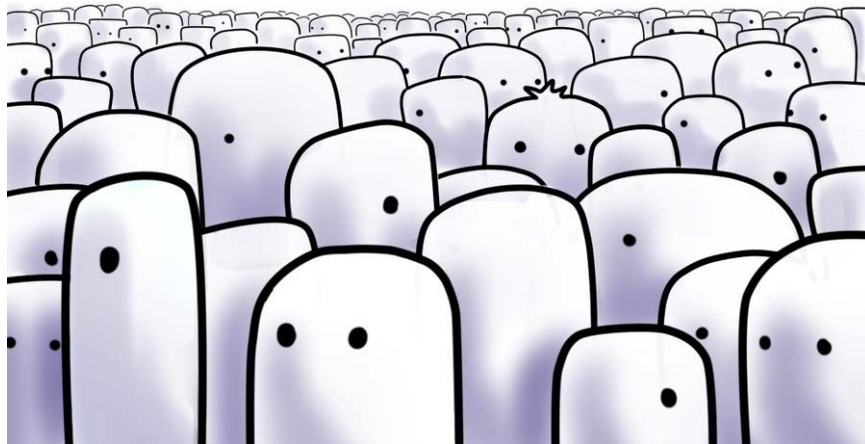


ANTICORPI, IMMUNOCHEMICA E IMMUNOPRECIPITAZIONE



Metodi colorimetrici



Metodi immunochimici



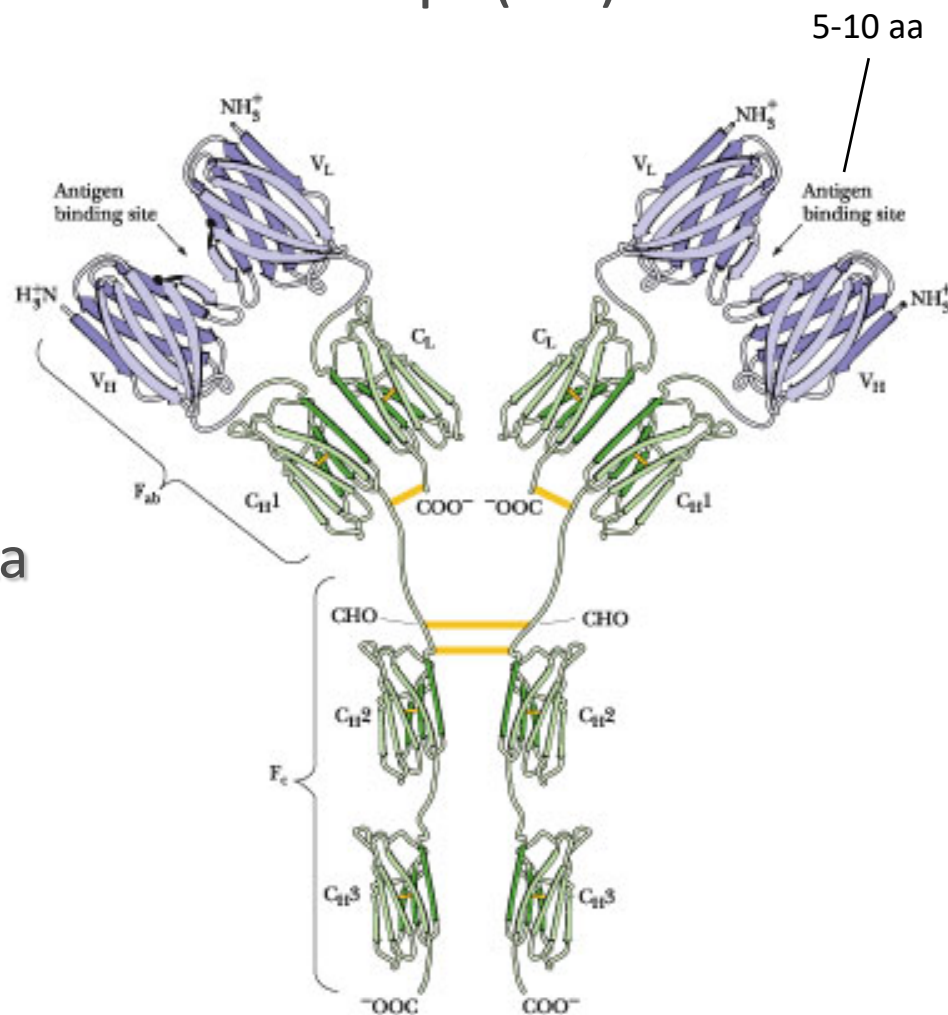
TECNICHE IMMUNOCHEMICHE

Si basano tutte sull'uso di anticorpi (**Ab**).

Anticorpo (Ab): glicoproteine **solubili**, della classe delle immunoglobuline (Ig), prodotte e **secrete** dai linfociti B.

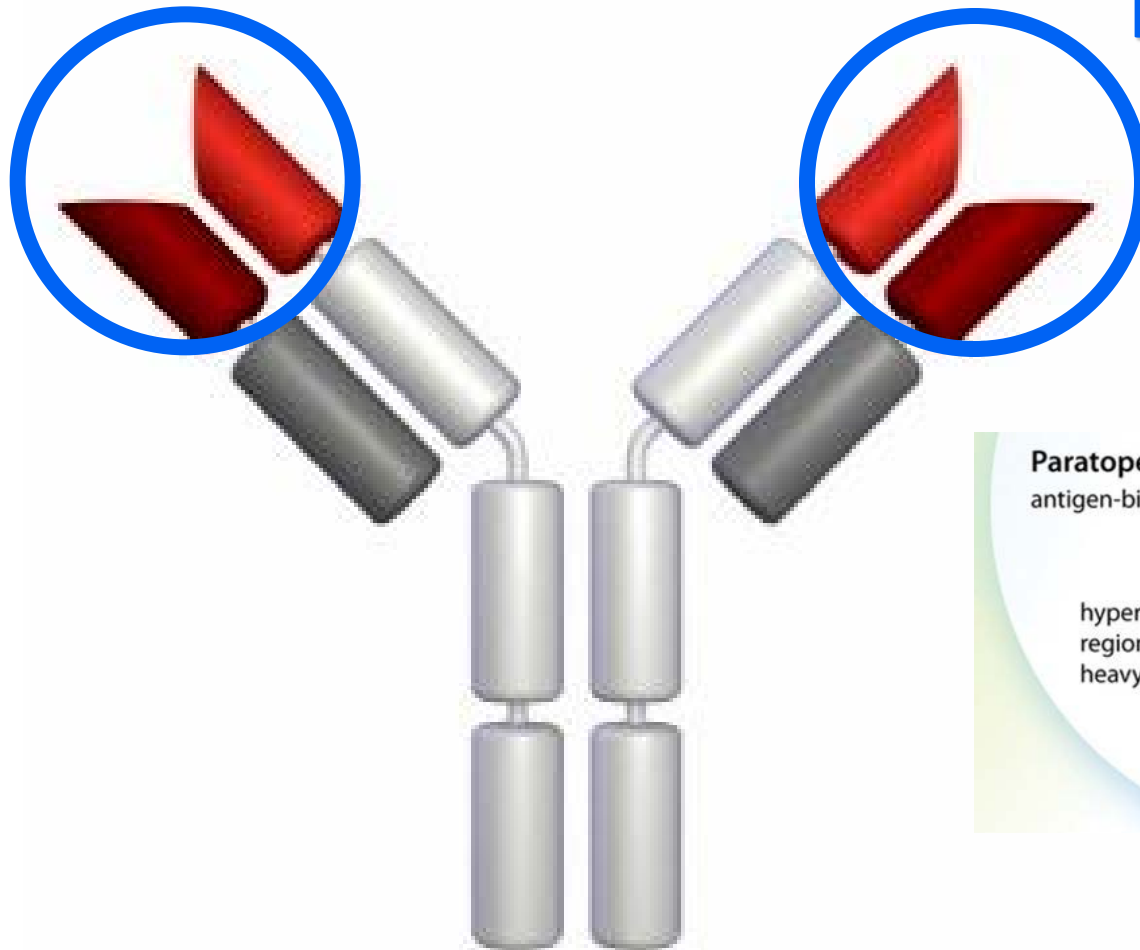
Antigene (Ag): Qualsiasi sostanza estranea che induca risposta immunitaria (es. **polisaccaridi**, **proteine**).

Sostanza riconosciuta e **legata** da un anticorpo.



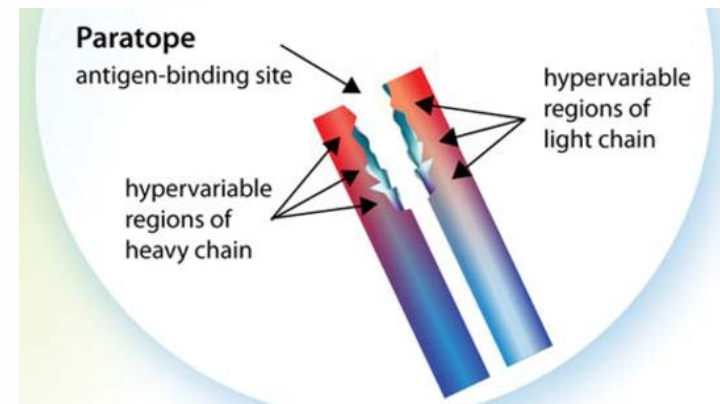
Epitopo (o determinante antigenico):
Parte dell'antigene **riconosciuta** dall'anticorpo

SCHEMATIZZAZIONE DI UN IgG

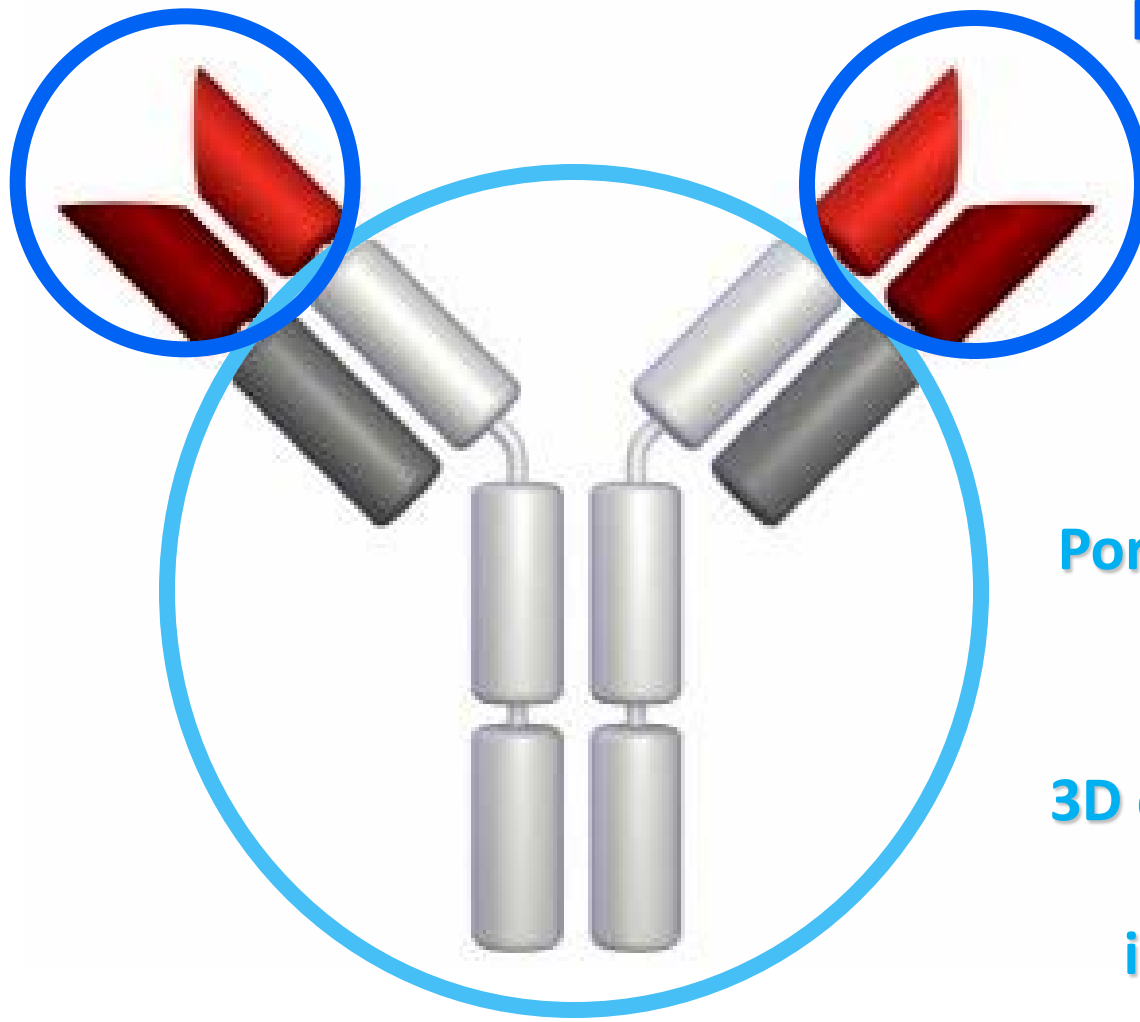


Porzioni variabili

Legame con
l'antigene



SCHEMATIZZAZIONE DI UN IgG



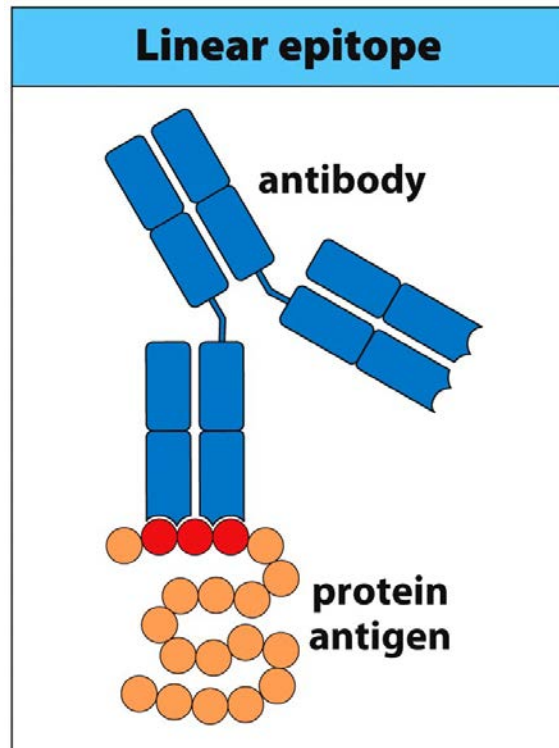
Porzioni variabili

**Legame con
l'antigene**

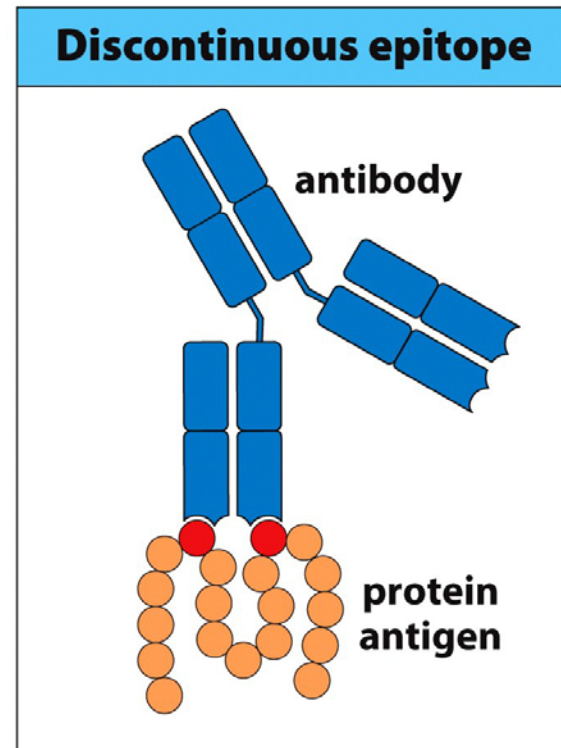
Porzione costante

**Mantiene la struttura
3D dell'Ab, attiva il sistema
del complemento,
interagisce con recettori
cellulari...**

EPITOPI



Linear epitope
Amino acid residues
are adjacent in the
polypeptide chain



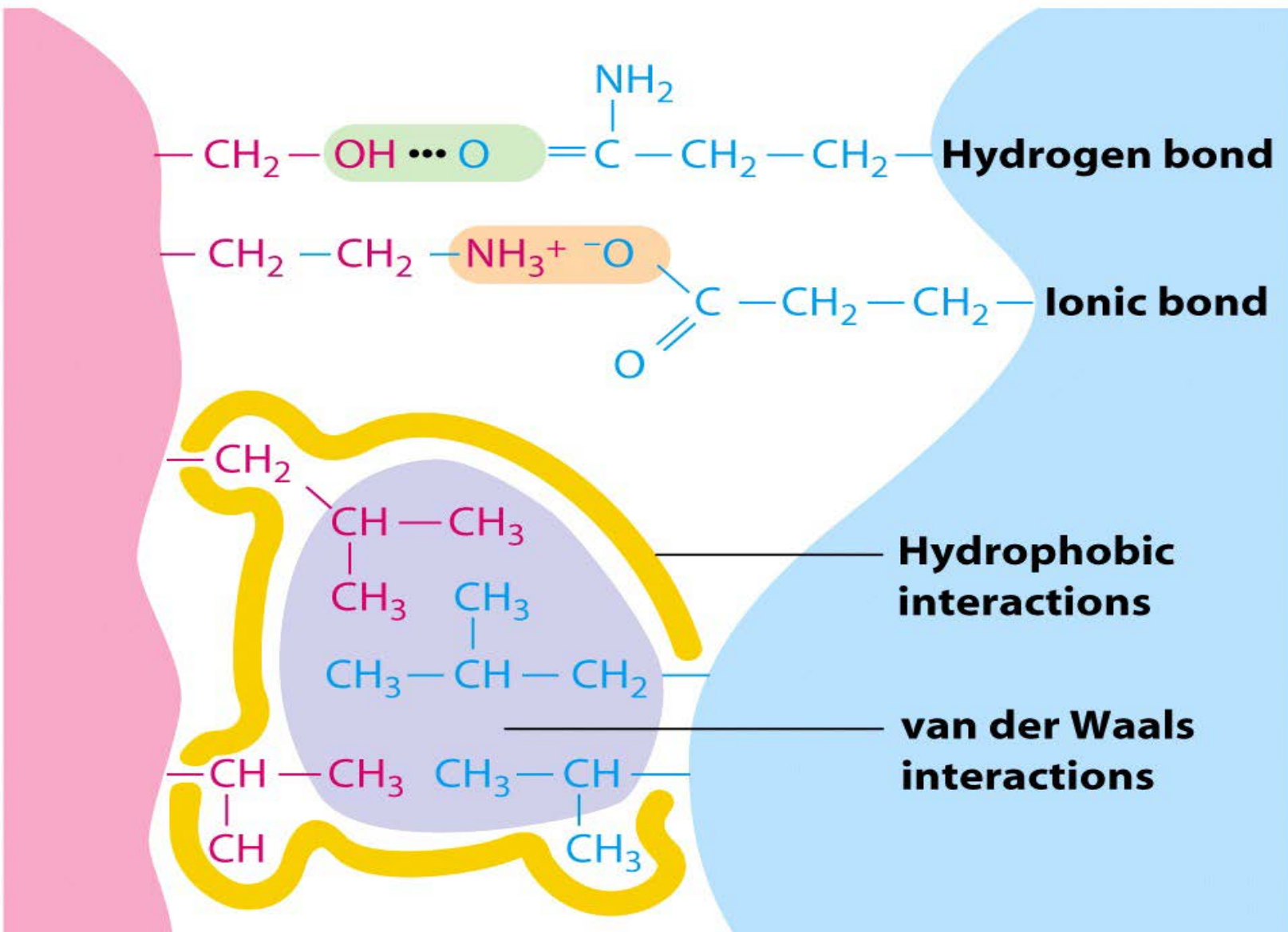
Discontinuous epitope
Created from amino acid
residues located in different
parts of the polypeptide chain

