

42. Appendice 1: immunologia in laboratorio

I edizione



(vale per tutto il capitolo)

42. Appendice 1: immunologia in laboratorio.....	1	42.3.1. La citometria a flusso.....	11
42.1. IMPIEGO DEGLI ANTICORPI IN LABORATORIO.....	3	42.3.2. Localizzazione dell'antigene nei tessuti e nelle cellule	13
42.1.1. Tecniche di precipitazione.....	3	42.4. IBRIDOMI ED ANTICORPI MONOCLONALI.....	14
42.1.2. Immuno-elettroforesi.....	5	42.4.1. Anticorpi policlonali versus monoclonali.....	14
42.1.3. Emoagglutinazione.....	6	42.4.2. Produzione di anticorpi omogenei a specificità nota: anticorpi monoclonali	14
42.1.4. Quantificazione degli antigeni.....	8	42.4.3. Metodo classico attraverso la produzione di ibridomi.....	15
42.2. BLOTING.....	9	42.4.4. Schema della formazione di un ibridoma.....	16
42.2.1. Western blot-immunoblot.....	9	42.4.5. Anticorpi monoclonali umani ed umanizzati.....	17
42.2.2. Immunoblotting.....	10	42.5. APPLICAZIONI DEGLI ANTICORPI MONOCLONALI.....	18
42.3. MARCATURA DI SUPERFICIE E SEPARAZIONE CELLULARE.....	11		

42.6. PRINCIPALI FONTI UTILIZZATE.....	19
--	----

42.1. Impiego degli anticorpi in laboratorio

- ☞ Gli anticorpi costituiscono un formidabile strumento per la valutazione su base strutturale
- La loro capacità di discriminare tra strutture molto simili ne fa un insostituibile *tool* diagnostico
- Possono essere usati per valutare strutture in soluzione/sospensione o in preparati solidi (istologici)
- Possono dar luogo a misurazioni quantitative, semi-quantitative o a valutazioni qualitative, dipendentemente dalla metodica utilizzata
- Possono essere usati in procedure diagnostiche *in vitro* o per fini terapeutici anche *in vivo*

42.1.1. TECNICHE DI PRECIPITAZIONE

- ☞ Storicamente, molti degli impieghi degli anticorpi poggiavano sulla capacità degli anticorpi e dei relativi antigeni di formare complessi di grosse dimensioni, che escono di soluzione
- Le metodiche principali che sfruttano questo principio sono:
 - precipitazione dell'immuno-complesso da una soluzione
 - precipitazione in agar per diffusione semplice secondo Outcherlony
 - immuno-elettroforesi

Precipitazione da una soluzione

- ☞ Gli studiosi di immuno-chimica hanno potuto identificare l'antigene osservando la formazione di questi complessi in soluzione mediante diffrazione della luce
- ☞ È stato possibile purificare l'antigene da soluzioni contenenti miscele di molecole raccogliendo i complessi immuni specifici per centrifugazione o per precipitazione dell'anticorpo con agenti chimici

