

LTA IMMUNOLOGIA

dimensione diametro:
cellula 10 micrometri
batteri 1 micrometri
virus 100 nanometri

Esame: 2 domande di teoria, 2 esercizi (scrivere passaggi e formule)
per fare terreno si aggiunge fino a volume medium

ESPERIENZE:

1. selezionare cellule B che facciano anticorpi di interesse
2. MLR come si testa la compatibilità tra donatori di trapianti: mettere linfociti T del paziente e MHC del donatore

ALLORICONOSCIMENTO

Perché avviene una reazione alloreattiva tra linfociti T e cellule che presentano l'antigene? Quindi perché avviene il rigetto dei trapianti.

Le cellule T diventano alloreattive e avviene il rigetto.

Le cellule TCD4 (helper) riconoscono l'antigene e si attivano (diventano alloreattive) e avviene il rigetto.

Le cellule che presentano l'antigene (cellule dendritiche e macrofagi) riconoscono il patogeno tramite i pattern recognition receptor, in particolare modo riconoscono le pathogen associated molecules. Questo genera una cascata di trasduzione del segnale che culmina con l'attivazione delle APC che producono citochine per la cascata infiammatoria, espongono molecole co-stimolatorie e processano l'antigene che, se di origine peptidica, vengono processati tramite le MHC I e i linfociti TCD8 (citotossici) o tramite le MHC II e i linfociti T helper.

Le cellule T riconoscono gli antigeni presentati dalle MHC tramite il T cell receptor.

I segnali determinano l'attivazione, polarizzazione e proliferazione delle cellule T che svolgono quindi le funzioni effettrici: secrezione di citochine, attività citotossica delle TCD8

Una volta attiva le cellule T helper producono IL-2 che serve per la loro proliferazione. Essi proliferano per mitosi, dando origine all'**espansione clonale**, quindi hanno tutti lo stesso TCR. Attivate ed espanse, attivano macrofagi, sostengono processi infiammatori producendo citochine e, soprattutto, possono sostenere processi anti-infiammatori per riportare all'omeostasi. Forniscono supporto alle cellule B per la loro differenziazione in plasmacellule.

Facciamo un esperimento di mixed leucocyte triactor, misurando la produzione di IL-2 attraverso ELISA.

MHC

Le MHC II, presenti solo sulle APC, presentano antigene esogeno a linfociti T helper. L'interazione avviene tra le MHC e i TCR.

Il riconoscimento tra antigene e TCR è altamente specifico, ma deve anche riconoscere in modo specifico anche l'MHC stesso altrimenti di innescano meccanismi di alloreattività.

Le MHC I sono presenti su tutte le cellule e presentano l'antigene ai linfociti TCD8.

Nell'uomo le MHC sono dette HLA; per le MHC II ci sono 3 geni (DP, DQ e DR) che codificano per 3 HLA diverse, mentre per le MHC I esistono sempre 3 geni che codificano per le regioni A, B e C. Inoltre, per le MHC II c'è un gene extra che codifica per la catena β che si accoppia alla catena α di DR generando un nuovo tipo di MHC II.

Mentre nel topo sono dette H2; ci sono molte omologie con il locus umano.

Le molecole HLA I sono 3 con 3 domini per le catene pesanti con elevati livelli di polimorfismo. Anche la catena α e β hanno elevati livelli di polimorfismo.

La poligenicità e i polimorfismi generano un ampio repertorio di molecole MHC.

SELEZIONE TIMICA

I peptidi self sono presentati dalle cellule epiteliali timiche tramite le MHC. Questo è importante per la selezione dei linfociti T.

Nel timo i linfociti doppi positivi che interagiscono debolmente con i complessi self sono selezionati positivamente (=sopravvivono) e procedono con il loro differenziamento in linfociti T. Quando i timociti doppi positivi non reagiscono con i complessi self vanno incontro a morte per negligenza (=sono lasciati morire)

I timociti doppi positivi che reagiscono fortemente con i complessi self vanno incontro ad apoptosi (=morte cellulare programmata); altrimenti darebbero origine a reazione autoimmuni.

Circa il 10% delle cellule T riconoscono come non self le molecole MHC di un donatore, portando al rigetto di trapianto.

Nei trapianti solidi, le cellule T del ricevente attaccano l'organo donato.

Nei trapianti di midollo, i linfociti T si attivano fortemente e producono un'enorme quantità di citochine pro-infiammatorie ("tempesta citochinica"), dando vita alla graft versus host disease.

Prima di un trapianto (solido o di midollo) bisogna verificare la compatibilità tra le HLA.

A livello sperimentale, unendo le cellule T del ricevente e le MHC del donatore, se avviene l'alloriconoscimento viene prodotta IL-2, la quale viene misurata.

Si possono fare altri esperimenti tramite trapianti di pelle in topo che mostrano che il trapianto da tra un topo di sesso maschile e uno femminile, si genera rigetto perché c'è variabilità tra le MHC di sesso diverso.

I trapianti possono essere anche sin-genici, ovvero tra individui con lo stesso genotipo, o autotrapianto, il quale non genera rigetto.

PRODUZIONE DI ANTICORPI

Il sistema immunitario è il nostro meccanismo di difesa contro agenti patogeni estranei, ma anche contro cellule endogene cancerogene.

Esistono due linee di difesa

- innata/non specifica, presente sin dalla nascita. Rappresenta la prima linea di difesa. È comune a tutti gli organismi pluricellulari. Ne fanno parte i linfociti NK, i mastociti, gli eosinofili, i basofili, i macrofagi, i neutrofili e le cellule dendritiche. Questa linea di difesa dipende anche da barriere anatomiche, fisiologiche, infiammatorie e meccanismi di endocitosi e fagocitosi
- acquisita/specifica. È un sistema che compare con i vertebrati. In presenza di un microrganismo patogeno si attivano in modo mirato il linfociti B e T. È caratterizzata dalla specificità dei recettori coinvolti.

I recettori dei linfociti B sono gli anticorpi, mentre per i linfociti T sono i T cell receptor. Entrambi sono presenti sulla superficie della membrana e possono riconoscere solo specifici epitopi.

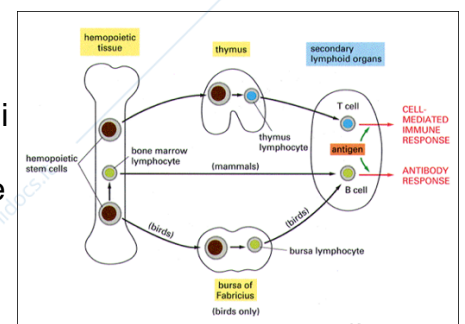
Sia TCR che anticorpi fanno parte della famiglie delle immunoglobuline.

I linfociti B e T hanno un precursore ematopoietico in comune e si sviluppano nel midollo osseo.