Epitopo **conformazionale**

BASI MOLECOLARI DELL'IMMUNOCOMPLESSO

ANTIGEN

ANTIBODY



SIGNIFICATO PRATICO DEL TIPO DI LEGAME

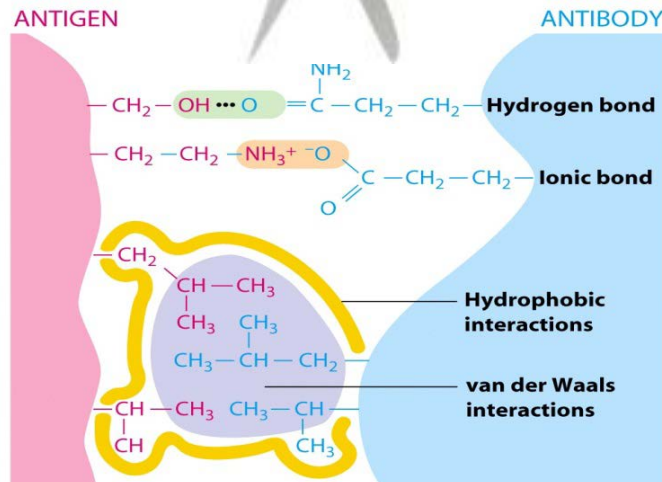
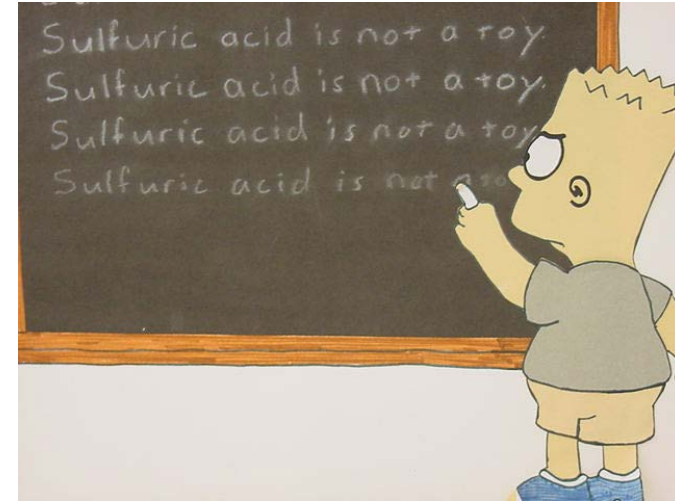


ALTA CONCENTRAZIONE SALINA

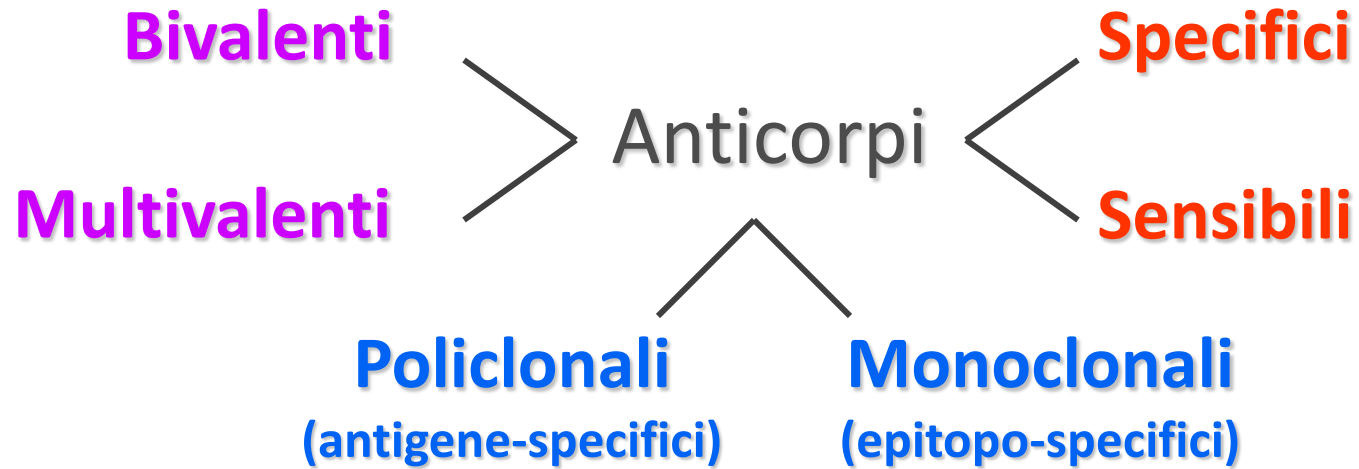


ALTA TEMPERATURA

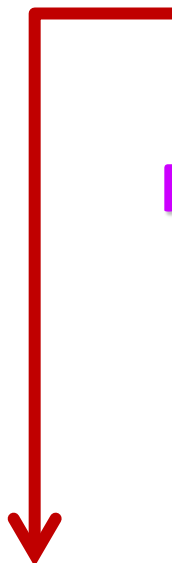
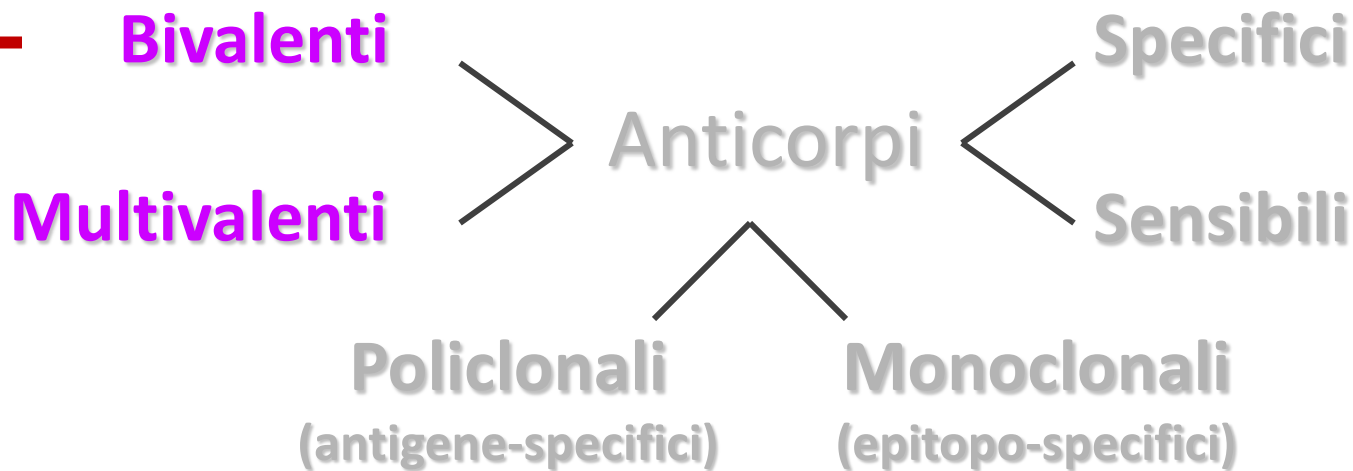
pH ESTREMI



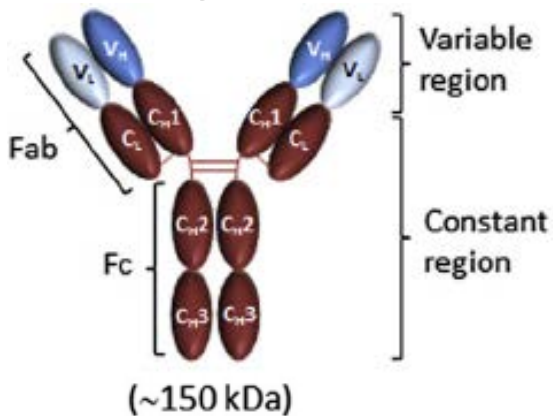
CARATTERISTICHE DI UN ANTICORPO



CARATTERISTICHE DI UN ANTICORPO



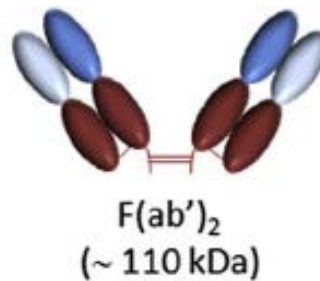
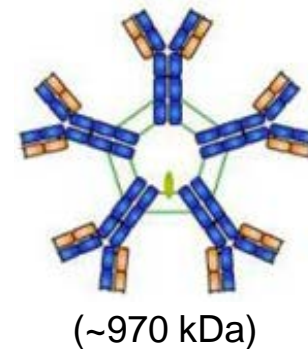
IgG



Valenza

2

IgM



F(ab')₂
(~ 110 kDa)

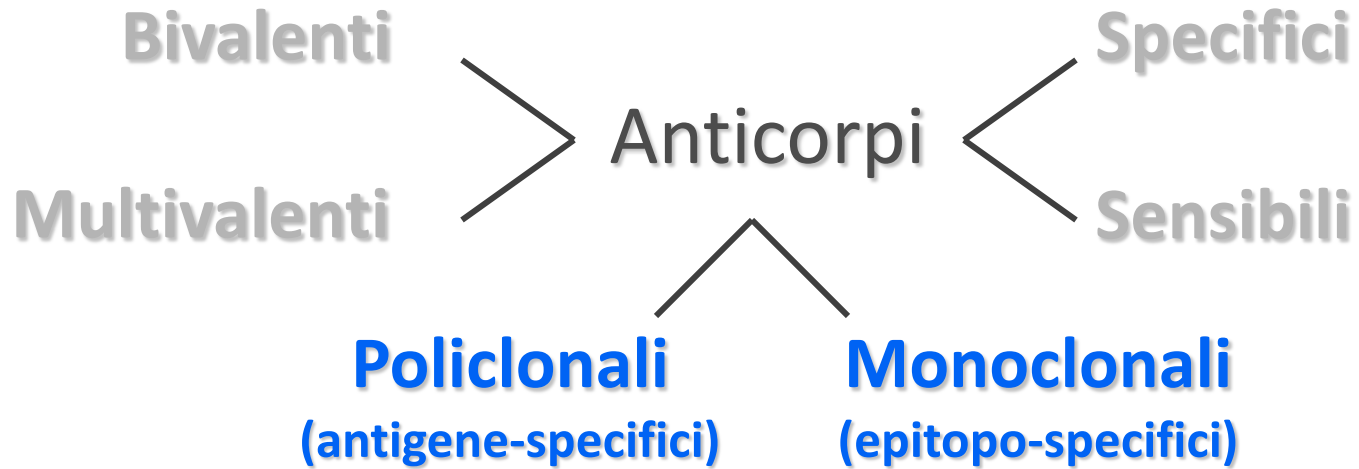


Fab
(~ 55 kDa)

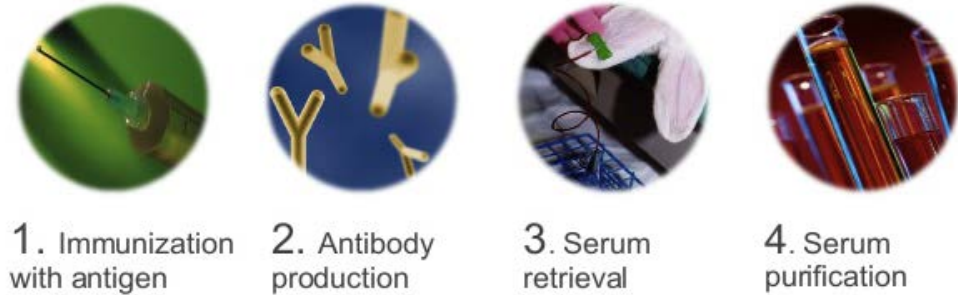
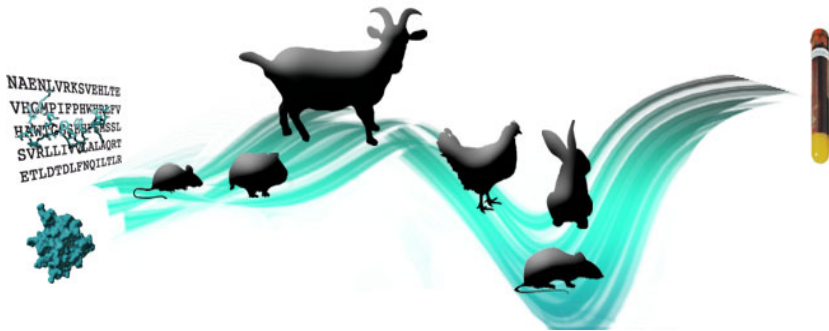
(~970 kDa)

10

CARATTERISTICHE DI UN ANTICORPO



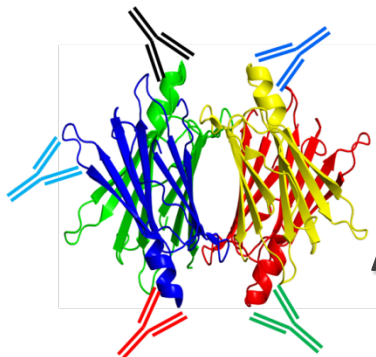
PRODUZIONE DI ANTICORPI POLICLONALI



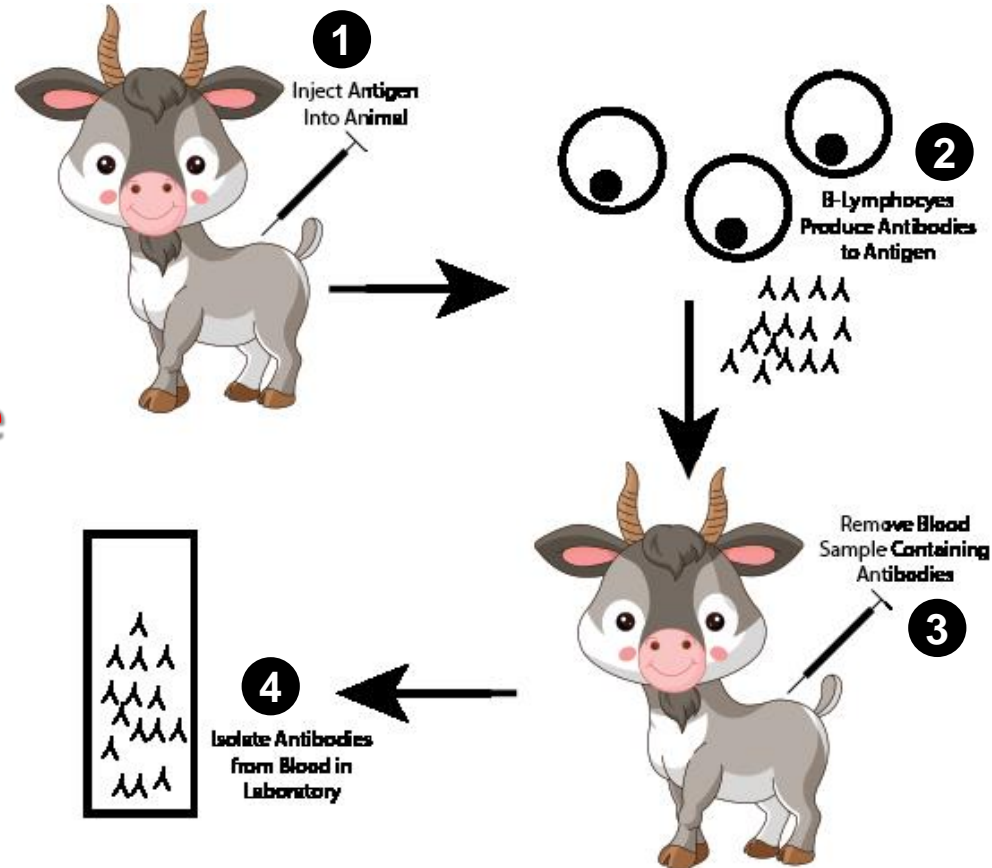
Anticorpi **policonali**:

-prodotti da **più tipi (cloni)** di cellule

-**antigene-specifici**: riconoscono **più epitopi** di uno **stesso antigene**



Proteina
+
Ab policonali



PRODUZIONE DI ANTICORPI MONOCLONALI

Nature Vol. 256 August 7 1975

**Continuous cultures of fused cells
secreting antibody of predefined specificity**

Köhler and Milstein. Nature. 1975;256(5517):495-7.