Precipitazione in agar secondo Outcherlony

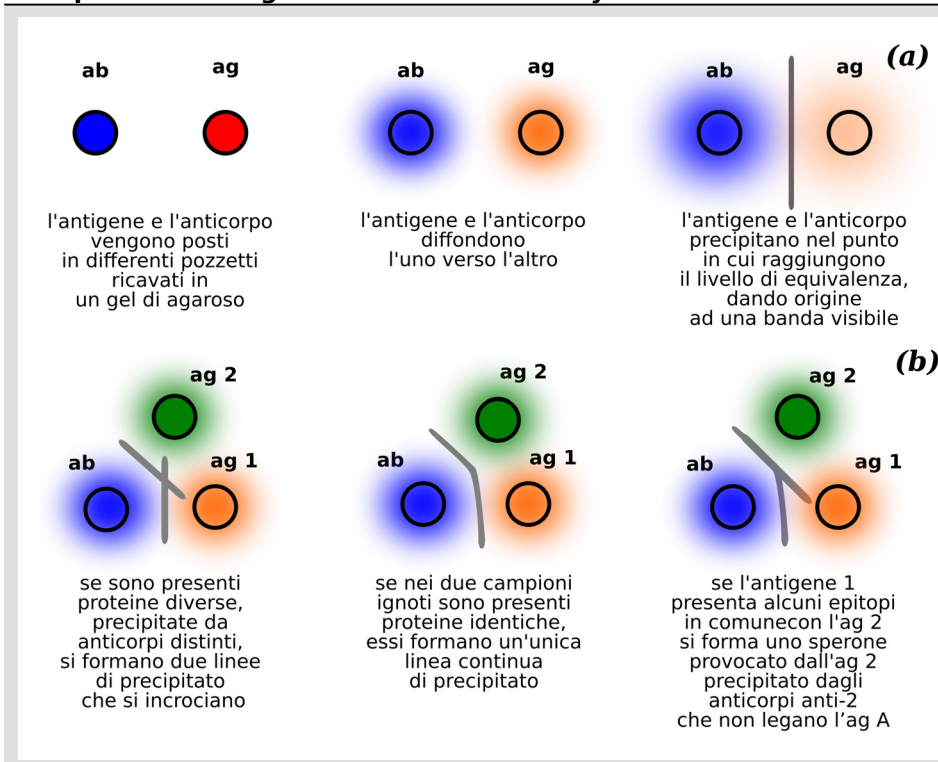


Figura 42.1. Doppia diffusione secondo Outcherlony
 antigene (ag); anticorpo (ab)

Nel metodo classico di "doppia diffusione" secondo Outcherlony, gli antigeni e gli anticorpi sono lasciati diffondere in gel da pozzetti vicini ma separati, in modo da ottenere una "linea di precipitazione" di immuno-complessi insolubili nel punto in cui le concentrazioni dell'antigene e dell'anticorpo raggiungevano l'equivalenza (grandi complessi reticolari)

(a) Utilizzo per verificare la presenza di un anticorpi contro un determinato antigene

(b) Utilizzo per la valutazione del grado di correlazione tra proteine sconosciute

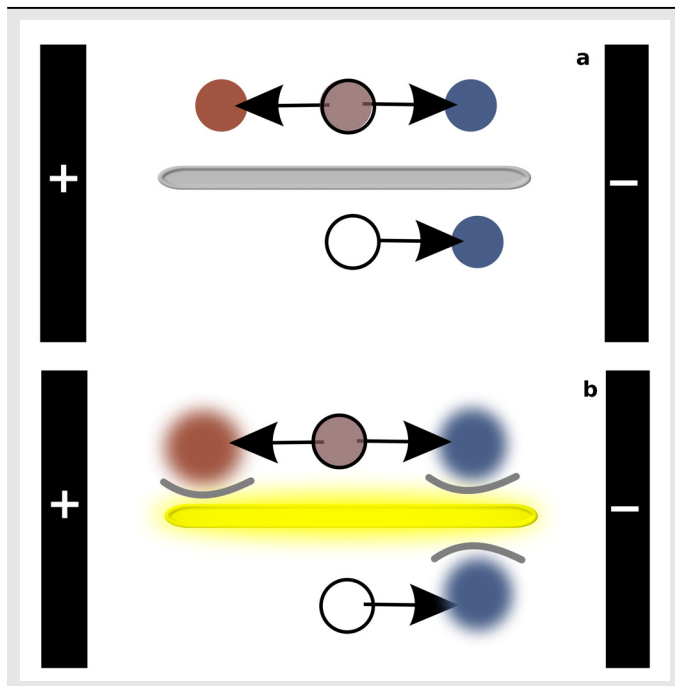
42.1.2. IMMUNO-ELETTROFORESI

Figura 42.2. Immuno-elettroforesi. a) separazione in un gel di agar; b) diffusione degli anticorpi

- Il canale tra i pozzetti viene riempito di anticorpi che diffondono e formano bande di precipitazione in corrispondenza dei rispettivi antigeni diffondenti
- La soluzione di antigene viene prima separata per elettroforesi in un gel di agar in condizioni non denaturanti, e successivamente lasciata diffondere in un gel contenente anticorpi: la distanza della migrazione durante la corsa elettroforetica fornisce ulteriori informazioni sulla struttura dell'antigene

