

Cds in Scienze e Tecnologie Biologiche

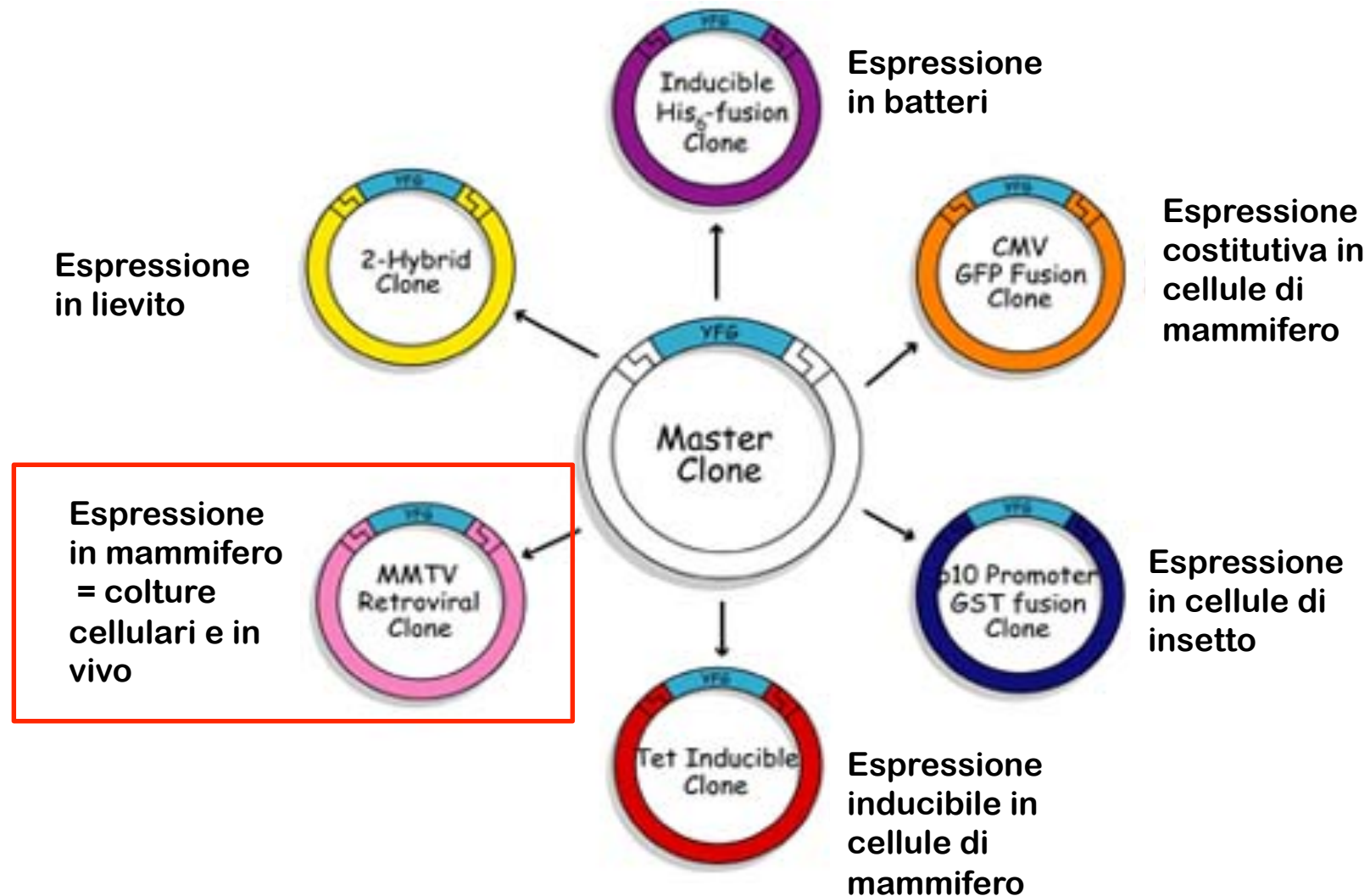
AA 2018-2019

Corso di Laboratorio di Biologia Cellulare

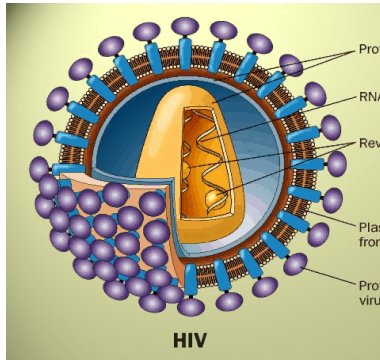
Lezione 5

**Trasferimento di DNA esogeno
in cellule di mammifero in coltura o in vivo:
metodi biologici**

Metodi biologici I: vettori derivati da virus



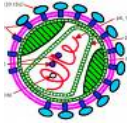
Trasferimento genico mediato da virus



Diversi tipi di **virus** possono essere **modificati** per ottenere **vettori** per il trasferimento di geni non virali mediante l'**infezione** di cellule eucariotiche.

I **virus ricombinanti** possono essere **impaccati in particelle infettive** in speciali linee cellulari, che esprimono le proteine del capside virale (*packaging cell line*).

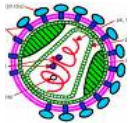
Trasferimento genico mediato da virus



Infezione stabile (random):

Retrovirus – hanno la capacità di **integrarsi** nel genoma di cellule **proliferanti**

Lentivirus – si integrano anche in cellule **quiescenti**
Utilizzati per cellule primarie in coltura ed anche **in vivo**,
in cellule differenziate. Utilizzati in terapia genica.

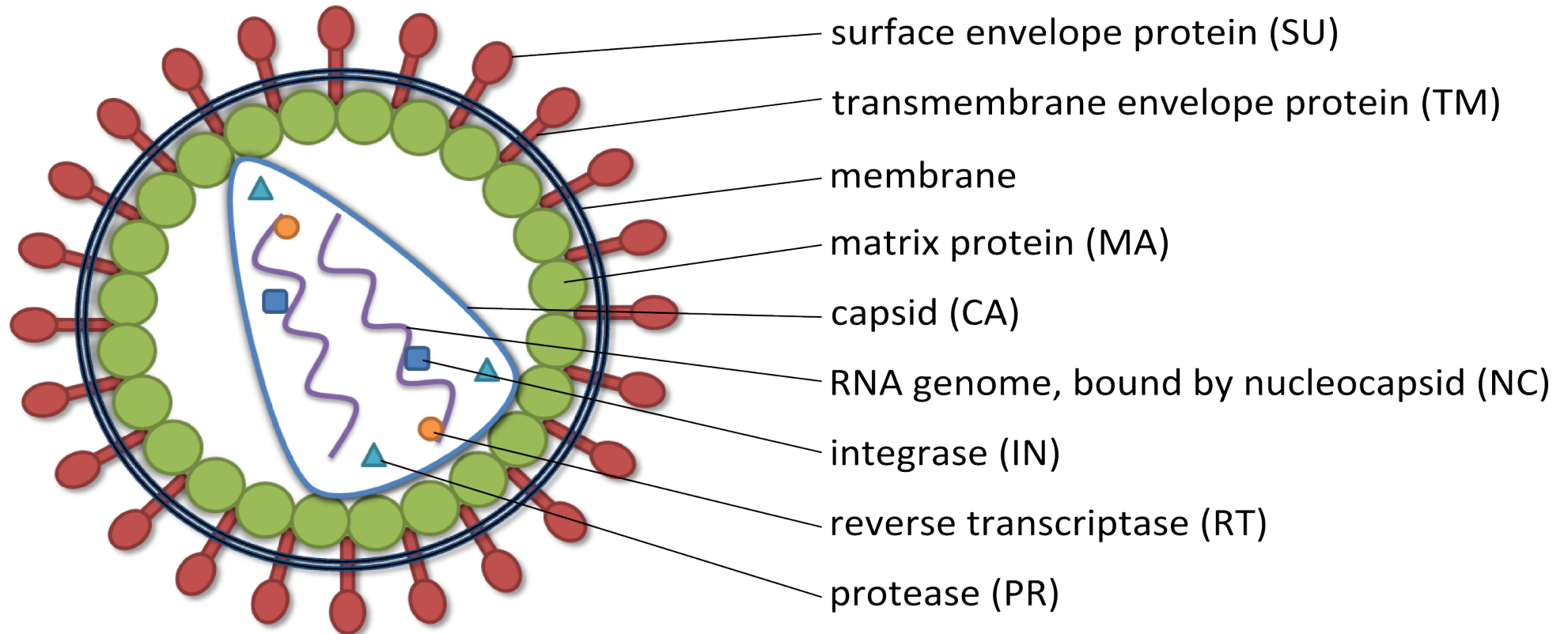


Infezione transiente:

Adenovirus e AAV – infettano anche cellule quiescenti,
ma **non** hanno la capacità di **integrarsi** nel genoma cellulare.

Baculovirus -per produrre grandi quantità di proteine da purificare.
Infettano **cellule di insetto** (lepidottero).

Retrovirus e lentivirus

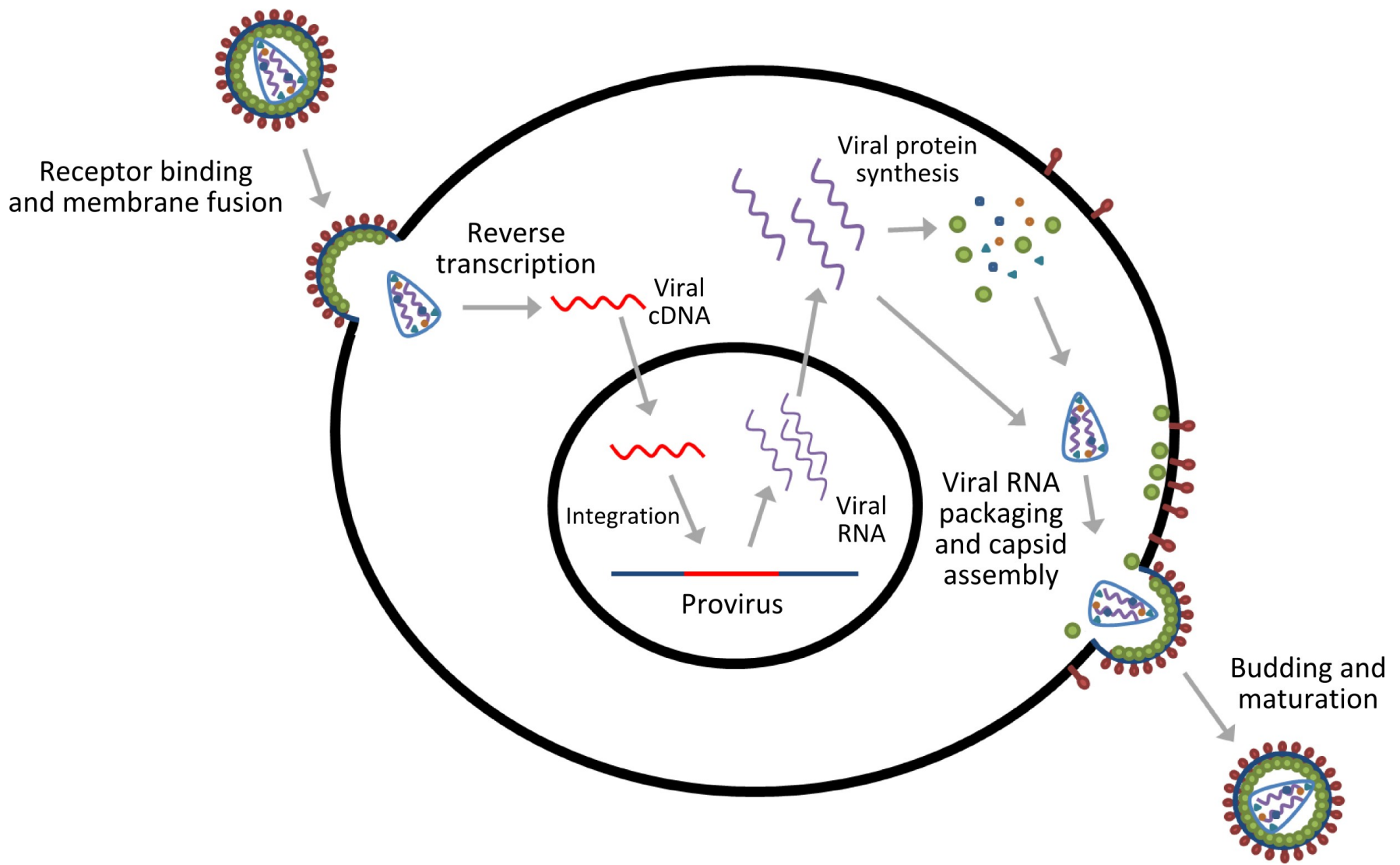


POL codifica per gli enzimi **RT, PR e IN**.