1984



Fisiologia o
Medicina



Niels K. Jerne



Georges J.F. Köhler



César Milstein

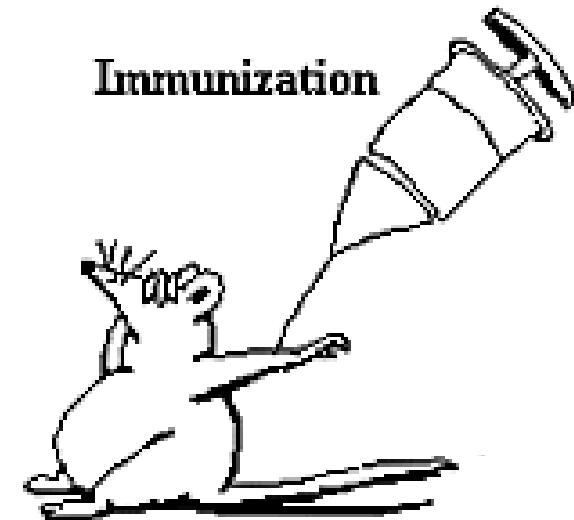
Basato sulla tecnologia degli **ibridomi**

-Cellule normali di topo vengono fuse con cellule tumorali (es. mieloma)

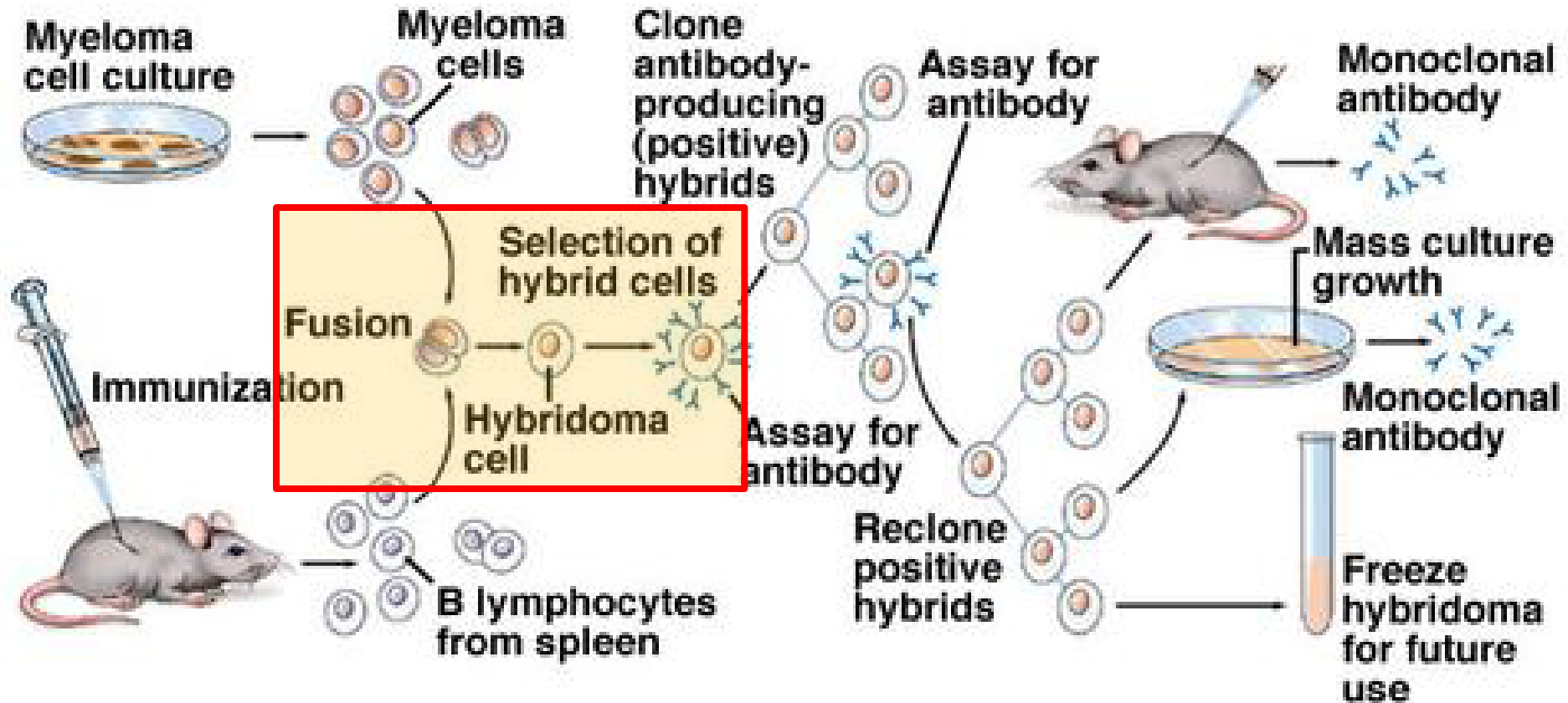
-La nuova cellula ibrida ha proprietà di entrambi i tipi cellulari:

-crescita illimitata;

-secrezione di **anticorpi monoclonali**

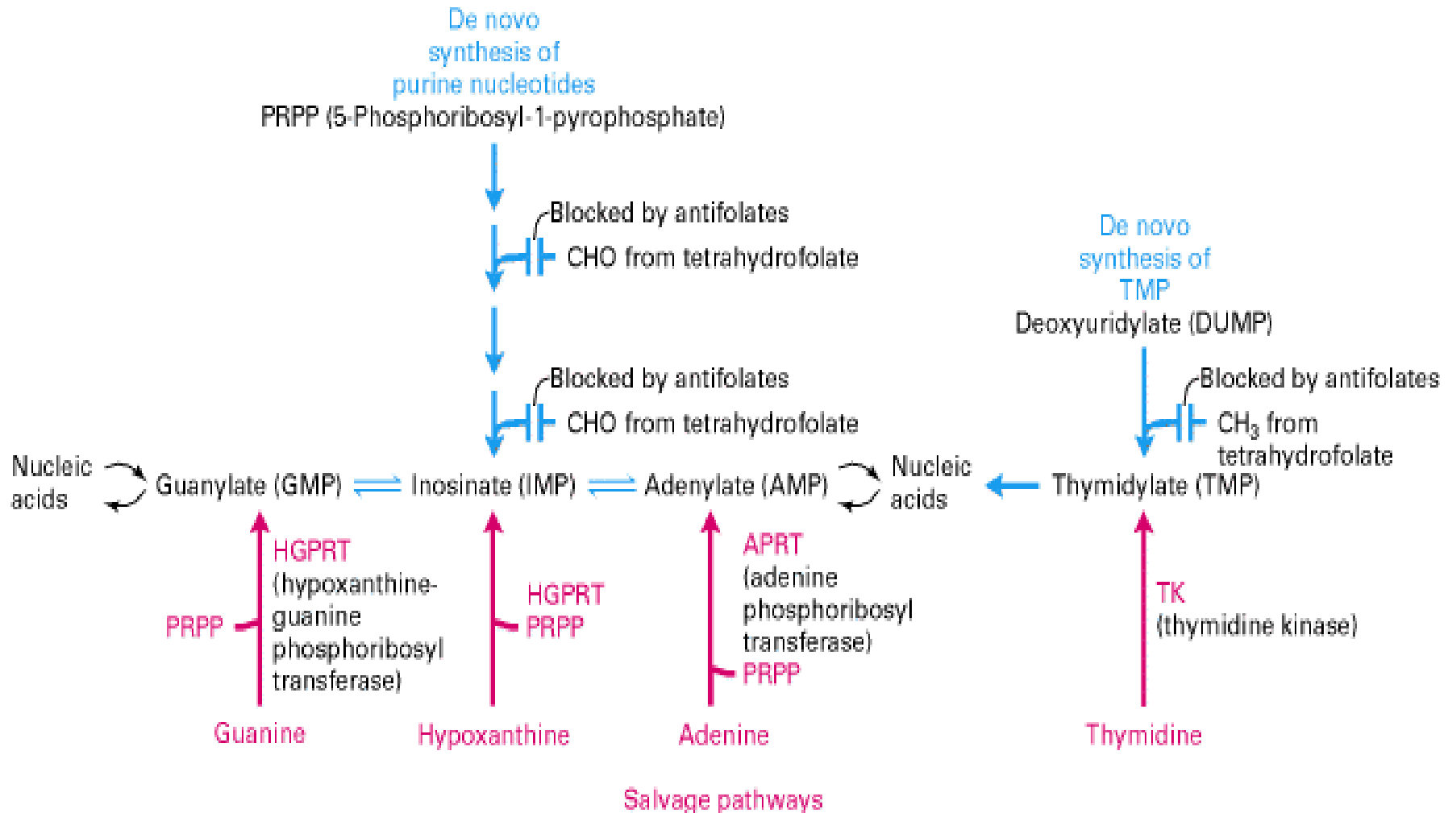


PRODUZIONE DI ANTICORPI MONOCLONALI



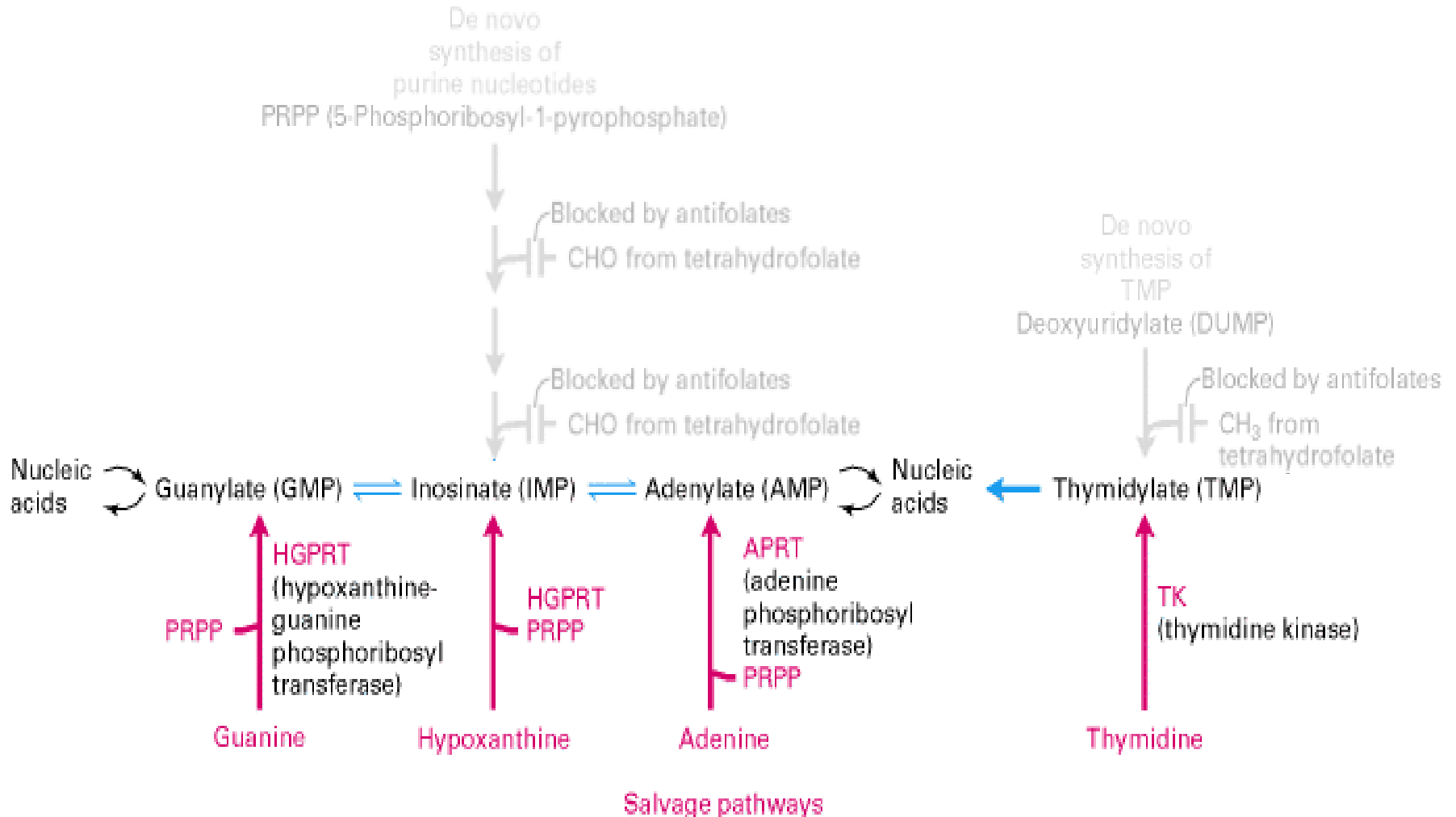
PRODUZIONE DI ANTICORPI MONOCLONALI - *HAT selection*

- HAT:** **Hypoxanthine** → indispensabile per la sintesi di recupero delle basi puriniche
Aminopterin → blocca la sintesi *de novo* delle basi puriniche e pirimidiniche
Thymidine → indispensabile per la sintesi di recupero delle basi pirimidiniche



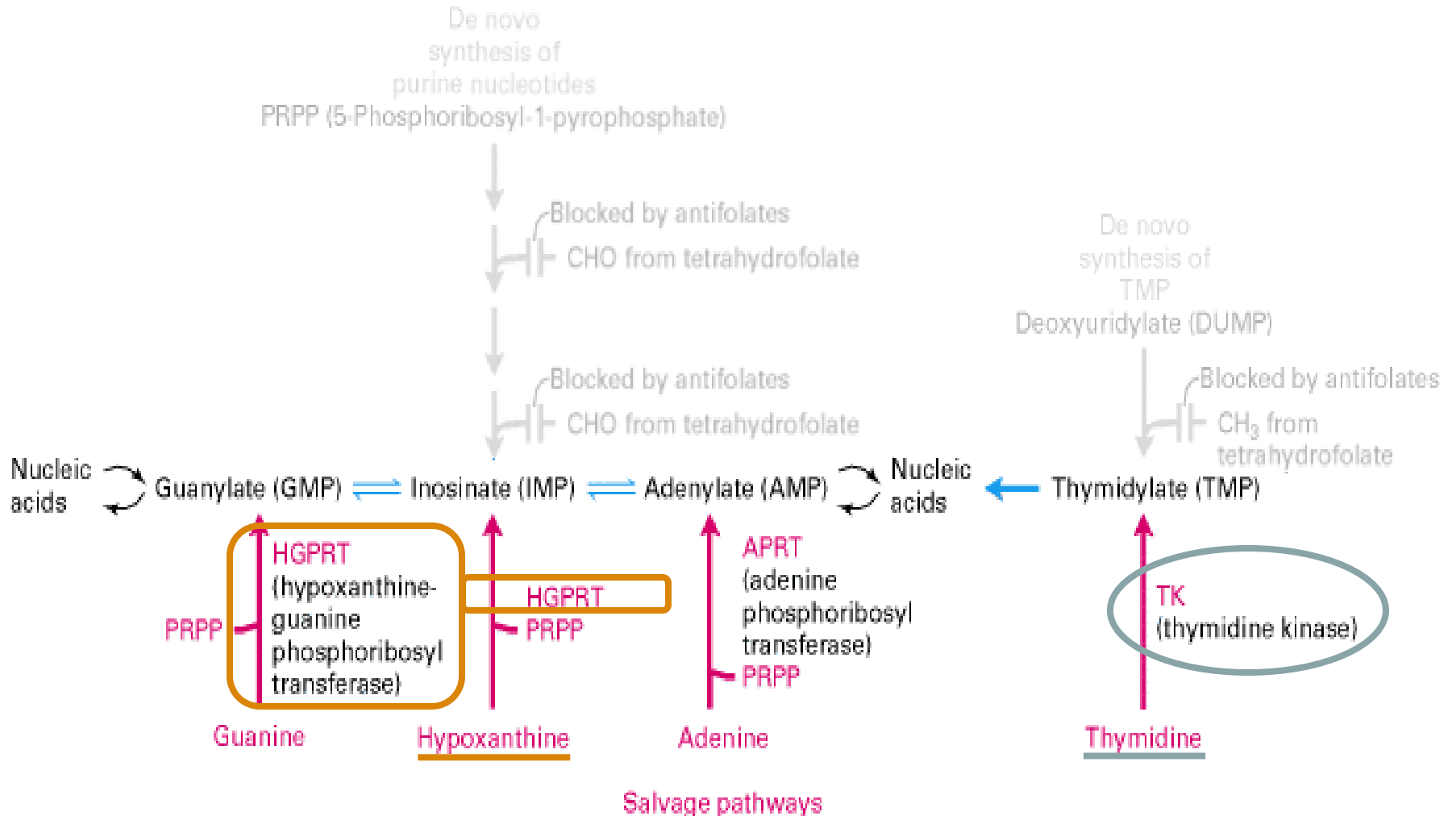
PRODUZIONE DI ANTICORPI MONOCLONALI - *HAT selection*

- HAT:** Hypoxanthine → indispensabile per la sintesi di recupero delle basi puriniche
Aminopterin → blocca la sintesi *de novo* delle basi puriniche e pirimidiniche
Thymidine → indispensabile per la sintesi di recupero delle basi pirimidiniche



PRODUZIONE DI ANTICORPI MONOCLONALI - *HAT selection*

- HAT:** **Hypoxanthine** → indispensabile per la sintesi di recupero delle basi puriniche
Aminopterin → blocca la sintesi *de novo* delle basi puriniche e pirimidiniche
Thymidine → indispensabile per la sintesi di recupero delle basi pirimidiniche



PRODUZIONE DI ANTICORPI MONOCLONALI - *HAT selection*

HAT: **Hypoxanthine** → indispensabile per la sintesi di recupero delle basi puriniche
Aminopterin → blocca la sintesi *de novo* delle basi puriniche e pirimidiniche
Thymidine → indispensabile per la sintesi di recupero delle basi pirimidiniche

Genotipo:

Tipo di cellula:

Selezione HAT:

Motivo:

HGPRT -



HGPRT +



HGPRT +



NO sintesi DNA:
- carenza di HGPRT nella "salvage pathway"
- l'aggiunta di aminopterin blocca la sintesi *de novo*

Linea continua e sintesi DNA:
1) Caratteristiche di cellula **immortalizzata** (**mieloma**)
2) Capacità di **sintesi DNA** (enzima **HGPRT**; **cellule B** di milza)

Mortalità:
HGPRT normale e sintesi DNA *ma* limitato numero di cicli di replicazione in coltura.

HGPRT = hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase (oppure anche TK-, TK = thymidine kinase)

PRODUZIONE DI ANTICORPI MONOCLONALI - *HAT selection*

Hybridoma selection using HAT medium

Hybridoma selection after fusion of myelomas and spleen cells is a critical step in monoclonal antibody production.

Often scientists use the **HAT (hypoxanthine-aminopterin-thymidine) method**.

During the fusion process, three types of cells are present: (1) **unfused myeloma cells** that are **deficient in the HGPRT enzyme**, (2) **unfused spleen cells**, and (3) **fused hybridoma cells**.

Unfused spleen cells are easily selected against since they **do not replicate in culture**.

Unfused myelomas can be **selected** against **using** media containing **HAT**. The **aminopterin** found in the medium **blocks** the **de novo DNA** nucleotide **synthesis** pathway. Typically when the *de novo* pathway is blocked, cells will then utilize the **salvage pathway** as an alternative means to replicate (only if hypoxanthine and thymidine are present). However, these myelomas are unable to do so since they are **deficient in the HGPRT enzyme**, which is **required for the salvage pathway**. Hence, myelomas are unable to replicate in culture.

Only hybridomas survive. Hybridomas inherit a functioning **HGPRT enzyme from** the **spleen cells**, so even though the *de novo* pathway is blocked, they can still use the salvage pathway to replicate, and are "**immortal**" due to features conferred by **myeloma cells**.

PRODUZIONE DI ANTICORPI MONOCLONALI

Nature Vol. 256 August 7 1975

Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity

Köhler and Milstein. Nature. 1975;256(5517):495-7.