42.1.3. EMOAGGLUTINAZIONE

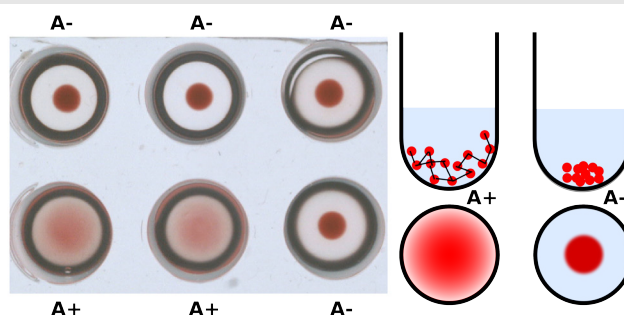
☞ L'emoagglutinazione è utilizzata per tipizzare i gruppi sanguigni e per identificare donatori e riceventi compatibili per le trasfusioni di sangue

- i gruppi antigenici A e B del sangue sono determinati grazie alla capacità degli anticorpi diretti contro di essi di agglutinare gli eritrociti che presentano i rispettivi antigeni
- anticorpi specifici per i gruppi antigenici del sangue si trovano in tutti gli individui che non possiedono un determinato antigene, come mostrato nella colonna di sinistra; perciò gli individui di tipo O, che mancano degli antigeni A e B, hanno anticorpi sia anti-A che anti-B, mentre gli individui AB non ne hanno nessuno. Lo schema di agglutinazione degli eritrociti del donatore e del ricevente con anticorpi anti-A ed anti-B fornisce i gruppi sanguigni ABO individuali
- prima di una trasfusione il siero del ricevente viene saggiato per la presenza di anticorpi che agglutinano gli eritrociti del donatore e viceversa, un procedimento detto esame crociato
- anticorpi presenti nel sangue del donatore che si legano alle cellule del ricevente, o anticorpi del ricevente che si legano alle cellule del donatore, potrebbero danneggiare gli eritrociti nel ricevente e debbono perciò essere evitati

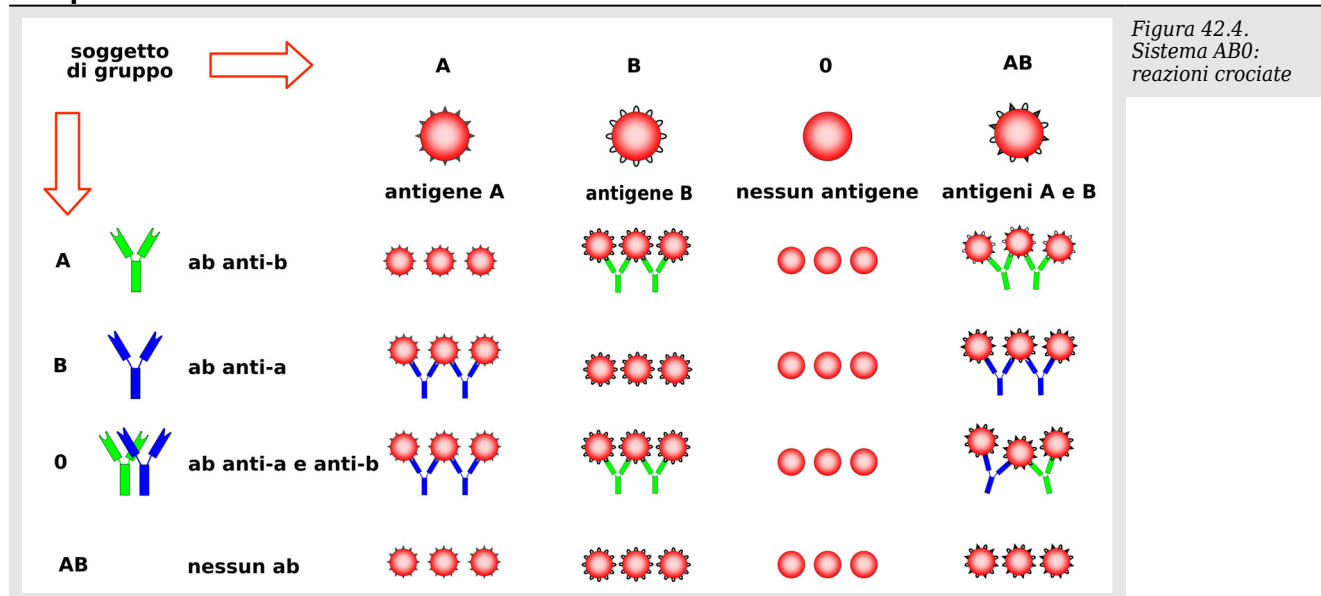
Figura 42.3. Emoagglutinazione

A+: agglutinato (gli anticorpi e gli antigeni polivalenti formano un reticolo che si appoggia sul fondo del pozzetto su una superficie ampia); A-: non agglutinato (gli eritrociti non trattenuti dagli anticorpi si accumulano nella parte più declive del pozzetto ammassati)