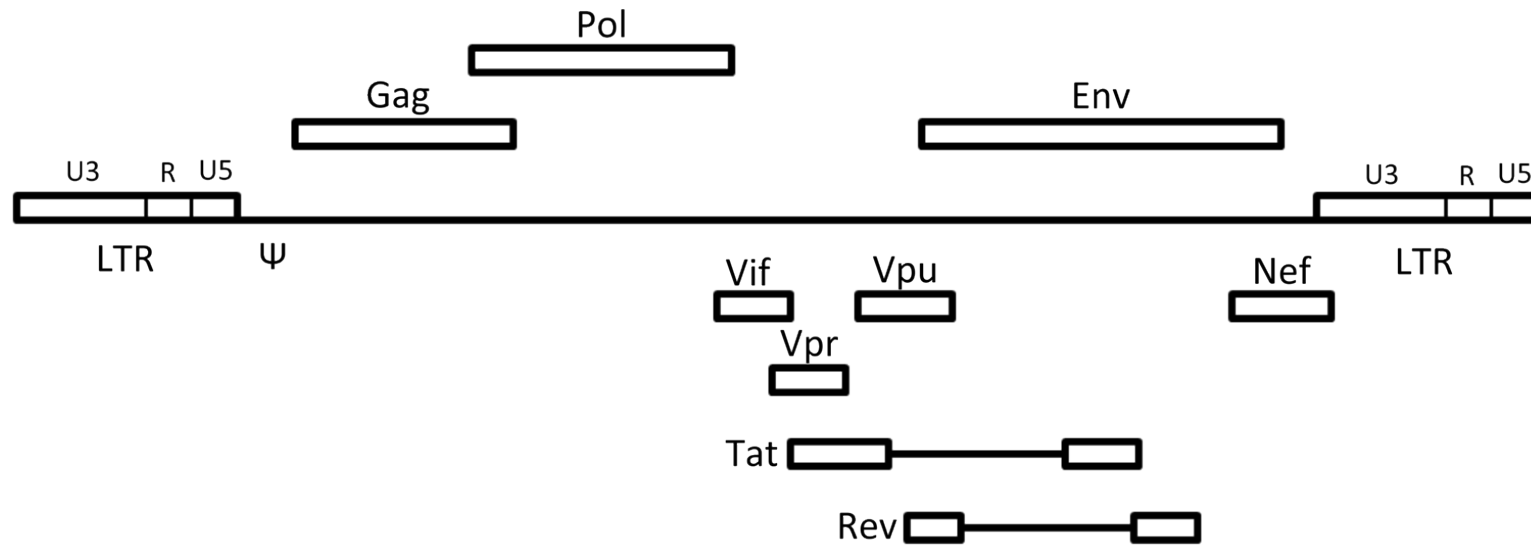
GAG codifica per proteine della **matrice** e **capside** MA CA, NC

ENV codifica per glicoproteine di **superficie** e transmembrana SU e TM

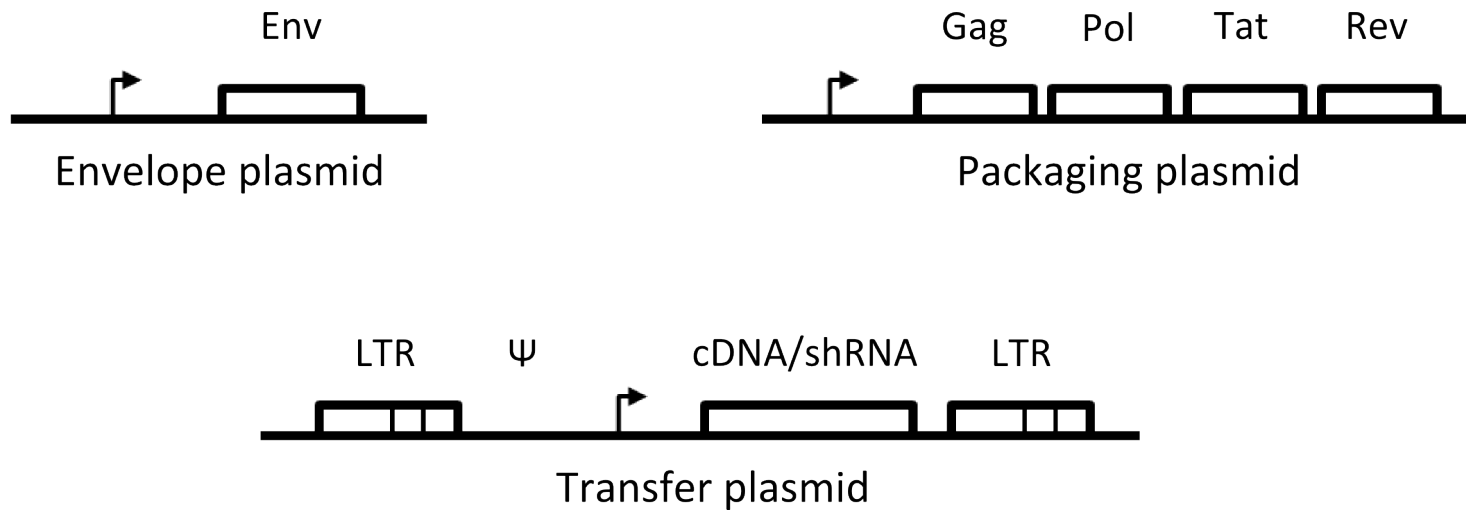
Il ciclo retrovirale



Struttura del provirus integrato



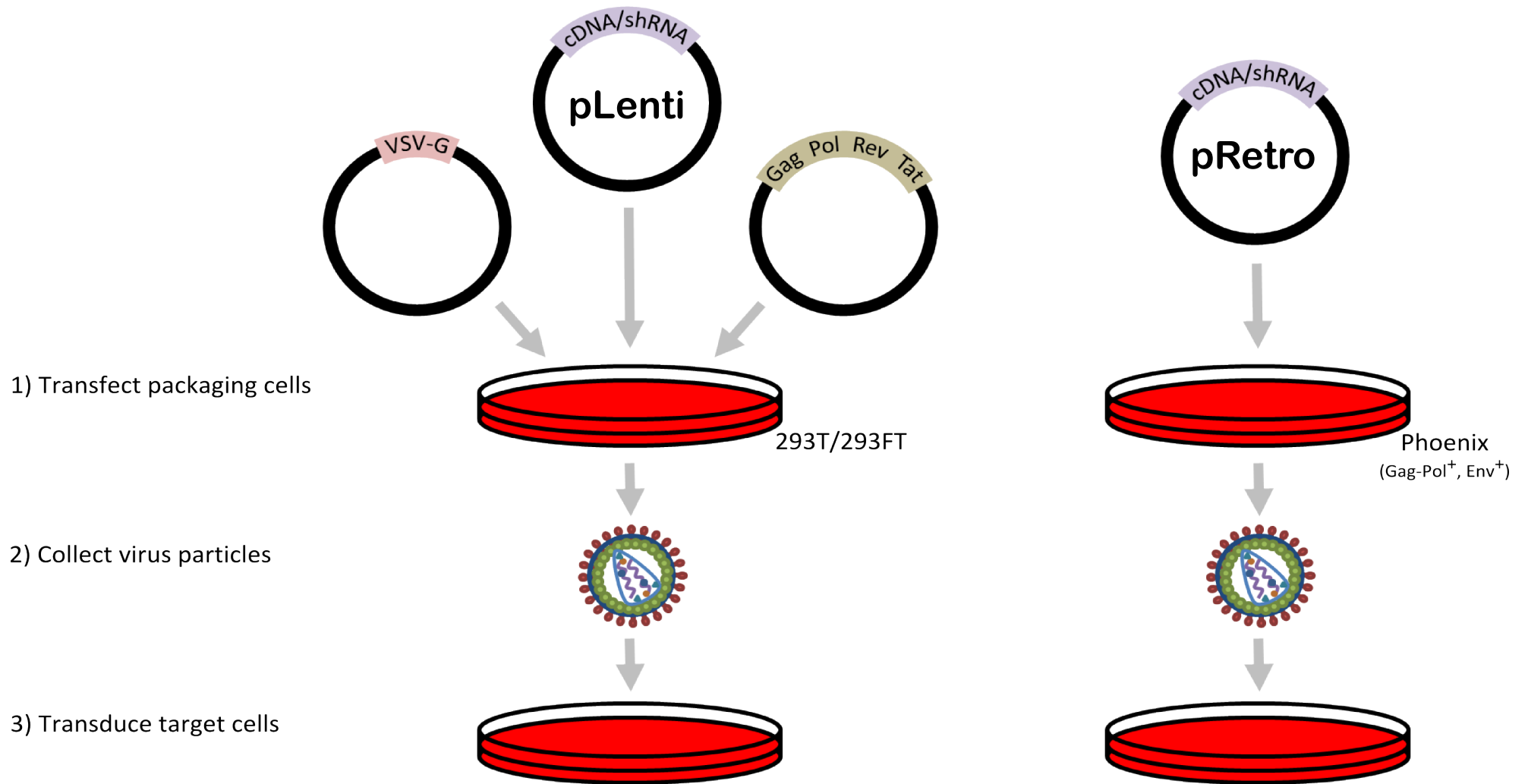
Preparazione di virus ricombinanti per trans-complementazione



Preparazione di virus ricombinanti per trans-complementazione

Lentivirus

Retrovirus



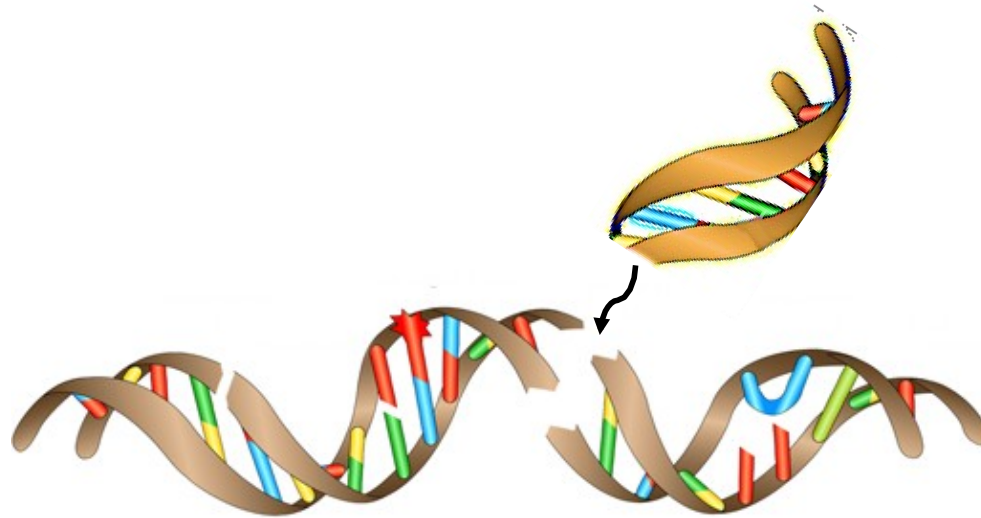


Sicurezza nell'utilizzo dei vettori retro- e lenti-virali

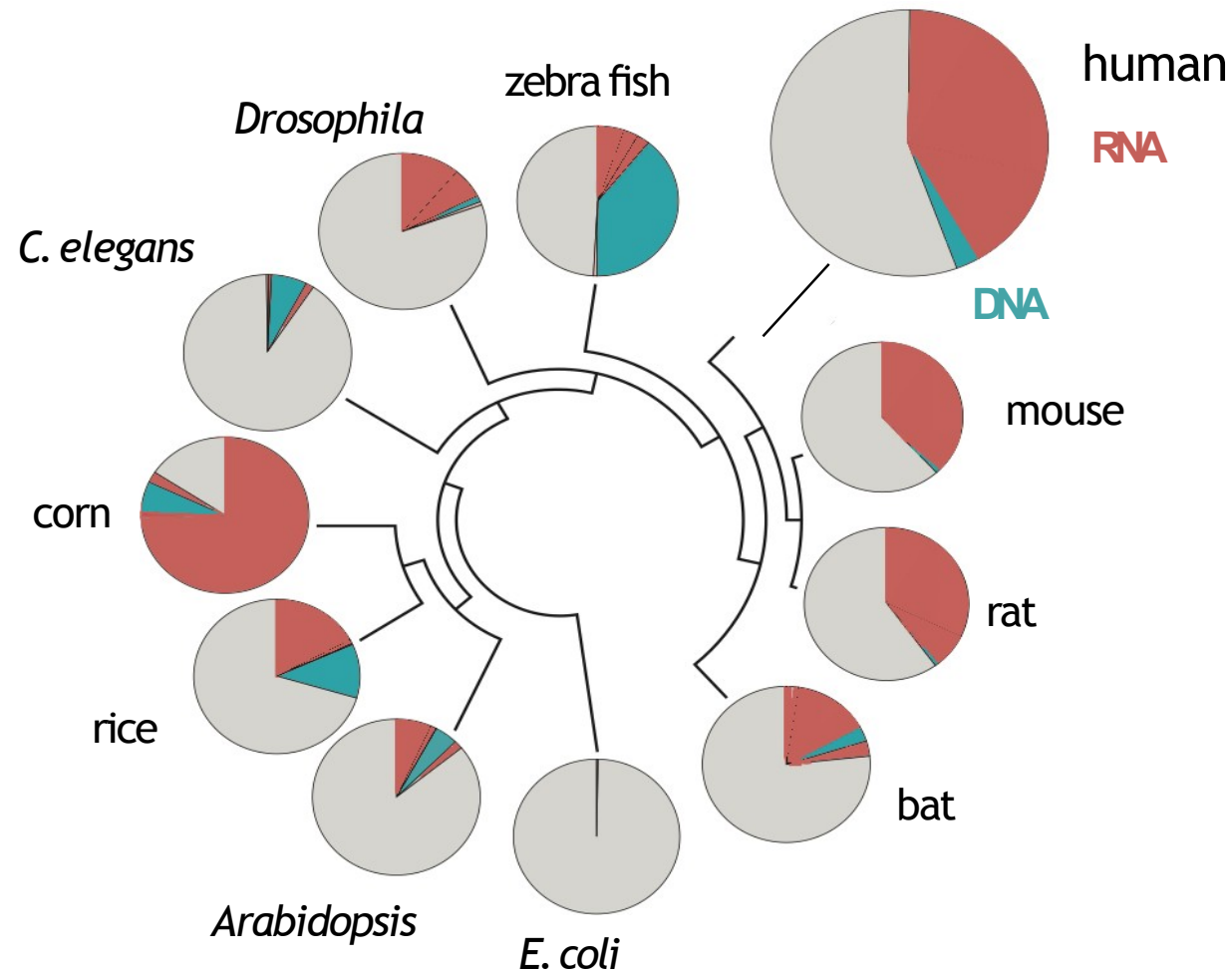
Principali rischi:

1. **Generazione di virus contaminanti competenti per la replicazione (ricombinazione con virus endogeni)**
 2. **Potenziale oncogenico per integrazione random (in vivo)**
 3. **Potenziale tossicità del transgene.**
-
1. **I vettori lentivirali di 2 e 3 generazione hanno diverse caratteristiche di sicurezza (vettori separati packaging & enzimatici)
molti sono vettori auto-inattivanti (delezione del 3' LTR)**
 2. **Vettori lentivirali integration-defective o che si integrano per HR (promotore specifico)**