I linfociti B maturati migrano agli organi linfoidi periferici: negli uccelli i linfociti B maturano nella borsa di Fabrizio (da cui deriva il nome).

I linfociti T migrano nel timo (da cui deriva il nome) dove maturano e avviene la selezione clonale.

Dal timo passano agli organi linfoidi periferici dove si ha l'incontro con l'antigene e la loro attivazione.



Le cellule T e B nello stadio di resting sono morfologicamente identiche (con nucleo ampio e citoplasma ridotto), in seguito ad attivazione con l'antigene si differenziano:

- le cellule B diventano plasmacellule (in cui aumenta il reticolo endoplasmico rugoso in quanto devono produrre le immunoglobuline)
- le cellule T attivate possono diventare cellule T helper o cellule T citotossiche (in cui aumenta il citoplasma per la formazione di granuli)

L'immunità adattativa è caratterizzata dalla selezione clonale.

Le cellule B e T, dopo il riconoscimento dell'antigene, si attivano e proliferano.

Il primo riconoscimento con l'antigene genera una risposta primaria che ha massimo effetto 10-17 giorni dopo il riconoscimento.

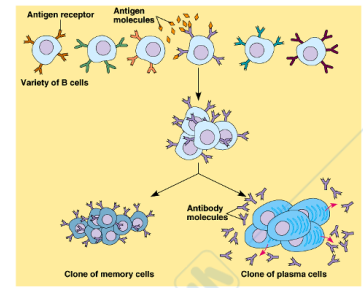
Se lo stesso antigene si ripresenta, si ha una risposta secondaria molto più efficace e veloce che ha massimo effetto dopo 2-4 giorni dall'esposizione: questo è dovuto alla memoria delle cellule B e T.

ANTICORPI MONOCLONALI

I linfociti B hanno il B cell receptor, un'immunoglobulina legata alla membrana che riconosce un determinato antigene.

In seguito al riconoscimento, avviene l'attivazione e la proliferazione del "clone".

Le cellule B possono diventare plasmacellule, cellule effettrici che producono numerose copie di anticorpi contro un determinato antigene che vengono secreti, oppure cellule della memoria che presentano sulla membrana plasmatica un BCR specifico per quell'antigene.



Gli anticorpi possono agire in vari modi:

- neutralizzare l'antigene, legando dei siti di legame di virus e batteri neutralizzandoli, in quanto previene il loro ingresso nelle cellule; questi verranno poi fagocitati da macrofagi
- il metodo dell'agglutinazione, in cui avviene l'aggregazione di un antigene dopo la reazione con l'anticorpo
- fanno precipitare antigeni solubili
- si legano alle membrane cellulari e tramite la porzione costante attivano il complemento che porterà alla lisi della cellula

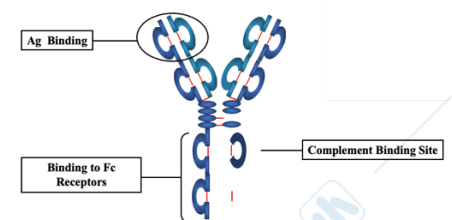
Le funzioni degli anticorpi è quindi di inattivazione, induzione della fagocitosi e attivazione del complemento.

STRUTTURE DEGLI ANTICORPI

Sono formate da catene pesanti e leggere che sono unite da ponti disolfuro.

La catena leggera è costituita da una regione variabile e una costante, lo stesso vale per la catena pesante.

La porzione variabile della catena leggera forma l'antigen binding site, che riconosce in modo specifico l'antigene; una porzione costante che ancora alla membrana della cellula T e permette l'attivazione del complemento.



Le immunoglobuline sono distinte in 5 classi: IgM, IgD, IgG, IgA e le IgE.

Queste differiscono per la catena pesante dando a caratteristiche e proprietà funzionali diverse.

- le IgM sono le prime ad essere, sono le più grandi, sono presenti solo nel sangue
- le IgG sono le più abbondanti, possono attraversa le pareti dei vasi e la barriera placentale
- le IgA sono presenti nelle secrezioni corporee
- le IgE modulano e mediano la risposta allergica
- le IgD si trovano sulla superficie dei linfociti B

Tutti gli anticorpi prodotti dalla cellula B hanno lo stesso antigen binding site presente sul BCR.

Qualsiasi molecola capace di indurre risposta immunitaria è detto antigene.

Un singolo anticorpo riconosce un solo epitopo o determinante antigenico.

Un antigene presenta diversi epitopi o determinanti antigeni che possono generare differenti anticorpi, detti anticorpi policlonali.

Gli anticorpi che riconoscono un singolo epitopo sono detti monoclonali.

Immunizzare = indurre una risposta immunitaria

Immunogeno = qualsiasi sostanza in grado di scatenare la risposta immunitaria

Antigene = qualsiasi sostanza che può legare uno specifico anticorpo

Anche se ogni struttura può essere riconosciuta da un anticorpo come antigene, normalmente solo le proteine sono in grado di indurre una risposta immunitaria completa.

Ad esempio, gli apteni sono piccole molecole non in grado di indurre la risposta immunitaria ma che la sviluppano solo quando legate a proteine più grandi detti carrier.

L'immunogenicità di una proteina dipende da vari fattori

- grandezza → più è grande, più genera immunogenicità

- composizione

- forma

- **adiuvanti** → usati con l'antigene proteico per aumentare la risposta immunitaria, in quanto convertono l'antigene proteico solubile in materiale articolato; inoltre, consentono un rilascio più lento e prolungato che facilitano una risposta immunitaria più forte. Molti adjuvanti contengono componenti microbici che aumentano l'immunogenicità della preparazione.

Possono essere di diversi tipi:

* adjuvanti incompleti di Freud, composti da emulsione di olio e acqua

* completo, composti da emulsione di olio e acqua e microrganismi morti

* allume, pro-infiammatorio che stimola l'inflammosoma

- via di somministrazione → la via preferenziale per l'immunizzazione è la via sottocutanea o intramuscolare, perché c'è un rilascio più lento

Le cellule B si differenziano nel midollo osseo e attraverso i vasi linfatici afferenti arrivano agli organi linfoidi periferici dove si stabiliscono nel centro germinale.

Nel centro germinale avviene il contatto con l'antigeno, quindi si attivano, proliferano e si differenziano in plasmacellule. Come tali, escono dai vasi linfatici efferenti e arrivano al sito di infezione dove rilasciano gli anticorpi.

Per avere una buona produzione di anticorpi, spesso si effettuano due o più immunizzazioni ripetute: generalmente la prima avviene con adiuvante completo per aumentare il più possibile la risposta, mentre le successive vengono fatte con adiuvante incompleto.

Le immunizzazioni ripetute aumentano il titolo anticorpale, aumentano l'affinità grazie all'ipermutazione somatica, inoltre avviene lo switch di classe (per questo le IgG sono i target più utilizzati come anticorpi monoclonali).