Liberamente tratto da: pages.usherbrooke.ca, e path.cam.ac.uk



Compatibilità ABO



42.1.4. QUANTIFICAZIONE DEGLI ANTIGENI

I metodi immunologici per quantificare la concentrazione degli antigeni garantiscono un'eccellente sensibilità e specificità, e sono diventate tecniche standard sia nella ricerca che per l'applicazione clinica

Tutti i moderni metodi immuno-chimici sono basati su un semplice ed accurato metodo per misurare la quantità di molecole indicatrici

- Quando la molecola indicatrice è marcata con un radioisotopo, può essere misurata contando l'emissione radioattiva in un contatore gamma; questo metodo è denominato test radioimmunologico (**radio-immunoassay, RIA**)
- Quando la molecola indicatrice è accoppiata covalentemente con un enzima, può essere quantizzata determinando con uno spettrofotometro il tasso di conversione di un substrato incolore in un prodotto colorato da parte dell'enzima; questo metodo è chiamato test immunoenzimatico (**enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA**)
- quando la molecola indicatrice è accoppiata covalentemente ad un fluorocromo si parla di **immunofluorescenza**

Questi saggi possono essere

- diretti
- indiretti

Nel caso di saggi diretti ad essere marcati sono gli antigeni o gli anticorpi specifici

Nel caso di saggi indiretti ad essere marcati sono anticorpi secondari rivolti contro gli anticorpi utilizzati nella reazione primaria con l'antigene

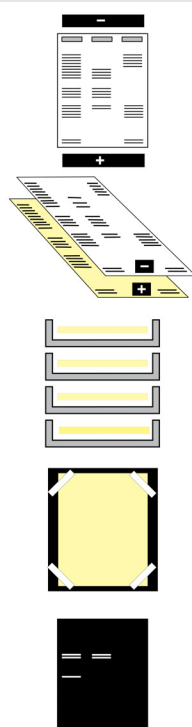
42.2. Blotting

42.2.1. WESTERN BLOT-IMMUNOBLOT

-  Se l'antigene proteico da caratterizzare è miscelato con altri antigeni, può essere per prima cosa sottoposto a separazione analitica, classicamente mediante elettroforesi in gel di acrilamide in presenza di sodio dodecilsolfato (SDS-PAGE, *polyacrylamide gel electrophoresis*), così che la posizione delle diverse proteine nel gel sia funzione delle dimensioni delle molecole
-  Le diverse proteine separate vengono poi trasferite dal gel di separazione su di una membrana di supporto per capillarità (*blotting*, assorbimento) o mediante elettroforesi; sulla membrana è così rappresentata una copia della serie di macromolecole separate nel gel
-  L'SDS viene rimosso dalla proteina durante il processo di trasferimento, e i determinanti antigenici nativi vengono spesso ricostituiti quando la proteina si "rinatura"
-  La posizione dell'antigene sulla membrana può essere infine visualizzata mediante legame di un anticorpo marcato, ottenendo così informazioni sulle dimensioni dell'antigene; sono comunemente usati a questo scopo sia anticorpi legati ad enzimi che radiomarcanti
-  La tecnica di trasferire proteine da un gel ad una membrana è chiamata **Western blot** per un gioco di parole inventato dai biochimici. Southern è infatti il cognome dello scienziato che per primo trasferì l'acido desossiribonucleico (DNA) da un gel di separazione ad una membrana, una tecnica da allora chiamata **Southern blot**. Per analogia il nome **Northern blot** fu dato alla tecnica per trasferire acido ribonucleico (RNA) da un gel ad una membrana, mentre il trasferimento di proteine fu chiamato **Western blot**

42.2.2. IMMUNOBLOTTING

Figura 42.5. Immunoblotting



i campioni con l'antigene vengono separati in un gel analitico, per esempio in un gel di poliacrilamide/sodio dodecil solfato, oppure un gel di focalizzazione isoelettrica

le molecole separate vengono trasferite su una membrana di nitrocellulosa (*blot*) in un contenitore per blotting

il *blot* viene poi sequenzialmente
 1. trattato con l'anticorpo specifico per l'antigene
 2. lavato
 3. trattato con anticorpo radiomarcato anti-anticorpo
 4. lavato

la membrana viene posta in contatto con una pellicola sensibile alle radiazioni in una cassetta

l'autoradiografia viene sviluppata e le bande dell'antigene che si sono legate all'anticorpo specifico sono messe in evidenza

