina si rompe subito, e ciò obbliga la cellula a rilasciarsi e rotolare via →così impegna una parte di superficie dove ci sono delle integrine: in questo modo il linfocito rotola e tocca l'endotelio (esempio della corrente sanguigna) →obbligano la cellula a LEGGERE l'endotelio. Sono il modo col quale il sistema immunitario è obbligato a leggere ciò che c'è al di sotto dell'endotelio, perchè i segnali prodotti dai tessuti passano nell'endotelio e si depositano su glicoproteine che ricevono questi segnali chemiotattici.

I linfociti T hanno anche molecole effettrici di membrana:

- CD40L : si lega al suo recettore CD40 sui macrofagi, cellule dendritiche, linfociti B e cellule endoteliali (cellule con funzioni helper). Viene espresso sulla superficie del linfocito. In questo modo il macrofago viene attivato metabolicamente
- FAS-ligando : ligando di FAS, il recettore di morte. Si ha l'innescamento di apoptosi perchè riconosce cellule che espongono FAS

Sono ligandi che si fanno leggere dalle cellule bersaglio dei linfociti

5 Maturazione e funzione delle cellule del sistema immunitario

Maturazione →porta alla formazione delle cellule vergini; dalla cellula staminale si fa il linfocito vergine. Il processo è simile per la linea B e T. Cellula staminale che ha un patrimonio genetico di enormi potenzialità, ma non ha funzione effettrice →decide di orientarsi verso lo stato linfocitario B o T: se si orienta a B resta nel midollo osseo, se si orienta verso T deve migrare verso il timo e riconoscerlo fisicamente →deve creare il recettore: prima la catena

β del TCR o la pesante delle Ig \rightarrow verifica della funzionalità della catena; la sua espressione sulla membrana trasduce il primo segnale antiapoptotico \rightarrow parte la catena di eventi per la produzione della catena α del TCR o la leggera della Ig \rightarrow linfocito con recettore funzionale e competenza a riconoscere antigeni: deve comunque essere testato per la capacità di riconoscere il self \rightarrow LINFOCITO MATURO E VERGINE, o naive: può vedere gli antigeni.

Non tutti i cloni che vedono il self muoiono: quelli che rimangono diventano LINFOCITI REGOLATORI. In ognuna delle fasi della maturazione, l'incapacità di mostrare sulla superficie un prodotto funzionale corrispondente a quella fase, è associata alla morte cellulare: il linfocito può morire in ogni passaggio cellulare.

Perché è così difficile fare un linfocito, visto che sono fatti a caso? Perché sono complessi i meccanismi che portano a differenziare linfociti che riconoscono antigeni diversi. Ci sono 10^{11} recettori diversi, che vengono fatti rimaneggiando i geni delle Ig (ma devo sempre ottenere le Ig): nel locus delle Ig ci sono repertori di sequenze geniche \rightarrow mettere insieme una delle sequenze V, D e J (ne scelgono una ed eliminano tutto il DNA interposto) \rightarrow così si forma il dominio variabile delle Ig ed ogni linfocito, a caso, si prende un V, un D e un J. Magari due linfociti scelgono la stessa sequenza. La sequenza VDJ sarà il dominio variabile di Ig/TCR. Ad esso vengono appiccicati i domini costanti.

Avendo assemblato un V, un D e un J, nei punti di saldatura tra V e D e tra D e J, vengono introdotte mutazioni casuali, aggiungendo o togliendo triplette \rightarrow rischio di introdurre un codone di stop. Solo le mutazioni che portano alla formazione di un Ig o di un TCR non vengono eliminate: come si fa a sapere che è fatta bene? Serve qualcosa che ci si leghi: viene fatta contemporaneamente una catena invariante (c'è un gene specifico) che si lega alla catena pesante delle Ig o alla β delle TCR: se non si lega, non parte il segnale di sopravvivenza. Ugualmente, se la catena leggera non è fatta bene, non può legarsi alla catena pesante \rightarrow verifica della competenza funzionale della catena leggera \rightarrow abbiamo così il nostro recettore.

CDR1, CDR2 e CDR3: il dominio variabile della Ig è in giallo, e nel dominio variabile c'è una regione V (in giallo), una D (in rosso) e una J (in verde): le parti tratteggiate sono CDR1,2,3. La 3 è la più variabile perché mentre la variabilità di 1 e 2 riguarda solo i segmenti V disponibili, la CDR3 riunisce le regioni di saldatura tra V, D e J! Ha quindi tutta la variabilità combinatoria che dicevamo prima.

Nel linfocito pro-B (linfocito che ha deciso di diventare B, ma non ha ancora fatto nulla), si ha il riarrangiamento V-D-J: se funziona bene, il recettore va sulla superficie; se non funziona, c'è l'altro allele per le Ig! Se invece viene bene il primo, si ha ESCLUSIONE ALLELICA, per cui viene impedita la

ricombinazione dell'altro allele. Ci sono quindi linfociti che hanno consumato solo un allele, ed altri che ne hanno utilizzato un secondo. Se nessuno dei due funziona, la cellula muore. Anche per le catene leggere: prima si prova a fare K con un allele, poi con l'altro: se non riesce, si fa la λ col primo allele ed eventualmente la λ con il secondo. Di solito, c'è maggioranza di K e minoranza di λ , perchè la cellula ha due tentativi per fare K (che viene fatta prima).

I linfociti T non provano la catena β , ma prima provano a fare il recettore $\gamma \delta$. Se non ci riescono, si riciclano come linfociti $\alpha \beta$. Viene così prodotto il linfocito vergine. C'è un problema: B e T hanno un mestiere diverso da fare! B non deve vedere i self, il linfocito T deve vedere l'MHC, quindi vanno bene solo le cose che riconoscono gli MHC! Come fanno? All'inizio, quando il recettore è maturato, i linfociti vergini non ancora maturi sono DOPPIO POSITIVI: esprimono sia CD4 che CD8 (e dentro il timo cercano un MHC a cui legarsi \rightarrow o all'MHC di classe 1 o 2, oppure proprio non si legano (e a quel punto muoiono). Se si legano però sono autoreattivi! Come si fa? L'MHC presente in cellule specializzate nel timo, contiene sempre un peptide self: i linfociti timici doppio positivi cercano l'MHC e se lo legano inensamente muoiono; quelli che legano BLANDAMENTE l'MHC invece sopravvivono: immessi in circolo rimarranno inattivi fino a che l'MHC dà un segnale molto più intenso perchè porta l'antigene complementare per il linfocito vergine, che scatena la forza di legame! Questo legame debole è o per CD4 o per CD8: a quel punto si innesca una modificazione dell'espressione genica per cui se lega MHC di classe 1 viene potenziata l'espressione di CD8 e se lega MHC 2 potenzia CD4.

