

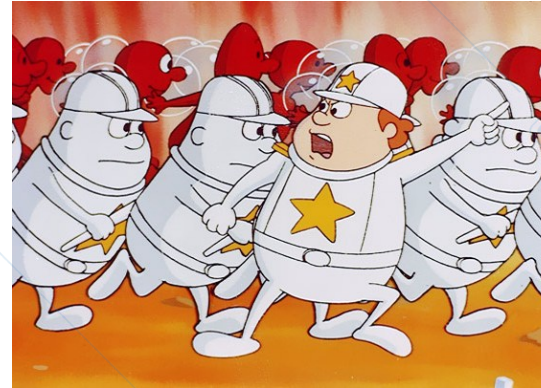
Anticorpi: caratteristiche, struttura e funzioni

-09/04/2019-

Il sistema immunitario

Il sistema immunitario protegge cellule e tessuti del corpo umano da microrganismi infettivi (virus, batteri, tossine, funghi, micoplasmi e protozoi) ed aiuta l'organismo ad eliminare parassiti e tossine, combattere tumori e cellule neoplastiche.

Il suo ruolo fisiologico è quello di mantenere la normale funzionalità dell'organismo.

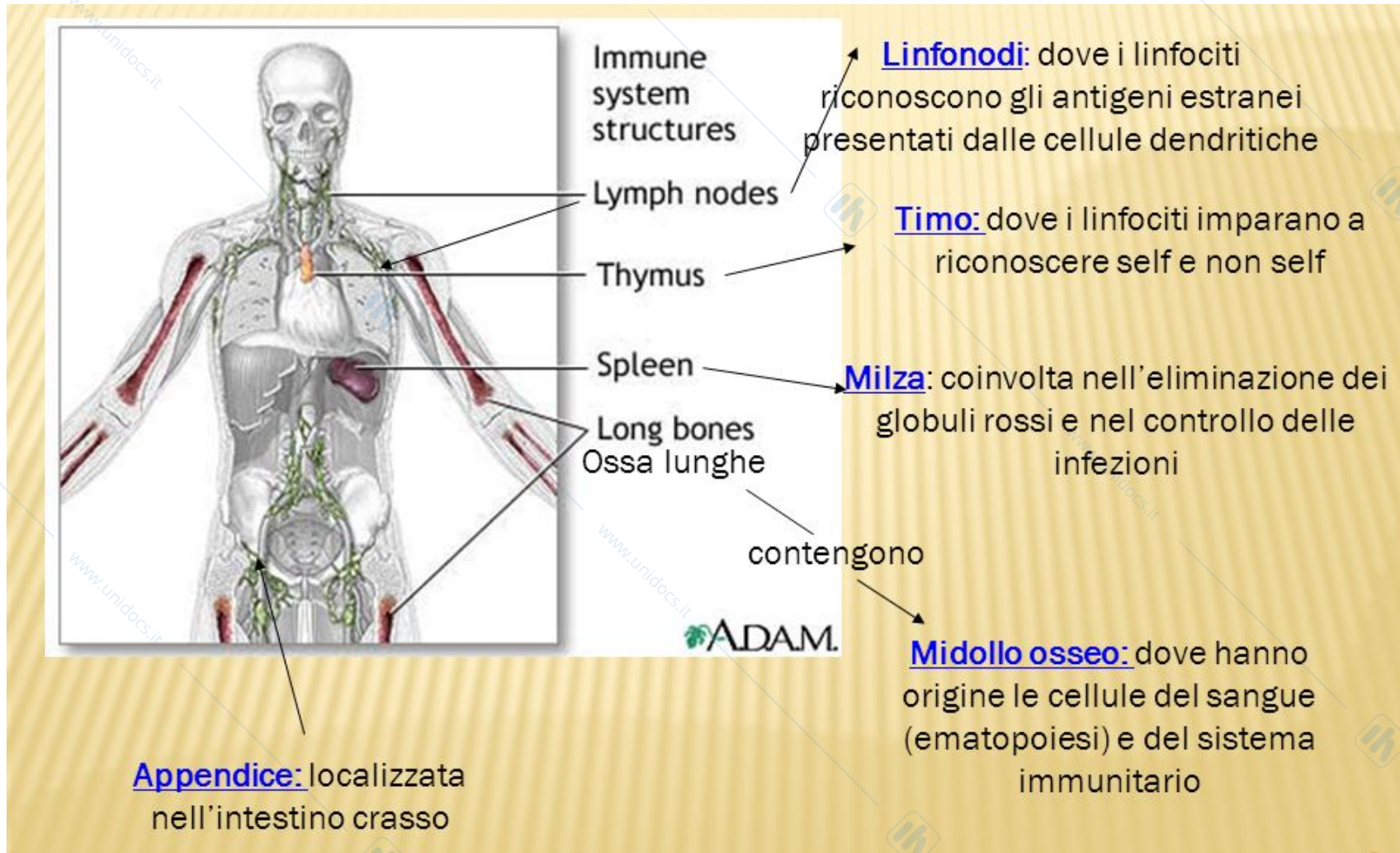


Immunità deriva dal latino *immunitas* = libertà da
Indica la resistenza alle malattie infettive

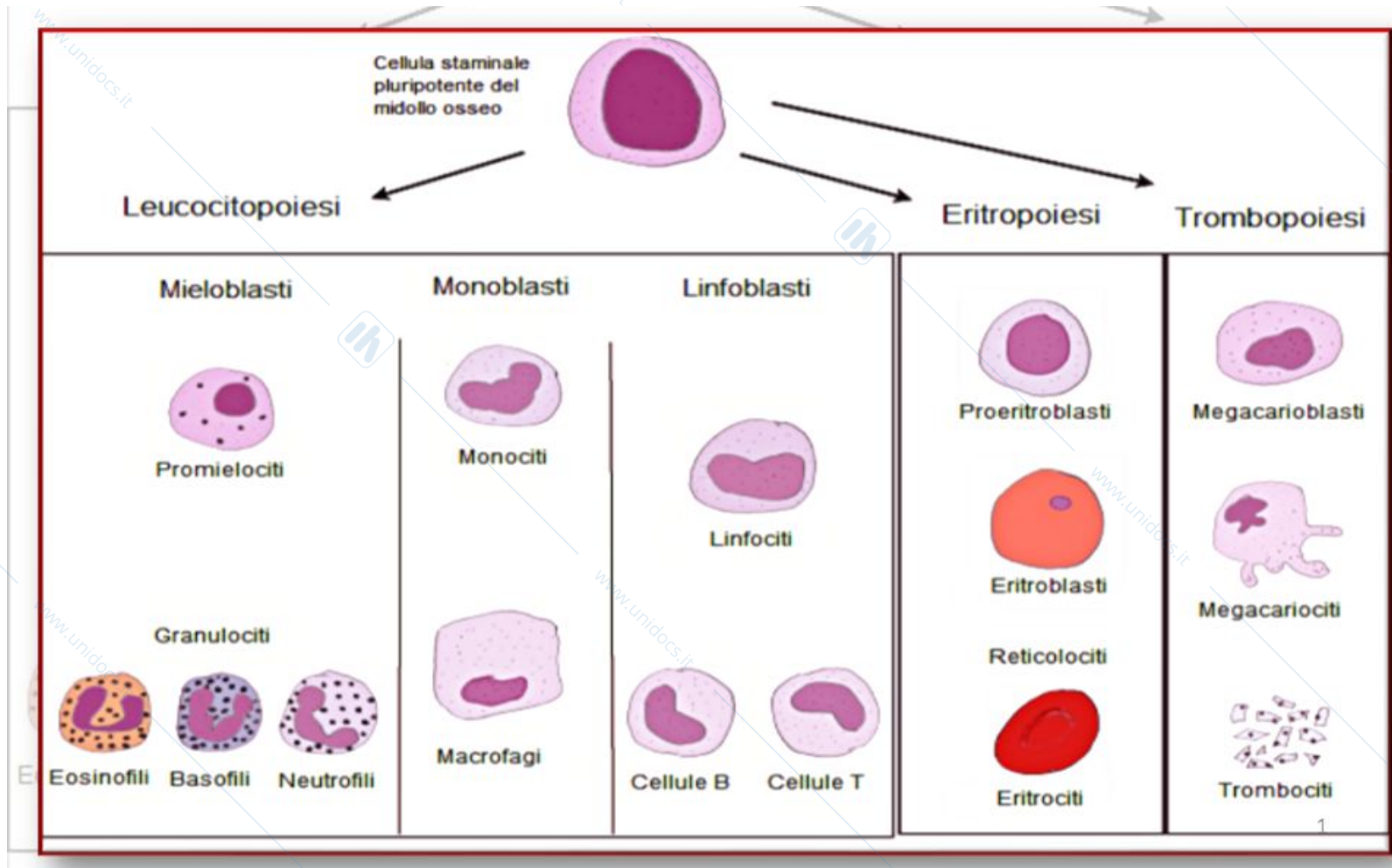
Il sistema immunitario e le reazioni che esso mette in atto contro le molecole riconosciute estranee (*non self*) sono studiate dall' **IMMUNOLOGIA**