1984



Fisiologia o
Medicina



Niels K. Jerne



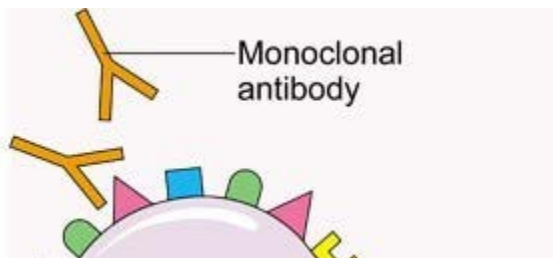
Georges J.F. Köhler



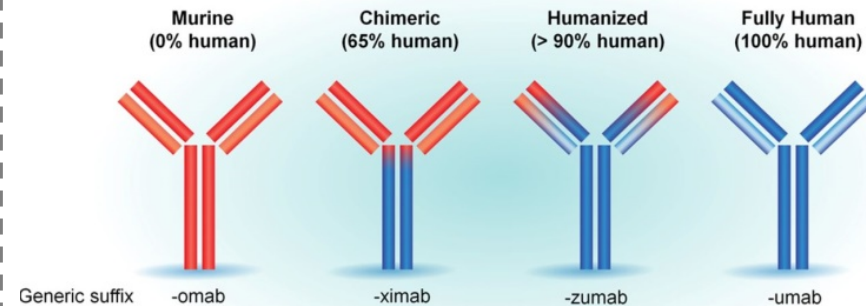
César Milstein

Anticorpi **monoclonali**:

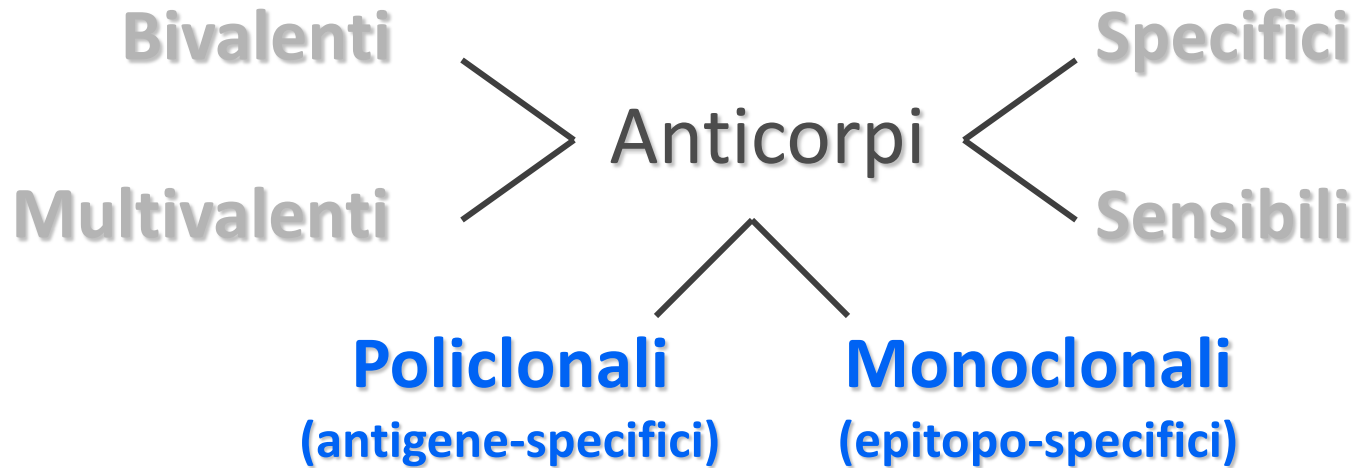
- anticorpi identici** prodotti da **un solo tipo (clone)** di cellule
- epitopo-specifici**: riconoscono **uno specifico epitopo** sull'antigene



Anticorpi monoclonali
ad uso terapeutico:

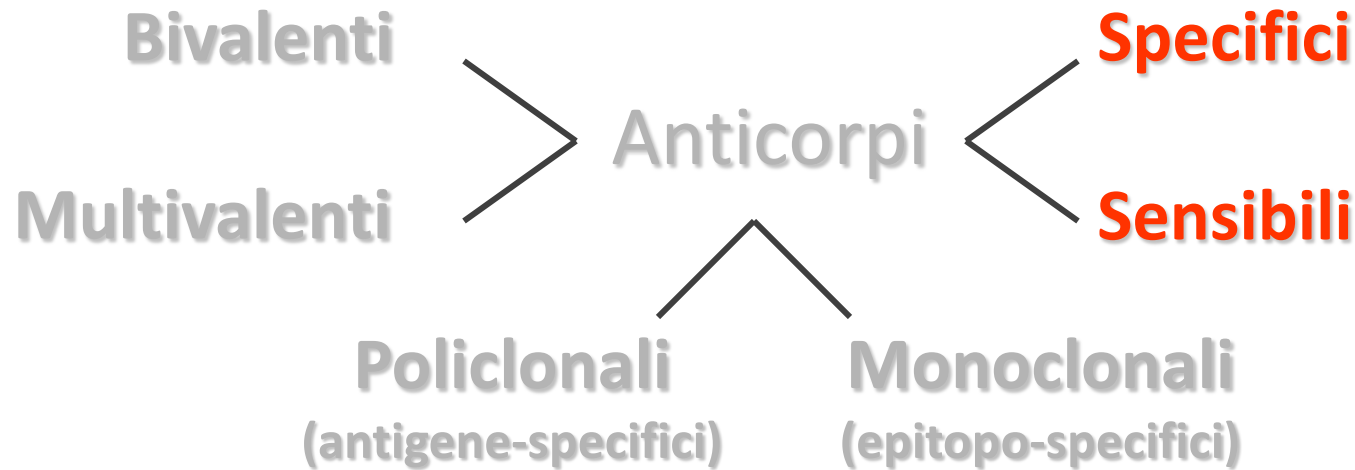


CARATTERISTICHE DI UN ANTICORPO



	<u>Polyclonal antibodies</u>	<u>Monoclonal Antibodies</u>
<i>Produced by:</i>	Many B cell clones	A single B cell clone
<i>Bind to:</i>	Multiple epitopes of all antigens used in the immunization	A single epitope of a single antigen
<i>Antibody class:</i>	A mixture of different Ab classes (isotypes)	All of a single Ab class
<i>Ag-binding sites:</i>	A mixture of Abs with different antigen-binding sites	All Abs have the same antigen binding site
<i>Potential for cross-reactivity:</i>	High	Low

CARATTERISTICHE DI UN ANTICORPO



Cross reattività

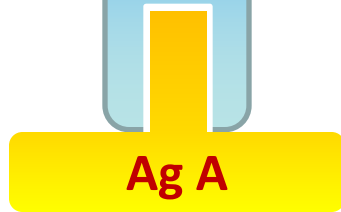
Capacità di un singolo Ab di legarsi a **più epitopi** o di una popolazione di Ab di reagire con **più antigeni**.

Cause:

- Epitopi in comune **(1)**
- Epitopi strutturalmente simili **(2)**

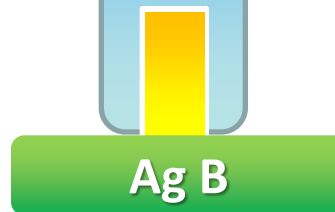
CROSS REATTIVITÀ

Ab
Anti-A



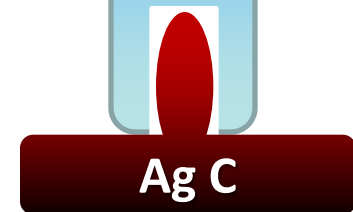
Riconoscimento
corretto Ab-Ag A

Ab
Anti-A

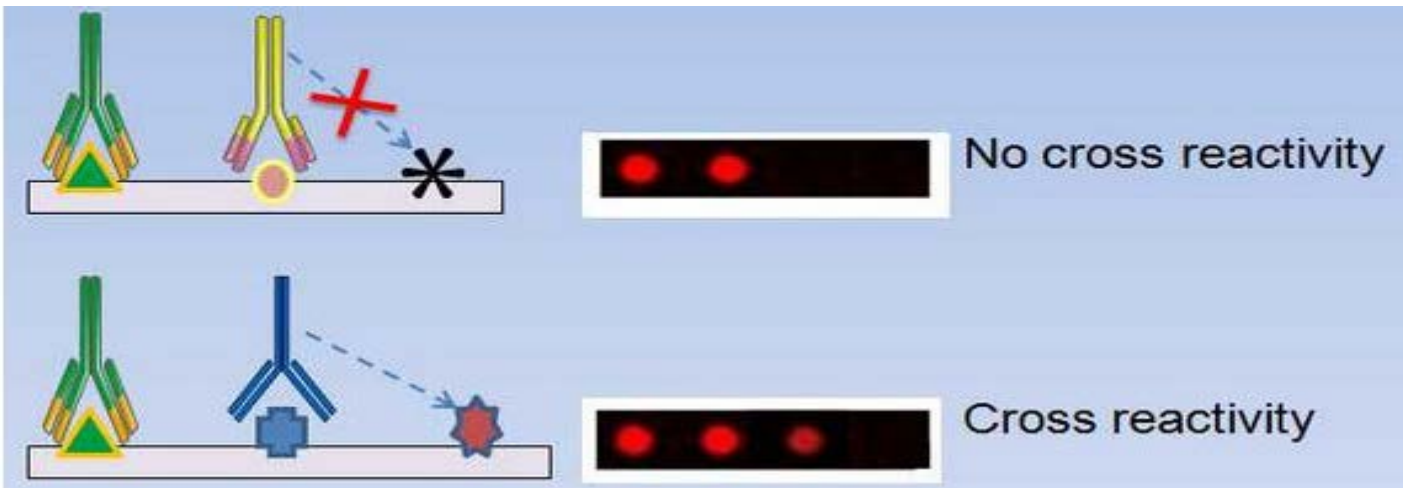


Epitopi
condivisi (1)

Ab
Anti-A



Epitopi
simili (2)

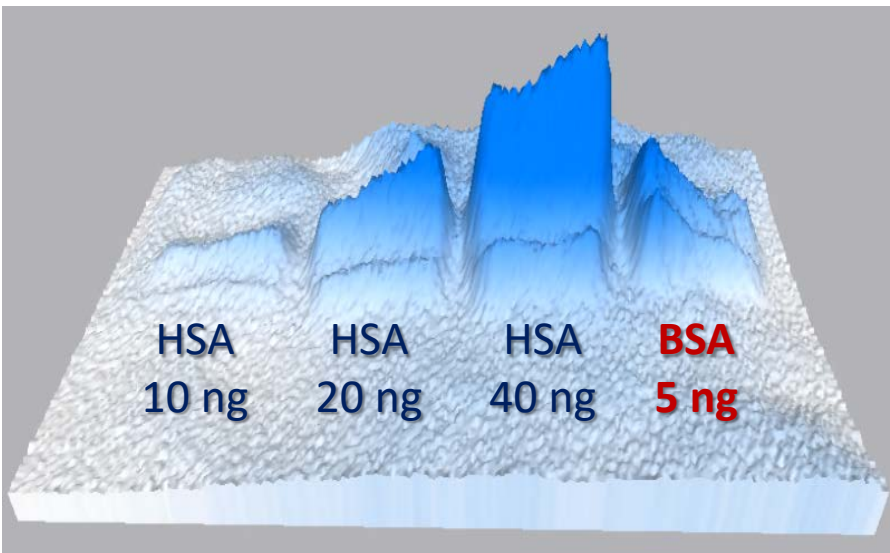


Effetto:

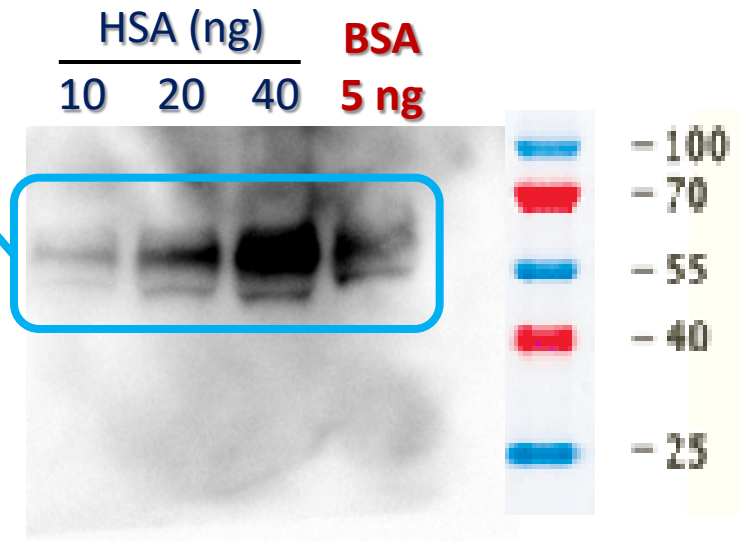
falso
segnale
positivo

ESEMPIO REALE DI CROSS REATTIVITÀ

Albumina bovina (**BSA**) vs Albumina umana (**HSA**)

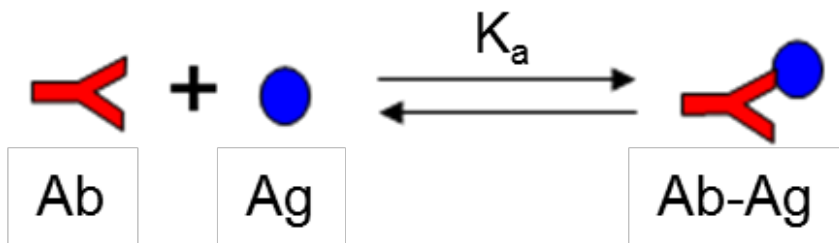
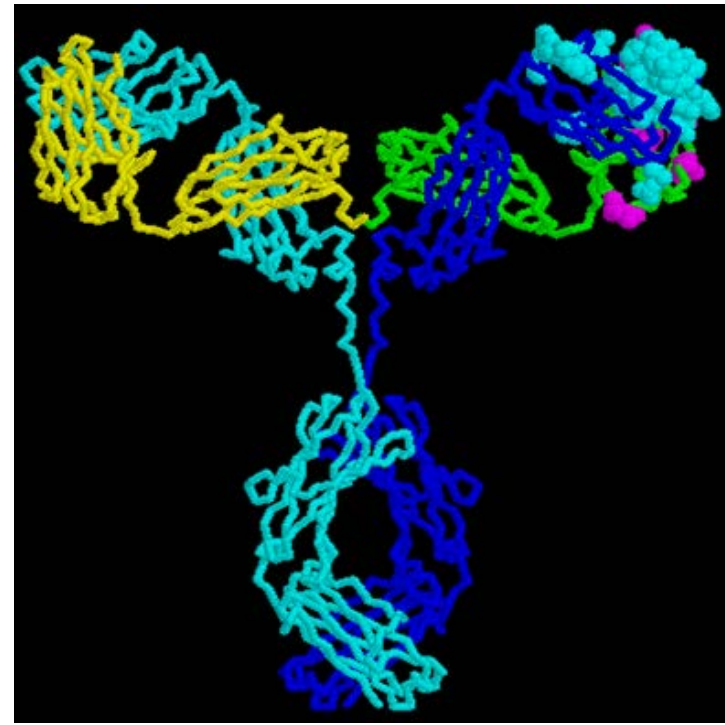


Riconoscimento
con anti-BSA



AFFINITÀ

- **Forza** della reazione fra un singolo epitopo dell'Ag e un singolo sito di legame sull'Ab (**affinità**).
- **Equilibrio** fra forze di attrazione e di repulsione.
- Legami **non covalenti multipli**.

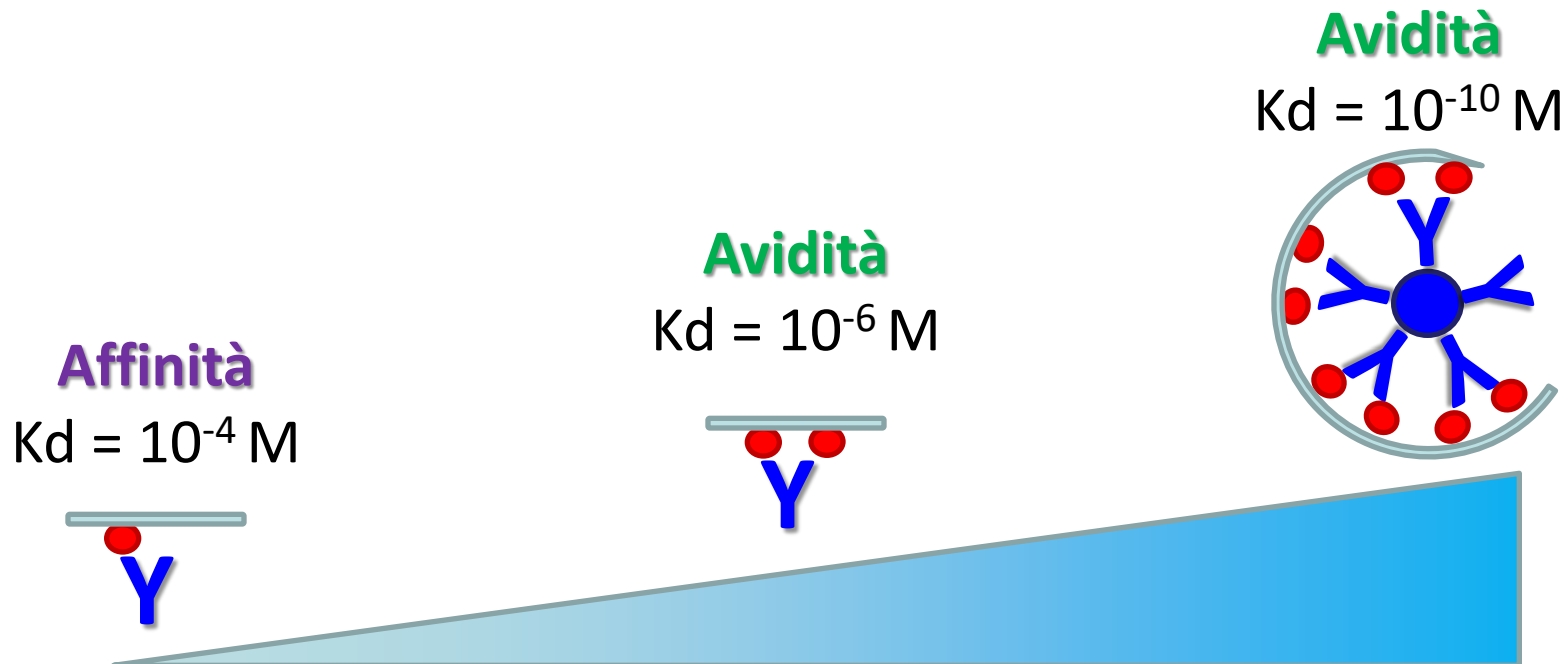


$$K_A = \frac{[Ab-Ag]}{[Ab] [Ag]}$$

- **Reversibilità** del legame.
- Matematicamente è dato dalla **costante di associazione** (**Ka** o dalla **Kd**).