Enzimi che servono per la genesi dei recettori: se i geni non vengono espressi, i linfociti incapaci di produrre un recettore maturo \rightarrow apoptosi. Il difetto di questi geni porta alla mancata produzione di linfociti vergini, poiché questi geni regolano entrambe le catene. Sono gli stessi enzimi che funzionano del linfociti B e T.

Diversificazione del repertorio dei linfociti B e T:

- diversità combinatoria (V, d e j)
- diversità per sottrazione/aggiunta nucleotidi (vedi lezione precedente).

Gli eventi di proliferazione e ricombinazione sono CRONOLOGICAMENTE SEPARATI, visto che gli eventi mutazionali sono connessi all'insorgenza di neoplasia di cellule dello sciame linfocitario.

5.1 Maturazione linfociti T

Sebbene il processo generale sia lo stesso per B e T, le cellule T hanno bisogno di un organo competente perchè devono riconoscere l'MHC self e non (restrizione MHC): il linfocito T contemporaneamente matura ed impara a riconoscere le MHC self, una volta che le due catene α e β sono state prodotte; ciò avviene sui linfociti con recettore alpha-beta doppio positivi (hanno sia corecettore CD4 che corecettore CD8). Entrambi il linfocito B ha selezione negativa perchè non deve riconoscere nulla, il T ha contemporaneamente selezione *positiva* e *negativa*, perchè deve riconoscere il peptide self e la proteina MHC indipendentemente dal peptide che è contenuto.

Selezione positiva processo attraverso cui vengono selezionati i linfociti T dotati di TCR che si legano con bassa affinità ai complessi MHC-peptide self, preservando così quelle cellule che potranno riconoscere gli antigeni esogeni presentate dalle molecole MHC di quel dato individuo.

Selezione negativa processo attraverso il quale i timociti³ dotati di TCR che legano fortemente gli autoantigeni, in associazione a MHC self, vengono eliminati.

Tutti i nostri linfociti sono fatti per riconoscere solo MHC self; l'organo trapiantato contiene cellule somatiche con MHC di classe 1; gli organi trapiantati vengono rigettati: ma se l'MHC non self non viene visto, perchè avviene ciò? Perchè i linfociti sono stati selezionati per riconoscere debolmente l'MHC self! Fra tutti i miei cloni linfocitari, ce ne saranno molti che esposti ad altri MHC non li lega, ma qualche clone li legherà *saldamente*, determinando rigetto del trapianto.

Ma non servono le cellule dendritiche per i linfociti vergini? Infatti il rigetto avviene da parte dei linfociti memoria, non dai vergini.

Citoflorimetro cellule esposte ad anticorpi, ognuno legato ad un fluorocromo diverso (che emette a lunghezza d'onda diversa). Es CD4 in rosso e CD8 in verde: abbiamo 4 popolazioni. Le cellule che hanno poca fluorescenza di CD4 e CD8 sono i *doppio negativi*. Fluorescenza elevata in entrambe è propria dei *doppio positivi* (es nelle cellule del timo).

³Cellule in corso di maturazione nel timo

Nei $\gamma\delta$, solo alcuni VDJ vengono usati per fare dei recettori: la capacità di riconoscimento li avvicina di più all'immunità naturale, perchè vedono antigeni comuni presentati da MHC non polimorfi, che legano anche molecole diverse dalle proteine.

(presentazione 9)

6 Attivazione dei linfociti T

Partiamo dal linfocito vergine, appena maturato: il linfocito vergine ha un meccanismo di attivazione più complesso rispetto ai linfociti effettori. Il linfocito T vergine non riesce ad entrare nei tessuti periferici, deve percorrere per forza i linfonodi, gli organi nei quali può avvenire l'incontro con l'antigene e il segnale costimolatorio (per attivare il linfocito vergine): deve quindi incontrare la cellula dendritica matura, che espone sulla superficie il costimolatore → attivazione del linfocito = *proliferazione + entrata in circolo* → produzione del *linfocito effettore*.

Il linfocito T effettore, uscendo dal vaso sanguigno, entra nel tessuto, interagisce con i macrofagi e dà luogo alla risposta immunitaria nel tessuto. In realtà la risposta immunitaria dipende anche da *caratteristiche del microambiente* interno al posto in cui si incontrano recettori ed antigeni (es liquido che riveste le cavità alveolari di coloro che vivono in città o in campagna: esso raccoglie tutto ciò che dall'aria si deposita sulla sua superficie).

Il tempo di contatto tra MHC e TCR è rapido! Ogni MHC presenta peptidi diversi: la stimolazione del linfocito T richiede più contatti in sequenza. Se così non fosse, si avrebbe:

- Mancata risposta
- Risposta parziale
- Mancata attivazione del clone → il clone non risponderà *mai*!

6.1 Ruolo della cellula APC nell'attivazione dei linfociti T

I macrofagi e i linfociti B possono attivare solo le cellule effettrici che sono state attivate dalle cellule dendritiche mature. Le cellule APC permettono:

1. Riconoscimento antigene
2. Sopravvivenza del linfocito

Una volta che un antigene è stato identificato come patogeno, non serve più una dose elevata per stimolare la risposta. L'eccesso di attivazione porta all'apoptosi.

Nella fase di attivazione, il linfocito deve solo *proliferare*: parte una secrezione autocrina di citochine, come l'*interleuchina-2*, e l'espressione per il recettore dell'*interleuchina-2*. In questo modo il linfocito si condiziona a proliferare: i linfociti diventano numerosi e si producono *linfociti effettori e memoria*. I linfociti effettori svolgeranno le numerose funzioni dei linfociti B (vedere MHC di classe 2 dei macrofagi e potenziare le funzioni dell'immunità innata) e dei T (possono interagire con i B → cambio irreversibile della classe di Ig, da M a U, 3, 4, A, E ecc).

Cosa decide quale classe deve essere prodotta? Lo decide il linfocito T. Esso decide quali citochine produrre prima di incontrare il B, quando entra in contatto con la cellula dendritica matura. Il linfocito CD4+ può produrre *citochine proinfiammatorie*, stimolando l'innescamento della risposta infiammatoria, principalmente nei confronti dei vasi → obliterazione del numero dei vasi e perdita dell'organo trapiantato.

Il linfocito maturo continuerà a produrre citochine per modulare le risposte immunitarie che sarà in grado di sostenere, non più per proliferare.

I linfociti CD8+ vergini, una volta attivati, producono linfociti T citotossici (CTL): essi sono morfologicamente diversi. CD8+ ha grande citoplasma e granulazioni citoplasmatiche azzurrofile, che si osservano nel sangue durante un'infezione virale. Non ci sono due linfociti che producono la stessa miscela di citochine! Il macrofago che incontra il CD4 attivato, viene attivato da esso!