Per generare una risposta immunitaria da parte di antigeni non peptidici o piccoli (come gli allergeni) che da soli non attiverebbero la risposta, si legano covalentemente gli apteni a una proteina carrier.

Successivamente gli anticorpi possono legarsi all'aptene anche in forma libera.

In genere il carrier più utilizzato è il BSA (Bovine Serum Albumin) o KLH (Keyhole Limpet Hemocyanin)

STERILIZZAZIONE

È il processo che si prefigge di distruggere su un substrato o in un determinato ambiente tutte le forme di vita, spore comprese.

Prima di procedere con la sterilizzazione serve capire la carica di contaminazione e il tempo di morte tecnica (=tempo necessario per uccidere tutti i microrganismi presenti. Varia in rapporto alla carica contaminante e alla conducibilità termica del materiale da trattare)

Può essere eseguita tramite:

- mezzi fisici
 - filtrazione
 - radiazione, possono essere usati
 - * radiazioni ionizzate (es. raggi gamma), cioè fotoni ad elevata energia. Esse agiscono trasferendo la loro energia all'interno della cellula colpita, la cui sensibilità è proporzionale alla quantità di DNA presente, in quanto quest'ultimo viene alterato. Il materiale di plastica utilizzato in laboratorio viene sterilizzato con radiazioni gamma.
 - * Le radiazioni ultraviolette sono radiazioni elettromagnetiche e vengono effettuate con elettroni con un fascio di raggi catodici attraverso delle lampade germicida. Usato soprattutto nei laboratori scientifici per trattare l'aria. Sotto le cappe ci sono radiazioni di questi lampade UV che vengono accese generalmente di notte, perché sono irritanti per gli operatori se presenti nella stessa camera. Il problema dei raggi UV è che sono poco penetranti (meno penetranti dei raggi gamma). Agiscono per trasformazione fotochimica delle basi pirimidiniche del DNA cellulare.
 - calore è considerato il mezzo più sicuro, rapido ed economico. Il tempo di sterilizzazione diminuisce all'aumentare della temperatura. Può essere utilizzato a secco (incenerimento o stufe di Pasteur) o ad umido (ebollizione o autoclave). La sensibilità del calore varia in rapporto al contenuto di acqua: più è alto il contenuto di H₂O, più i microrganismi sono sensibili al calore. Il vapore è un migliore conduttore termico, cioè a parità di temperatura, la sterilizzazione è raggiunta in un tempo minore. Si usano le stufe di Pasteur a secco in cui il calore si trasmette per convezione o irraggiamento dalle pareti della stufa. Si può usare solo materiale termoresistenti che non può essere corrosivo. Si possono regolare sia la temperatura che il tempo. L'ebollizione è il metodo più semplice, deve essere eseguito per almeno 20 minuti. Con la sterilizzazione sotto pressione (autoclave) si hanno 3 variabili: la temperatura, il tempo e la pressione. Generalmente il ciclo di base è 121 °C, per 15 minuti ad 1 atm.
- mezzi chimici
 - L'ossido di etilene è un gas solubile in acqua e nella maggior parte dei solventi organici. Agisce su tutti i microrganismi, comprese le spore per alchilazione.

CAPPE A FLUSSO LAMINARE

Servono per riuscire a lavorare in sterilità e riuscire a non contaminare le vostre culture.

Le cappe a flusso laminare utilizzano dei filtri assoluti che vengono chiamati HEPA (High Efficiency Particulate Air) che riescono a filtrare particelle di 0,3 μm di diametro che sono presenti nell'aria. Quindi l'aria che attraversa questi filtri viene diciamo in un certo senso sterilizzata. Inoltre, il filtro HEPA ha la capacità di raddrizzare il flusso di aria che lo attraversa generando un **flusso laminare unidirezionale e privo di turbolenze** che aiuta a lavorare in sterilità.

Le cappe a flusso laminare garantiscono la sterilità per il campione, ma non garantiscono la protezione verso l'operatore.

La cappa a flusso laminare orizzontale: il flusso viene preso dal basso della cappa, viene indirizzato attraverso un motoventilatore verso la porzione alta della cappa, passa attraverso i filtri HEPA e viene direzionato in modo orizzontale.

La cappa a flusso laminare verticale: l'aria viene aspirata all'interno della cappa nel punto di ingresso delle mani, viene indirizzata sempre attraverso un motore verso l'alto dove viene filtrata attraverso un filtro HEPA e indirizzata in modo verticale dall'alto verso il piano di lavoro.

Garantisce il filtraggio dell'aria e un ambiente sterile. Inoltre, l'aria esce dall'altro e passa sempre attraverso un filtro.

Come possono essere le culture di mammifero?

Le culture di mammifero possiamo averle in due stati: in sospensione o in adesione.

Inoltre, possiamo avere due tipi differenti di colture:

- le culture primarie sono quelle culture che derivano da un frammento ad esempio di organo e in genere, hanno un numero di replicazioni ben definito, dopo il quale vanno incontro a apoptosi.
- le linee continue (immortalizzate e tumorali) hanno un numero di passaggi quasi infinito.

Bisogna ricordarsi che, mentre le cellule dei procarioti hanno tempi di duplicazione molto brevi (20-30 min), le cellule di mammifero hanno tempi di duplicazione lunghe (almeno 12-24 ore).

L'ingresso indesiderato dei microrganismi nel terreno di cultura è dannoso perché questi microrganismi competono con le cellule e gli agenti che sono nel terreno; inoltre, possono secernere delle sostanze tossiche.

I tipici contaminanti delle cellule in coltura sono batteri, micoplasmi, lieviti e muffe.

In caso di infezione batterica è molto semplice da vedere perché il terreno vira cioè cambia colore perché acidifica. Invece le infezioni da microplasma sono più difficili da riconoscere.

Per evitare il più possibile di aver contaminazioni nelle culture cellulari si utilizzano degli antibiotici (streptomicina e penicillina) che vengono aggiunti al terreno di cultura.

TIPI CELLULARI

Possiamo avere tre morfologie di base:

- cellule simili all'epitelio che crescono adese al substrato e hanno una forma poligonale
- cellule simili a linfoblasti che non sono attaccati al substrato, ma rimangono in sospensione e in genere una forma sferica
- cellule simili a fibroblasti che sono attaccati al mezzo di cultura e hanno una forma tendenzialmente bipolare

Ogni tipo di cellula cresce in condizioni ottimali differenti, bisogna conoscere sia il terreno che il mezzo di coltura in cui crescono.

Allora, molto importante per le nostre culture cellulari è il mezzo extracellulare in cui vengono fatte crescere. Abbiamo bisogno di:

- fase gassosa → gli incubatori in cui vengono fatte crescere le culture cellulari vengono addizionati di anidride carbonica al 5% (che corrisponde alla pressione di anidride carbonica cellulare misurata all'interno dei tessuti) questo perché così è possibile mantenere il pH del terreno di 7.2/7.4 grazie al sistema del tampone bicarbonato
- regolare la temperatura,
- conoscere il terreno
- il substrato di adesione.