42.3. Marcatura di superficie e separazione cellulare

☞ Gli anticorpi sono comunemente impiegati per caratterizzare, identificare o separare popolazioni cellulari
L'anticorpo può essere

- radiomarcato
- legato ad enzimi
- marcato con sostanze fluorescenti

42.3.1. LA CITOMETRIA A FLUSSO

- ☞ La citometria a flusso consente di contare le cellule e di identificarle mediante i loro antigeni di superficie
- le cellule per essere analizzate in citometria a flusso devono essere marcate con fluorocromi, solitamente coniugati ad anticorpi specifici per antigeni della superficie cellulare
 - le cellule vengono quindi forzate a passare attraverso un capillare, allo scopo di ottenere un flusso di cellule singole che scorre davanti ad un raggio laser
 - tubi fotomoltiplicatori (PMT, *photomultiplier tubes*) rilevano la deviazione della luce, che dipende dalle dimensioni della cellula e dalla sua granulosità e l'emissione di luce fluorescente dai differenti fluorocromi
 - misurando molte cellule si può avere una stima esatta del numero di cellule di una popolazione, con uno specifico quadro di caratteristiche consentendo di valutare su queste cellule il livello di espressione di varie molecole
 - l'uso di un singolo anticorpo può fornire indicazioni sulla percentuale di una popolazione cellulare che presenta l'antigene riconosciuto da quell'anticorpo e la quantità di tale antigene espresso da ogni cellula
 - l'impiego di due anticorpi può definire quattro popolazioni cellulari: quelle che esprimono una sola molecola (verde o rossa), quella che esprime entrambe le molecole e quella che non ne esprime nessuna

Citofluorimetria e fluorescence activated cell sorter, FACS

☞ Nel caso dei traccianti fluorescenti, la quantità di anticorpo legato ad ogni singola cellula di una popolazione può essere misurata facendo passare la sospensione cellulare, una cellula alla volta, attraverso un fluorimetro

☞ Le cellule che fluiscono attraverso il citofluorimetro possono anche essere deviate in maniera differenziale da campi elettromagnetici, la cui forza e direzione varia a seconda dell'intensità del segnale di fluorescenza, permettendo così di separare delle popolazioni di cellule a seconda del legame dell'anticorpo alla superficie cellulare
Lo strumento che compie questa operazione è chiamato separatore cellulare attivato dalla fluorescenza (**fluorescence activated cell sorter, FACS**)

☞ FACS moderni permettono di *routine* la risoluzione simultanea di tre o più segnali fluorescenti diversi, ognuno associato ad un diverso anticorpo, consentendo l'analisi e la separazione di cellule in base a qualsiasi combinazione di fenotipi di superficie diversi

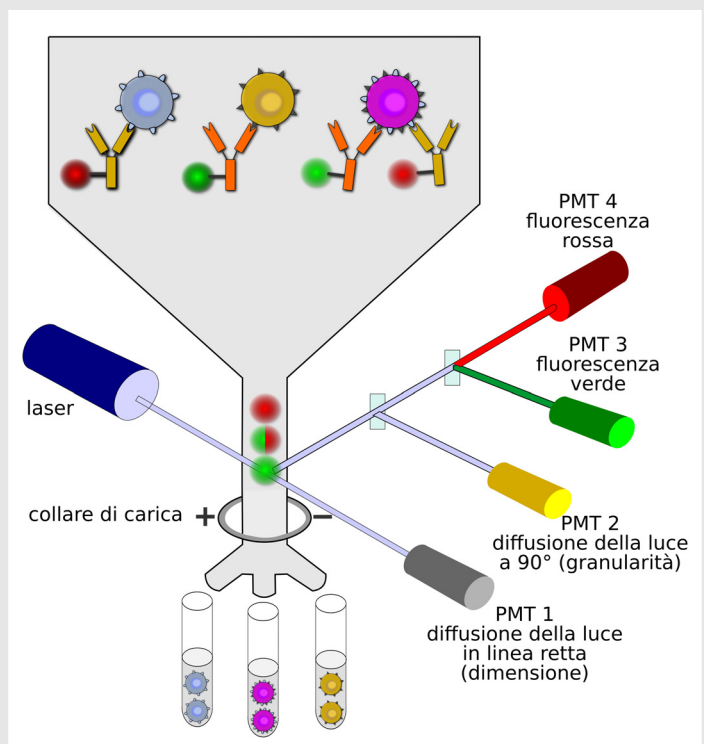


Figura 42.6. Fluorescence activated cell sorter. PMT: photomultiplier tube (tubo fotomoltiplicatore)