6.2 Declino delle risposte

Fino a che c'è antigene disponibile, nuovi linfociti vengono reclutati, ma alla fine la risposta cessa perché:

- Manca l'antigene
- Mancano costimolatori e citochine (anche se c'è l'antigene)

N.B. i linfociti memoria non vanno incontro ad apoptosi, perché servono per la volta successiva ad innescare una nuova risposta. Essi infatti esprimono livelli maggiori di proteine antiapoptotiche Bcl-2 e Bcl-xL. Le cellule memoria aumentano con l'età.

6.3 Espressione dei costimolatori

I segnali che determinano l'espressione dei costimolatori sono *segnali del danno*, dell'infiammazione. Essi aumentano la trascrizione del gene per l'interleuchina-2, stabilizzano il suo mRNA e favoriscono l'espressione di BCLx, proteine con funzione antiapoptotica. Sono detti *secondi segnali*, mentre l'antigene rappresenta il primo segnale.

I costimolatori sono espressi dalle cellule APC. In assenza di costimolazione, non si può avere risposta immune e il linfocita può morire per apoptosi, oppure entrare in uno stato di *non responsività*.

7 Attivazione dei linfociti B

L'incontro tra linfocito B vergine e l'antigene ha come conseguenza l'attivazione (policlonale) del linfocito \rightarrow proliferazione. Alla fine del primo ciclo di riposta (risposta primaria) si ha la prima ondata di produzione di *immunoglobuline*, secrete dalle plasmacellule ed uguali al BCR, ma mancanti della porzione transmembrana. Si producono più che altro IgM, che sono il recettore del linfocito B vergine (anche le IgD lo sono, ma non sono secrete in forma solubile).

Vengono prodotte *cellule B memoria* (simili alle T memoria), ma anche plasmacellule a lunga vita, un elemento cellulare effetore (questo non avviene nella branca T) che continua a produrre anticorpi, mantenendo un ottimo tasso anticorpale (servirà poi per una nuova risposta).

Le cellule B memoria, all'inizio della risposta secondaria, proliferano e di nuovo si producono plasmacellule ma la produzione anticorpale per ogni clone è di una classe di Ig diversa da quella precedente. In realtà il sistema B è in grado di fare anche risposte non secondarie: può continuare a fare risposta primaria ad esempio se intervengono i linfociti T.

Anche la risposta B è plastica: è in grado di *produrre recettori BCR migliori* ad ogni risposta⁴ e con un'affinità di legame per l'antigene proteico maggiore. Se l'antigene non è proteico, non è richiesto il linfocito (e la parte variabile è sempre la stessa).

Le risposte contro i polisaccaridi vanno principalmente verso la produzione di IgM. La risposta M è particolare perchè permette l'attivazione del complemento (basta una IgM legata) se si è in presenza di un polisaccaride batterico⁵.

⁴ma solo se è intervenuto il linfocito T!

⁵i virus non ne hanno

I linfociti B hanno *selezione negativa*: chi lega il self muore. Non hanno MHC nè sinapsi immunitarie⁶ come i T: qui abbiamo *aggregazione del BCR*, perchè l'antigene deve attirare nella porzione di membrana in cui si trovano tanti BCR. Antigeni polivalenti possono scatenare questo fenomeno (legano molti BCR su di sé), mentre i monovalenti no, e quindi non riescono ad attivare i linfociti B.

L'internalizzazione dell'antigene con passaggio all'endosoma permette al linfocito B di comportarsi come cellula APC, presentando l'antigene di classe 2. Quest'ultimo è la proteina, non l'antigene iniziale! Presentano solo la parte proteica (deglicosilata eventualmente) dell'antigene iniziale.

Anche i linfociti B necessitano di un secondo segnale: il **complemento**, che garantisce che quel materiale sia non-self (le cellule self sono piene di inibitori del complemento). CR2, CD19 e CD81 sono il complesso co-recettoriale.

Esperimento: si prende un animale irraggiato, quindi immunodepresso, si iniettano da un animale sano cellule del midollo osseo. Si somministrano cellule sanguigne rosse di pecora → non si assiste alla produzione di anticorpi nella milza. Se diamo cellule del dotto toracico (linfociti T. È l'ultima via linfatica prima del circolo) → no produzione. Se si danno contemporaneamente, insieme all'antigene → si! Per avere la risposta umorale quindi servono linfociti B e T.

7.1 Interazioni T/B nella risposta immune

vedi slides

Incontro secondario tra T e B: mutazioni somatiche del clone linfocitario B, si formano pseudocloni ciascuno con parte variabile diversa. (?) Hanno comunque bisogno dell'antigene per sopravvivere: essendoci poco antigene e tanti linfociti, possono sopravvivere quelli che hanno maggior affinità per l'antigene. Solo quel clone sopravvive, gli altri muoiono, su di esso si innescano ulteriori mutazioni che migliorano ulteriormente l'affinità.

7.2 Ruolo delle citochine nella funzione B

Quale FC viene inserito negli anticorpi dipende da quali citochine sono state prodotte dal linfocito T, e quindi da come il T ha risposto quando ha in-

⁶Le sinapsi immunitarie, o immunologiche, si formano nel sito di contatto tra linfocito e APC. Vengono rapidamente reclutate molecole come il complesso del TCR, i corecettori CD4 e CD8, i recettori per le molecole costimolatorie (come CD28) ecc. È il sito di assemblaggio della macchina di trasduzione del segnale del linfocita

contrato l'antigene. A seconda della citochina prodotta, il linfocito B può scegliere quale shift isotipico mettere in atto.

N.B. i follicoli non ci sono se non ci sono i linfociti T, sebbene siano strutture B.

7.3 Antigeni timo-indipendenti

Non necessitano dei linfociti T per produrre IgM. Sono antigeni non proteici e non hanno memoria di shift isotipico. Quanto più sono in grado di attivare i macrofagi, tanto più è potente la risposta. Si distinguono risposte:

- Timo-indipendenti 1: LPS, sono capaci da soli di attivazione B
- Timo indipendenti 2: hanno comunque bisogno di linfociti T

7.4 Feedback anticorpale

L'antigene fa rispondere il linfocito B ma gli dà anche un segnale vitale; contemporaneamente all'aggregazione dei BCR tra loro, si ha sul linfocito B l'aggregazione dei BCR con un recettore per Fc, che lega l'Fc delle Ig: dentro ci sta una delle immunoglobuline secrete. Questa aggregazione spegne il sistema. In questo modo potrebbe non funzionare nulla! il meccanismo non si blocca subito perchè il recettore per Fc è normalmente occupato dalle Ig già presenti, non da quella prodotta dal linfocito stesso. Man a mano che la produzione di Ig da parte del linfocito B va avanti ed esse si accumulano all'esterno, ci sarà più probabilità di averne una compatibile con il recettore sullo stesso linfocito. Ciò regola la produzione di anticorpi.