AVIDITÀ

Misura la forza di legame **totale** di un Ab con un Ag con molti determinanti antigenici.

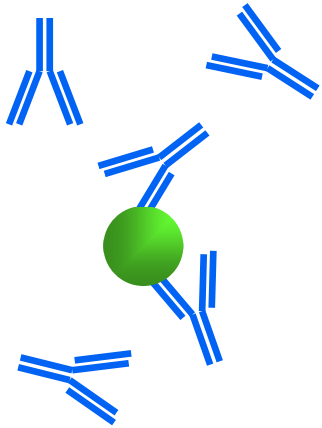


L'**avidità** è **>** della somma delle singole affinità

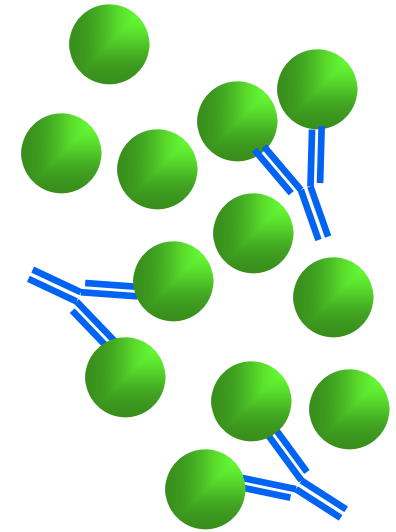
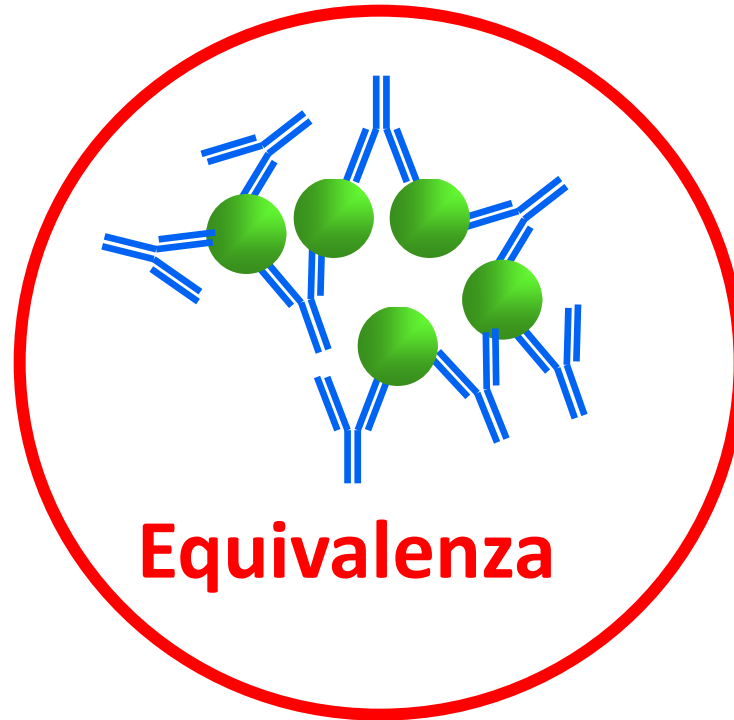
Forza Ionica - pH - Temperatura contano sempre

IMMUNOPRECIPITAZIONE

Molti Ab divalenti (IgG) e multivalenti (IgM) hanno la capacità di far **precipitare** antigeni **in soluzione**, per formazione di un grande **reticolo macromolecolare**.



Eccesso di **Ab**

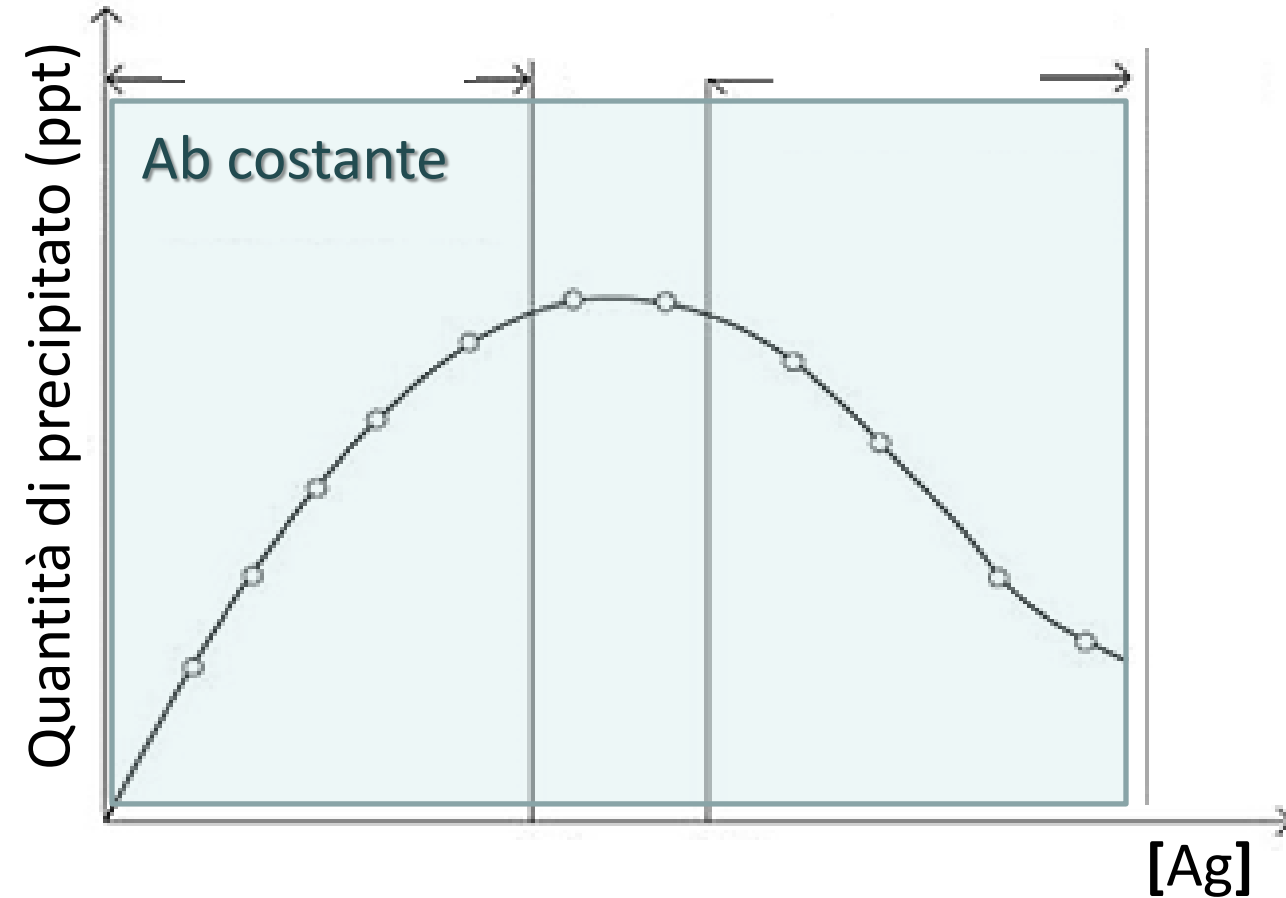


Eccesso di **Ag**

Non può avvenire con Ab monoclonali che riconoscano un solo epitopo sull'antigene

ZONA DI EQUIVALENZA

Non si raggiunge **MAI** un vero plateau.

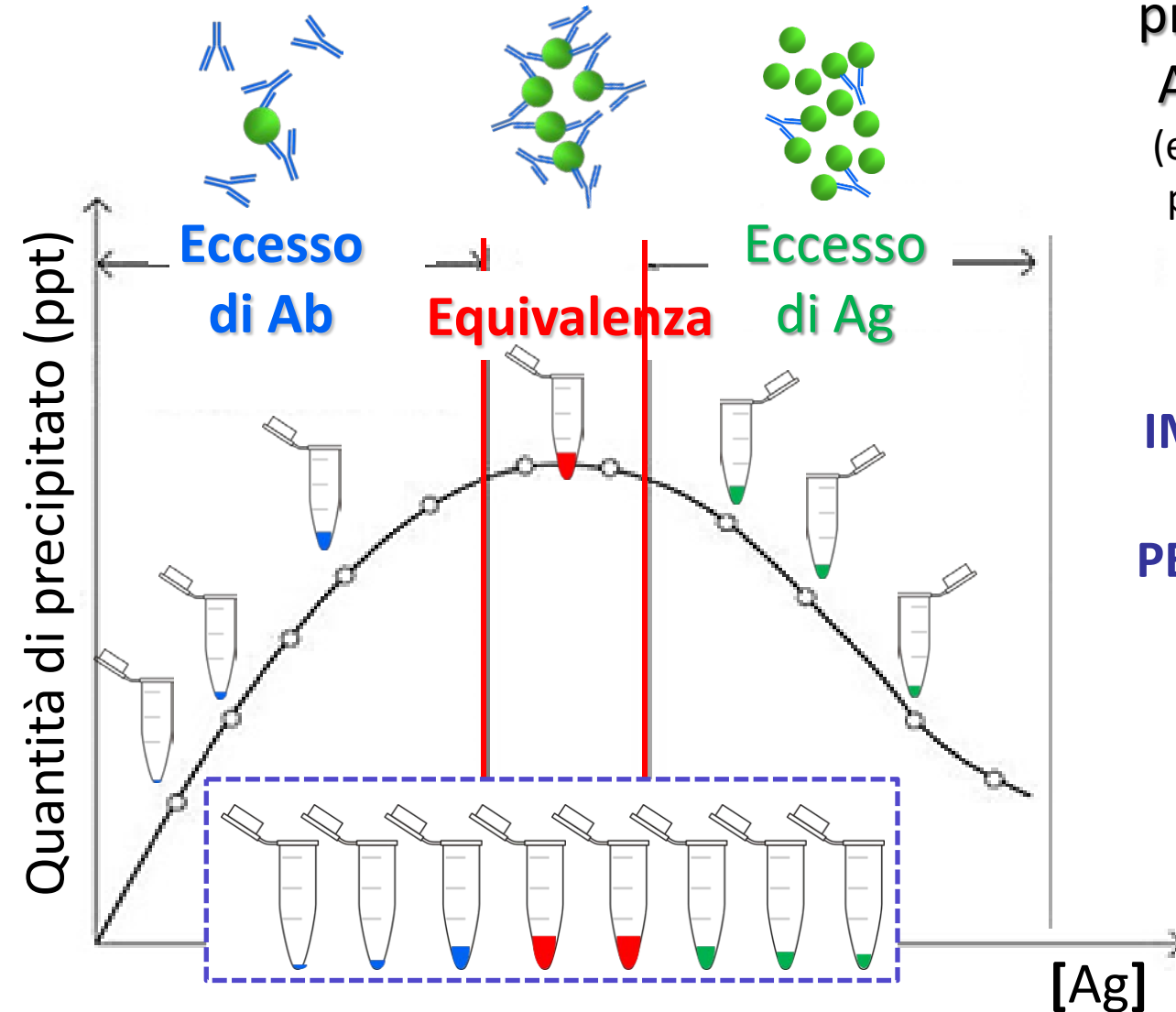


ZONA DI EQUIVALENZA

Non si raggiunge **MAI** un vero plateau.

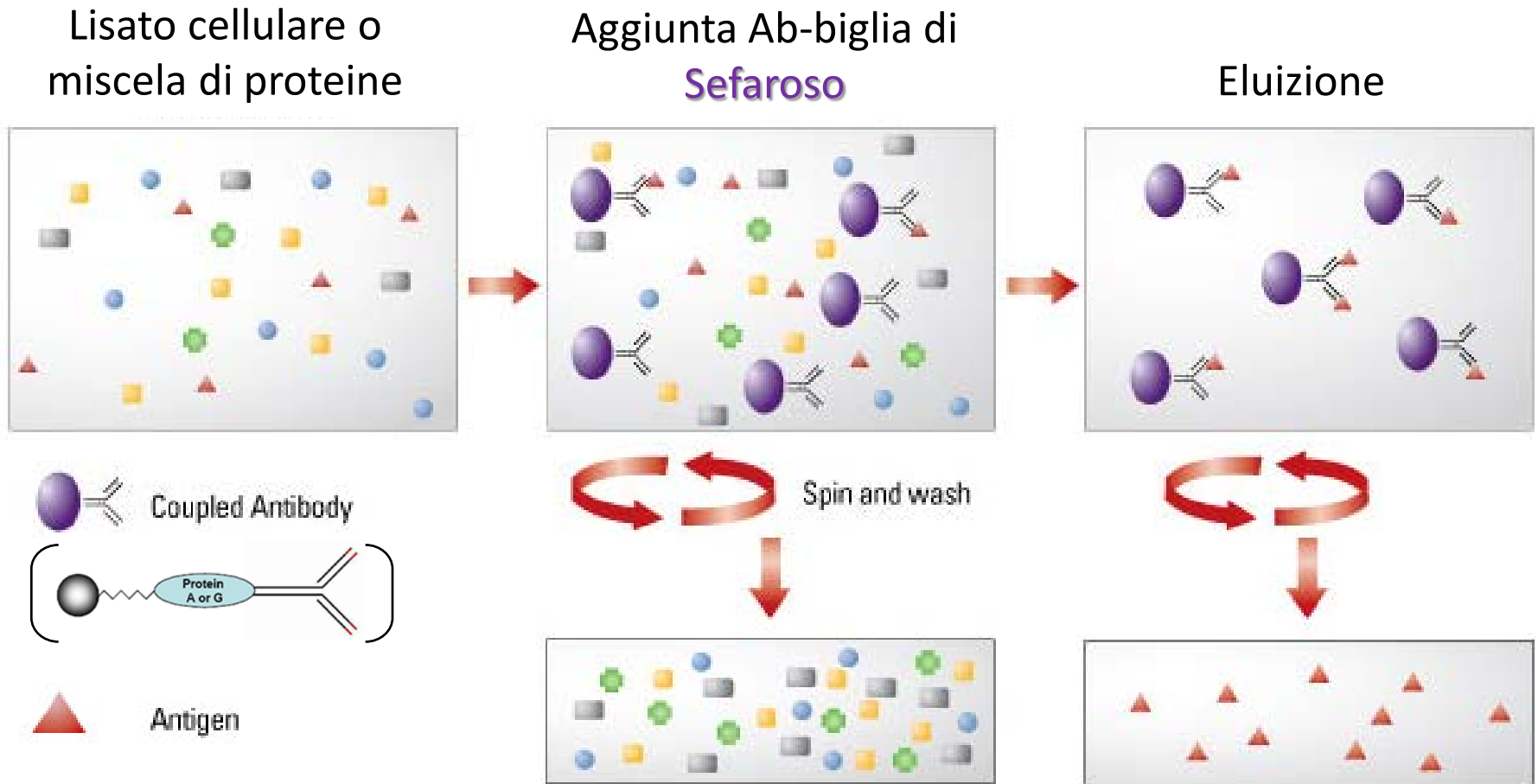
Per determinare la presenza o isolare un un Ag in/da un campione.
(es. tossine, immunoglobuline, prodotti solubili da patogeni)

**IMMUNOPRECIPITAZIONE
IN SOLUZIONE
PER ANALISI QUALITATIVE**



IMMUNOPRECIPITAZIONE IN SOLUZIONE - OGGI

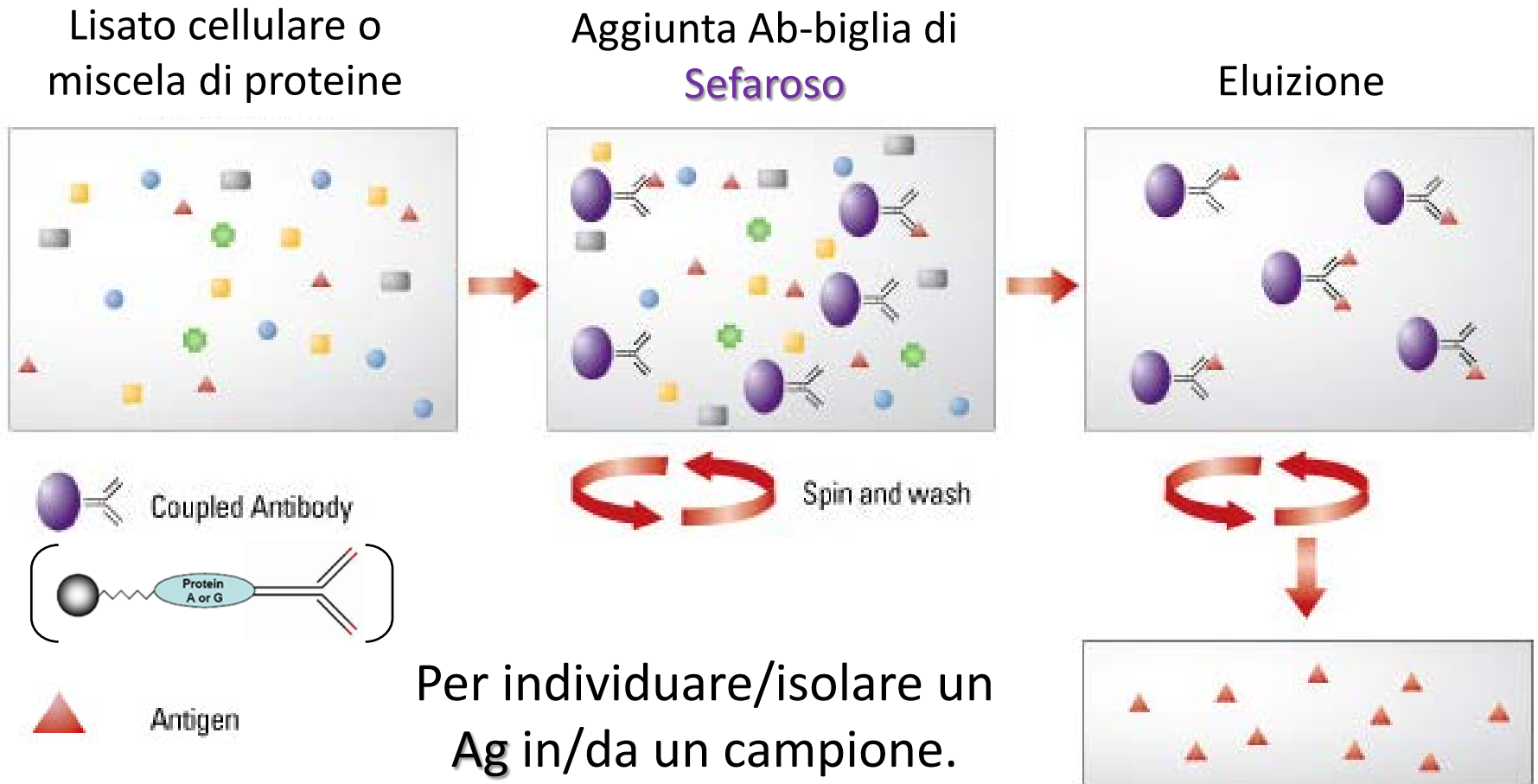
AUMENTO DELL'EFFICIENZA (1)