**Utilizzo di TRASPOSONI per l'introduzione di DNA
esogeno in cellule in coltura o in vivo**

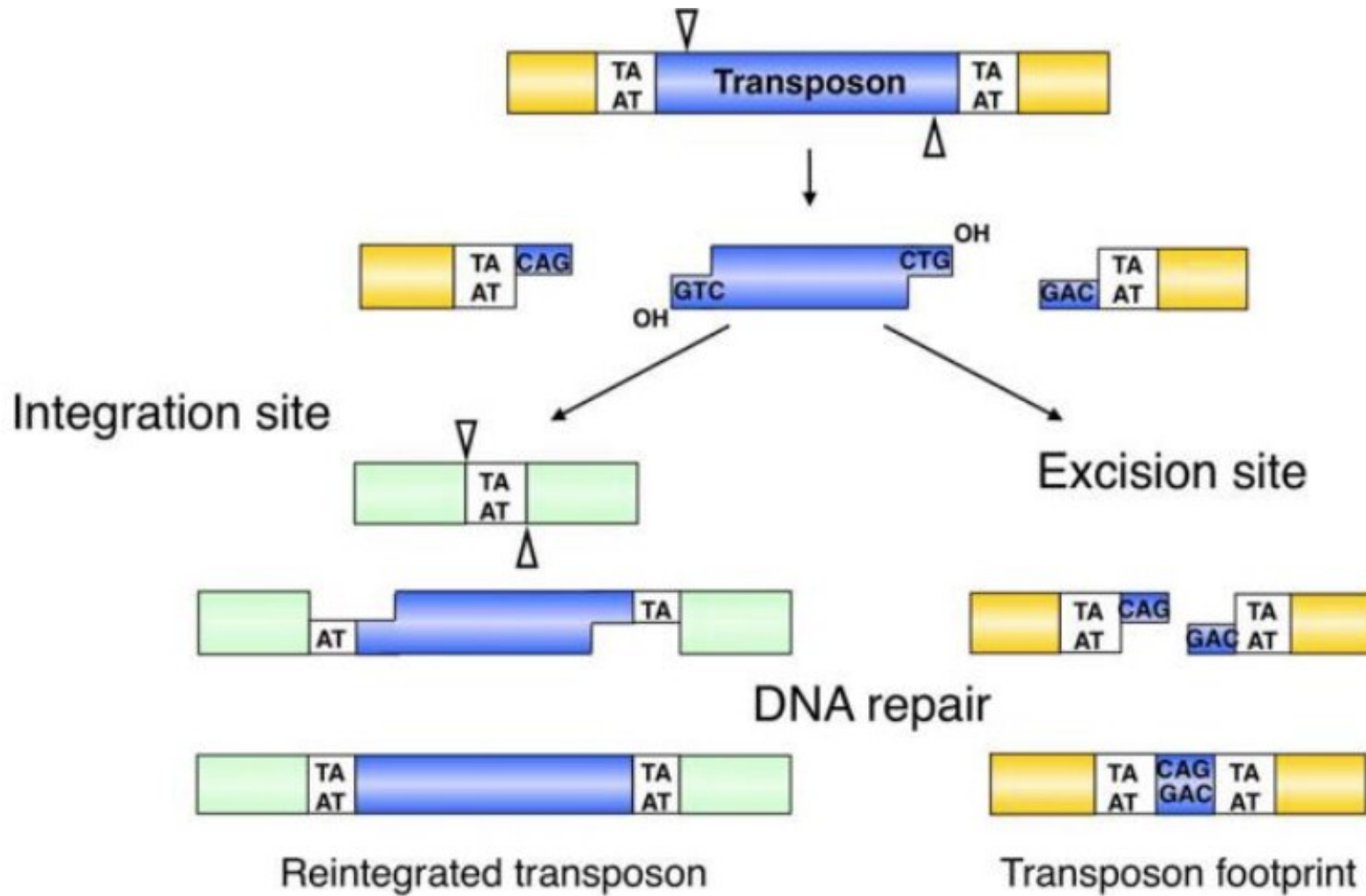


Utilizzo di TRASPOSONI per l'introduzione di DNA esogeno in cellule in coltura o in vivo



Adapted from Huang, Burns, Boeke. Annu Rev Genet. 2012

Meccanismo della trasposizione a DNA "cut and paste"



Vettori derivati da transposoni: SLEEPING BEAUTY

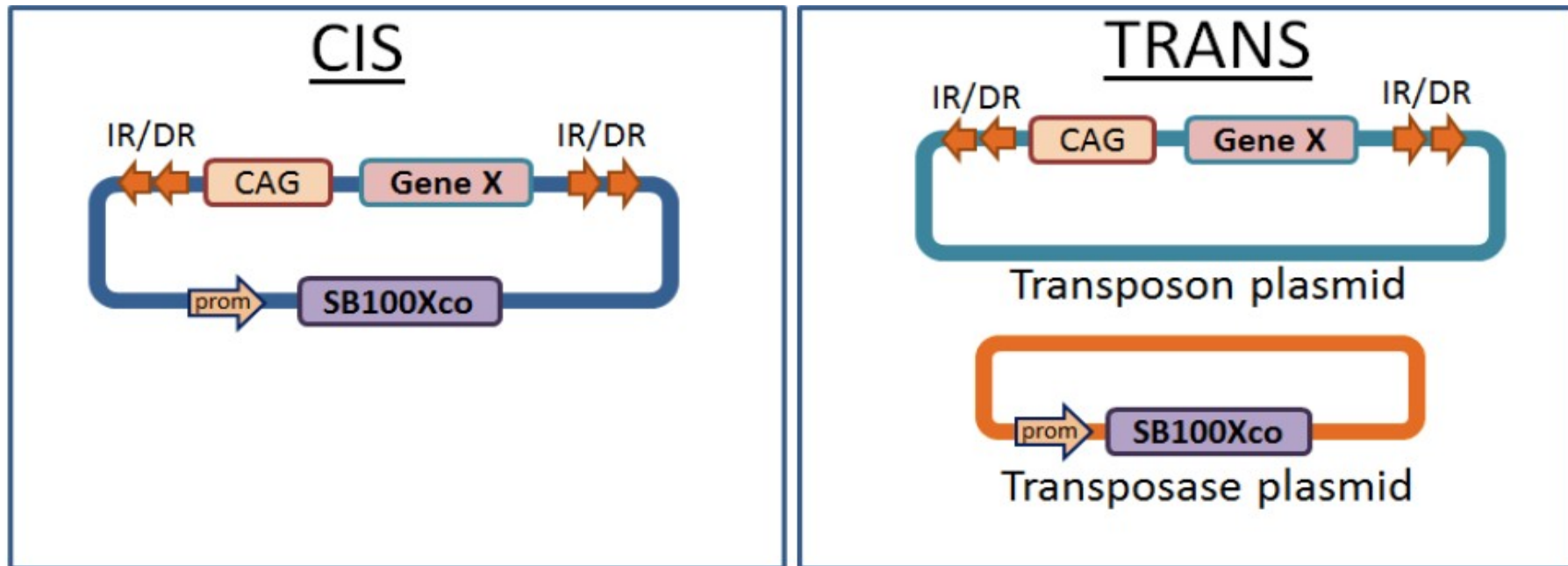


Figure 2: Schematics of Cis and Trans Sleeping Beauty plasmids.

Cds in Scienze e Tecnologie Biologiche

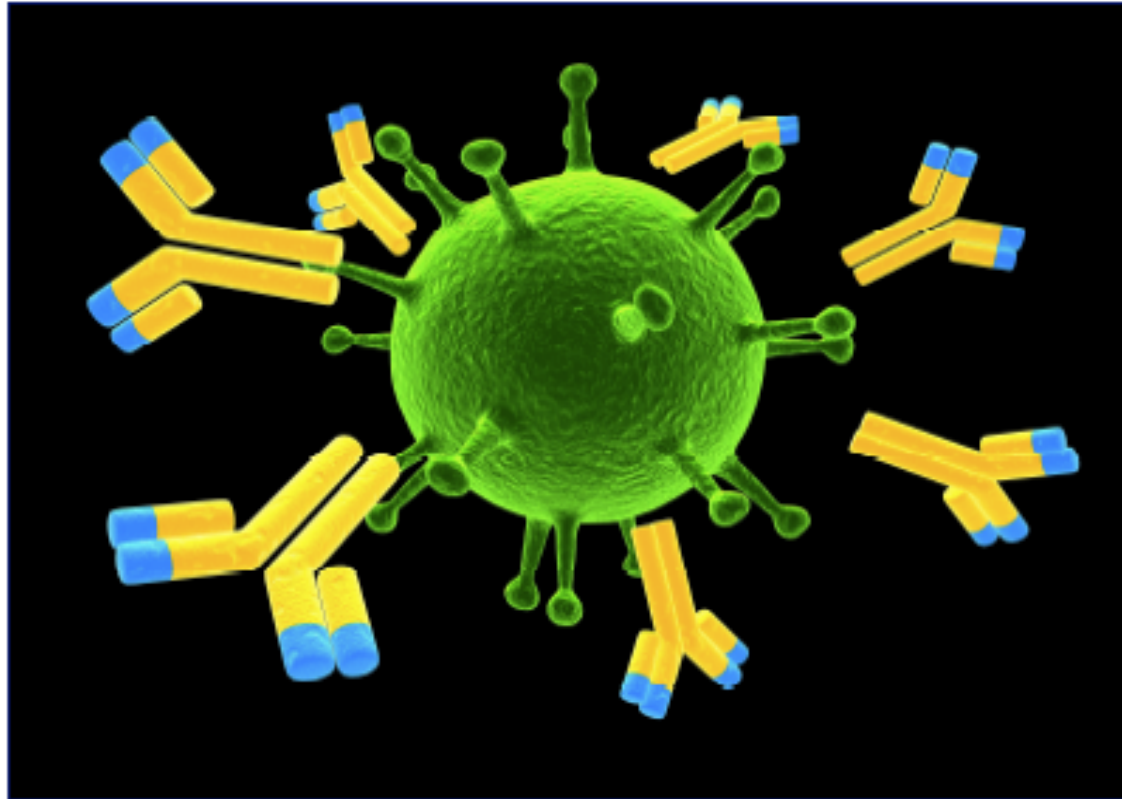
AA 2018-2019

Corso di Laboratorio di Biologia Cellulare

Lezione 5

Produzione di anticorpi per applicazioni biomediche

TECNICHE IMMUNOCHEMICHE

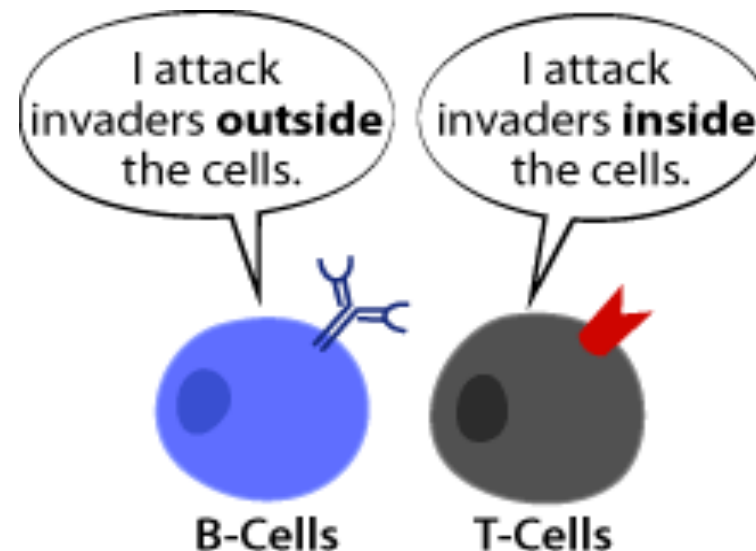


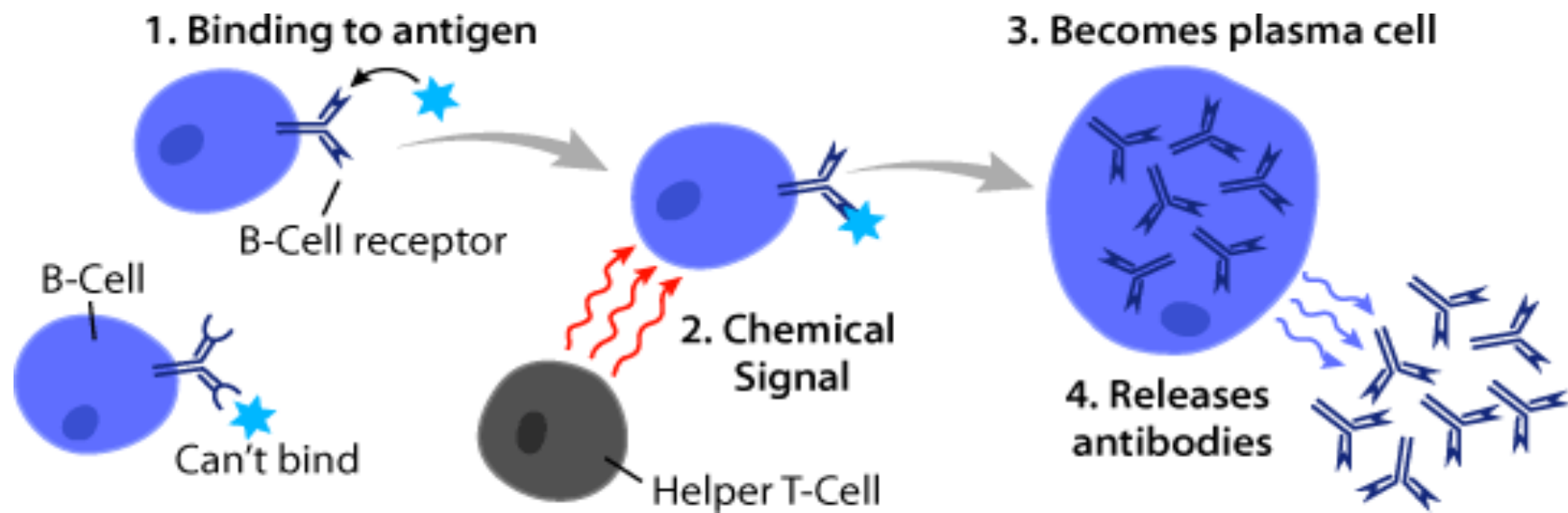
TECNICHE BASATE SULL'INTERAZIONE ANTIGENE-ANTICORPO

Il sistema immunitario distingue ciò che è proprio (self) da ciò che è estraneo all'organismo (not self).

Qualsiasi molecola o organismo patogeno capace di indurre una **risposta immunitaria** è detto **antigene**.

La risposta immunitaria umorale è mediata dagli **anticorpi (immunoglobuline, IG)** prodotti dai linfociti B, glicoproteine in grado di riconoscere antigeni specifici.