42.3.2. LOCALIZZAZIONE DELL'ANTIGENE NEI TESSUTI E NELLE CELLULE

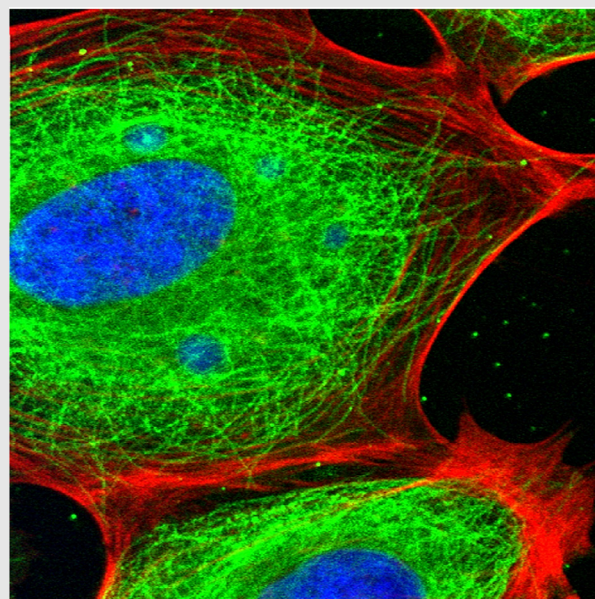
☞ Gli anticorpi possono essere usati per identificare la distribuzione anatomica di un antigene nell'ambito di un tessuto o di un compartimento cellulare

☞ Il principio comune alla base di queste tecniche è che un tracciante venga legato a un anticorpo specifico; la posizione del tracciante nel tessuto o nella cellula, stabilita con un opportuno microscopio, consente di ricavare la posizione dell'antigene

☞ I principali metodi sono:

- immunofluorescenza
- immuno-perossidasi e fosfatasi alcalina

Figura 42.7. Immunoblotting. Da Traffick.dk, modificato.
Immunofluorescenza dei filamenti intracellulari



42.4. Ibridomi ed anticorpi monoclonali

42.4.1. ANTICORPI POLICLONALI VERSUS MONOCLONALI

☞ I normali anticorpi prodotti *in vivo* verso un antigene sono prodotti da numerosi cloni cellulari diversi che sintetizzano molecole con specificità e affinità variabili: si definiscono pertanto policlonali

Gli anticorpi monoclonali provengono invece da un singolo clone e sono quindi il prodotto di un unico gene: si possono ottenere artificialmente. Unica eccezione sono le proteine mielomatose prodotte da tumori clonali di plasmacellule

42.4.2. PRODUZIONE DI ANTICORPI OMOGENEI A SPECIFICITÀ NOTA: ANTICORPI MONOCLONALI

☞ La tecnica di produzione di quantità praticamente illimitate di un singolo anticorpo specifico per un particolare determinante antigenico ha rivoluzionato l'immunologia ed ha avuto un impatto straordinario in diversi campi della ricerca e della pratica clinica

☞ Si possono isolare singoli linfociti B a specificità nota, che però hanno vita breve
Gli sforzi si sono quindi concentrati sulla possibilità di immortalizzare cellule B secernenti uno specifico anticorpo

☞ La tecnica iniziale per raggiungere questo scopo, ora applicata diffusamente, è stata descritta per la prima volta da **Georges Kohler** e **Cesar Milstein** nel 1975

☞ Il metodo comporta:

- la fusione cellulare, o ibridizzazione cellulare somatica, fra un linfocita B normale che secerne anticorpi ed una linea di mieloma: **ibridoma**
- la selezione delle cellule fuse, al fine di isolare linee che producano anticorpi della specificità desiderata, derivata dal linfocita B normale