In questo caso, l'Ab può essere sia policlonale che monoclonale

IMMUNOPRECIPITAZIONE IN SOLUZIONE - OGGI

AUMENTO DELL'EFFICIENZA (1)



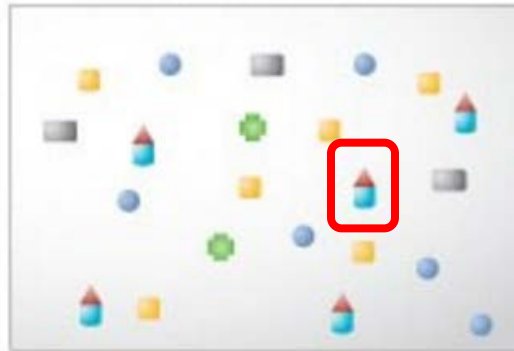
In questo caso, l'Ab può essere sia policlonale che monoclonale

Ab già coniugato ad una biglia, facile da separare dalla soluzione

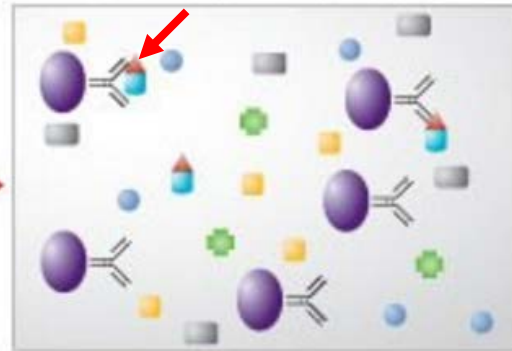
ESTENSIONE DELLA IMMUNOPRECIPITAZIONE

CO-IMMUNOPRECIPITAZIONE

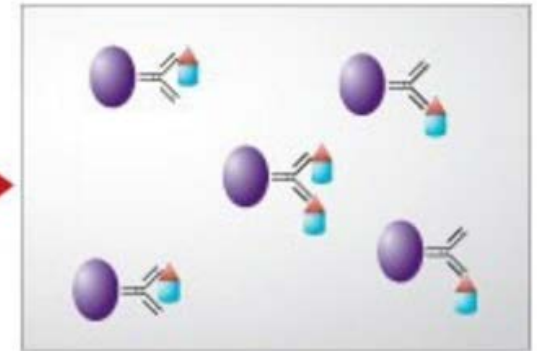
Lisato cellulare o
miscela di proteine



Aggiunta Ab-biglia di
Sefaroso





Centrifugazione



 Coupled Antibody

 Protein
A or G

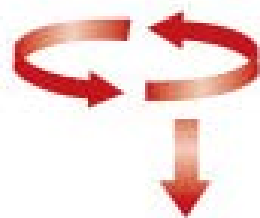
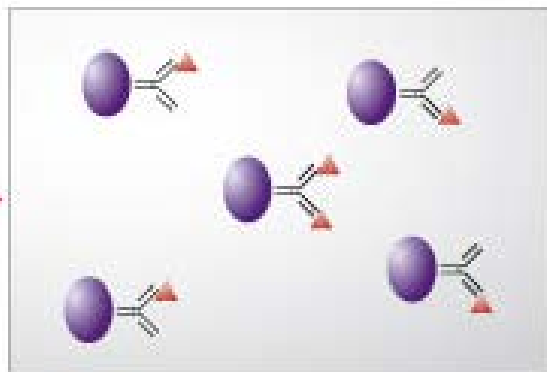
 Antigen

 Protein Interacting
with Antigen

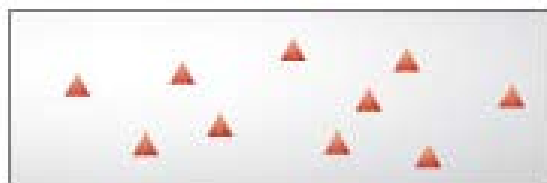
Per isolare il target primario (l'Ag) e altre
molecole che con esso interagiscono

IMMUNOPRECIPITAZIONE vs CO-IMMUNOPRECIPITAZIONE

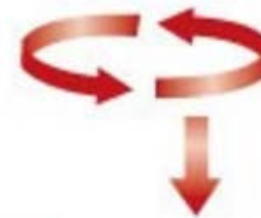
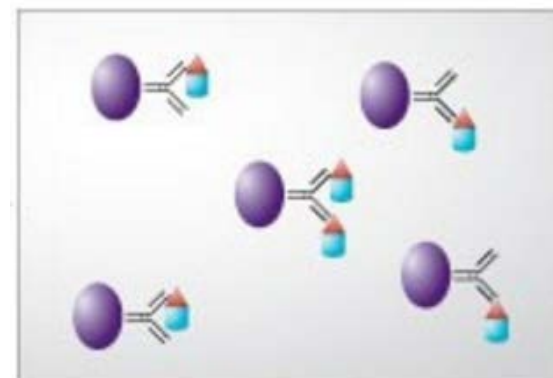
IP



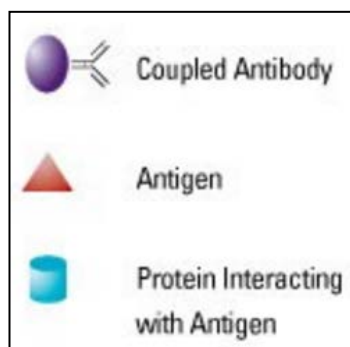
Elute



Co-IP



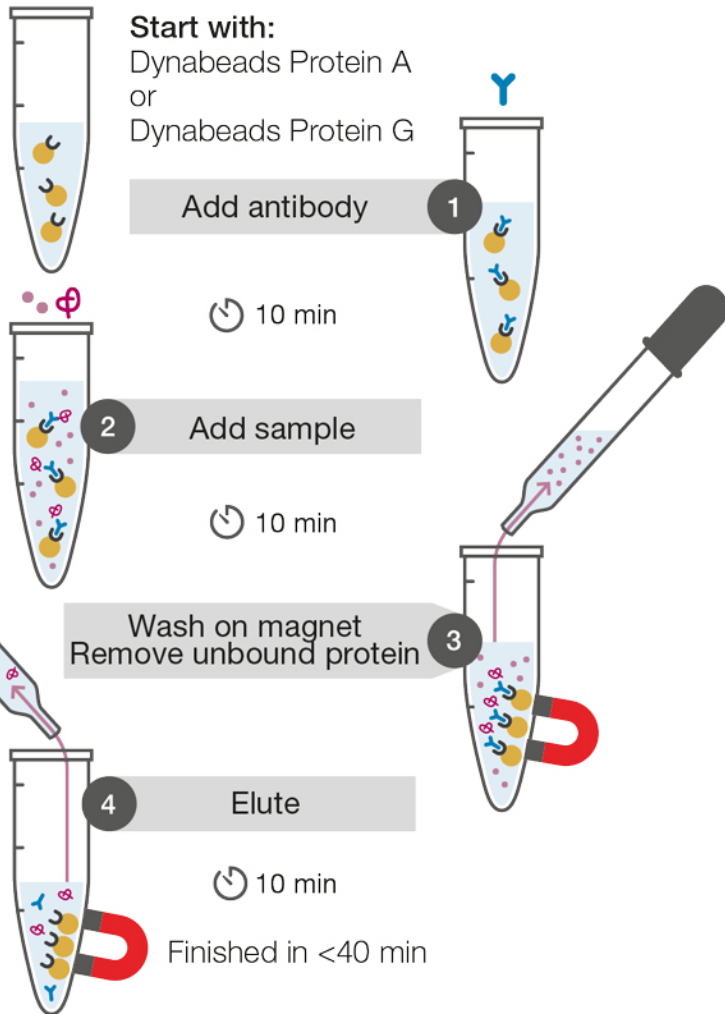
Elute



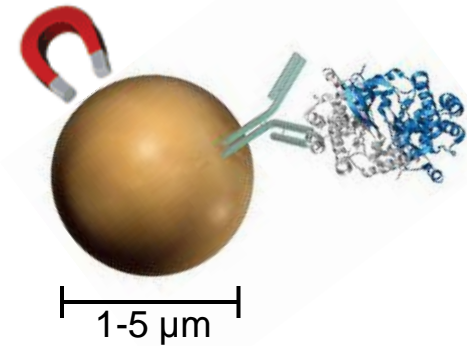
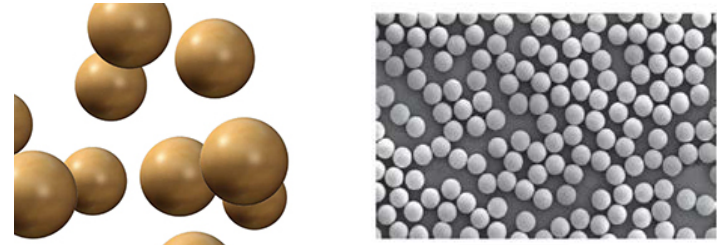
Si parla di **IP** o **Co-IP** se la molecola di interesse nell'esperimento è il **target primario (Ag)** o **secondario (proteina complessata)**

IMMUNOPRECIPITAZIONE IN SOLUZIONE - OGGI

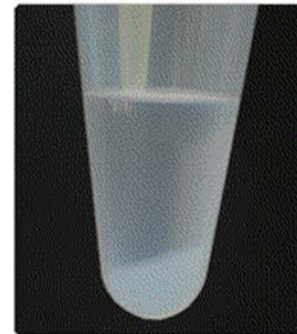
AUMENTO DELL'EFFICIENZA (2)



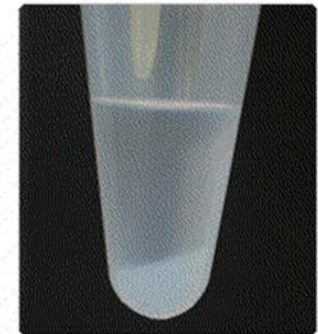
- Dynabeads
- ⌋ Antibody
- ⌋ Protein A or G
- ⌋ Target protein
- Nonspecific protein



Loss of sepharose & sample



Unwanted remaining buffer



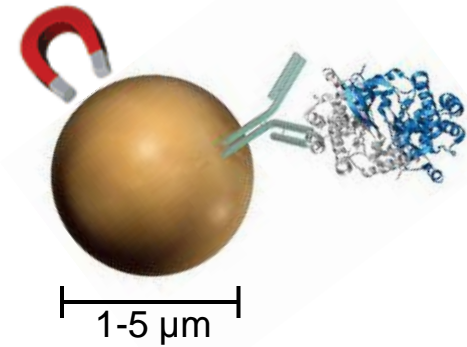
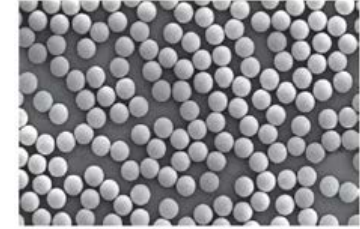
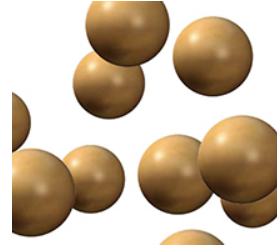
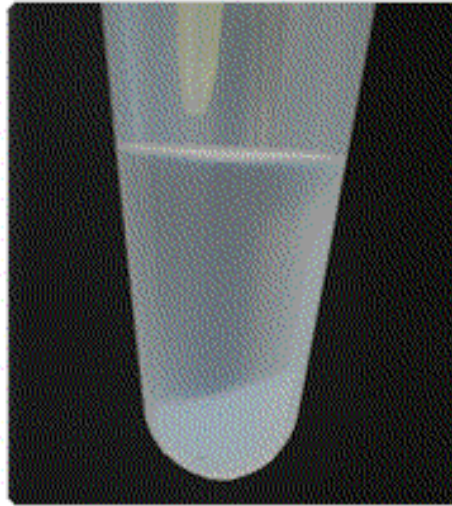
IMMUNOPRECIPITAZIONE IN SOLUZIONE - OGGI

AUMENTO DELL'EFFICIENZA (2)

Loss of sepharose & sample



Unwanted remaining buffer

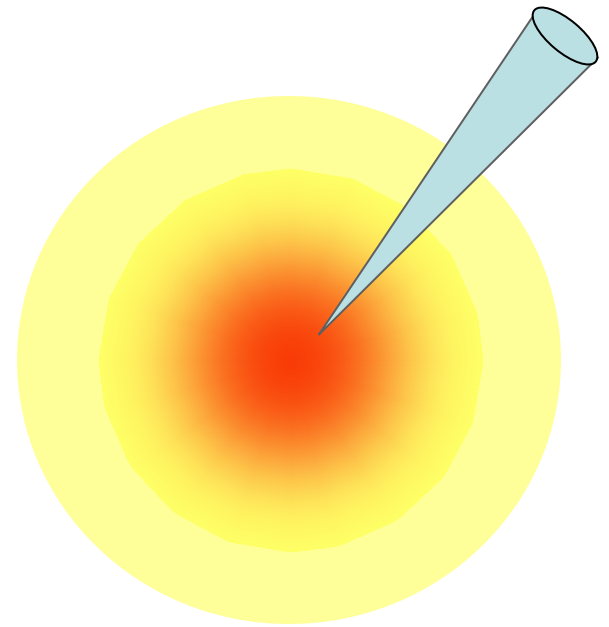


INDAGINI QUANTITATIVE: IMMUNOPRECIPITAZIONE SU GEL IMMUNODIFFUSIONE (ID)

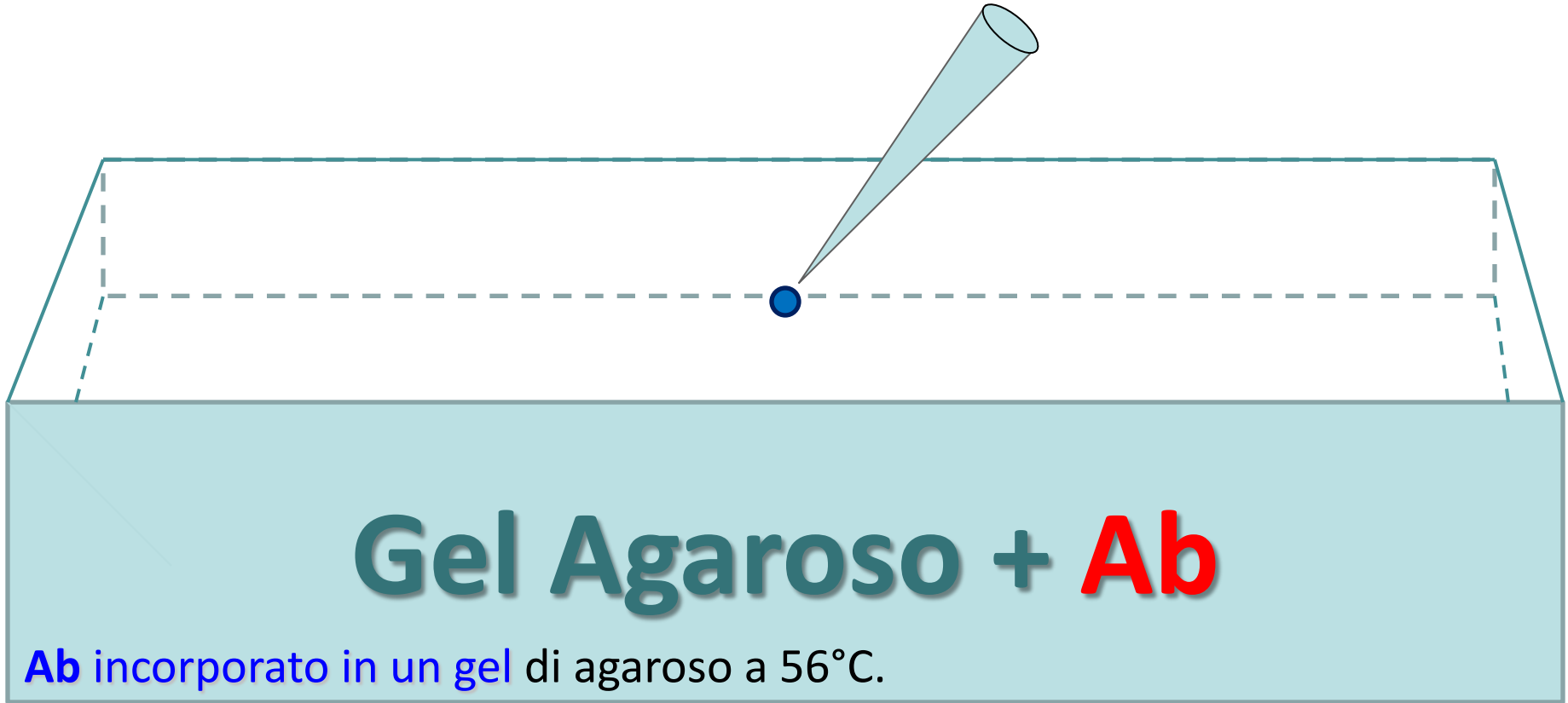
Concetto : antigeni solubili diffondono in gel di agarosio creando un gradiente di concentrazione.

Max [Ag]: in corrispondenza del punto di deposizione dell'Ag.