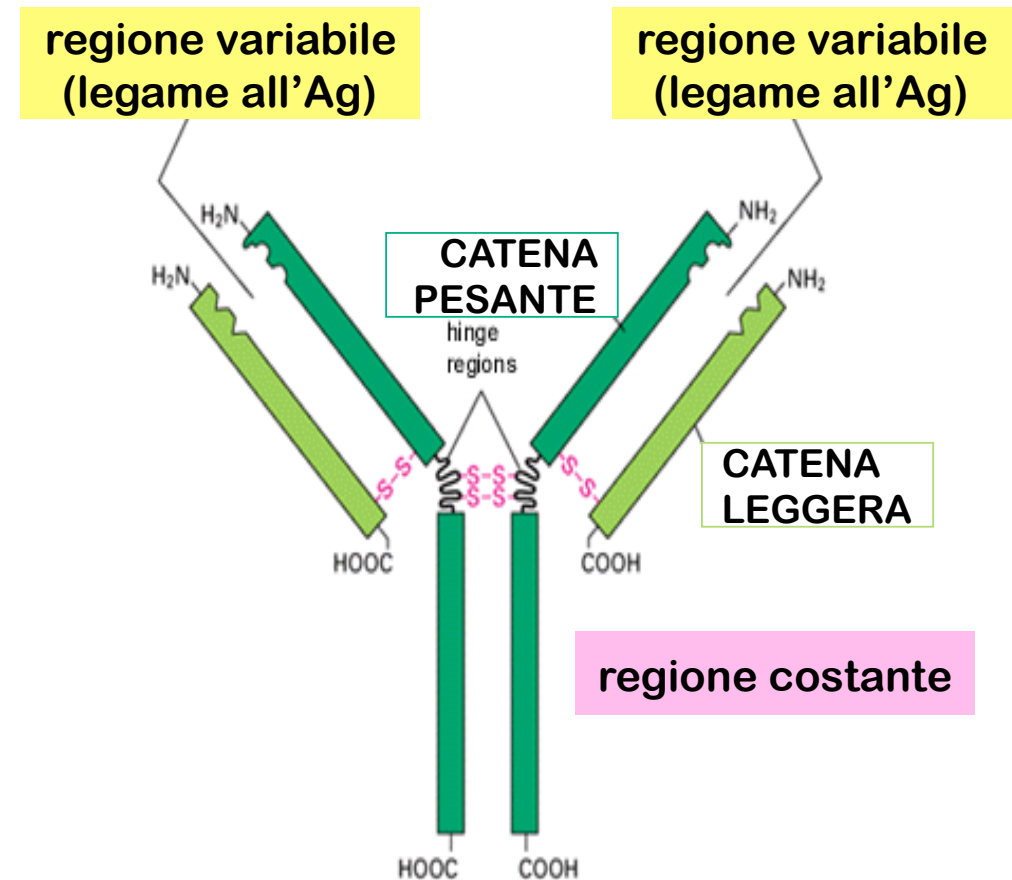




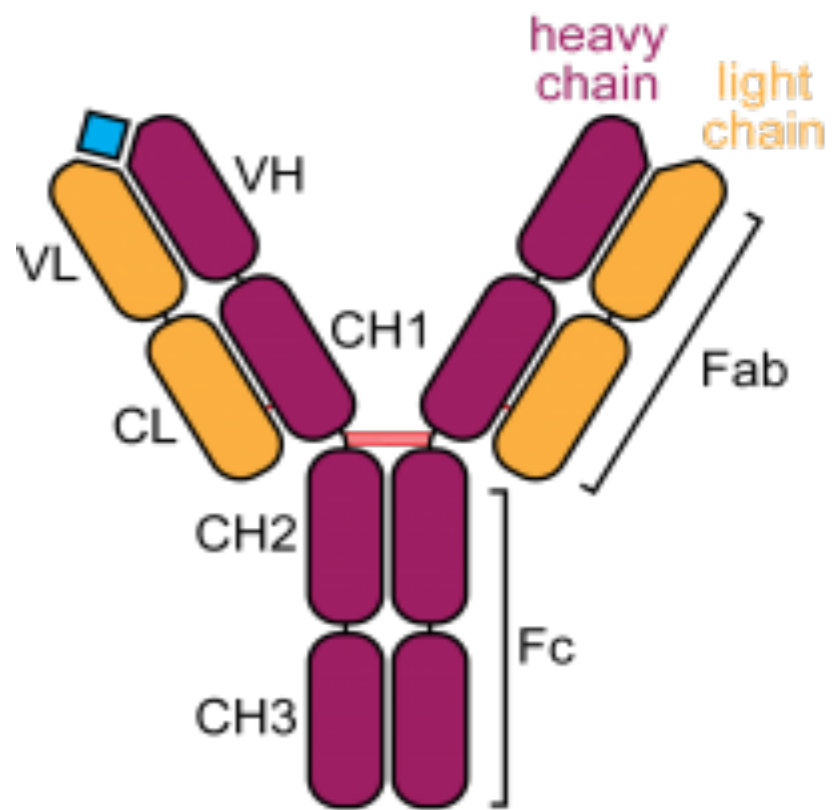
STRUTTURA degli ANTICORPI

Gli anticorpi sono **GLICOPROTEINE TETRAMERICHE** composte da 2 catene leggere e 2 catene pesanti uguali

- Sono in grado di riconoscere in modo estremamente specifico una determinata molecola (**antigene**)
- La specificità del **legame** antigene/ anticorpo è determinata dalla regione **VARIABLE** dell'anticorpo
- La regione **COSTANTE** svolge funzioni **strutturali**



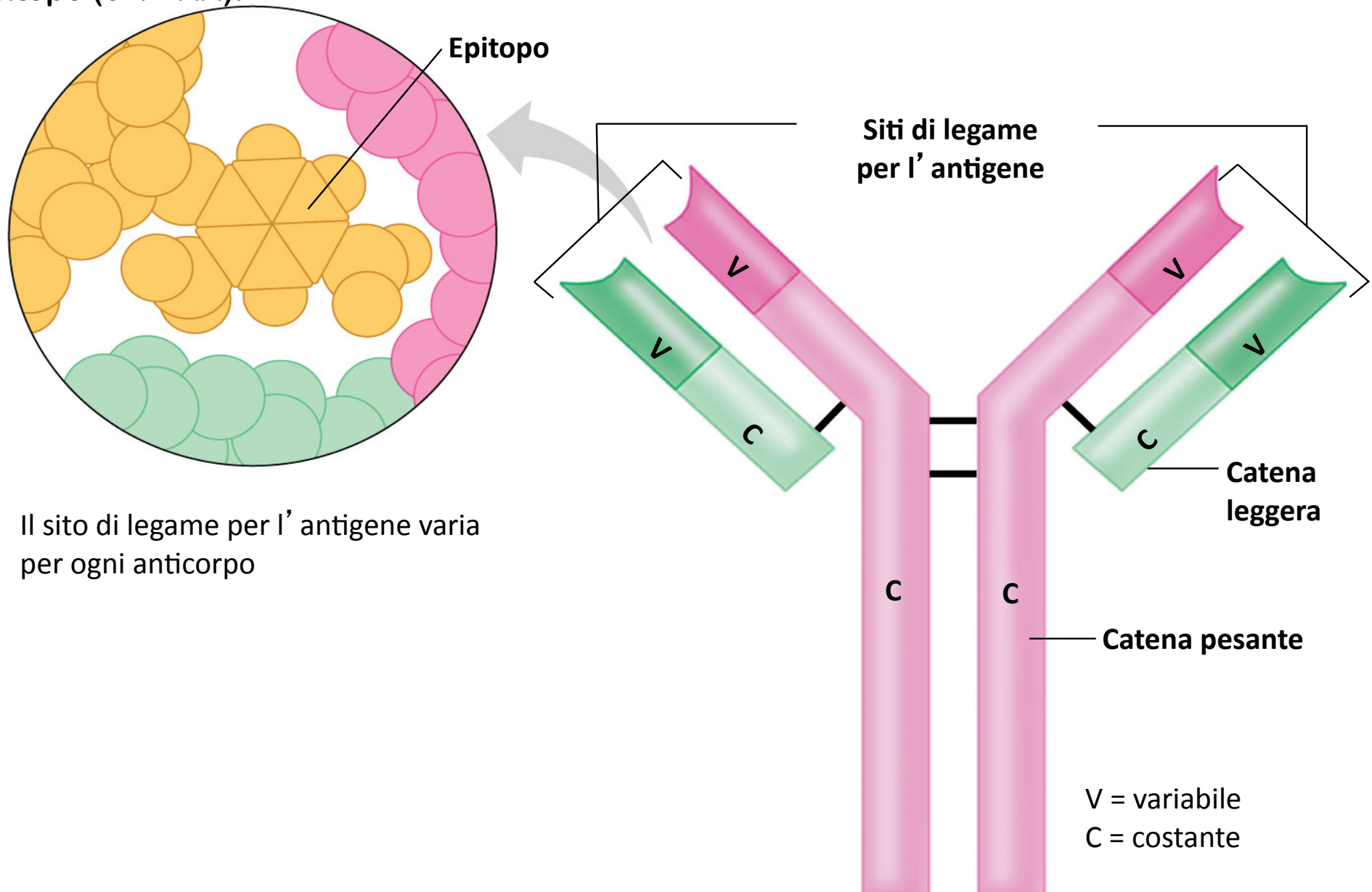
La regione costante definisce la CLASSE ANTICORPALE E LA FUNZIONE EFFETTRICE



Conventional IgG

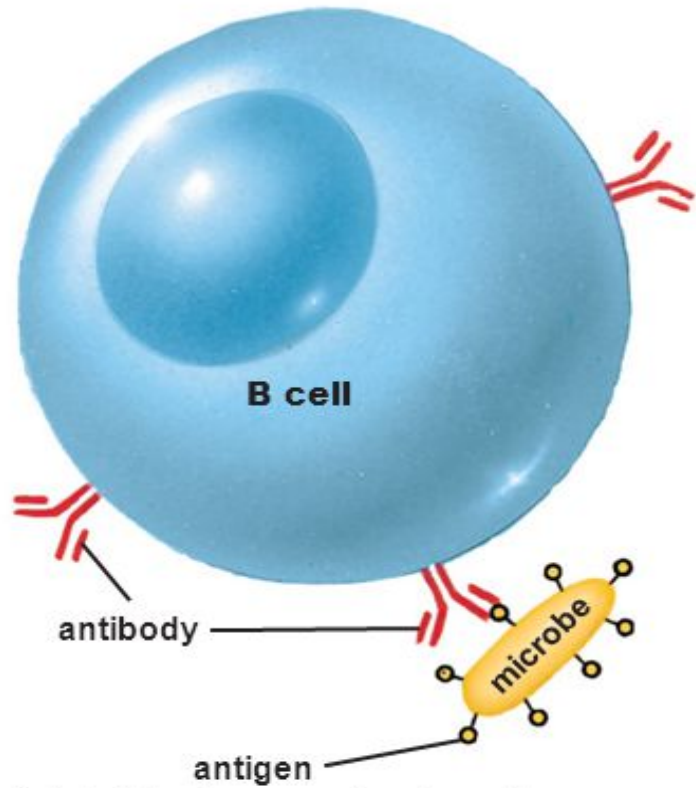
ANTIGENI: macromolecole riconosciute specificamente dall'anticorpo

Il **sito di riconoscimento** è detto **EPITOPO**: un antigene normalmente comprende più di un epitopo (6-10 AA).

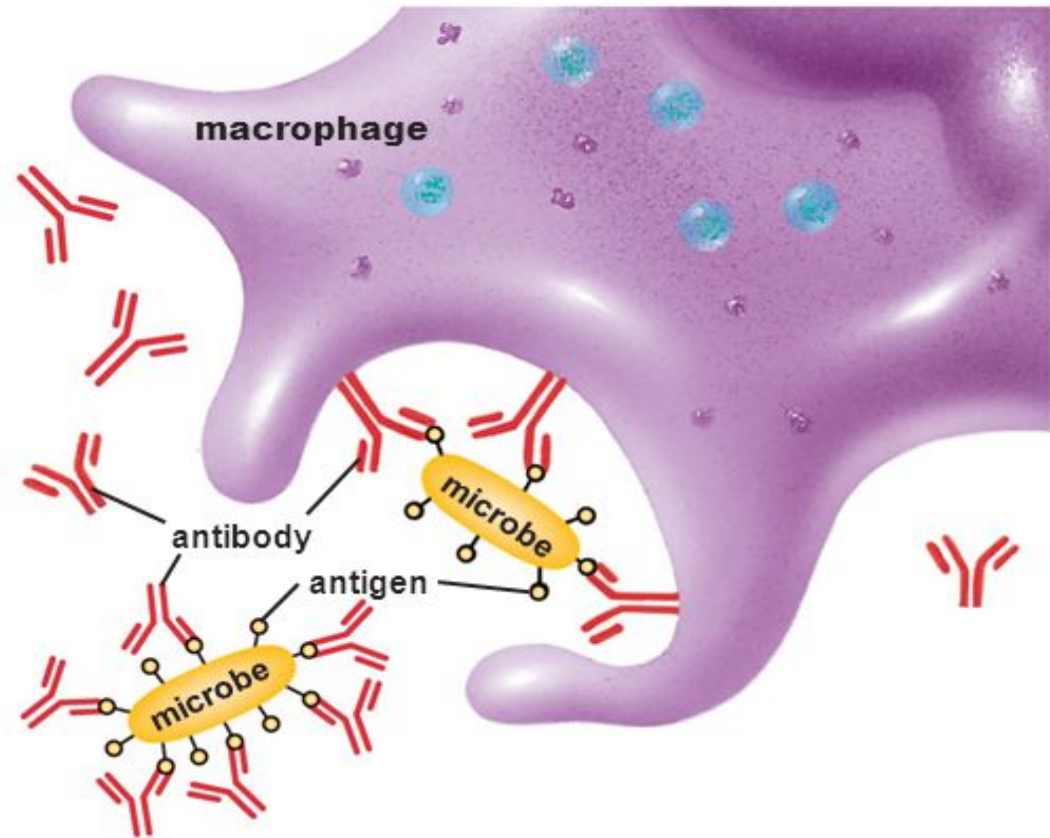


Il sito di legame per l' antigene varia per ogni anticorpo

GLI ANTICORPI FUNZIONANO SIA COME RECETTORI CHE EFFETTORI



(a) Antibody receptor function



(b) Antibody effector function

CLASSI ANTICORPALI

M, prodotte durante la prima risposta, sono le più grandi (contengono cinque unità). Sono presenti solo nel sangue e sono le prime prodotte dal neonato.

G, le più abbondanti. Possono attraversare le pareti dei vasi e la barriera placentare

A, presenti nelle secrezioni corporee

E, mediano la risposta allergica

D, si trovano sulla superficie dei linfociti B

**Tecniche per la produzione
di anticorpi specifici**

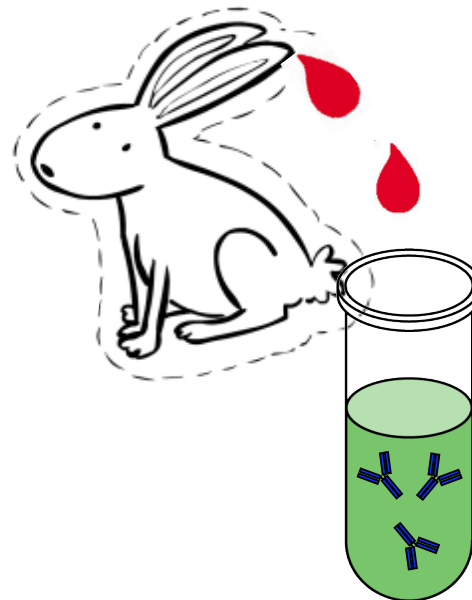
OTTENIMENTO di ANTICORPI POLICLONALI:

Mediante **IMMUNIZZAZIONE**
di animali da laboratorio
= iniezione dell' antigene

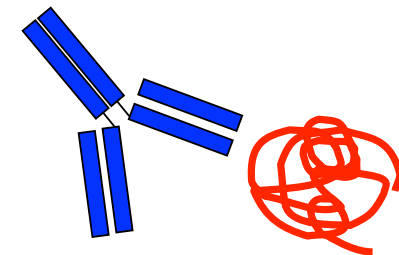


coniglio, ratto, topo, capra, cavallo....

al termine del ciclo di immunizzazione gli
anticorpi specifici contro l'antigene
sono presenti nel **SIERO** del sangue dell'
animale (prelevato senza sacrificare l'animale)