(5.101.14)

8 Utilizzo degli anticorpi

8.1 Evidenze cristallografiche della specificità

Gli anticorpi riescono a legare gli antigeni grazie alle α eliche CDR1, 2 e 3, che sono la parte variabile. Le Ig non sono cristallizzabili perchè sono tutte diverse. Siamo però in grado di produrre anticorpi monoclonali e di farne la cristallografia; anche i soggetti affetti da mieloma, un tumore dei linfociti B: tutte le plasmacellule derivano dalla cellula iniziale e i cloni hanno tutti lo stesso BCR, e producono quindi la stessa Ig (se la producono). L'iperproduzione di anticorpi da parte del clone neoplastico inibisce la produzione di anticorpi normali.

Ibridomi → linee cellulari che fanno anticorpi monoclonali.

Su ibridomi contro l'albumina è stato possibile clonare il gene dell'anticorpo ed indurlo a mutazione: si è verificato che la struttura dell'anticorpo è uguale sia con l'antigene legato che senza → l'anticorpo è uno *stampo rigido* (modello chiave-serratura). Il legame antigene-anticorpo era mediato da 17 residui aa dell'anticorpo e 16 dell'antigene; dei 17 dell'anticorpo, 6 appartengono alle CDR della catena leggera, 9 alla catena pesante e 2 non appartengono alle CDR. Si è scoperto anche che i residui dell'antigene non sono consecutivi: l'antigene denaturato non si lega all'anticorpo.

Alcuni anticorpi riconoscono epitopi conformazionali: se la proteina è denaturata, non avviene il riconoscimento; altri riconoscono epitopi strutturali. Alcuni anticorpi riconoscono alcuni frammenti di una proteina ed anche la proteina intatta (in questo caso lineare).

Gli anticorpi comunque non sempre riconoscono ciò che dovrebbero riconoscere. La *cross-reattività*, o reattività incrociata, comporta che:

1. l'antigene sia condiviso da tipi cellulari diversi o da cellule di specie diverse : il CD4 è presente sia sui linfociti T che sui neuroni. oppure l'antigene di Fossman, presente sulla superficie di cellule animali, ma non sulle nostre: in alcune malattie, sviluppiamo anticorpi per questo antigene.
2. Antigeni differenti possiedono epitopi comuni : polimorfismi all'interno di una specie ed epitopi comuni tra specie vicine. Es. se metto l'albumina di scimpanzè con un antisiero umano, le Ig si legano a tutti gli epitopi esclusi quelli umani.
3. Due antigeni non correlati condividono epitopi simili ma non identici : es. proteine diverse hanno epitopi molto simili tra loro, e quindi l'anticorpo specifico per un certo epitopo può legarsi anche ad epitopi simili di proteine diverse.
4. Epitopi chimicamente distinti ed apparentemente non correlati assumono una conformazione compatibile con il legame con le stesse Ig. Ad esempio, anticorpi diretti contro peptidi cross-reagiscono con polisaccaridi

Cosa implica la cross-reattività?

- Errori nelle tecniche analitiche immunologiche.
- Potenziale utilizzazione della sierodiagnosi, ad esempio per la diagnosi della mononucleosi.

- Innesco di patologie autoimmuni, come la febbre reumatica, dovuta a cross-attività con antigeni batterici, con l'antigene M degli streptococchi α -emolitici.

Le forze che fanno legare l'anticorpo all'antigene, sono interazioni deboli come le interazioni a idrogeno, le interazioni idrofobiche, le forze elettrostatiche e le forze di Van der Waals (dimezzando la distanza tra le superfici, la forza aumenta alla settima potenza: microscopiche variazioni di distanza tra i residui ammonioacidici di antigene ed anticorpo causano enormi differenze di forza di legame).

Per vedere il legame tra antigene ed anticorpo. si usa una membrana da dialisi, si mette dentro un anticorpo e il tutto in un sacchetto da dialisi con dentro la soluzione di antigene: l'antigene passa la membrana. All'esterno del sacchetto abbiamo solo antigene libero, all'interno antigene libero e antigene legato ad anticorpo; più il legame è efficace (non è covalente, ma per la maggior parte del tempo l'antigene sta legato all'anticorpo), più la differenza di concentrazione tra antigene libero dentro e fuori è alta. L'anticorpo quindi può estrarre antigeni dalla soluzione : come fare a vederlo?

Si usano metodi molto sensibili:

- Ring test: si vede un anello di precipitazione il cui diametro dipende dalla quantità di antigene/anticorpo. Sensibilità = 20-200 $\mu g/ml$ di antigene
- Immunodiffusione singola o di Mancini. Sensibilità = 10-50 $\mu g/ml$ di antigene
- Immunodiffusione doppia o di Outcherlony. Sensibilità = 20-200 $\mu g/ml$ di antigene
- Immunolettroforesi. Sensibilità = 20-200 $\mu g/ml$ di antigene
- Agglutinazione diretta. Sensibilità = 0.3 $\mu g/ml$ di antigene
- Agglutinazione passiva. Sensibilità = 0.5-5 ng/ml
- ELISA. Sensibilità = 0.5 ng/ml
- RIA. Sensibilità = 0.5 ng/ml

8.2 Le reazioni antigene-anticorpo

Si usavano metodi di precipitazione: in eccesso di anticorpo o antigene si formano complessi solubili, ma nella *zona di equivalenza* si forma un composto insolubile → la soluzione diventa torbida e si osserva precipitazione (quando ad una soluzione di anticorpo si aggiunge l'antigene).