42.4.3. METODO CLASSICO ATTRAVERSO LA PRODUZIONE DI IBRIDOMI

-  **Reagenti:**
- linfociti sensibilizzati per l'antigene verso cui si vogliono gli anticorpi monoclonali
 - linee di mieloma difettive nell'enzima ipoxantina-guanina fosforibosil-transferasi (HGPRT, *hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase*) la cui assenza impedisce loro di crescere in un terreno selettivo particolare (terreno HAT)
 - terreno selettivo HAT (*hypoxanthine-aminopterin-thymidine*) contenente aminopterina che blocca la produzione endogena dei nucleotidi stessi
-  **Procedura:**
- si espongono topi all'antigene di interesse cercando di ottenere una risposta intensa
 - si isolano i linfociti dalla milza dell'animale
 - i linfociti si fondono con cellule di mieloma HPRGT difettive con l'ausilio del virus di Sendai o di polietilenglicole
 - si coltiva *in vitro* il prodotto della fusione per 10-14 giorni in mezzo HAT
 - le cellule di mieloma non fuse muoiono perché incapaci di sintetizzare nucleotidi e coltivate in un mezzo carente di essi
 - i linfociti non fusi muoiono perché hanno una aspettativa di vita breve se privi di stimoli adeguati
 - le cellule fuse (ibridate) sopravvivono perché possono fabbricare nucleotidi (il gene viene dai linfociti immunizzati) e sono immortali (assetto genetico proveniente dal mieloma)
 - dalla miscela di cellule ibridate vengono selezionate quelle produttrici anticorpi contro l'antigene voluto: attraverso diluizioni al limite si arriva ad avere singoli cloni produttori anticorpi formati da cellule derivate da un unico ibrido: ibridoma
 - L'ibridoma viene amplificato *in vitro* e utilizzato per la produzione di anticorpi monoclonali

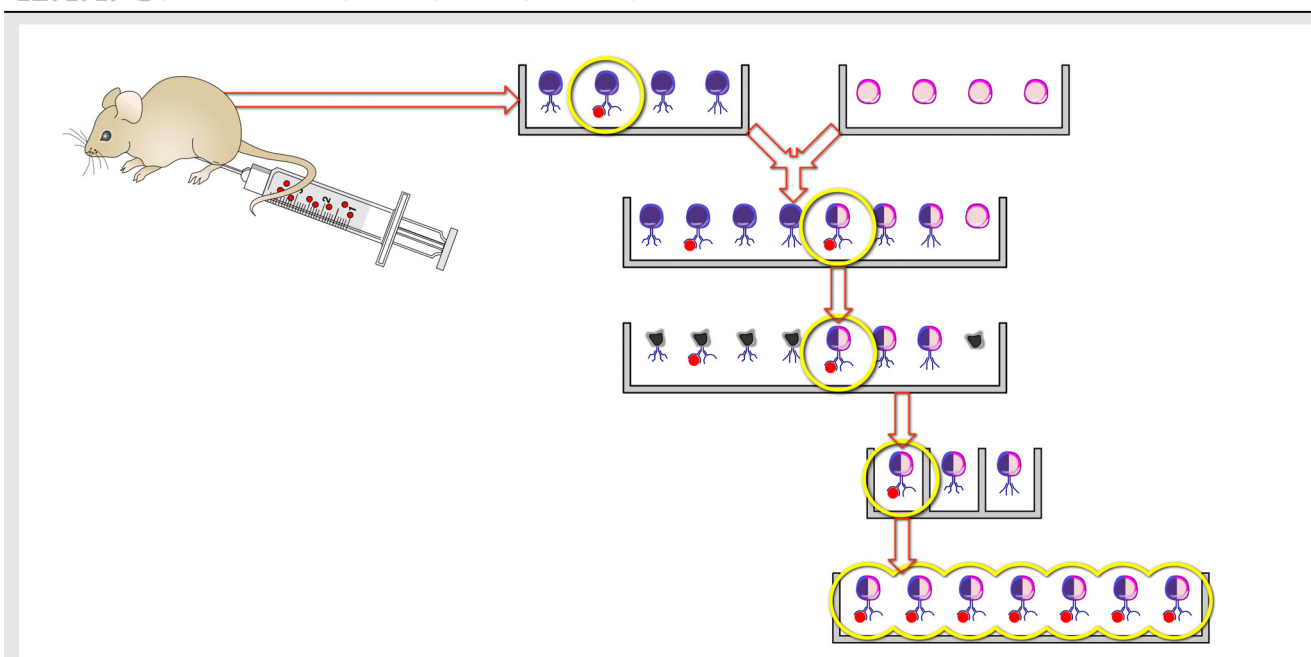
42.4.4. SCHEMA DELLA FORMAZIONE DI UN IBRIDOMA