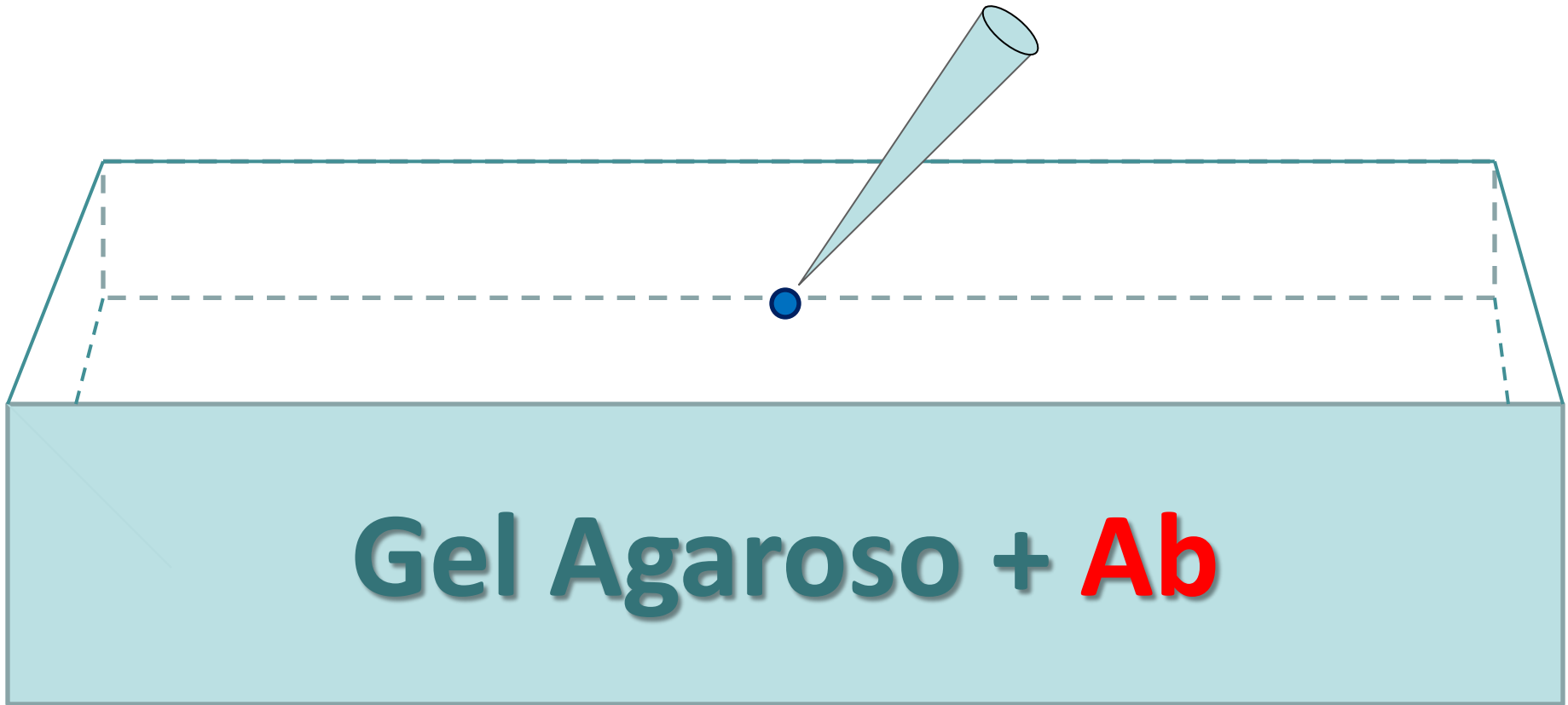
Min [Ag]: alla massima distanza dal punto di deposizione dell'Ag.



IMMUNODIFFUSIONE RADIALE SEMPLICE (SRID)



IMMUNODIFFUSIONE RADIALE SEMPLICE (SRID)



● = Concentrazione
massima



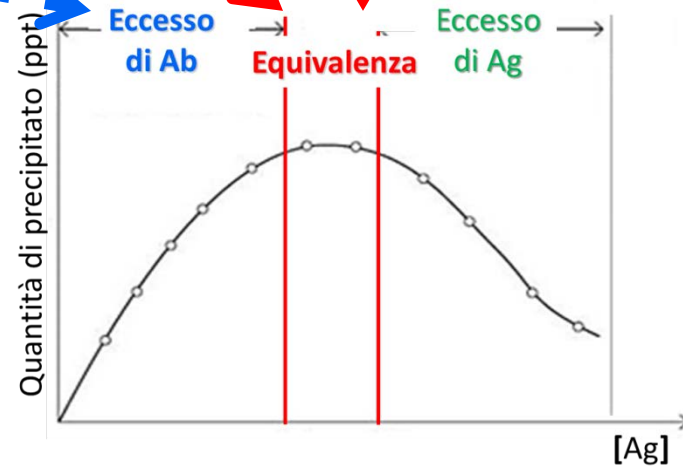
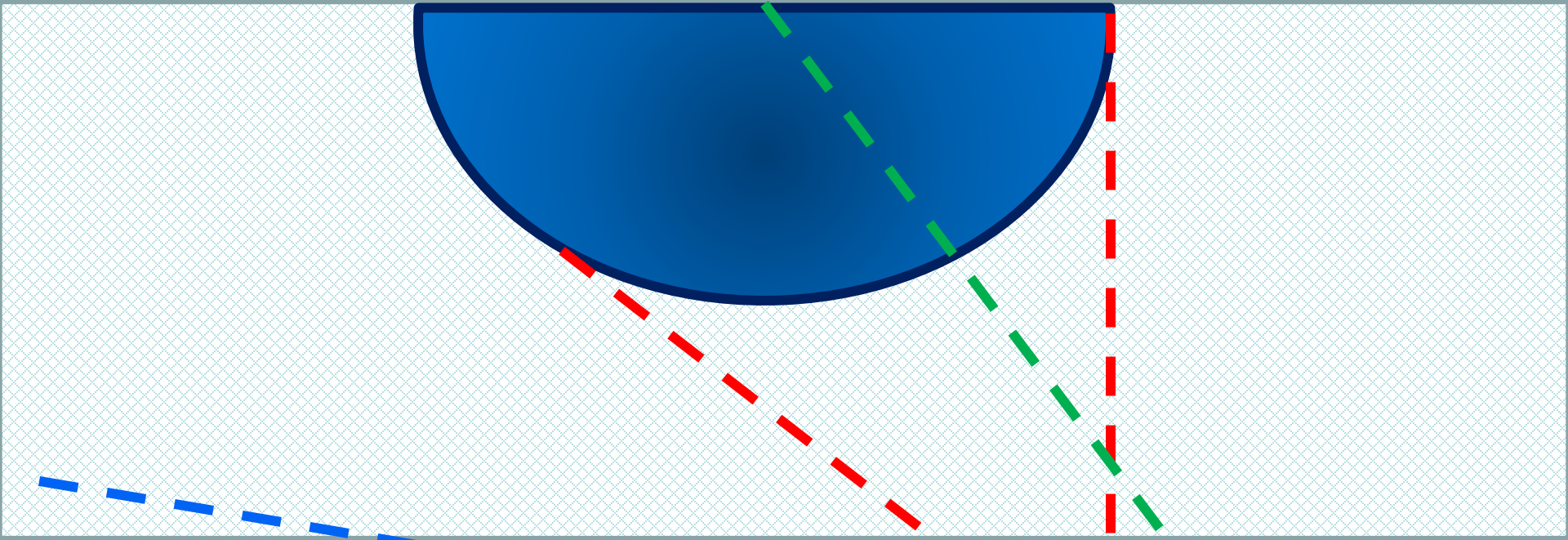
IMMUNODIFFUSIONE RADIALE SEMPLICE (SRID)



● = Concentrazione
massima

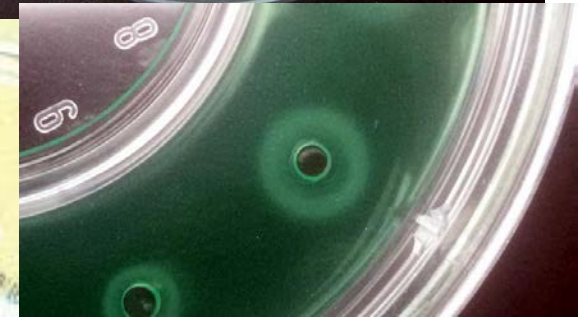
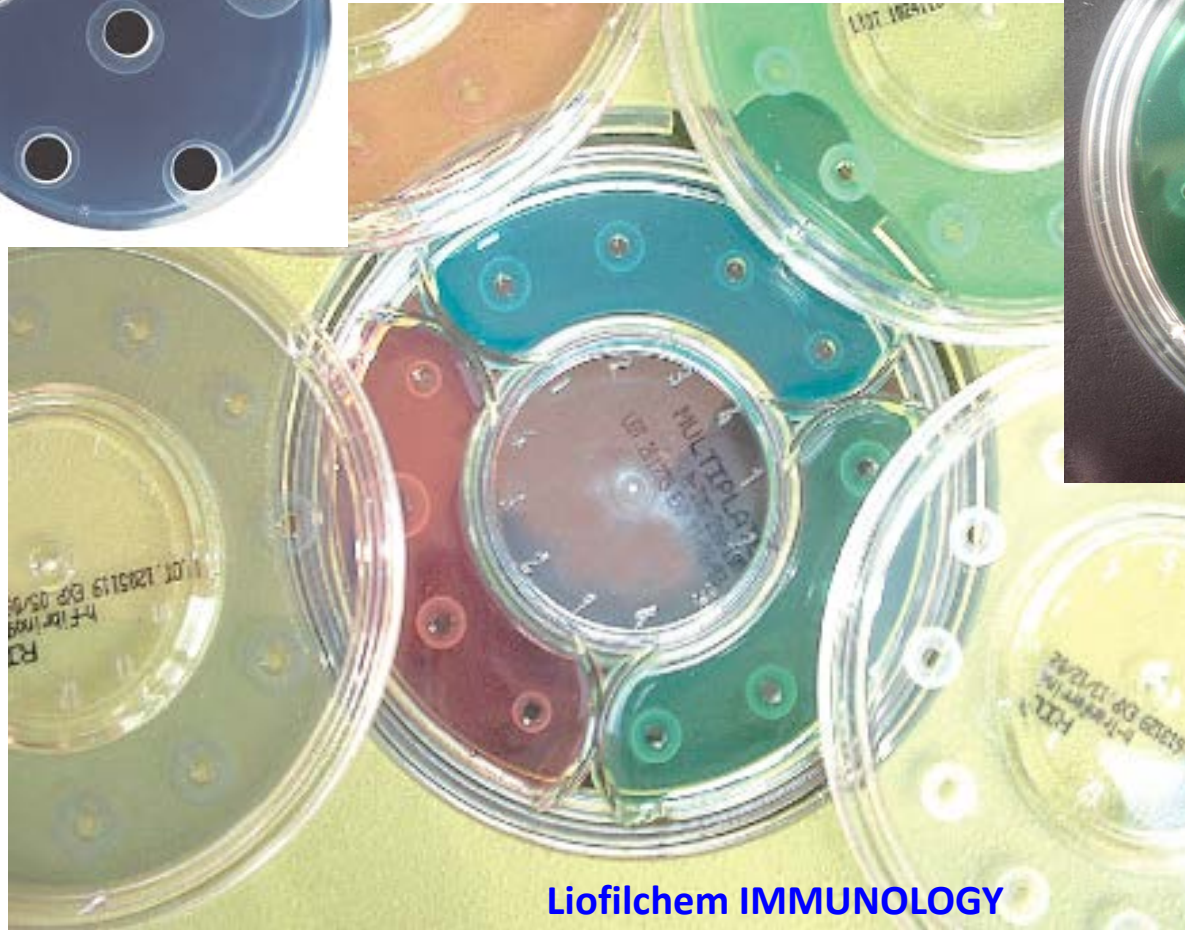
○ = Zona di equivalenza

IMMUNODIFFUSIONE RADIALE SEMPLICE (SRID)



● = Concentrazione massima

PIASTRE PER SRID



Contengono **coloranti** per evidenziare gli immunocomplessi.

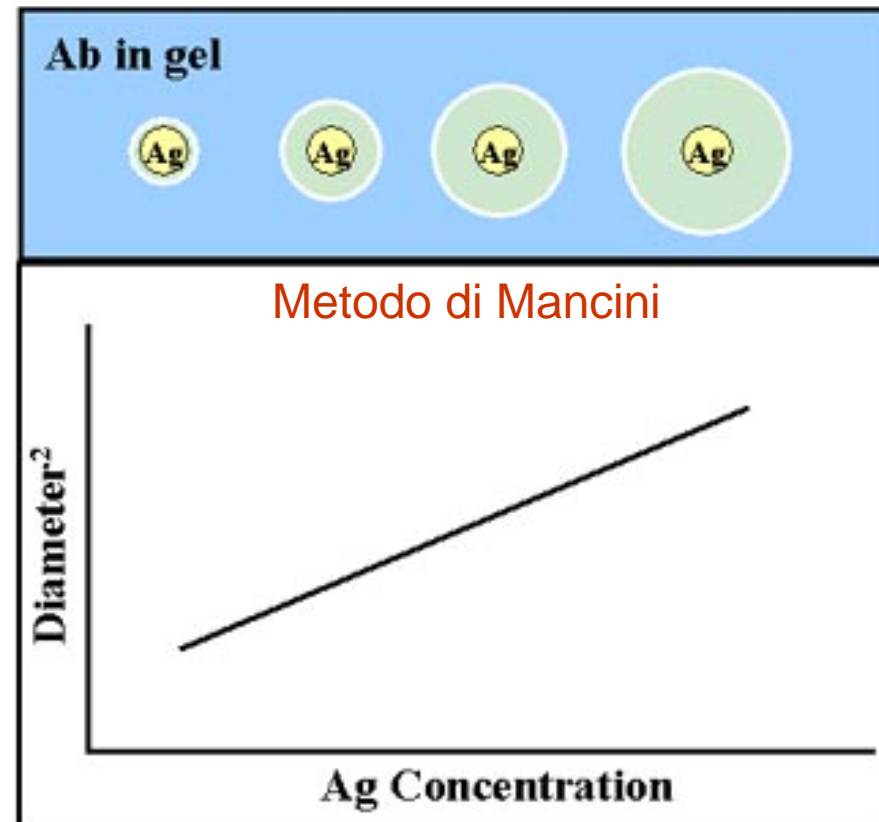
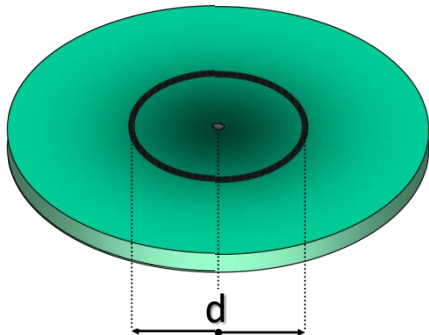
IMMUNODIFFUSIONE RADIALE SEMPLICE (SRID)

- **Ab** incorporato in un gel di agarosio a 56°C.
- **Ag** aggiunto in pozzetti → **diffusione** → formazione di un **gradiente** → **anelli di precipitato** al punto di equivalenza.

- Possibile realizzazione di una curva standard →

test quantitativo.

- \varnothing degli anelli proporzionale alla **[Ag]**.



IMMUNODIFFUSIONE RADIALE SEMPLICE (SRID)

- **Ab** incorporato in un gel di agarosio a 56°C.



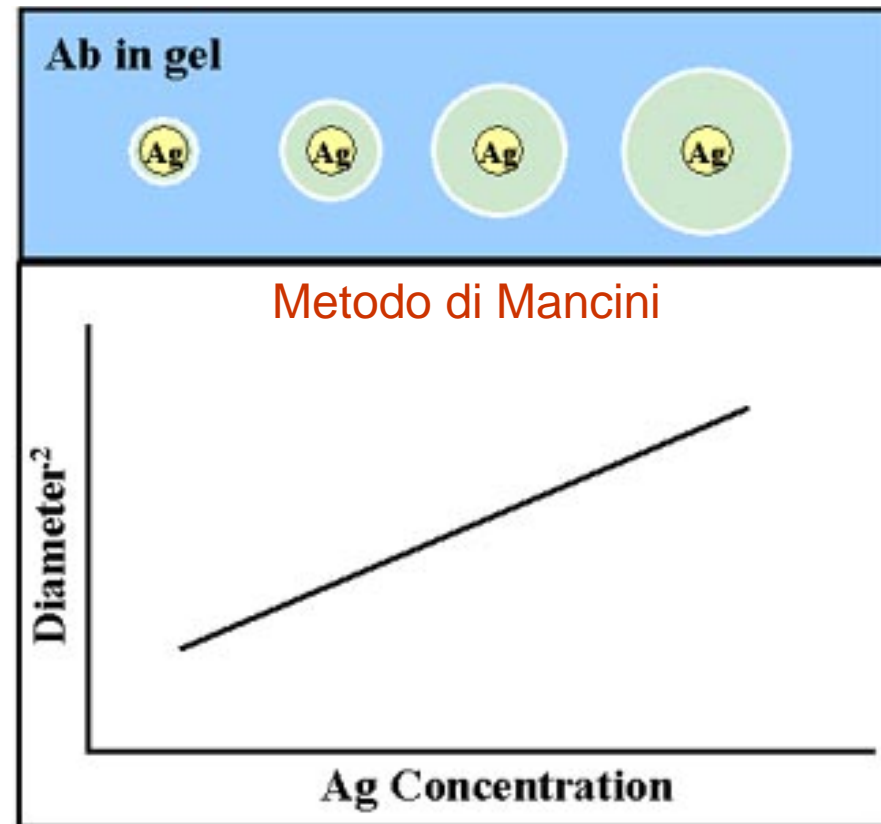
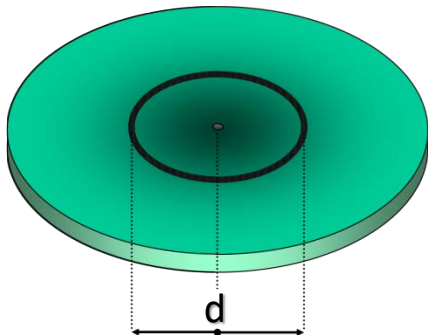
- **Ag** aggiunto in pozzetti → **diffusione** → formazione di un **gradiente** → **anelli di precipitato**

al punto di equivalenza.

- Possibile realizzazione di una curva standard →

test quantitativo.

- \varnothing degli anelli proporzionale alla **[Ag]**.