1. **Immunoprecipitazione in fase fluida** → si prende una soluzione di antigene in una provetta e sopra si stratifica l'anticorpo: i due diffondono uno dentro l'altro in un punto dell'interfaccia si trova la zona di equivalenza, e lì precipita → si vede un anello torbido. Questa tecnica funziona bene, ma è poco sensibile.
2. **Metodo di mancini** : trasferiamo la stessa cosa in mezzo semisolido. Si prende Agar e si fa fondere: una volta liquido vi si introduce anticorpo, poi si lascia solidificare su un vetrino. Sul vetrino faccio un buco, un pozzetto → nel pozzetto metto una piccola quantità di antigene e vedo cosa succede. L'anticorpo ha concentrazione costante nell'agarosio e l'antigene avrà max concentrazione nel pozzetto, quindi inizia a diffondere : dopo un certo tempo però che la concentrazione nell'agarosio dell'antigene aumenta e sarà maggiore vicino al pozzetto e minore più lontano → vedrò un *anello di precipitazione*, un alone bianco che mi esprime sia la presenza dell'antigene sia la sua quantità. Se faccio due pozzetti e ci metto due volumi uguali di antigene, ma a diverse concentrazioni, l'alone sarà diverso. Il diametro dell'alone è in funzione della concentrazione di antigene.
3. **Test di Outcherlony** : uso un tampone e faccio il gel di agarosio vuoto, poi metto anticorpo ed antigene in due pozzetti diversi → entrambe diffondono verso l'agarosio ed avrò anche qui un gradiente di concentrazione. Ad un certo punto si formerà una banda di precipitazione nel punto di equivalenza. Tecnica solo quantitativa, non qualitativa. Mi consente però di identificare gli antigeni: faccio 3 pozzetti, in uno l'antisiero diretto contro l'antigene che cerco, in uno il campione ignoto e nell'altro l'antigene vero: se quello che reagisce nel pozzetto ignoto è lo stesso dell'altro pozzetto, si forma un'unica linea di precipitazione; se quello che reagisce è diverso da quello vero che ho messo nel pozzetto, si formano due linee diverse.

8.3 Il Dot Blot ed il Western Blot

Queste tecniche si basano sulla proprietà di alcuni materiali di legare le proteine. Si usa la nitrocellulosa, che lega tutte le proteine in modo aspecifico.

Se mettiamo una goccia del campione sulla nitrocellulosa, tutte le proteine si legano, anche gli anticorpi! Se voglio riconoscere la proteina non va bene.

Si utilizza quindi un substrato che lega le proteine, si mette il campione con l'antigene e poi si immerge la membrana in una soluzione di latte scremato in polvere. Tutti i siti di legame vengono occupati, e se mettiamo gli anticorpi, questi non possono più legarsi alla nitrocellulosa se non dove c'è l'antigene specifico. Non c'è però precipitazione da vedere : come vediamo se è avvenuto il legame antigene-anticorpo?

Se l'antigene che cerchiamo è normale, da diagnostica, compriamo l'anticorpo da produttori che lo vendono già legato ad un enzima: immergendo la nitrocellulosa in una soluzione che contiene il substrato per l'enzima, vediamo una reazione colorimetrica (da qui il nome di Dot Blot, perchè si vede un punto colorato).

Se invece l'antigene non è da diagnostica, compriamo un anticorpo secondario coniugato con un enzima, che sia specifico per le Ig legate alla proteina (anticorpo primario). Si usa una perossidasi o una fosfatasi: usiamo un substrato che deve essere solubile, ma il precipitato deve essere insolubile affinché non diffonda! Se il substrato precipita, significa che copre l'enzima → la reazione perde sensibilità, perchè impedisce l'ulteriore reazione.

Attenzione: *col Dot blot non possiamo sapere se si è legato il nostro antigene o se un cross-reattivo in grande quantità.*

Il **Western Blot** ha lo stesso principio, ma la proteina non è deposta subito sulla nitrocellulosa: prima si fa una SDS-poliacrilammide (elettroforesi), poi si appoggia il gel sulla nitrocellulosa, poi trasferiamo in un campo elettrico le proteine sulla nitrocellulosa → la corsia di separazione sarà stampata sulla nitrocellulosa (se mettiamo anche uno standard, vediamo se abbiamo trovato la proteina giusta). Ci sarà una banda grossa (la proteina) e altre bande piccole (cross-reattività).

Nel Western blot vediamo quindi un campione denaturato, e la visibilità per l'anticorpo non sarà la stessa del Dot blot. Es. se l'anticorpo è monoclonale e vede un epitopo conformazionale, nel Western Blot non si distingue.

Al posto della nitrocellulosa si può usare una membrana PVDF, che è più resistente, ma non si decolora se usiamo il colorante Ponceau.

8.4 ELISA

Quando dobbiamo fare un alto numero di discriminazioni, non si usano queste tecniche, ma si usa la tecnica ELISA: si usa polistirene per colture cellulare.

Il polistirene lega le proteine: viene sottoposto a Flash Charge, ovvero viene caricato elettrostaticamente → le proteine lì si legano.

La tecnica ELISA corrisponde al Dot Blot: prendiamo il campione e lo mettiamo nei pozzetti (96), e se l'antigene è una proteina si lega sul fondo, dove c'è il polistirene; sciacquare e mettere un detergente → il polistirene è inerte e legato a proteine; mettiamo l'anticorpo (o coniugato con l'enzima o dopo un secondario) e poi il Dot Blot. Il substrato è sempre per la fosfatasi, ma il prodotto che si genera è *solubile*: non si ha quindi inibizione dell'enzima. Vigge anche la legge di Lambert e Beer, che invece non vigge nel Dot Blot → tecnica quantitativa (W-B e D-B sono solo qualitative). Ci sono comunque i problemi di specificità: quello che abbiamo trovato potrebbe essere una cross-reattività, non l'antigene.

Il limite è il fatto che l'antigene nella soluzione ignota deve competere con tutte le altre proteine per legarsi sul fondo della piastra al polistirene: ELISA è sensibile, ma non così tanto. Per rendere queste tecniche più sensibile, basta mettere nella piastra una soluzione di anticorpo contro l'antigene che cerchiamo → vista l'elevata affinità, l'anticorpo estrae l'antigene dalla soluzione, e tutte le molecole sul fondo saranno legate all'antigene (tecniche Capture o sandwich). Queste tecniche Capture sono quantitative, ma non tantissimo: si prestano bene per gli anticorpi monoclonali.

Il problema della specificità può essere risolto anche in questo modo: ho il campione ignoto, voglio sapere se c'è la tireoglobulina → prendo una piastra con l'anticorpo e mi procuro tireoglobulina radioattiva, ce la metto e questa si lega. Se mischio la tireoglobulina calda e la aggiungo in un campione di plasma, se c'è n'è già (fredda) ce ne sarà metà calda e metà fredda, altrimenti se non c'è è tutta calda. Si ha competizione tra la calda e la fredda.

9 Gruppi Sanguigni

Il sistema degli antigeni dei gruppi ematici è stato scoperto da Carl Landsteiner agli inizi del 1900. *Carboidrati* caratterizzanti i gruppi sanguigni:

- ABO
- Lewis
- P

Proteine caratterizzanti i gruppi sanguigni:

- MNSs

- Rh

I geni dei gruppi ematici ABO, glicosiltransferasi, hanno ereditarietà autosomica dominante. Gli antigeni ABO sono formati da *Fucosio*⁷, *N-acetil-galattosamina*⁸ e *galattosio*⁹.

Gli antigeni A, B ed H sono scarsamente espressi alla nascita e raggiungono la massima espressione verso i 2-4 anni di età.