Figura 42.8. La formazione di un ibridoma secondo il metodo classico. Le linee cellulari derivate da questo processo di fusione sono immortalizzate, e sono chiamate **ibridomi**, e gli anticorpi da queste prodotti **anticorpi monoclonali**

42.4.5. ANTICORPI MONOCLONALI UMANI ED UMANIZZATI

-  Gli ibridomi sono prodotti prevalentemente fondendo mielomi murini HAT-sensibili con cellule B ottenute da topi, ratti o cavie immunizzati
-  Si possono anche generare anticorpi monoclonali umani, soprattutto per la somministrazione *in vivo* a pazienti, sviluppando come *partner* di fusione linee di mielomi umani
-  È regola generale che la stabilità degli ibridi è bassa se vengono fuse cellule distanti fra loro nella scala filogenetica, e questo è verosimilmente il motivo per cui linfociti B umani non generano con buona efficienza ibridomi con linee di mieloma murino
Anche gli ibridomi uomo-uomo sono piuttosto instabili
-  solo una piccola parte della molecola anticorpale è responsabile del legame coll'antigene; il resto della molecola può esser pensata come una sorta di "intelaiatura"
-  L'organizzazione strutturale degli anticorpi permette di "incastonare" i segmenti di DNA che codificano per la regione di legame coll'antigene di un anticorpo monoclonale in un cDNA che codifica per una proteina mielomatosa umana, così da creare un gene ibrido
-  Quando viene espressa, la proteina ibrida che risulta dalla fusione dei due geni, e che mantiene la specificità antigenica, viene definita **anticorpo umanizzato**
-  Gli anticorpi umanizzati costituiscono una strategia alternativa per produrre anticorpi monoclonali che possono essere somministrati senza effetti indesiderati ai pazienti

42.5. Applicazioni degli anticorpi monoclonali

-  Identificazione di marcatori fenotipici specifici per particolari tipi cellulari. Le basi della moderna classificazione dei linfociti e dei fagociti mononucleati poggiano sul legame di anticorpi monoclonali specifici per una determinata popolazione (classificazione CD)
Es.: se vengono generati ibridomi diversi che producono anticorpi diretti verso molecole di superficie di una particolare cellula, ciascun clone di ibridoma secernerà un anticorpo specifico per un solo determinante antigenico di membrana. Questi anticorpi monoclonali possono essere quindi utilizzati per purificare diverse molecole presenti sulla superficie cellulare, alcune delle quali possono essere già conosciute, mentre altre possono non essere ancora state identificate
-  **Immuno-diagnosi.** La diagnosi di numerose infezioni e malattie sistemiche si basa sulla dimostrazione di specifici antigeni e/o anticorpi in circolo o nei tessuti, usando anticorpi monoclonali in test immunologici
-  **Diagnosi e terapia dei tumori.** Anticorpi monoclonali tumore-specifici vengono utilizzati per evidenziare tumori mediante tecniche di *imaging*, e per l'immunoterapia delle neoplasie *in vivo* ed *ex-vivo*
-  **Analisi funzionale** delle molecole cellulari di superficie e di secrezione. Nella ricerca immunologica, gli anticorpi monoclonali che si legano a molecole cellulari di superficie stimolando o inibendo una particolare funzione cellulare costituiscono uno strumento insostituibile per definire le funzioni di tali molecole, compresi i recettori per gli antigeni. Anticorpi che neutralizzano le citochine sono routinariamente usati per evidenziare sia *in vitro* che *in vivo* la presenza ed il ruolo funzionale di questi ormoni proteici

42.6. Principali fonti utilizzate

Janeway, C.A., Travers, O. (1994) *Immunobiology: the immune system in health and disease*. Garland, New York

Köhler, G., Milstein, C. (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *J. Immunol.* 174, 2453-2455

Siti web

pages.usherbrooke.ca

visitato il 05-06-2010

contenuto non più disponibile il 23/06/2011

path.cam.ac.uk

visitato il 05-06-2010

accessibile il 22/06/2011

traffick.dk

visitato il 13/02/2011

contenuto non più disponibile il 22/06/2011