ESEMPIO DI SRID

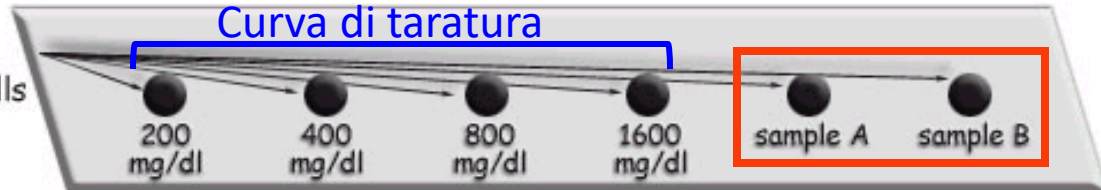
Usata per misurare i livelli sierici di IgG, IgM e IgA in alcune patologie. **L'Ag ricercato può essere un Ab!**

REAGENTS:

agar gel impregnated with antiglobulins (anti-IgG)



1. add serum sample & IgG standards to wells



2. allow time for diffusion of IgG's into gel



3. precipitin rings form at site of optimal IgG:anti-IgG concentration

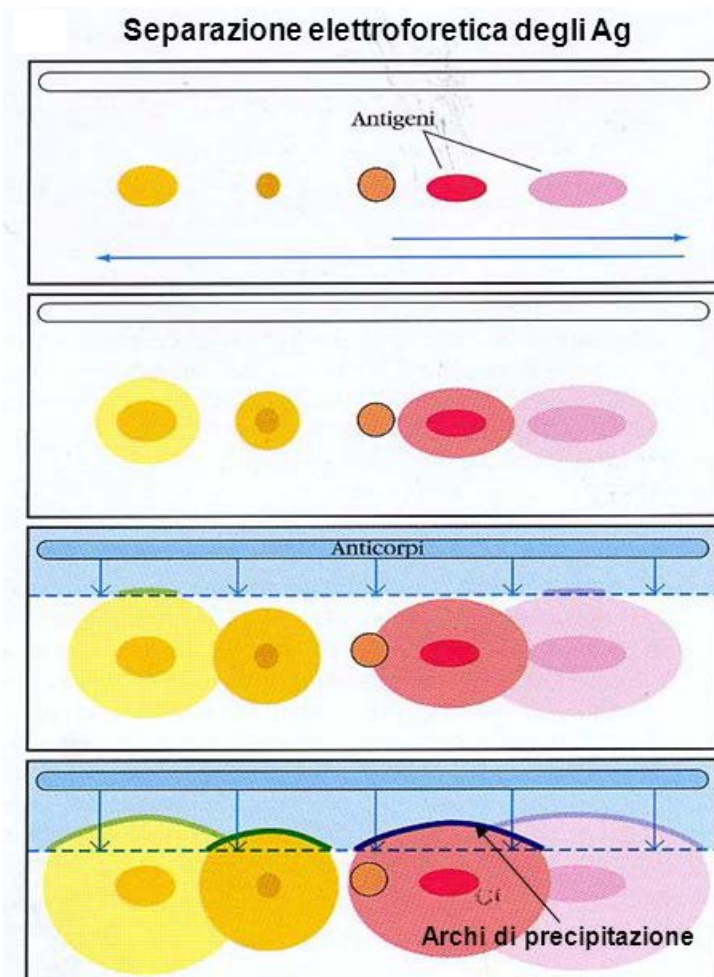


4. measure ring diameters (proportional to IgG concentrations)

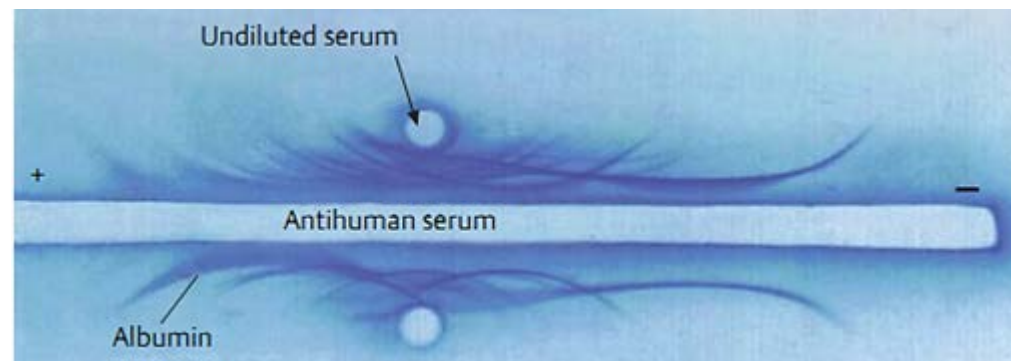


IMMUNOELETTROFORESI

1. **Miscela di Ag**, separati per **elettroforesi** su agarosio.
2. Deposizione e **diffusione** di **Ab**.
3. Formazione di **archi di precipitazione (zona di equivalenza)**.

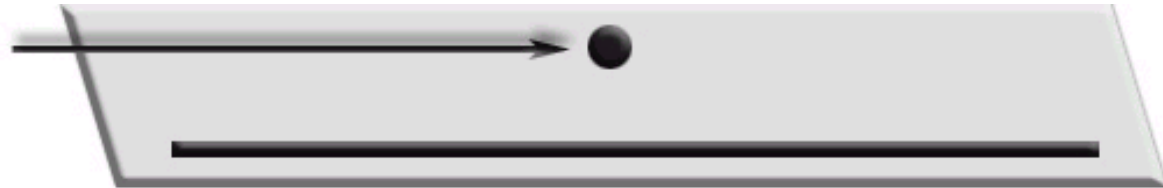


- Misura **qualitativa**.
- Possibile stima **quantitativa** (spessore delle bande di precipitazione).
- Es. analisi: le componenti sieriche.



IMMUNOELETTROFORESI - FASI

1. Add serum to well



2. Electrophorese serum proteins

Positive ← ● → ● ● ● ● → Negative



3. Add antiserum to slot



4. allow time for diffusion of:
• serum proteins
• Ab's in antiserum



5. stain gel & read precipitin lines



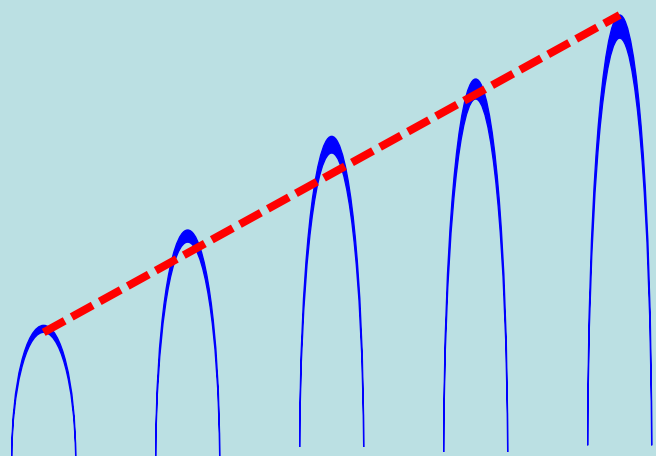
Usata su campioni di **siero**, **urina**, e liquido spinale.

IMMUNOELETTROFORESI ROCKET

Bande di precipitazione a forma di **razzo**, la cui **altezza** è proporzionale alla **[Ag]**. **Tecnica quantitativa.**

+

[Ab] costante nel gel (agaroso)



Ag: pl basso per garantire una carica **negativa**

Ab: preferibilmente con carica **nulla** o **positiva**, come normalmente avviene a **pH 8.6.**

Pozzetti per l'Ag

Concentrazione
crescente di Ag

pH 8.6

Modificazione della SRID

IMMUNOELETTROFORESI ROCKET

Bande di precipitazione a forma di **razzo**, la cui **altezza** è proporzionale alla **[Ag]**. **Tecnica quantitativa.**

Human Serum Albumin, pI ~4.7

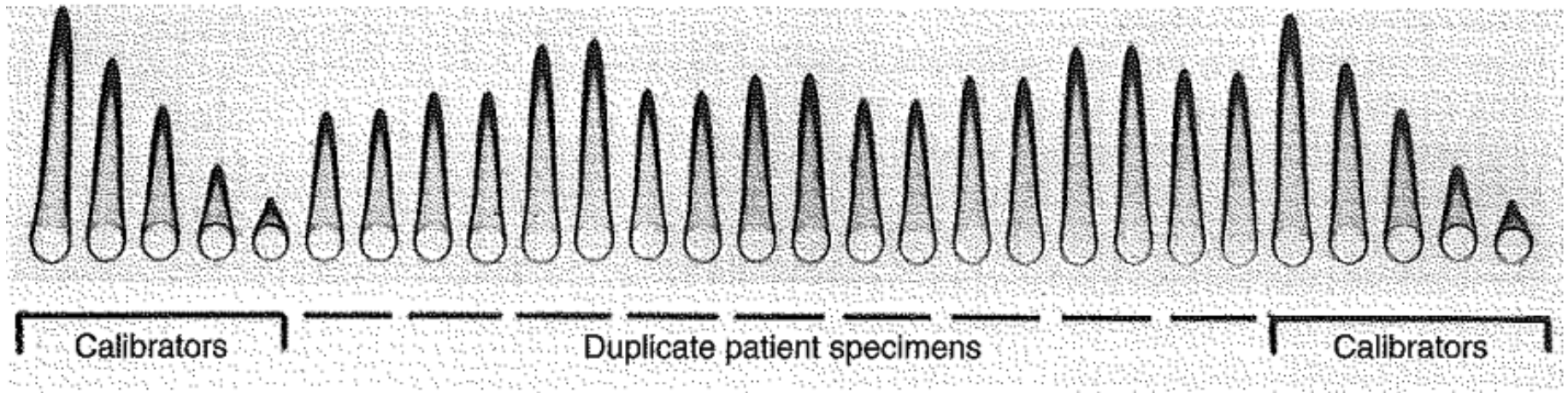
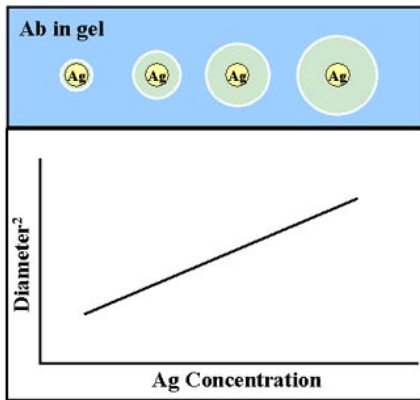


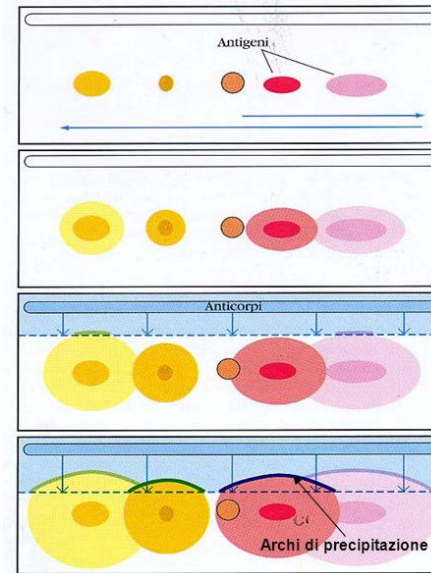
Figure 10-11 Rocket immunoelectrophoresis of human serum albumin. Patient samples were applied in duplicate. Calibrators were placed at opposite ends of the plate.

CONFRONTO FRA TECNICHE

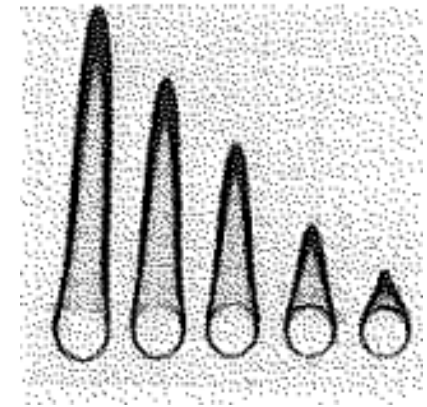
SRID



IMMUNOELETTROFORESI



IMMUNOELETTROFORESI ROCKET

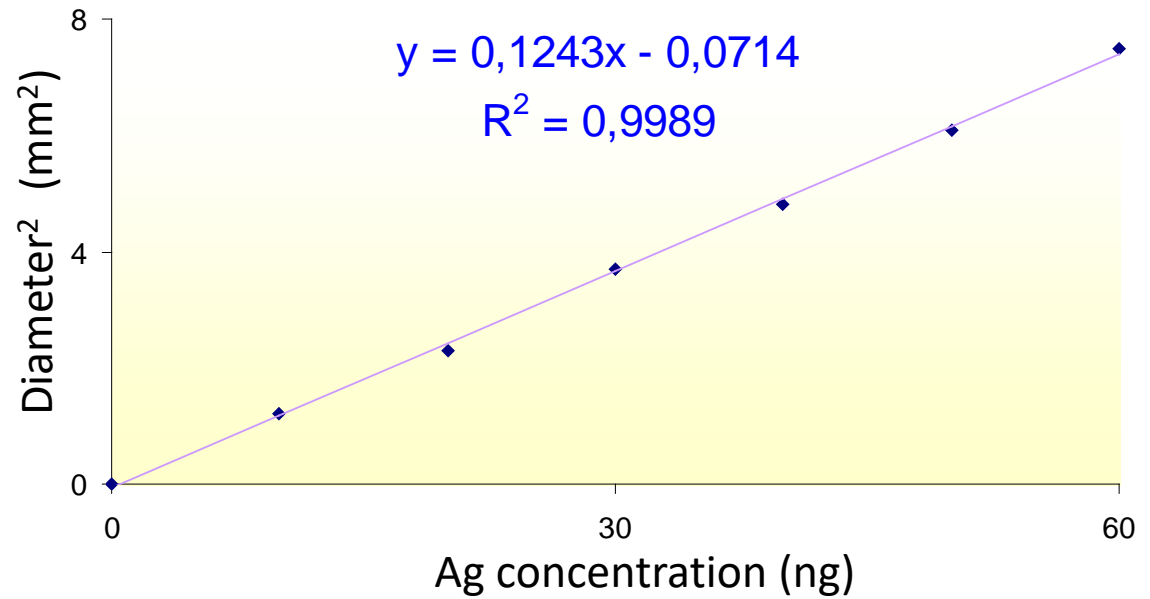
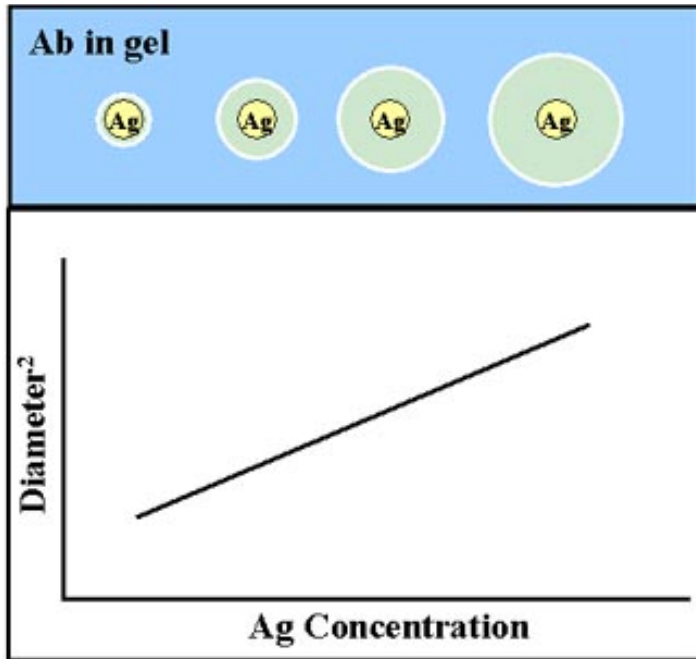


Diffusione
e
precipitazione

Elettroforesi,
poi
diffusione
e
precipitazione

Elettroforesi
e
precipitazione

ESERCIZIO SULLA SRID

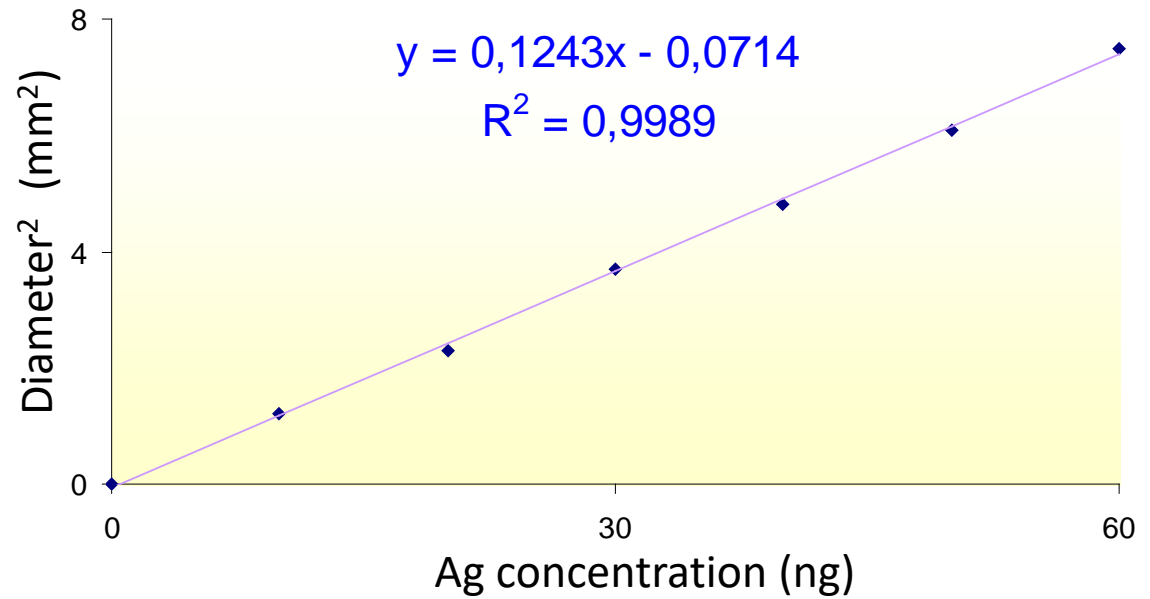
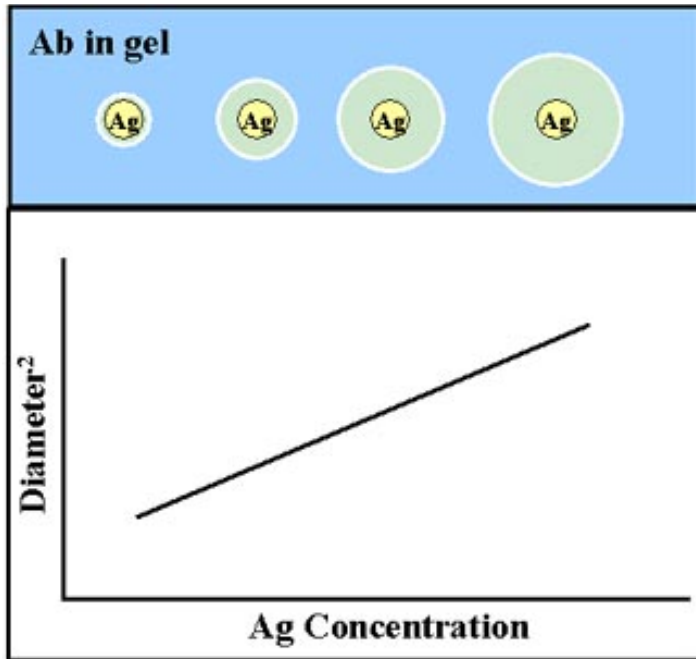


$$Y = 4.2 \text{ mm}^2$$

$$X =$$



ESERCIZIO SULLA SRID



$$Y = 4.2 \text{ mm}^2$$

$$X = 34.4 \text{ ng}$$