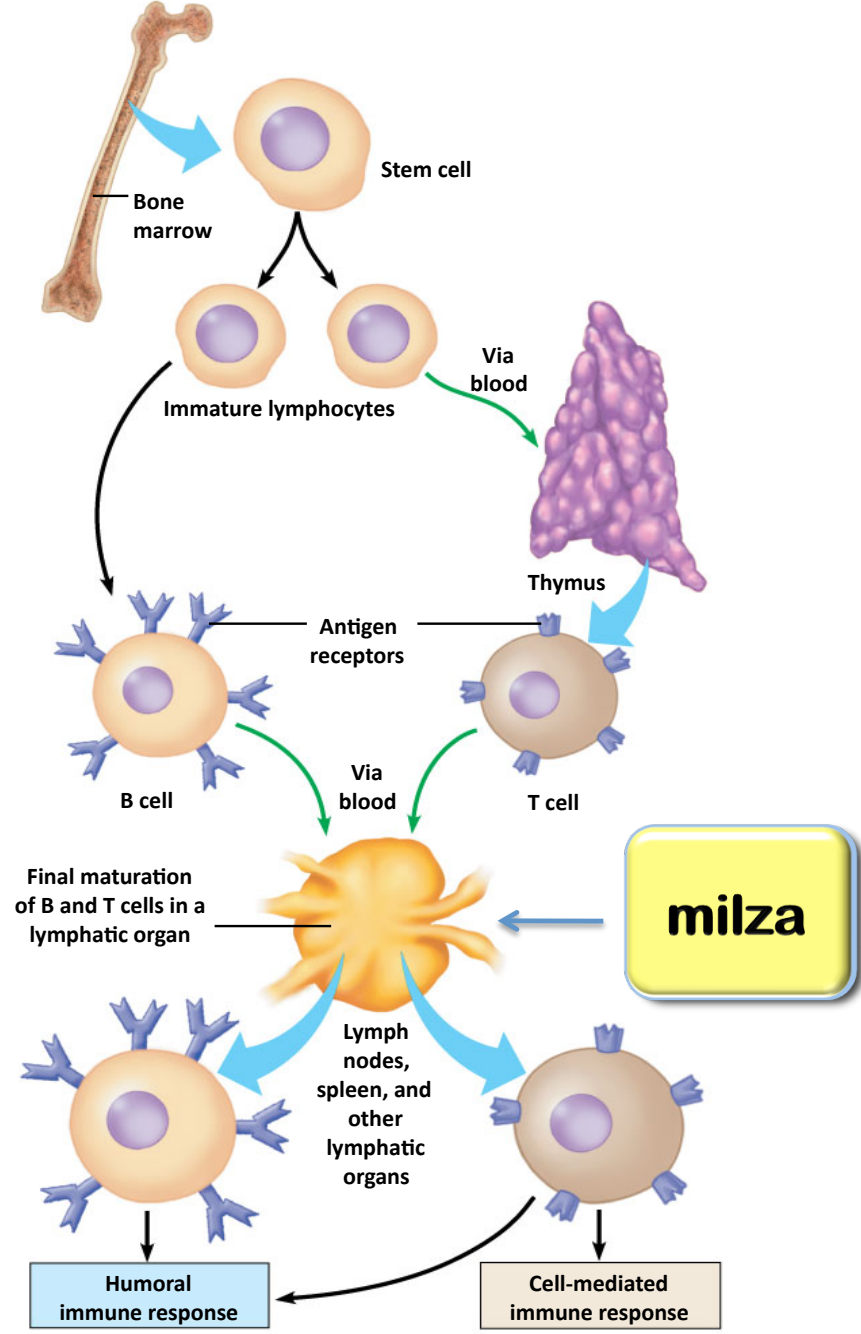
Anticorpi diretti contro
la proteina di interesse



SIERO IMMUNE o ANTISIERO

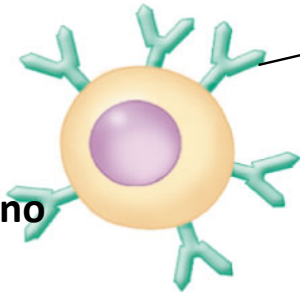
NB:

**Ciascun
linfocita B
espone e
produce UNO
specifico
anticorpo**

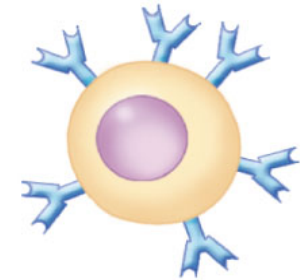
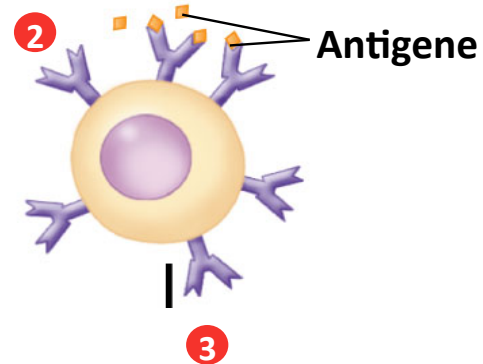


RISPOSTA IMMUNE PRIMARIA: RICONOSCIMENTO DELL'ANTIGENE

1 Popolazione di linfociti B che espongono diverse Ig di membrana

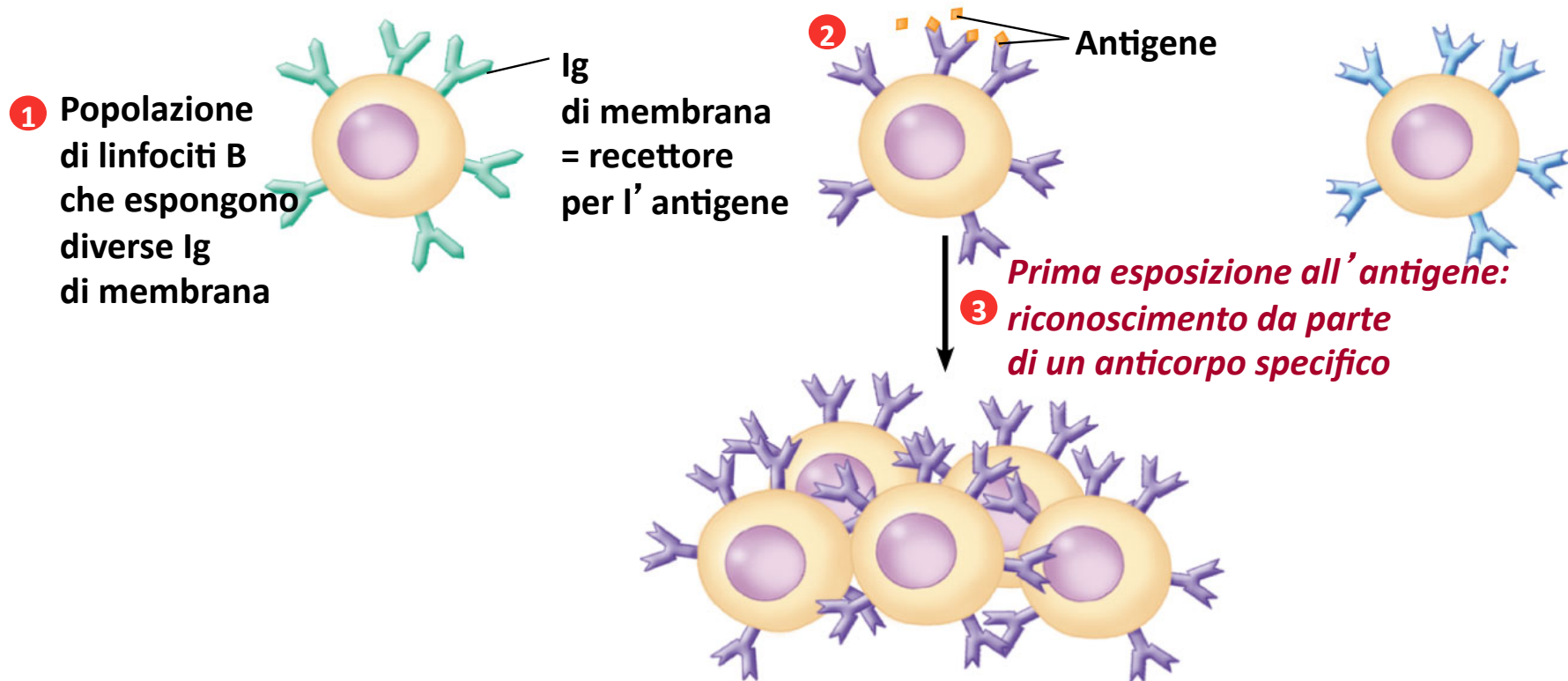


Ig di membrana = recettore per l'antigene



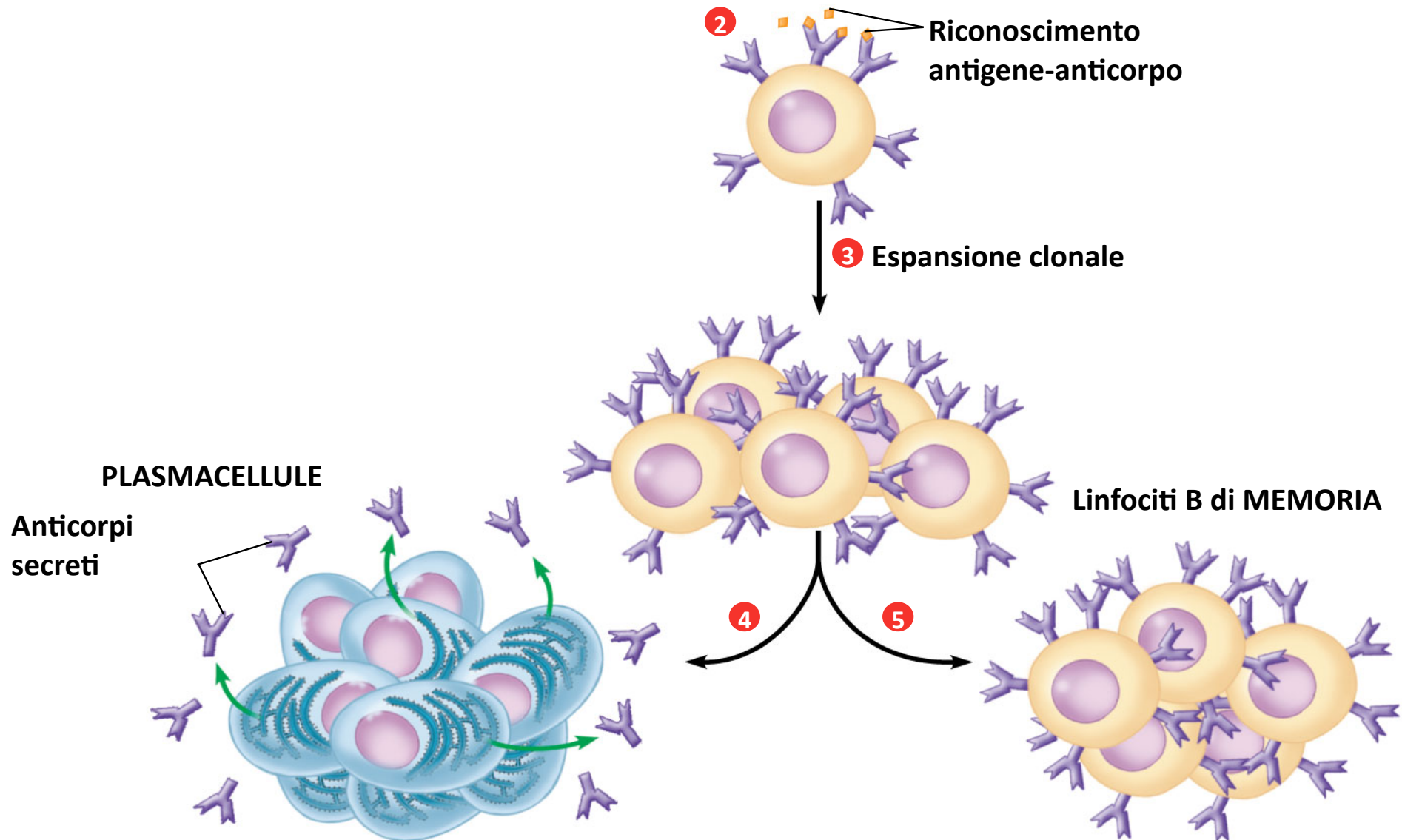
*Prima esposizione all'antigene:
riconoscimento da parte
di un anticorpo specifico*