9.1 Agglutinazione

Separando plasma e siero dal sangue di individui diversi, in alcuni casi mettendo insieme globuli rossi di un individuo e plasma di un altro, non succedeva nulla; in altri casi si aveva precipitazione. Questa era però una cosa sistematica, non casuale: alcuni individui non agglutinavano mai ed altri solo in presenza di uno in particolare. I composti che stanno sui globuli rossi sono gli *agglutinogeni* (antigeni) e le proteine del plasma *agglutinine* (anticorpi). Furono distinte tre classi: A, O (non zero, ma o), B (gruppi sanguigni).

Si riuscì a fare trasfusioni compatibili con il paziente. Succedeva però che individui O con trasfusioni di sangue O, sviluppavano una reazione trasfusionale → scoperta dell'Rh.

I gruppi ematici non vengono ereditati: si eredita però il gene implicato nella glicosilazione (glicosiltransferasi) delle proteine. È un'eredità autosomica dominante.

9.1.1 Antigeni ABO

Uno trasferisce il galattosio (B) e uno l'N-acetil-galattosamina (A) sul fucosio (antigene H, quello che hanno gli individui di gruppo O). Un solo zucchero di differenza fa un antigene diverso. (gli anticorpi per gli oligosaccaridi sono timo-indipendenti, quindi IgM). Anche i batteri fanno questi oligosaccaridi, quindi fanno risposta immunitaria. Se sono A quindi l'anticorpo per A è morto, perchè self.

Anche la sostanza H è un antigene: un soggetto di gruppo A quindi può avere anticorpi contro H, e quindi non è vero il fatto che il gruppo O è donatore universale! Dipende da quanto è efficace l'enzima per produrre l'antigene A (quindi da quanta sostanza H libera c'è nel corpo: se ce n'è tanta, gli anticorpi anti H muoiono perchè viene riconosciuto come self).

⁷sostanza fondamentale

⁸gruppo A

⁹gruppo B

Gli antigeni A e B possono far sviluppare anticorpi IgG invece che IgM: qual è il problema? Le IgM attivano il complemento e determinano lisi cellulare, ma non passano la placenta: una donna infatti porta a termine una gravidanza con il figlio di un altro gruppo. Le IgG invece possono esistere nel plasma della madre e questi passano la placenta: se il feto non ha antigeni, la quantità di emolisi è comunque limitata.

Per vedere la compatibilità fra due individui, si separano plasma e globuli rossi di entrambe e si fa la **prova crociata**: si usano rossi del donatore e plasma del ricevente (prova crociata maggiore) o rossi del ricevente e plasma del donatore (prova crociata minore). Se gli anticorpi sono IgM e la trasfusione è incompatibile si ha emolisi: è quindi importante che i globuli rossi del donatore siano compatibili. Il contrario è meno importante perchè gli anticorpi contenuti nel plasma del donatore non si legano ai globuli rossi del ricevente, perchè gli antigeni ABO si trovano non solo sui globuli, ma anche su glicoproteine, che sequestrano gli anticorpi.

9.1.2 Antigene Rh

Gli anticorpi che lo riconoscono sono le IgG. È un sistema complesso fatto da diversi antigeni, circa 50, che si comportano come alleli. Antigene C, D ed E (3 coppie alleliche): si pensava che fossero fatte da un allele C ed uno c, quindi Cc, Dd ed Ee. Ognuno di noi può essere C o c, D o d, E o e: quello che corrisponde all'Rh è D: CDE è la tripletta di antigeni del sistema Rh.

In realtà sono dei *polimorfismi* dello stesso allele. Non sono tutti ugualmente immunogeni: una persona sottoposta a trasfusione incompatibile di Rh, sviluppa gli anticorpi dopo varie trasfusioni o dopo eventi equivalenti alla trasfusione, come la gravidanza: non c'è mai commistione di sangue tra madre e feto, anche se la distanza è molto ridotta. Nelle ultime fasi della gravidanza, la placenta inizia a degenerare per cui in certe zone c'è necrosi e commistione fisica tra sangue materno e sangue fetale → le madri sono chimere: mantengono nella circolazione cellule del feto per tutta la loro vita. Anche i globuli rossi passano: è una trasfusione dal figlio alla madre, che innesca una risposta primaria, fa IgM e ciò non è un problema se avviene appena prima del parto perchè la risposta si scatena dopo una settimana. Il problema nasce alla gravidanza successiva: la risposta secondaria è intensa, produce IgG ad alto titolo ed è più precoce della primaria: le IgG entrano nella circolazione fetale e fanno emolisi (non quanto le IgM, che attivano il complemento).

9.2 Test di Coombs

Utilizzato per rilevare la presenza di anticorpi fissati alla superficie dei globuli rossi (*test di coombs diretto*) oppure di anticorpi liberi nel siero (*test di coombs indiretto*). Il test di coombs indiretto viene eseguito prima di una procedura medica che prevede un eventuale scambio di sangue tra due pazienti (quale una trasfusione o la gravidanza). Quello diretto invece viene eseguito a seguito della stessa qualora si sospetti che gli anticorpi del donatore (o della madre) siano venuti a contatto con gli eritrociti danneggiandoli.

Si cercano gli anticorpi IgG (anti Rh) nel sangue della madre. Se prendo il siero della madre (contenente probabilmente anticorpi anti-D) e metto gli IgG in presenza di globuli rossi che so che hanno l'antigene D → non succede nulla perchè le IgG sono talmente piccole da non permettere l'agglutinazione. Se lavo bene, in modo da lasciare le IgG attaccate, e aggiungo un'altra IgG che riconosce le due IgG precedentemente legate ai due globuli rossi → vedo agglutinazione (ovviamente se le IgG anti-D c'erano).

Ha a che fare con la capacità di globuli rossi di avvicinarsi, ma di non toccarsi: questo perchè le glicoproteine delle quali parlavamo fanno sì che i globuli rossi si respingano perchè sono cariche negativamente. Le IgG sono talmente piccole che non riescono a legarsi contemporaneamente a due globuli rossi. Possono al massimo legarsi a due antigeni Rh.

Se mettiamo un anticorpo in grado di legarsi contemporaneamente a due IgG, otteniamo l'agglutinazione → le IgM (anticorpi generici) ci riescono perchè sono abbastanza grandi da avvicinarsi a due globuli rossi prima che essi si respingano per le cariche.

9.2.1 Test di Coombs diretto

Si fa nel feto, si prende il sangue del feto/neonato, centrifugare i globuli rossi e risospendere in fisiologica, mettere l'anticorpo anti Ig umane (*siero di Coombs*)e, se ci sono anticorpi anti-Rh, vediamo agglutinazione.

Il test di Coombs si può fare anche su componenti del complemento: sono sieri polispecifici.