È importante mantenere il corretto valore di pH e mantenere il grado di umidità che ha lo scopo di limitare l'evaporazione del terreno di coltura per non provocare l'aumento della pressione osmotica del terreno di coltura.

Il sistema tampone più utilizzato che quello del bicarbonato / acido carbonico, molto importante per mantenere il pH costante. È molto facile monitorare il pH perché nel terreno di cultura è addizionato il rosso fenolo che vira a seconda del pH:

- rosso-rosa (= pH corretto)
- terreno porpora violaceo (=troppo basico) quando c'è una contaminazione o quando l'umidità è troppo bassa o le cellule sono morte
- terreno che vira verso il giallo (=troppo acido) quando possiamo avere una contaminazione da batteri o la CO₂ deve essere aggiustata all'interno dell'incubatore oppure le cellule sono cresciute troppo nel mezzo di coltura e hanno acidificato il terreno.

La temperatura deve essere a 37° C.

Il terreno di cultura che viene comprato è addizionato da aminoacidi, vitamine, sali, glucosio e l'indicatore del rosso fenolo: questo è detto basic culture medium.

Al basic culture medium vanno aggiunti:

- gli antibiotici (vanno aggiunti all'ultimo perché sono labili)
- la glutammina
- il siero FBS (fetal bovine serum) che va scomplementato e aggiunto al terreno base

Il substrato di adesione

In laboratorio esistono due tipi di plastica:

- trattata utilizzata per le cellule che crescono in adesione
- non trattata utilizzata per le cellule che vengono cresciute in sospensione

L'aspetto delle plastiche è davvero identico quindi va letta bene l'etichetta sulla plastica.

I mezzi di cultura avvengono sono molto differenti e possiamo avere delle fiasche, delle piastre multi pozzetto e delle piastre Petri. Si usano in base al numero di cellule da coltivare.

La scomplementazione del siero

Il siero ha una:

- componente termolabile, data dalle proteine del complemento, che è in grado di lisare i batteri quando gli animali sono sensibilizzati contro quei batteri. È una componente aspecifica. Per questo motivo si va a scaldare il siero per mezz'ora a 56°C in modo da distruggere questa componente termolabile.
- componente termostabile, data dagli anticorpi, è una componente specifica

Quindi, quando dobbiamo preparare un terreno, dobbiamo

1. Scomplementare il siero

La scomplementazione del siero avviene per 30 minuti a 56°C e una volta scomplementato il siero va filtrato: si utilizzano dei filtri da 0,2 μm che si applicano ad una siringa

2. Dobbiamo capire come crescono le nostre cellule e quali sono i fattori di crescita da aggiungere al nostro terreno di cultura

Il terreno nel laboratorio è un terreno addizionato al 10% di FBS in cui aggiungiamo penicillina/streptomina, L-glutammina e FBS.

Ci sono dei terreni particolari come l'HAT a cui sono aggiunti anche i fattori che determinano la selezione degli ibridomi

3. Capire il numero di cellule perché ogni tipo cellulare ha un numero di cellule per piastra ottimale

Quindi bisogna contare le cellule:

per cellule deve prima staccarle dal substrato

contare almeno 3 quadranti

$n^{\circ} \text{ cell/mL} = \text{numero medio di cellule per quadrante} \times \text{fattore di diluizione} / 10^{-4} \text{ (volume)}$

SOLUZIONI PER CELLULE

Le cellule possono essere coltivate in sospensione (come linfociti B e T) o in adesione (gran parte delle altre cellule).

Durante la crescita bisogna monitorarle e verificare che non siano arrivate ad una densità troppo elevata, nel caso delle cellule in adesione si parla di **confluenza** delle cellule. Bisogna evitare che le cellule vadano a confluenza, perché le cellule possono andare incontro a stress, il terreno di coltura comincia ad acidificare (il terreno vira verso il giallo) e soprattutto cominciano a mancare i nutrienti.

Quindi, bisogna splittare, cioè prelevarle e dividerle aggiungendo del terreno fresco in modo tale da ridurre la densità delle cellule. Con le cellule in sospensione basta effettuare delle diluizioni, per le cellule in adesione bisogna staccare le cellule dal fondo della piastra di coltura prima di poterle sospendere in terreno.

Per quanto riguarda le culture di cellule in adesione, ci sono diversi metodi che possono essere utilizzati per staccare le cellule:

1. l'approccio meccanico: si utilizza uno strumento che si chiama cell scraper che permette di grattare via le cellule dal fondo della cultura. È un metodo abbastanza semplice, veloce ma comporta un elevato livello di morte cellulare per cui deve essere utilizzato nel caso in cui poi queste cellule non devono più essere rimesse in coltura, ma devono essere utilizzate per esempio per l'estrazione.

2. l'utilizzo di enzimi proteolitici

Il più famoso è la tripsinizzazione, cioè l'utilizzo della tripsina che taglia specificatamente tutte quelle proteine che sono necessarie alle cellule per poter aderire al fondo della piastra, l'unico svantaggio della tripsinizzazione è che vengono tagliate letteralmente le proteine di superficie e quindi questo può comportare chiaramente dei problemi per alcune applicazioni particolari
Nella pratica:

- 1) si toglie il terreno di coltura (le cellule sono adese e quindi tirando via il terreno di coltura non portate via le cellule),
- 2) si fa un lavaggio con una soluzione salina isotonica in PBS e questo è particolarmente importante perché serve per togliere eventuali detriti cellulari e soprattutto residui di terreno
- 3) si aggiunge una soluzione contenente tripsina, la si mette a incubare e per 5 minuti a 37°
- 4) si può risospesione nel terreno di coltura: bisogna aggiungere un volume di terreno completo contenente serio uguale al volume di tripsina. Questo è necessario per bloccare la reazione di tripsinizzazione, in realtà la tripsina non attacca le proteine sulla superficie della cellula ma quelle del siero.
- 5) Si possono essere centrifugare, si elimina il surnatante e le cellule vengono poi risospese in terreno fresco e vengono splittate in più piastre

3. l'EDTA

È un chelante di ioni equivalenti, soprattutto Ca^{2+} e Mg^{2+} , infatti alcune delle molecole che sono necessarie per l'adesione delle cellule per funzionare necessitano di calcio e magnesio, per cui aggiungere l'EDTA sequestra questi ioni e quindi favorisce il distacco delle cellule
Usato quelle che non aderiscono in maniera molto forte.