RISPOSTA IMMUNE PRIMARIA: SELEZIONE CLONALE



Rapida divisione del linfocita B selezionato dal legame all'antigene

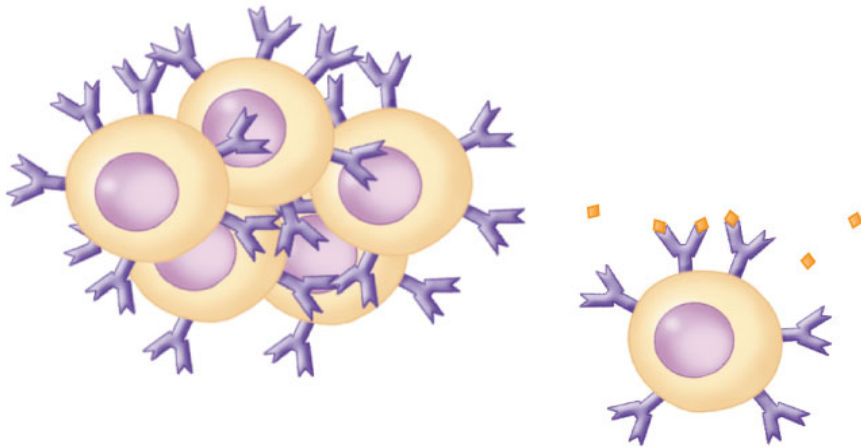
RISPOSTA IMMUNE PRIMARIA: MEMORIA IMMUNITARIA



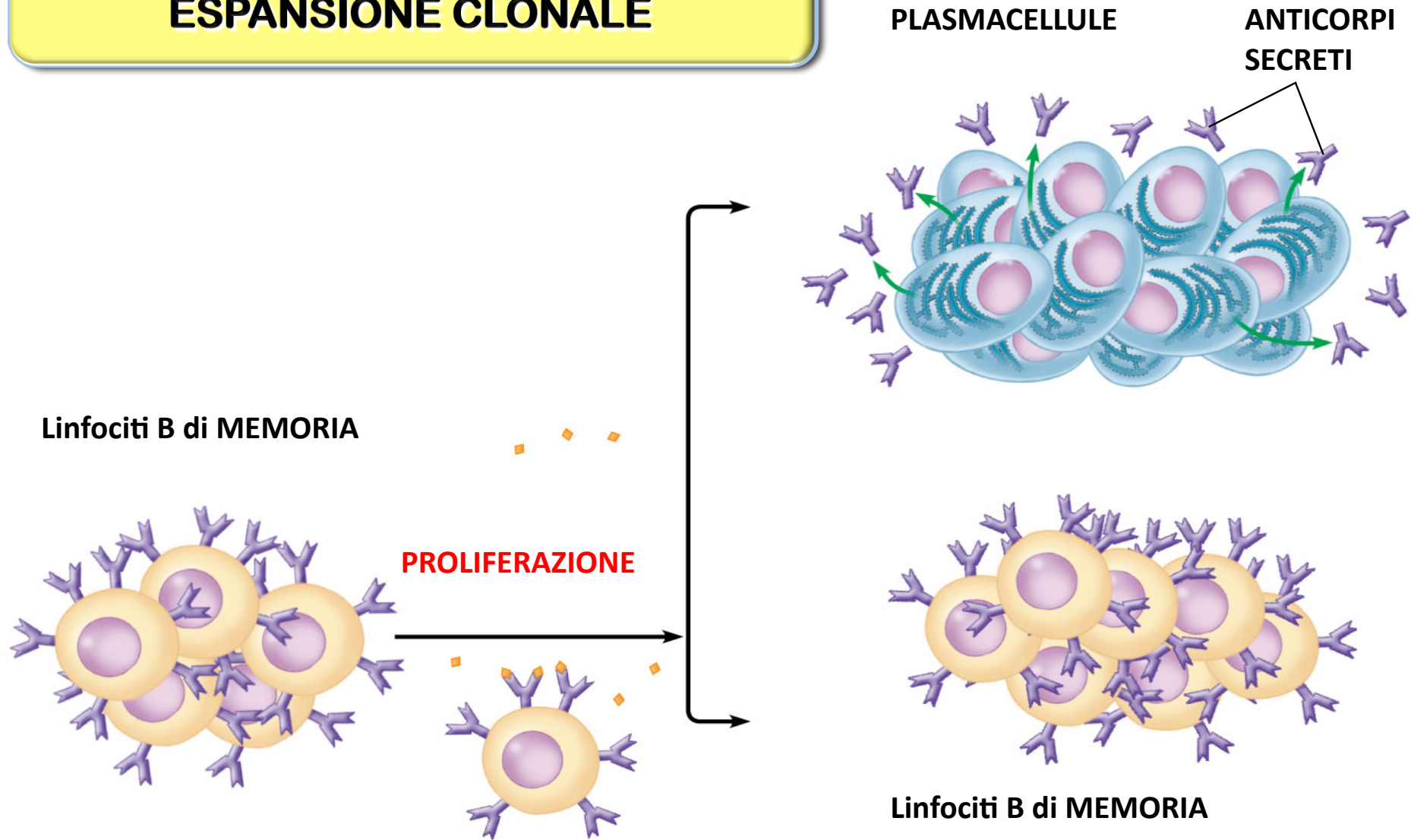
RISPOSTA IMMUNE SECONDARIA: SECONDA ESPOSIZIONE ALL'ANTIGENE

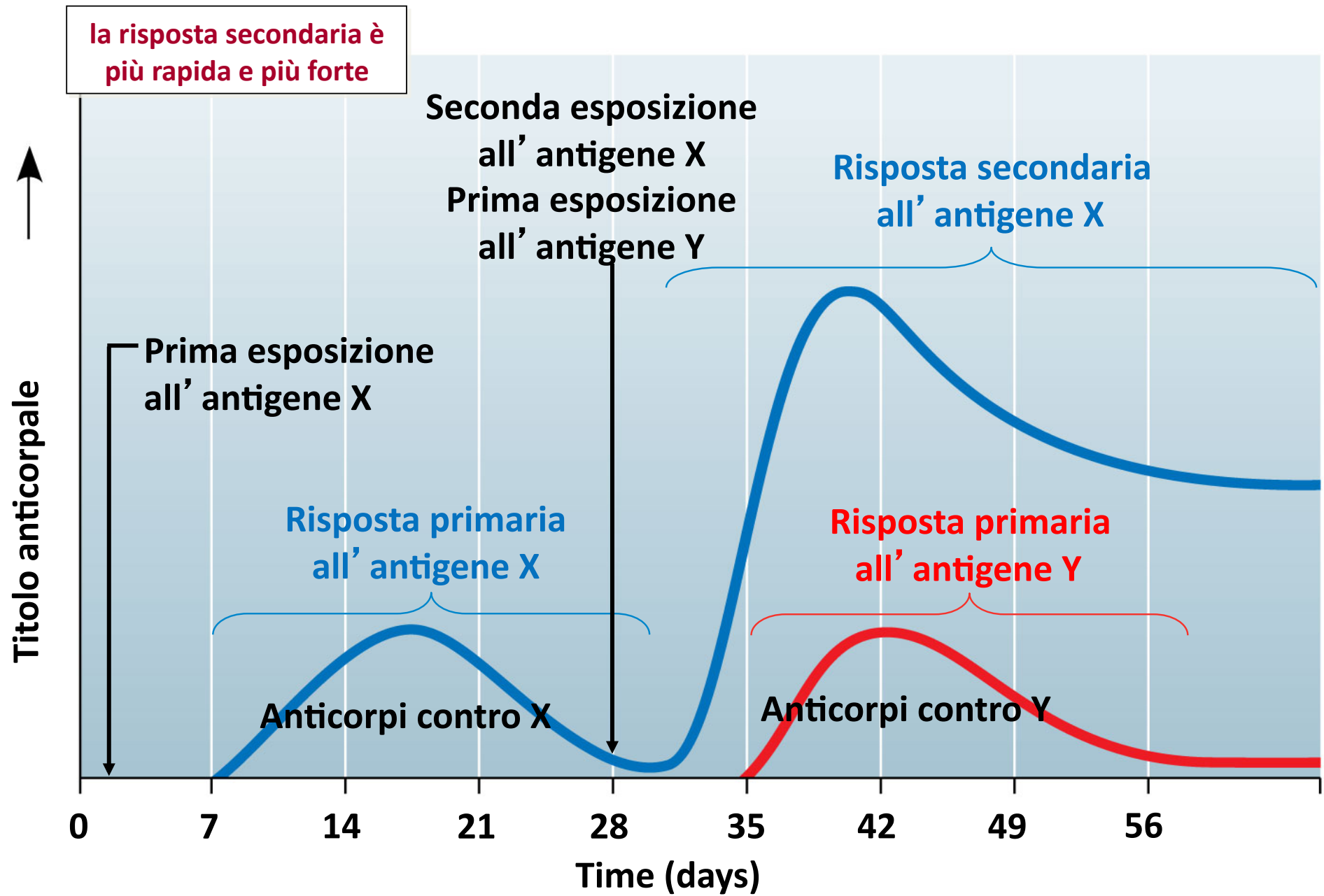
SECONDO INCONTRO CON L' ANTIGENE

Linfociti B di MEMORIA



RISPOSTA IMMUNE SECONDARIA: ESPANSIONE CLONALE





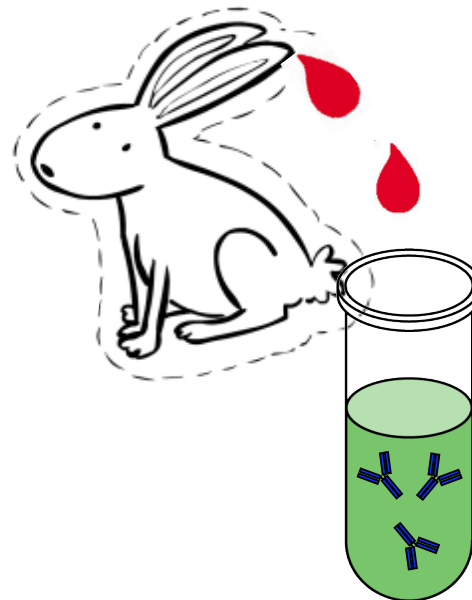
OTTENIMENTO di ANTICORPI POLICLONALI:

Mediante **IMMUNIZZAZIONE**
di animali da laboratorio
= iniezione dell' antigene

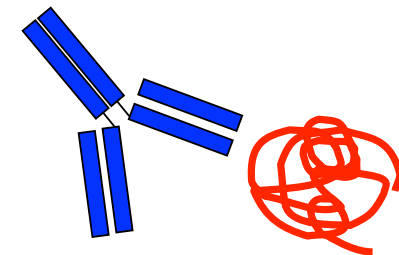


coniglio, ratto, topo, capra, cavallo....

al termine del ciclo di immunizzazione gli
anticorpi specifici contro l'antigene
sono presenti nel **SIERO** del sangue dell'
animale (prelevato senza sacrificare l'animale)



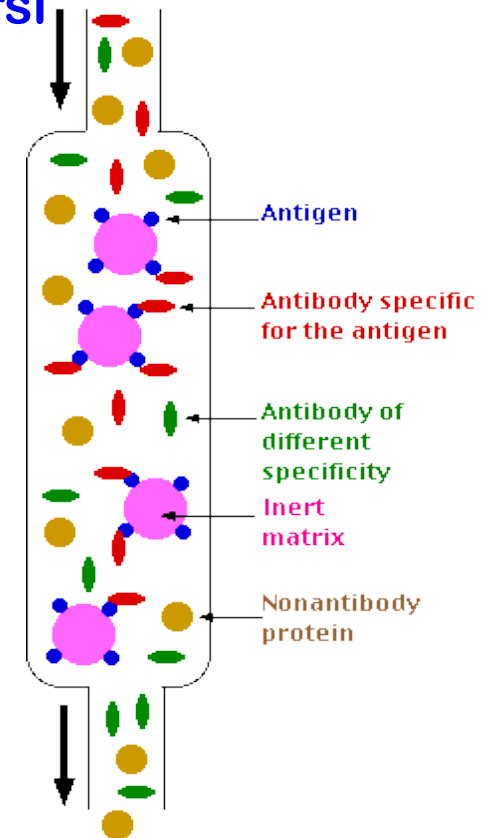
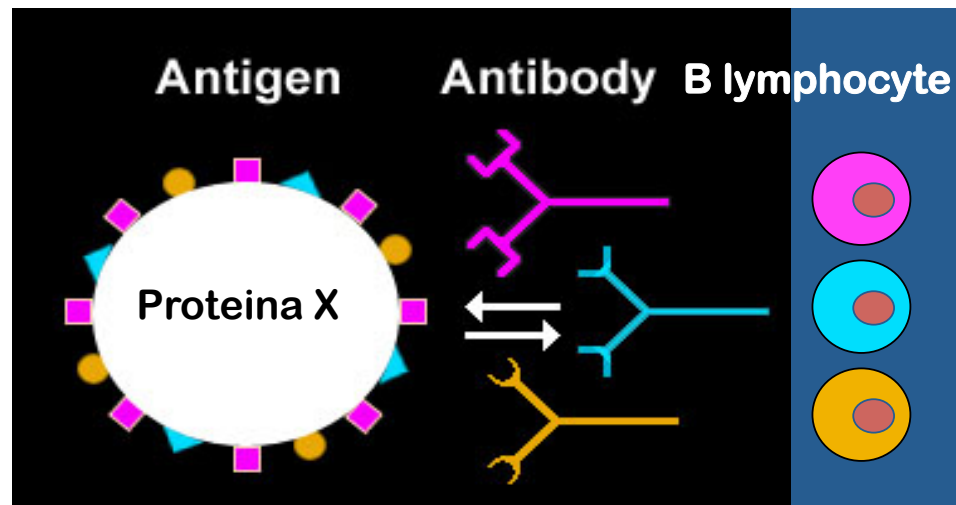
Anticorpi diretti contro
la proteina di interesse



SIERO IMMUNE o ANTISIERO

ANTICORPI POLICLONALI:

Poichè l'immunizzazione con un **antigene** stimola molti linfociti diversi, ciascuno dei quali produce un **diverso anticorpo**, il **siero immune** contiene una **miscela di anticorpi diversi** tutti diretti contro lo **stesso antigene** ma contro regioni (**epitopi**) **diverse** di questo

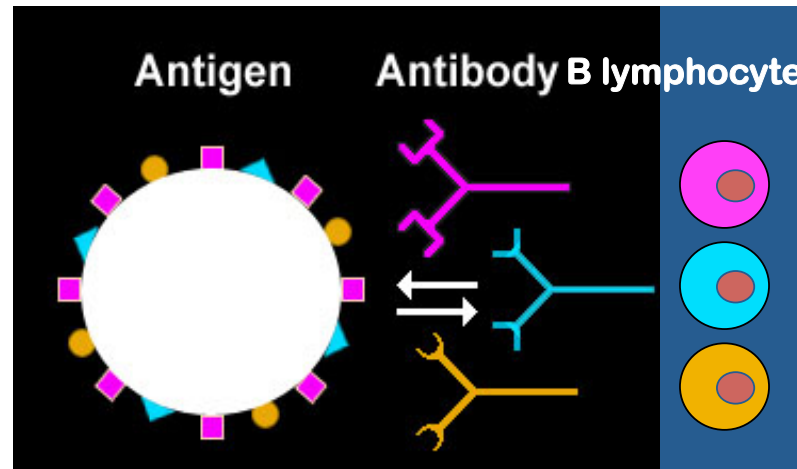


Il siero immune (policlone) può essere usato direttamente o può essere **purificato** contro l' **antigene** (cromatografia di affinità)

ANTICORPI POLICLONALI:

Vantaggi:

- ✓ Segnale forte (diversi anticorpi riconoscono uno stesso antigene)
- ✓ Basso rischio che l'epitopo sia nascosto / mascherato



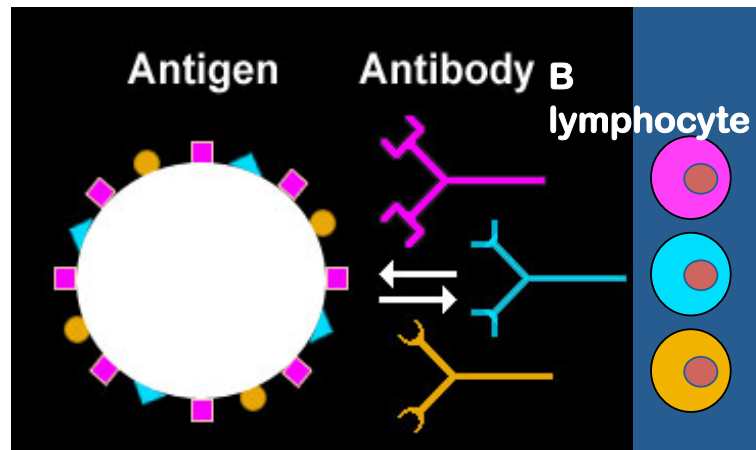
Svantaggi:

- ci può essere **crossreattività** con **antigeni diversi**
- **presenza di altri anticorpi** (risposte immuni) nel siero dell'animale

ANTICORPI MONOCLONALI:

Anticorpi prodotti da un **singolo clone di linfociti B**

Riconoscono **un solo epitopo** dell'antigene utilizzato per l'immunizzazione



Vantaggi:

massima specificità di riconoscimento

(posso eliminare Ab che mostrano crossreattività)