La capacità degli anticorpi di legarsi con gli antigeni eritrocitari dipende anche da dove stanno sul globulo rosso. Un test di Coombs risultato negativo può essere ripetuto trattando gli eritrociti con enzimi proteolitici come la tripsina, poi si lava e si ripete il test. Ciò permette di:

- far emergere antigeni che di solito sono coperti dalle proteine di membrana

- è una tecnica di sensibilizzazione: tagliando le proteine di superficie, diminuisce la carica negativa e viene favorito l'avvicinamento tra i globuli rossi.

9.2.2 Test di Coombs indiretto

Al siero della madre (con eventuali anticorpi anti-D) si aggiunge il sangue del feto e quindi il siero di coombs. La positività del test significa quindi che gli anticorpi anti-D sono presenti ed è evidente grazie all'emoagglutinazione che si viene a formare.

10 Produzione di anticorpi

Bisogna ottenere l'antigene: non è semplice e si può fare in vari modi:

1. Purificato
2. Sintetizzato
3. Ricombinante

Antigene purificato è molto difficile da ottenere e i processi di purificazione sono complessi e lunghi; c'è un rischio di denaturazione della proteina e della presenza di cross-reattività.

Antigene sintetizzato è necessario legarlo ad un carrier per aumentarne la specificità; dà un tipo di risposta *selettiva*; basso costo e disponibilità illimitata, ma incertezza sul risultato: non sempre si ottengono anticorpi!

Antigene ricombinante è un casino, perchè la proteina va tirata fuori dai batteri e non sarà glicosilata come lo sarebbe nelle cellule di mammifero.

Si può fare un anticorpo utilizzando un animale: per scegliere la specie, bisogna considerare che la quantità che ci serve è piccola. Si utilizza un coniglio o un topo, animali piccoli e maneggevoli, per anticorpi primari monoclonali, mentre per anticorpi secondari utilizziamo la capra.

N.B. l'anticorpo primario, nel western Blot, non va buttato ma riusato, perchè ogni volta funziona meglio, spariscono le bande di cross-reattività.

Bisogna anche preparare l'antigene in una soluzione adiuvante: si usa una soluzione adiuvante di Freund, con batteri tuberculanti che fanno esprimere costimolatore alle cellule dendritiche. È un olio che viene emulsionato

con l'antigene, fino ad ottenere una specie di crema. Viene iniettata per via intradermica nell'animale facendo tante piccole iniezioni nello spessore dell'epidermide → si induce una reazione infiammatoria, che comporta la maturazione delle cellule dendritiche.

Periodicamente si ripete l'iniezione e si verifica il titolo anticorpale → man a mano che si effettuano i richiami, se facciamo un ELISA, vediamo l'aumento di anticorpi negli animali (con diluizioni sempre maggiori dell'antisiero). Se facciamo un western blot, alle prime immunizzazioni vediamo la banda dell'antigene e quelle delle cross-reattività. man a mano che si fanno i richiami, non solo aumenta il titolo, ma diminuiscono le bande della cross-reattività → è la maturazione dell'antigene.

Per gli anticorpi secondari si usano la capra, la pecora o il cavallo. Questi animali, dopo diversi anni di produzione degli anticorpi, sviluppano una malattia legata alla deposizione nei tessuti di frammenti di Ig.

10.1 Purificazione per affinità

(vedi libro) Si mette tutto nella colonnina e si fa l'eluizione acida su bicarbonato, poi si passa sulla colonna tampone glicina pH 2.5 → la regione variabile delle Ig non è più capace di stare legato all'antigene e viene eluito nel bicarbonato. Quello è l'anticorpo purificato per affinità. È necessario stabilizzare l'anticorpo rimettendoci una gran quantità di proteine non anticorpali, sennò la proteina da sola viene rapidamente destabilizzata.

10.2 Anticorpi monoclonali

Anticorpi tutti identici fra loro perchè prodotti dallo stesso clone linfocitario. È una risposta o tutto o nulla: se nelle condizioni in cui siamo l'epitopo non si vede, non abbiamo reazione di alcun tipo. Modulabile. Vantaggio: molto potenti. Svantaggio: vedono molti epitopi e da una serie di Ig diverse. Elevata possibilità di cross-reattività verso l'anticorpo che utilizziamo. Come si fa? Si prende un topo, si immunizza. Dopo un po' nella sua linfa sarà aumentato i linfociti verso il nostro antigene, perchè con le due risposte abbiamo indotto la produzione di linfociti B secernenti Ig verso l'antigene che abbiamo inoculato. Avremo quindi anche linfociti che non c'entrano nulla, perchè ogni clone risponde o con l'antigene o con altre cose presenti nella milza.

La strategia è di fondere i linfociti specifici per l'antigene con cellule di mieloma, con linfociti B neoplastici che sono cellule immortali, perchè continuano a proliferare indefinitamente. Si verificano varie possibilità:

- fondere un linfocito splenico di topo con un altro → muore
- fondere due cellule di mieloma → muore
- fondere la cellula di mieloma con linfocito → cellula che ha acquisito dal mieloma l'*immortalità* e dal linfocito la *capacità di secernere Ig*

Le cellule di mieloma utilizzate non crescono in presenza di aminopterina, si utilizzano terreni selettivi HAT che la contengono ed inibiscono la crescita di mieloma: solo le cellule di mieloma che si sono fuse con linfociti e che hanno portato i geni del linfocito crescono! In questo terreno crescono solo *ibridomi*, ovvero le cellule buone.

Nella coltura però c'è di tutto: diluiamo queste cellule di ibridomi, 1 cellula in 300 μL e otteniamo colture che derivano da un solo linfocito fuso con una cellula di mieloma. Peschiamo il soprannatante e facciamo ELISA per vedere se le Ig contenute nel terreno sono quelle contro il nostro antigene. Alla fine abbiamo tanti cloni che fanno Ig dirette contro l'antigene: nelle fasi iniziali sono *instabili!!!* Una parte di essi sopravvive e rilascerà sempre Ig nel terreno in cui vive.

Per mantenere in vita gli ibridomi, vanno iniettati nella cavità addominale di un topo → si forma essudato, laddove si gonfia → su punge il topo, si prende il liquido, si centrifuga, il supernatante contiene le Ig → si reiniettano e si aspetta che si produca di nuovo essudato ecc. Per motivi etici si accettano ibridomi coltivati in vitro.

Gli anticorpi monoclonali, riconoscendo un solo epitopo, hanno un'alta capacità di discriminare l'antigene. Riconoscono anche una forma fosforilata o defosforilata di una proteina, cosa che il policlonale non fa. Sono però molto soggetti alle interferenze, ad esempio la denaturazione.