Bisogna fare grande attenzione dal tipo di plastiche utilizzate e quindi alle piastre per coltura cellulari che vengono usate. Le piastre di coltura possono essere:

- trattate adatte per far crescere le cellule in adesione. È stata trattata per avere dei fattori di adesione come il collagene, la gelatina, una fibronectina e la laminina che favoriscono l'adesione di cellule anche delle cellule che crescono in sospensione. Questa è importante perché ci possono essere degli esperimenti in cui anche cellule che crescono in sospensione debbano aderire come per esempio esperimenti di imaging.
- non trattate sono che le cellule in sospensione

Gli esperimenti di coltura cellulare prevedono che le cellule possono essere conservate per creare sostanzialmente degli stock, quindi bisogna congelarle: non si congelano chiaramente un congelatore normale ma si congelano in azoto liquido la temperatura di -196° . Non è possibile congelare le cellule direttamente nel loro medium di coltura perché questo comporterebbe la loro morte a causa della formazione di cristalli di ghiaccio ma anche dell'alterazione di elettroliti, disidratazione e di cambiamenti nel pH; per cui per poter conservare a lungo delle cellule queste vanno sospese in freezing medium che contiene degli agenti protettivi solitamente glicerolo e DMSO.

Le cellule, quindi, possono essere poi trasferite in una criovial, una particolare provetta che resiste a basse temperature.

Le cellule vanno congelate lentamente, proprio per evitare che si possono formare dei cristalli di ghiaccio che ne comportano la morte, quindi una buona pratica è quella di mettere prima le cellule nelle criobox poste prima in un congelatore a -80° per favorire la fuoriuscita di acqua dalle cellule e poi trasferite in un tank di azoto liquido e quindi a temperature di -196°C . Il rate di congelamento ottimale di circa 1° al minuto

Quindi vengono conservate in free medium, quindi 90% di siero e 10% di DMSO. È buona pratica congelare cellule che siano vitali e che quindi crescano in fase logaritmica.

Per poter procedere quindi con un congelamento lento di circa 1° al minuto, si utilizzano delle criobox, delle particolari scatole che all'interno presentano una spugna che viene imbevuta con isopropanolo. L'isopropanolo permette infatti il fenomeno di congelamento lento. La criobox poi viene messa in un congelatore a -80°C per tutta la notte.

Dopodiché viene trasferita molto velocemente nell'azoto liquido.

Le cellule una volta conservate possono stare per lunghi periodi di tempo.

Quando devono essere utilizzate però bisogna utilizzare sostanzialmente un procedimento opposto quindi uno scongelamento molto veloce: le cellule una volta prese dall'azoto liquido devono essere messe immediatamente in un bagnetto d'acqua calda già a 37°. Una volta che la soluzione medium è completamente scongelata, le cellule devono essere immediatamente trasferite in terreno fresco questo perché il DMSO comunque è parzialmente tossico per le cellule.

BSA è polvere

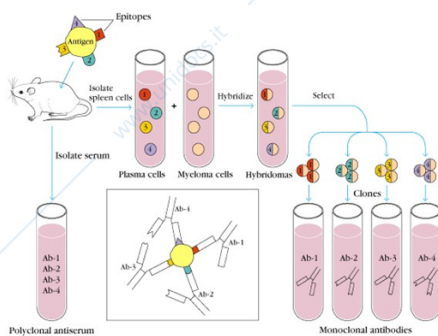
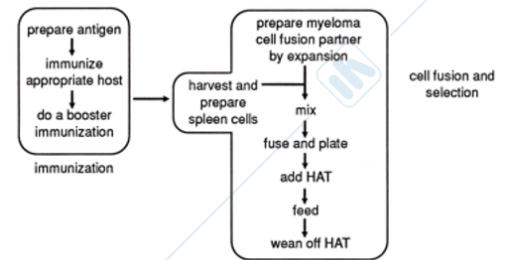
TWEEN-20 è liquido

FUSIONE E PRODUZIONE DI ANTICORPI MONOCLONALI

Produrre un anticorpo monoclonale in laboratorio non era così semplice, in quanto andavano incontro ad apoptosi nel giro di pochi giorni. Due scienziati Kohler e Milstein hanno sviluppato un sistema per produrre in laboratorio gli anticorpi di interesse: il sistema dell'ibridoma.

Per la produzione dell'anticorpo è necessario immunizzare un animale: in questo caso in laboratorio in genere si usano dei topi in cui viene iniettato un antigene con un adiuvante; in seguito alla prima immunizzazione si esegue una seconda immunizzazione che serve per avere una produzione più efficiente e efficace degli anticorpi.

Una volta immunizzati gli animali, si preleva la milza e si selezionano le cellule B che avrebbero un tempo di vita limitato; esse si fondono a delle cellule che donano alle cellule l'immortalità. Per selezionare queste cellule si utilizza l'HAT medium.

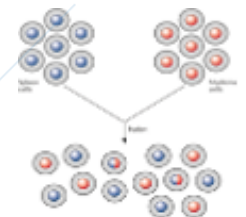


Le cellule che doneranno l'immortalità generalmente sono cellule di mieloma che sono state geneticamente modificate per non sopravvivere in un terreno selettivo.

Il topo immunizzato produrrà anticorpi specifici per i diversi epitopi dell'antigene quindi avremo nella milza un pool di cellule B produttrici anticorpi, ognuno dei quali riconosce un epitopo differente dell'antigene. Le cellule B vengono fuse con le cellule di mieloma, una cellula cancerogena, e verranno prodotti quindi ibridomi differenti, ognuno dei quali produrrà un anticorpo differente.

Utilizzando il polietilenglicole (una cera), si riesce a favorire la fusione della membrana tra le cellule ottenendo una popolazione mista che presenta:

- cellule che non si sono fuse;
- cellule B fuse con mielomi → ibridoma;
- mielomi fusi tra di loro;
- cellule B fuse tra di loro.



Le cellule B che non si sono fuse e le cellule B fuse tra di loro moriranno dopo circa 7-10 giorni perché non sono state rese immortali e quindi non sono in grado di sopravvivere in coltura.

Rimangono invece i mielomi non fusi, i mielomi fusi tra di loro e gli ibridomi.

Per selezionare l'ibridoma che produce l'anticorpo di interesse, misero a punto un terreno di coltura selettivo che faceva sopravvivere solo gli ibridomi.

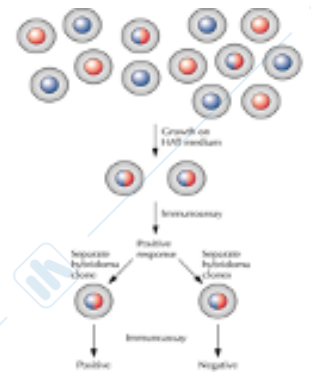
Il terreno HAT (ipoxantina - amminopterina - timidina) è un terreno selettivo dove sopravvivono solo gli ibridomi e non i mielomi. Le cellule di mieloma furono geneticamente modificate in modo da:

- non produrre anticorpi, così non interferiscono con quelli prodotti dall'ibridoma;
- non produrre l'enzima ipoxantina-guanina fosforibosil transferasi (HGPRT), che può generare guanina dall'ipoxantina.