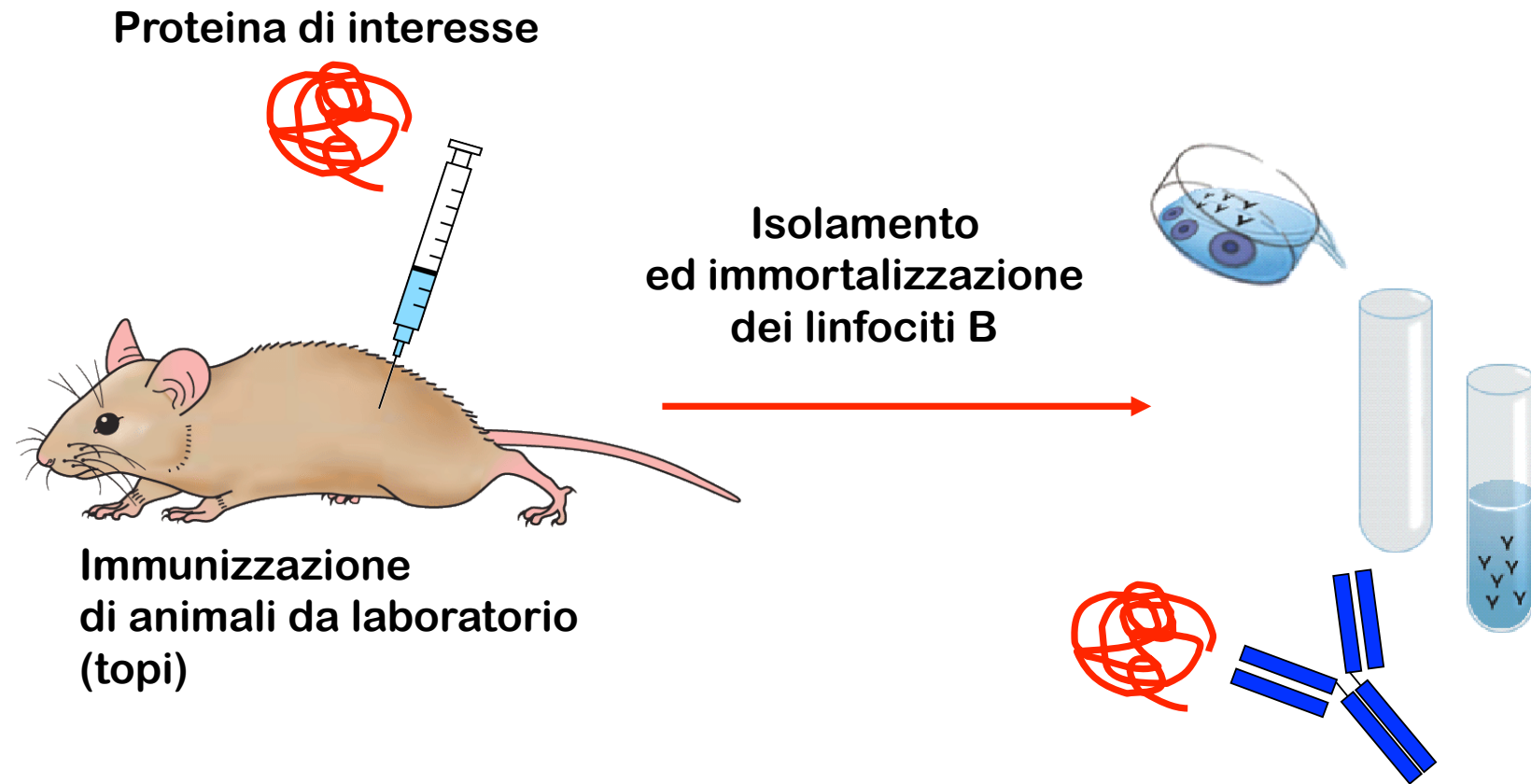
Svantaggi:

Segnale più **debole** (riconosce un solo epitopo dell'antigene)

Rischio che l'epitopo sia **nascosto**/mascherato

ANTICORPI MONOCLONALI:

Prodotti mediante **immortalizzazione di singoli linfociti**
per ottenere **CLONI** di cellule che producono e **secernono anticorpi in vitro**

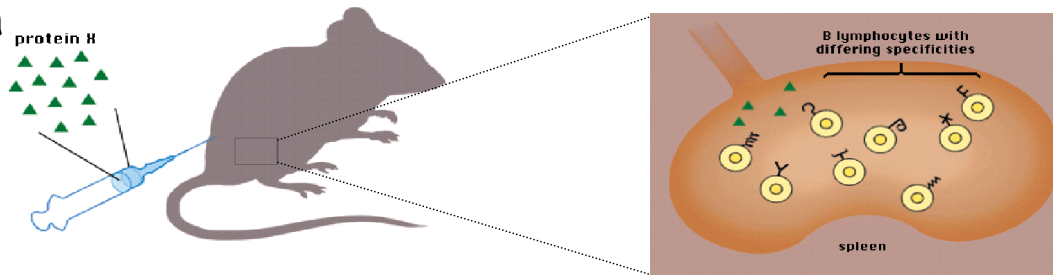


Anticorpi monoclonali diretti contro **singoli epitopi** dell'antigene di interesse

Produzione di anticorpi monoclonali

1

La proteina purificata viene inoculata nel **topo**

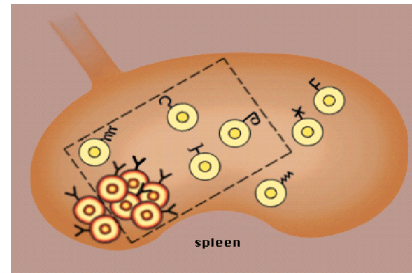


2

Nella **milza** i linfociti B contro l'Ag si attivano ed iniziano a proliferare

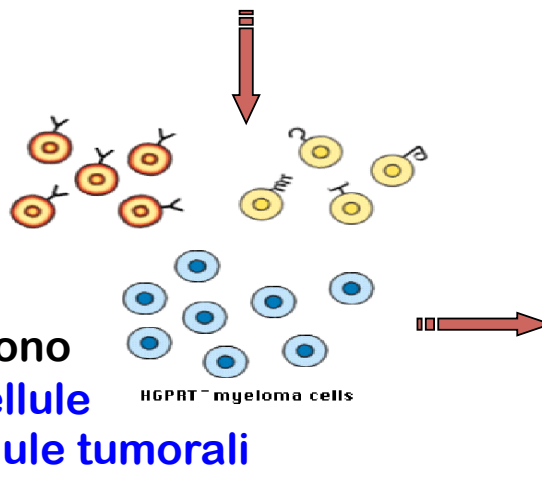
3

La milza viene prelevata e si isolano i linfociti



4

I linfociti vengono mescolati a **cellule immortali (cellule tumorali di MIELOMA)**



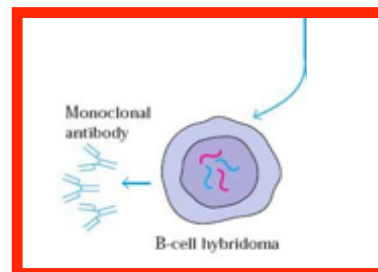
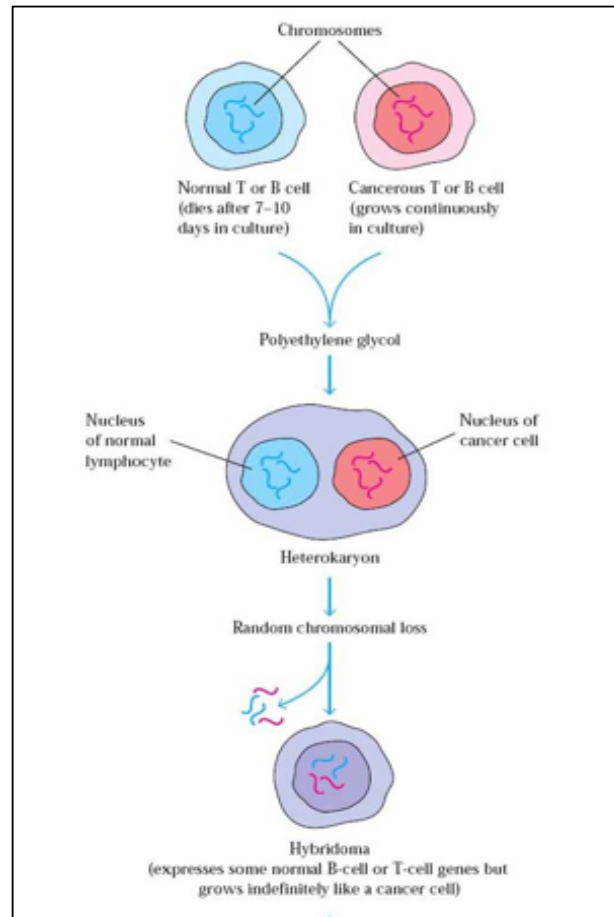
5

Si effettua una **FUSIONE CELLULARE**:

i linfociti B fusi alle cellule di mieloma si dicono **IBRIDOMI**:

= linee cellulari immortali che producono anticorpi

Formazione di ibridomi attraverso fusione cellulare

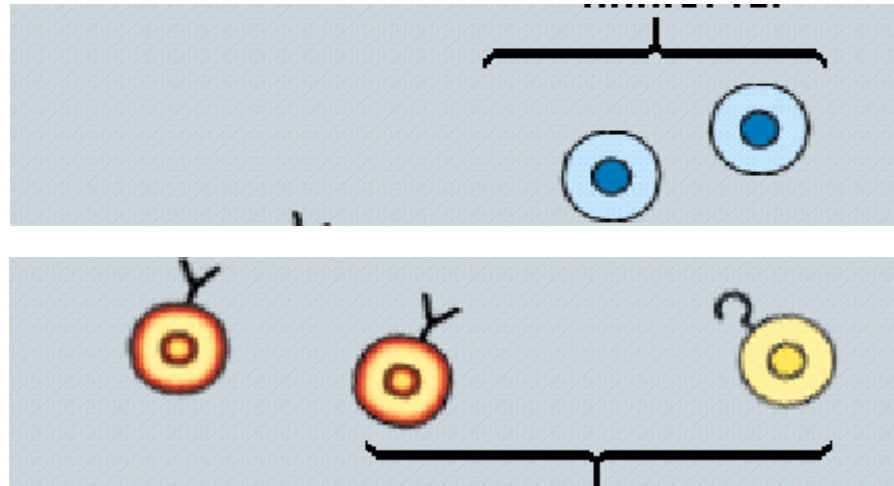


Selezione degli ibridomi in terreno HAT

(Hypoxantine Aminopterine Timidine)

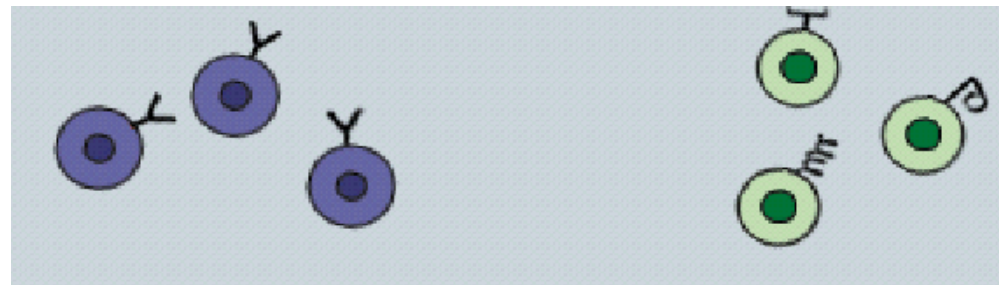
Il terreno HAT blocca la **via biosintetica** “de novo” dei nucleotidi **purinici**: le cellule possono crescere solo se hanno l'enzima **HGPRT** della via biosintetica “di salvataggio”

Cellule di **mieloma**: immortali ma **HGPRT-** → **muiono**



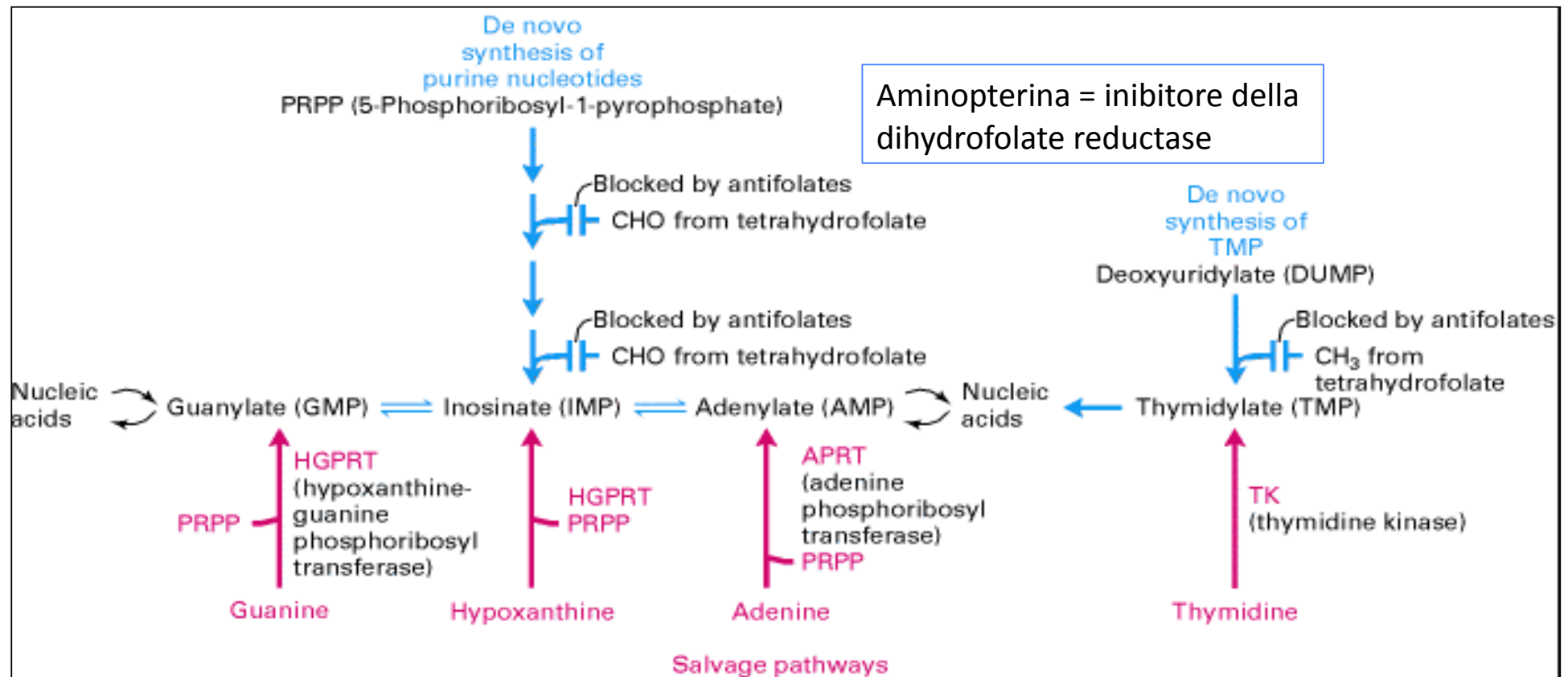
Linfociti: HGPRT + ma non crescono in coltura