11 Le citochine

Dette anche linfocine, monocine o interleuchine.

Sono messaggeri intercellulari che controllano varie attività all'interno dei tessuti. Quelle dell'immunità innata sono diverse da quelle della specifica. Alcune controllano l'*emopoiesi*.

Le citochine dell'immunità innata servono non solo a stimolare i macrofagi, ma anche per indurre le risposte tissutali conseguenti all'immunità innata. Va anche a modificare l'endotelio, consentendo la fuoriuscita delle cellule. Mediano la risposta infiammatoria e l'attivazione dell'immunità specifica dopo lo stimolo infiammatorio.

Sia azione locale che sistemica, prodotte in quantità così elevata da influenzare anche i tessuti molto distanti dall'area infiammatoria. Esempi di citochine dell'immunità innata sono l'IL-12, il TNF e l'INF- γ .

Le citochine dell'immunità specifica Controllano la proliferazione dei linfociti vergini quando attivati, la modulazione dei CD4 e CD8, la produzione di shift isotipico; INF- γ coopera col C40L ad attivare il macrofago. Regolano anche l'attivazione delle cellule effettrici CTL.

La quantità prodotta è molto bassa.

Le citochine hanno azione sia *locale* che *sistemica*: l'attivazione della risposta ai patogeni, soprattutto quella innata, ha pesanti ripercussioni sistemiche perchè le citochine diffondono nei vasi e vengono drenate nella linfa. Causano la febbre, il malessere, la perdita di appetito. La loro produzione induce la produzione di altre citochine a valle.

Hanno un'azione *pleiotropica e ridondante*: ogni citochina ha tante azioni, ma ogni azione è influenzata da tante citochine contemporaneamente. Il linfocita T helper attivato produce interleuchina 4 \rightarrow produzione di IgE e shift isotipico nel follicolo + differenziamento dei CD4+ in Th2 + inibizione della funzione dei macrofagi. Un unico segnale quindi scatena azioni sconnesse, ma che condividono il significato funzionale: si potenzia la fare riparativa dell'infezione (produzione della cicatrice).

La produzione di interferone γ farebbe accadere il contrario: si parla di *antagonismo*.

Abbiamo anche la *sinergia*: diversi canali di attivazione si attivano e l'effetto finale si somma.

La loro azione è mediata da recettori specifici: ci sono recettori per la stessa citochina che hanno azioni opposte! La risposta della cellula verso la citochina dipende quindi dalla concentrazione del recettore.

Il recettore dell'interleuchina 2 esiste in diversi assemblaggi di proteine per cui passa da ordini di affinità per il ligando molto diversi.

I recettori sono una o due proteine transmembrana associate in modo non covalente con subunità di trasduzione del segnale condivise tra più recettori., che fanno partire la stessa via di segnalazione (spesso). La maggior parte presenta più catene indotte ad aggregarsi dal ligando, che di solito è un trimero: i recettori vengono forzati a trimerizzare, si fosforilano.

1. Fattore di necrosi tumorale (TNF α): sono le citochine primarie, innescano la risposta infiammatoria. Proteina non grande, attiva i neutrofilo, le cellule endoteliali, determina la febbre (ipotalamo). Provoca

il catabolismo del muscolo (perdita di peso) e apoptosi su alcuni tipi cellulari

2. Interleuchina 1: prodotto da macrofagi e cellule epiteliali, le attiva, provoca febbre. Ha azione pro-infiammatoria locale e generale
3. Chemochina : prodotte da macrofagi, linfociti T, fibroblasti, cellule endoteliali. Agiscono sui leucociti e inducono *chemiotassi*: servono per localizzare gli effettori nella sede della risposta e per spostare le cellule nei vari siti (es i linfociti nei linfonodi). Molecole piccole, diffondono facilmente. Adesive alla superficie endoteliale
4. Interleuchina 12: induce la sintesi di interferone γ e potenzia l'attività citotossica

11.1 Azioni biologiche del TNF

(vedi slides)

Le citochine, oltre ad essere un complesso sistema di regolazione tutte insieme, lo sono una per una: il TNF è formato da 2 agonisti, $\text{TNF}\alpha$ e $\text{TNF}\beta$, un enzima che lo rende solubile (TACE), due recettori (resi solubili da TACE).

È un omotrimerico, induce la risposta attraverso la trimerizzazione delle catene dei recettori. Gli effetti dipendono da quale recettore è stimolato: se RI morte cellulare, se RII inibizione dell'apoptosi e produzione di shock proteins. Sia i TNF che i loro recettori sono proteine di membrana che vengono rese solubili da proteasi.

Inibisce la proliferazione midollare (al contrario di IL-1).

11.2 Chemochine

Piccole, azione chemotattica. Motivi strutturali comuni fra loro, in particolare un *nodo di cisteine*: sono 4, la prima fa un ponte disolfuro con la terza, la seconda con la quarta. A seconda del numero di aa interposti fra le Cys si chiamano C, CC, CXC, CX3C.

Funzioni:

- Regolazione del traffico di leucociti e loro reclutamento nei siti di infezione/risposta attraverso modulazione delle funzioni contrattili delle strutture intracellulari e modulazione della affinità delle integrine
- Regolazione del traffico di leucociti nei tessuti linfoidei

- Sviluppo embrionale

Ci sono molte chemochine e molti recettori. Un recettore lega diverse chemochine anche contemporaneamente. Ogni cellula, scegliendo il recettore, può scegliere a quali chemochine rispondere.

Alcuni recettori invece sono specifici per una chemochina sola.

11.3 Interleuchina 12

Sta in mezzo tra immunità specifica e naturale. Agisce sul linfocito vergine, sulle cellule NK, sui linfociti CD8. A tutti permette di produrre maggiori quantità di INF- γ .

Tutti attivano quindi i macrofagi e potenziano le funzioni effettrici; ma anche l'attività citolitica dei CD8 e delle cellule NK.

11.4 Interferoni di tipo I

20 INF- α e 1 INF- β , si legano tutti allo stesso recettore. Questi interferoni inducono lo stato antivirale inducendo enzimi che bloccano la replicazione virale, e l'aumento delle molecole di MHC di classe I.

11.5 IL-2

Induce la proliferazione dei linfociti T e l'aumento della sintesi di citochine IL-4 ed INF- γ , la proliferazione di linfociti B (con produzione di anticorpi) e di cellule NK, con conseguente aumento della loro attività citolitica.

11.6 INF- γ

Funzioni:

- Attivazione dei macrofagi ed aumento dell'attività microbica
- Scambio di classe verso isotipi in grado di mediare l'opsonizzazione
- Sviluppo di cellule effettrici T_H1
- Aumento dell'espressione di MHC e della capacità di presentare l'antigene nelle cellule APC