Nel terreno HAT l'amminopterina blocca la normale via di sintesi degli acidi nucleici, ma essi possono essere sintetizzati anche a partire dalla timidina e ipoxantina grazie all'enzima appropriato.

Nei mielomi quindi tutte le vie di sintesi degli acidi nucleici vengono bloccate, per questo nel terreno HAT le cellule di mieloma muoiono.

Le cellule B che invece hanno mantenuto quell'enzima attivo, una volta fuse con i mielomi, per il fenomeno di complementazione riescono sopravvivere nel terreno HAT.



Gli ibridomi inizialmente presentano due nuclei, che nel tempo si uniscono, avviene il rimescolamento dei cromosomi, con una divisione cellulare si ritorna allo stato diploide.

Tra tutti gli ibridomi che crescono, bisogna selezionare soltanto quelli che producono l'anticorpo di interesse, quindi, si procede con la separazione delle singole cellule da cui si fanno crescere i cloni.

A questo punto si selezionano i cloni che producono l'anticorpo di interesse.

Le cellule infatti vengono fatte crescere in terreno HAT ma in pozzetti da in una piastra da 96 pozzetti: esse secernono l'anticorpo che quindi si trova nel surnatante

Esso viene analizzato tramite ELISA che ci indicherà in quale viene prodotto l'anticorpo di interesse.

A questo punto il pozzetto positivo per il nostro anticorpo viene piastrato nuovamente in un'altra piastra da 96 pozzetti con quella che viene chiamata **diluizione limite** o **clonale**, cioè una diluizione che viene fatta in piastra con diluizioni successive che portano ad avere una cellula per pozzetto. Questo processo viene chiamato clonaggio.

Prenderemo le cellule che sono contenute nel pozzetto e le amplifichiamo, in piastra; dopodiché si rifà appunto come vi aveva già detto una successiva diluizione. Questa piastra verrà analizzata sempre tramite ELISA che rileverà in quale pozzetto viene prodotto il nostro anticorpo.

L'analisi della produzione di anticorpi nei pozzetti e quindi il clonaggio viene fatta appunto più di una volta in modo da essere sicuri di ottenere un unico clone.

Il saggio ELISA indiretto misura quindi la produzione di anticorpo nel surnatante. È un metodo proprio visivo, il pozzetto che conterrà l'anticorpo monoclonale verrà colorato di giallo.

Il clone che produce l'anticorpo di interesse viene fatto crescere su una piastra un po' più grande da 24 pozzetti e viene poi rilevato e rianalizzato. Il clone può anche essere fatta crescere in un flasca.

Chiaramente queste cellule verranno congelate per essere sicuri di non perdere il clone di cellule di interesse.

Il surnatante può essere usato così com'è perché all'interno del cellule è presente l'anticorpo monoclonare oppure può essere concentrato e purificato.

MLR

L'MLR (Mixed Lymphocyte Reaction) è un esperimento usato per il rigetto dei trapianto in cui si valuta l'istocompatibilità.

Prendiamo le milze di due topi con due background genetici differenti (BALB con MHC di aplotipo d e C57 con MHC di aplotipo b) che quindi hanno due MHC diversi.

Mettendo in contatto le cellule T di un topo con gli splenociti (cioè le APC) dell'altro, si genera una reazione con alloriconoscimento. L'attivazione delle cellule T porta alla produzione di interleuchina 2 che sarà poi misurata tramite ELISA.

Quindi ci permetterà di capire se effettivamente è avvenuto l'alloriconoscimento,

1. Si prendono le milze dei topi BALB e C57
2. Si purificano i linfociti T e gli splenociti al cui interno ci sono diverse APC: si fa tramite selezione positiva, cioè si utilizzano degli anticorpi che hanno come bersaglio i linfociti T helper e citotossici.
3. Si mischiano gli splenociti dei BALB con i linfociti T dei C57 e viceversa e questo genera un alloriconoscimento, quindi attivazione delle cellule T, proliferazione e produzione di IL-2
4. Si misura la produzione di IL-2 tramite ELISA

dunque la prima cosa che andrà a fare sarà quella di purificare i linfociti T tramite la MACS (Magnetic Activated Cell Sorting).

Si effettuerà prima ramite selezione positiva: utilizzando degli anticorpi che bersagliano specificatamente i linfociti T helper e T citotossici; gli anticorpi sono coniugati con dalle famiglie magnetiche.

Nella pratica sostanzialmente andremo a creare una sospensione di cellule della milza che contiene sia linfociti che APC. La sospensione poi verrà incubata con questi anticorpi e verrà fatta passare attraverso una particolare colonnina che verrà posizionata su una piastra magnetica: le cellule T marcate con gli anticorpi rimangono nella colonna, mentre il diluito conterrà tutto ciò che non è stato marcato con l'anticorpo coniugato con la biglia, comprese le APC, cioè la selezione negativa.

Possiamo quindi recuperare la nostra colonna, allontanandola dal magnete facendo così eluire la frazione positiva quindi i linfociti T.

Metteremo in co-coltura gli splenociti dei BALB con le cellule T dei C57 e viceversa generando una un miked lymphocyte reaction. Inoltre, come controlli negativi, metteremo insieme gli splenociti dei BALB con le cellule T dei BALB e gli i splenociti dei C57 con le cellule T dei C57. Queste colture che contengono cellule con lo stesso aplotico MHC non daranno luogo a nessuna reazione, quindi a nessuna produzione di !L-2.

Il readu out dell'esperimento sarà quindi la produzione di !L-2 tramite ELISA sandwich: solo tra strain diverse i linfociti T riconoscono le APC come non self e producono IL-2.

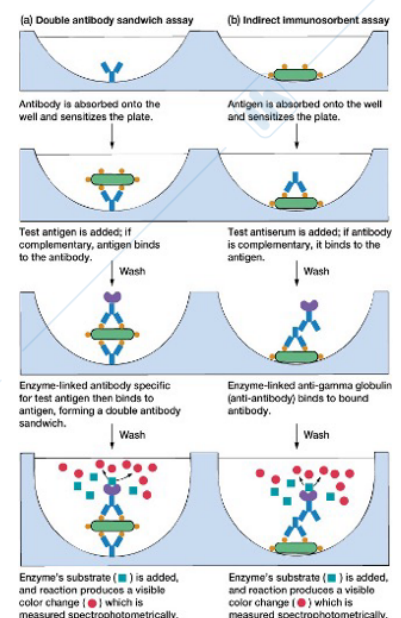
ELISA

ELISA = Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

È un test usato per rilevare e quantificare anticorpi/antigeni in una matrice biologica (siero, surnatanti di coltura cellulare, lisato tissutale).