Ibridomi: immortali e HGPRT +: possono crescere in terreno HAT



Il terreno HAT (Aminopterina, Hypoxantina, Timidina) blocca la **via biosintetica** “de novo” dei nucleotidi **purinici**: le cellule possono crescere solo se hanno l’enzima **HGPRT** della via biosintetica “di salvataggio”

Biosintesi delle purine



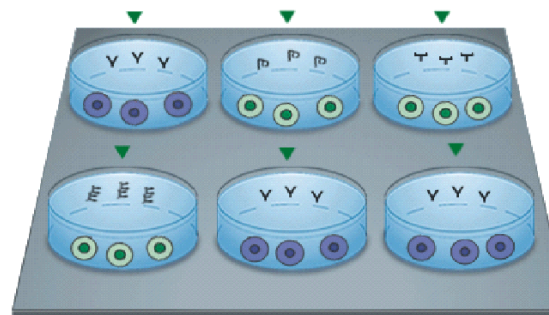
Produzione di anticorpi monoclonali

7 Gli **IBRIDOMI** ottenuti vengono diluiti e piastrati in piastre multiwell, in modo da avere in media una singola cellula per pozzetto

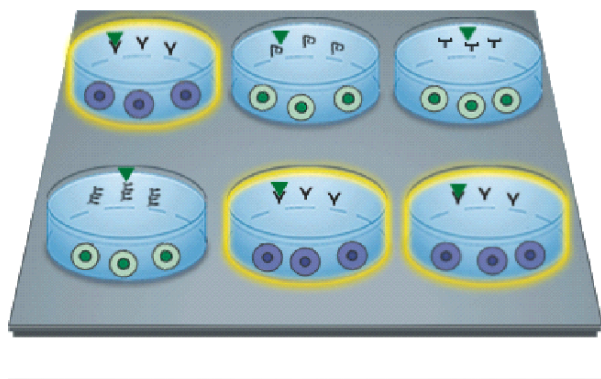


8 I **CLONI** crescono e cominciano a produrre anticorpi.

Ogni clone produrrà un anticorpo con diversa specificità di antigene



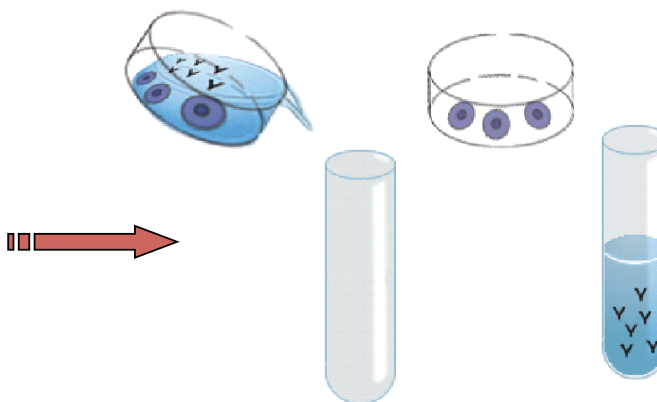
9 Con un saggio immunochimico (ELISA) si può determinare quale clone riconosce l'antigene di partenza



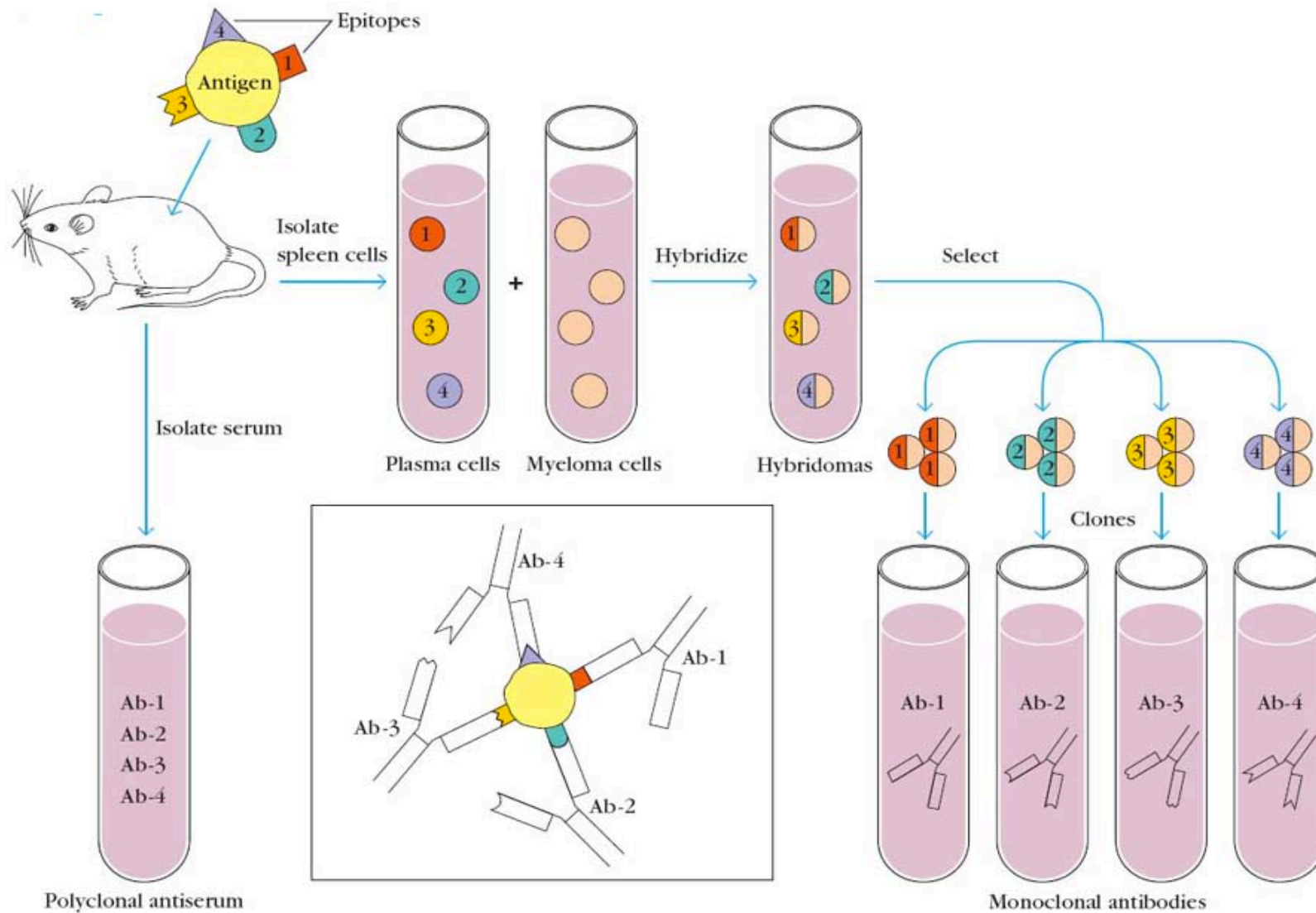
10

Si ottiene una popolazione pura di **ANTICORPI MONOCLONALI**

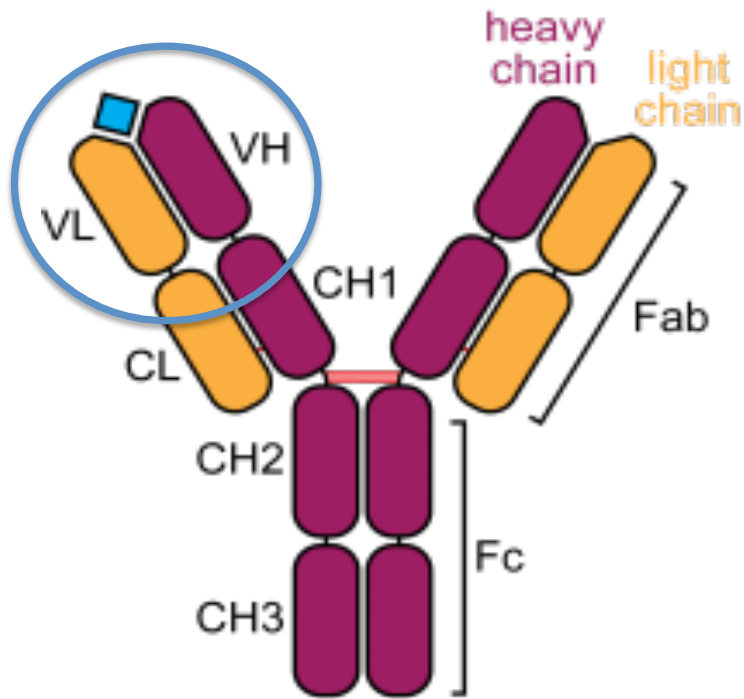
(derivati da un singolo clone) che riconoscono lo specifico antigene X



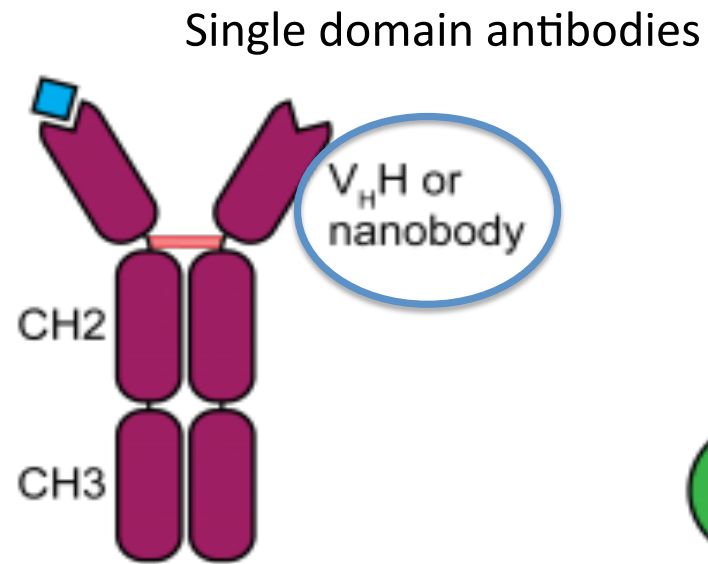
Tecnica utilizzata per selezionare cloni di linfociti B nella produzione di anticorpi monoclonali



Anticorpi camelidi, nanobodies, single chain Fv, sono prodotti in vitro con tecniche di biologia molecolare



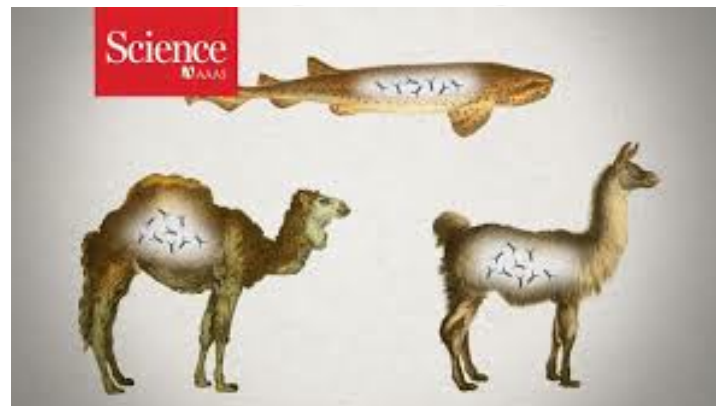
Conventional IgG



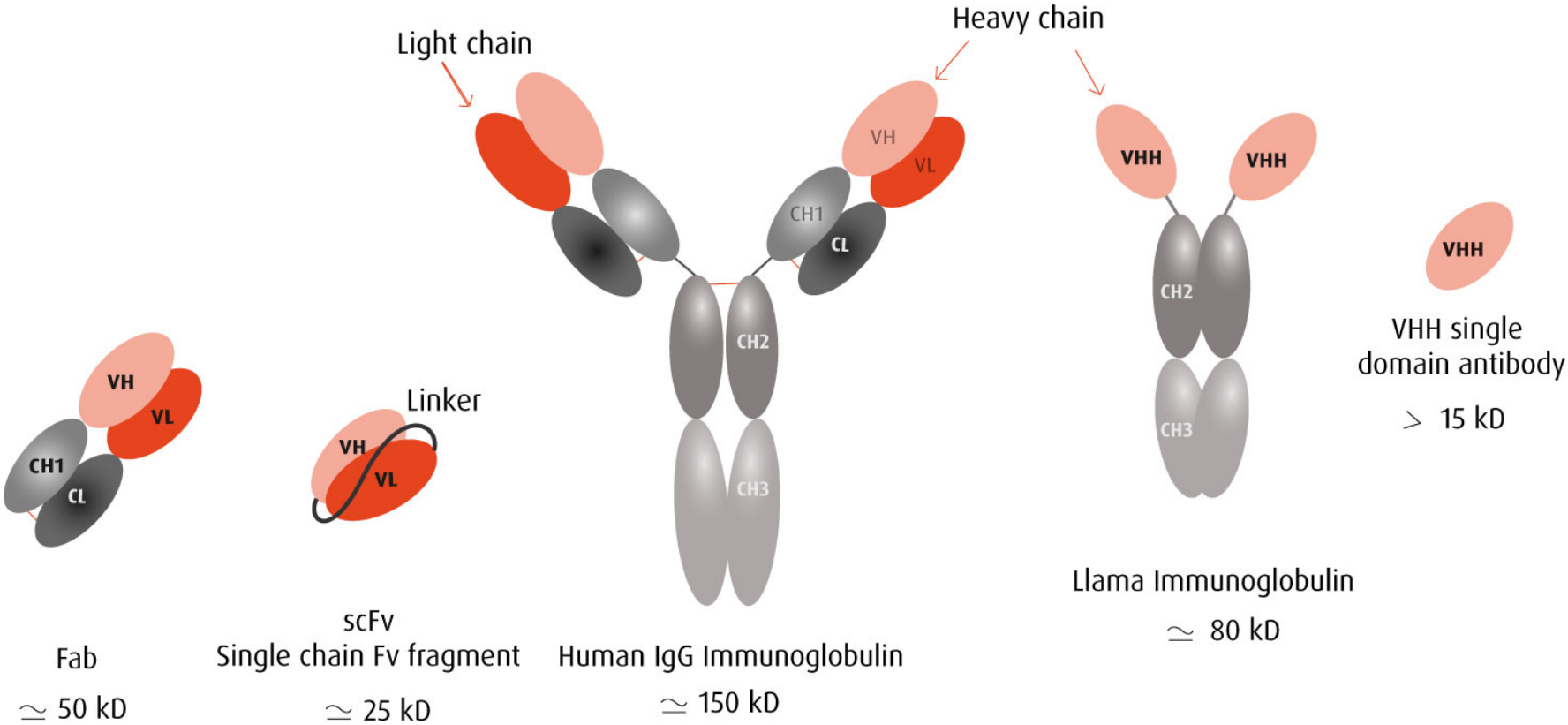
Camelid Heavy chain-only



Chromobody



IgG, scFv, VHH



Produzione e selezione di anticorpi in vitro: Phage display