Ci sono due tipi di ELISA:

- **diretto** in cui si rileva la presenza di un antigene usando l'anticorpo specifico, quindi è l'anticorpo che viene adeso (fase di coating) alla piastra. Lo usiamo per verificare l'avvenuta attivazione delle cellule T in seguito ad MLR.
- **indiretto** in cui si può sostanzialmente misurare la concentrazione dello specifico anticorpo usando l'antigene specifico, quindi l'antigene viene attaccato alla piastra (coating) a cui poi si aggiunge la soluzione o matrice biologica da cui misurare la concentrazione dell'anticorpo. Lo sfruttiamo per verificare l'avvenuta produzione di anticorpi monoclonali in seguito alla fusione.



- misura in maniera molto specifica e sensibile la concentrazione
- è rapido, specifico
- non richiede l'uso di strumenti costosi a meno che non si voglia automatizzare questa procedura

Per l'ELISA si usa una piastra da 96 e 384 pozzetti, è costituita da una plastica particolare che è particolarmente porosa ed assorbente perché la prima fase del di un saggio ELISA, sia diretto che indiretto, è la fase di coating, ovvero di di copertura del fondo della piastra con l'antigene oppure l'anticorpo.

ELISA INDIRETTO

Viene utilizzato per misurare specificatamente la concentrazione o la positività a determinati anticorpi:

- per fare lo screening dei supernatanti del nostro esperimento di ibridoma quindi per verificare che effettivamente si siano formati dei ibridomi e quindi degli anticorpi monoclonali
- per misurare la presenza di autoanticorpi, anticorpi specifici nei confronti di alcuni virus (HIV, epatite B, COVID) oppure la presenza di autoallergeni (autoanticorpi contro allergeni)

PRIMA FASE: COATING

Il coating viene fatto con l'antigene specifico per l'anticorpo che noi vogliamo misurare: esso si lega in modo aspecifico.

SECONDA FASE: BLOCKING

Si esegue prima un lavaggio con PBS per poter lavare l'eccesso di antigene che è stato utilizzato. Dopodiché si procede con la fase di blocking usando una blocking solution, una soluzione che contiene BSA utilizzata per saturare tutti i siti aspecifici di legame.

Infatti, la piastra per ELISA è super assorbente (sia sul fondo che sulle pareti) per cui tutte quelle porzioni di piastra che non hanno assorbito l'antigene devono essere saturati con una proteina non reattiva nei confronti dell'anticorpo.

La fase di blocking è di fondamentale importanza per evitare potenziali falsi positivi.

TERZA FASE: CAMPIONE

A questo punto si può aggiungere il nostro campione di riferimento in cui vogliamo misurare la presenza di un anticorpo specifico che andrà a interagire specificatamente con l'antigene.

Generalmente si incuba per 1-2 ore a temperatura ambiente, il processo può essere velocizzato ponendolo a 37°C.

Se il campione è meno concentrato, è meglio incubare per tempi più lunghi e temperatura più basse.

QUARTA FASE: ANTICORPO SECONDARIO

A questo punto si effettua qualche lavaggio per togliere l'eccesso di campione.

Si aggiunge la soluzione con l'anticorpo secondario che coniugato con un enzima permette di misurare con una reazione colorimetrica l'anticorpo di interesse.

Questo anticorpo secondario è un anti-anticorpo specifico per la frazione FC dell'anticorpo: solitamente ha una regione specifica nei confronti dell'FC di una determinata specie (umana, murina).

Anche l'anticorpo secondario deve essere incubato per 1 ora a 37°C o 2 ore a temperatura ambiente.

QUINTA FASE: RILEVAZIONE

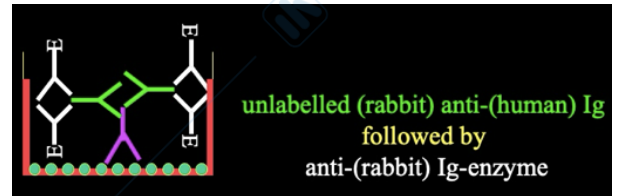
L'ultima fase è quella della rilevazione: l'anti-anticorpo è coniugato ad un enzima che reagisce specificatamente con un substrato di reazione che genera colore.

Tramite il viraggio di colore si può misurare qualitativamente se è presente l'anticorpo e, se costruiamo una curva standard, possiamo anche quantificare la presenza dell'anticorpo di interesse.

Può capitare che la concentrazione dell'anticorpo sia estremamente bassa per cui è necessario amplificare il segnale. Utilizzando l'approccio di aggiunta diretta dell'anticorpo secondario che è specifica per la frazione FC dell'anticorpo non è possibile detectare il segnale: per ciascun anticorpo primario si legano due anticorpi secondari.

Si possono utilizzare degli anticorpi secondari di una specie differente dell'anticorpo primario che riconoscono in maniera specie specifica all'anticorpo primario, Siccome è stato generato in una specie differente rispetto all'anticorpo primario è possibile poi utilizzare un ulteriore anticorpo, l'anticorpo terziario, che riconosce la frazione la frazione FC specifica dell'anticorpo secondario, riuscendo così ad amplificare ulteriormente il segnale perché abbiamo due anticorpi secondari a cui si legano quattro anticorpi terziari.

Ad esempio se l'anticorpo di interesse è umano, si usano anticorpi secondari di specie murina che riconoscono la frazione FC della specie umana. L'anticorpo terziario riconosce invece la frazione FC della specie murina.



Uno degli approcci più utilizzati per l'amplificazione del segnale è quello di utilizzare degli anticorpi secondari coniugati con la biotina.

La biotina forma dei legami molto forti con la streptavidina: ogni molecola di biotina permette di legare a sua volta fino a quattro molecole di streptavidina che è coniugata con un enzima colorimetrico, l'horseradish peroxidase (HRP).

Quindi l'anticorpo primario riconosce due anticorpi secondari che sono coniugati alla biotina, aggiungendo poi in seguito la streptavidina coniugata con lo perossidasi si può amplificare il segnale. La procedura quindi richiede un'ulteriore passaggio: dopo l'aggiunta dell'anticorpo secondario con la biotina, poi va aggiunta la streptavidina, è possibile poi effettuare dei lavaggi per rimuovere la streptavidina in eccesso che non si è legata alla biotina e poi procedere con la detection.

I substrati utilizzati per la reazione con l'HRP sono le benzidine, in particolar modo la TMB. Quando aggiunto come substrato genera un pigmento blu che può essere eletta allo spettrofotometro alla lunghezza di 450 nm.

L'intensità della colorazione è in funzione della concentrazione dell'anticorpo primario. Questo è relativamente vero, dopo aver incubato, la reazione va stoppata prima che il substrato si reagisca tutto con HRP. Se non si ferma la reazione, il segnale sarebbe uguale per tutti, anche a concentrazioni differenti di enzima e quindi di anticorpo.

Per fermare la reazione, si aggiunge la fosfatasi alcalina e del suo substrato (paranitrofenolo fosfato, PNP) generando una reazione più stabile che genera una colorazione gialla che può essere letta allo spettrofotometro a una lunghezza di 405 nm.

Nell'esperimento utilizzeremo l'ELISA per verificare la presenza di ibridomi che producono l'anticorpo di interesse. Non ci interessa una quantificazione assoluta.

ELISA DIRETTO o SANDWICH

L'ELISA diretto è anche detto sandwich perché l'antigene che viene detectato si ritrova letteralmente in mezzo due strati di di di anticorpi.

Sfruttiamo questo test per andare a misurare la concentrazione di IL-2 prodotte in seguito all'esperimento di MLR per verificare se è avvenuta la reazione di alloriconoscimento.

PRIMA FASE: COATING

Il primo passaggio è la fase di coating, utilizzando un anticorpo che bersaglia specificatamente l'analita, quindi nel nostro caso, un anticorpo contro l'IL-2.

SECONDA FASE: BLOCKING

Come per l'ELISA indiretto, bisogna poi procedere con la fase di blocking con PBS + BSA 3%. Altrimenti l'IL-2 potrebbe legarsi a tutti quei siti aspecifici presenti sulla piastra, generando potenziali falsi positivi o semplicemente andando ad alterare i livelli di concentrazione reali presenti nel nostro campione.

Si incuba per 1 ora a 37°C

TERZA FASE: CAMPIONE

Si può aggiungere il campione con un'incubazione sempre per 1 ora a 37°.

QUARTA FASE: ANTICORPO SECONDARIO

A questo punto si può procedere con l'aggiunta dell'anticorpo secondario, che bersaglia specificatamente l'antigene, coniugato all'enzima e che quindi serve poi per la fase di detection.

QUINTA FASE: RILEVAZIONE

Per aumentare la sensibilità è necessario amplificare il segnale: il miglior modo per amplificare il segnale di utilizzare un anticorpo secondario coniugato alla biotina.

La biotina poi può riconoscere quindi fino a quattro molecole di streptavidina che coniugata l'HRP. La soluzione streptavidina può essere incubata per circa mezz'ora a temperatura ambiente; dopodiché, dopo aver tolto la soluzione, viene effettuato il lavaggio. Si può procedere poi con l'aggiunta del substrato. Anche in questo caso è importante stoppare la reazione.

L'intensità della colorazione sarà in funzione della concentrazione dell'antigene perché:

- l'intensità della reazione colorimetrica è proporzionale alla quantità di enzima
- la quantità di enzima presente nel pozzetto proporzionale alla quantità di anticorpo secondario
- la quantità di anticorpo secondario proporzionale alla quantità di antigene

Però la reazione colorimetrica può essere solo semiquantitativa se nella stessa piastra a quella dell'ELISA non sono stati aggiunti dei campioni standard a concentrazione nota.

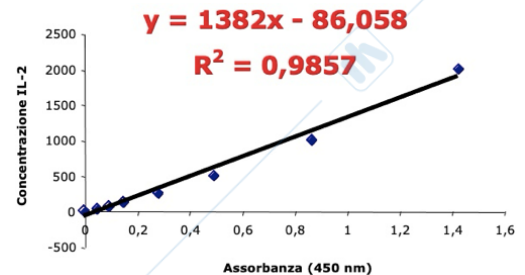
RETTA DI TARATURA

Quindi, in seguito al saggio, se si vuole ottenere un'analisi quantitativa è necessario costruire una retta di taratura.

Alcuni dei pozzetti conterranno concentrazioni note del nostro analita: partendo da una soluzione a concentrazione nota, si fanno delle diluizioni seriali 1:2.

Misurando allo spettrofotometro, si ottengono le misure relative di assorbanza: siccome l'intensità della colorazione è proporzionale alla concentrazione dell'analita, conoscendo la concentrazione è possibile plottarli e la crescita è direttamente proporzionale, quindi i punti (assorbanza, concentrazione) si disporranno lungo una retta.

Nota quindi l'assorbanza di una concentrazione incognita, si può determinare la concentrazione.



È importante aggiungere anche campioni non solo tal quali, ma anche diluiti perché bisogna evitare che la concentrazione di IL-2 all'interno dei campioni sia superiore o inferiore sia al di fuori della linearità della retta di taratura.

Nel nostro esperimento, si esegue anche un controllo negativo: BALBxBALB e C57xC57 non dovrebbero produrre IL-2.

DILUZIONI PER RETTA DI TARATURA

Si preparano le diluizioni di una piastra speculare all'ELISA ma non è maxisorb, inoltre è a fondo ad U.

In questa piastra, detta "gemella", bisogna preparare le soluzioni a concentrazioni nota.

Si parte da IL-2 ricombinante a 20ng/ml e dobbiamo preparare nel primo pozzetto A1 IL-2 a 2ng/ml con volume finale a 260 μ L di PBS (concentrazione massima della retta di taratura).

Bisogna mettere 26 μ L di IL-2

Successivamente si procede con diluizioni seriali 1:2:

- riempire i successivi pozzetti a 130 μ L
- aggiungere dal pozzetto precedente 130 μ L della soluzione.

ATTENZIONE: l'ultimo pozzetto sarà il bianco (NON fare trasferimenti)

Una volta preparate le diluizioni seriali, si trasferiscono 50 μ L sulla piastra ELISA

Noi non facciamo le diluizioni per i campioni.

Si fa un **replicato tecnico** per irrobustire le posizioni della retta (la media di più valori è meglio di un solo risultato): se non sono uguali c'è un problema tecnico.

Il volume da prelevare per le diluzioni seriali dovrebbe essere $100 \mu\text{L}$ perché, per il replicato, se ne prelevano $50 \mu\text{L} \times 2$.

Per l'errore tecnico ne preparo in eccesso, quindi ad esempio $260 \mu\text{L}$.

Dopo aver ottenuto le assorbanze, si sottrae al valore dell'assorbanza il bianco perché di default quello dovrebbe essere lo 0.

Si costruisce la retta assorbanza (x) - concentrazione (y)

Si interpola la retta per restituire anche R^2 che è un valore che mostra quanto fittano i punti dalla retta (si deve avvicinare all'1, va bene da 0,95 circa)

Dai valori dell'assorbanza del campione si ottengono le concentrazioni dei campioni.

Due cose importanti:

1. OD non deve essere maggiore di 1
2. Dalla retta di taratura non si può estrapolare una concentrazione maggiore di quella massima degli standard (valore fuori scala, la retta non è affidabile). In questo caso bisogna rifare l'esperimento diluendo il campione → bisogna lavorare nel range di linearità

Sensibilità di ELISA:

Se ci sono poche cellule che rilasciano la citochina di interesse, può essere che siamo sotto il limite di detenzion.e

Soluzione: usare ELISA più sensibile, cambiare approccio (amplificazione), in pochi casi si riesce a concentrare il surnatante.