Il sistema immunitario: gli organi

Le cellule del sistema immunitario hanno origine nel midollo osseo



Cellule del sistema immunitario



Risposta immunitaria

I diversi meccanismi di difesa che mette in atto il sistema immunitario possono essere classificati in due modi:

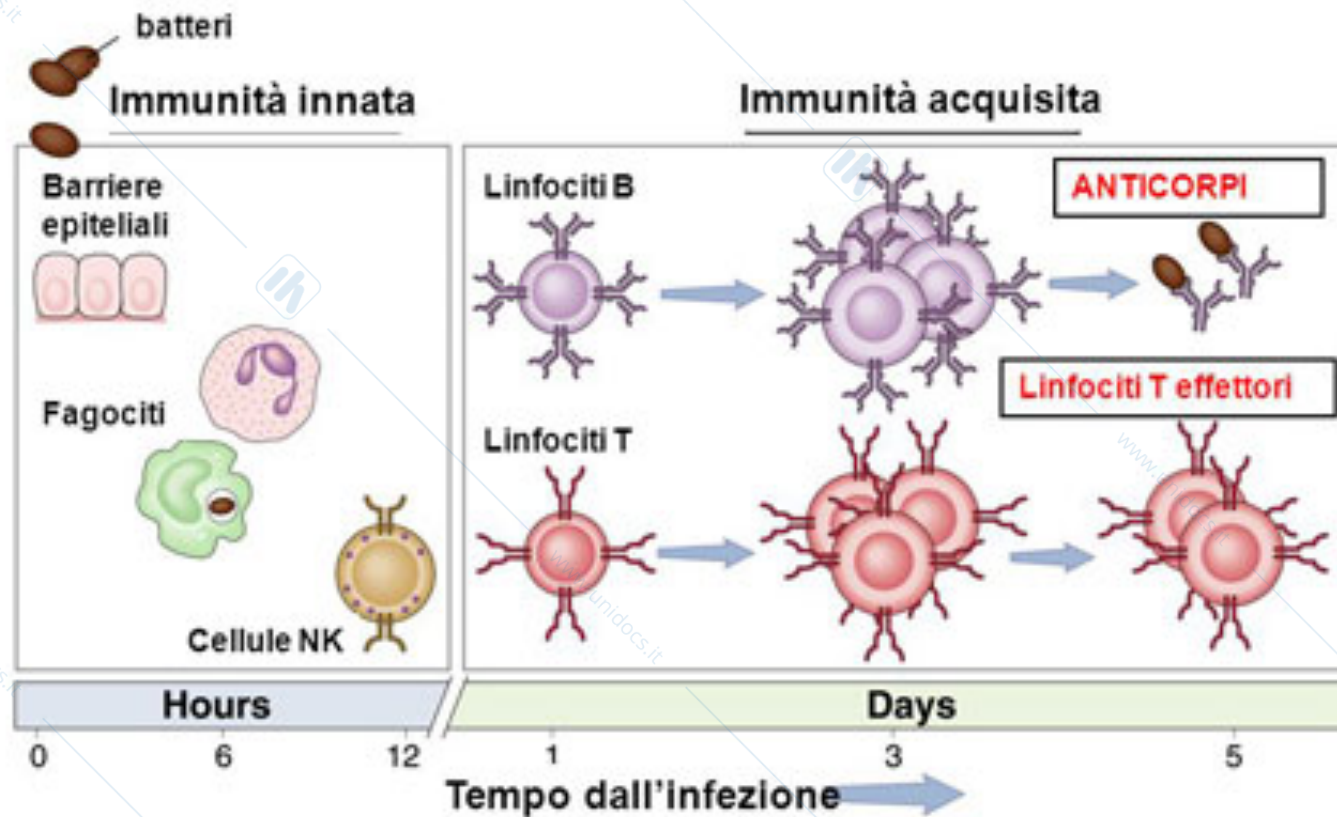
immunità innata (naturale, aspecifica)

- Non richiede precedente esposizione alla sostanza estranea
- E' mediata in primo luogo da cellule di origine monocitica (i macrofagi) e da leucociti polimorfonucleati.
- Non distingue chiaramente tra self e non self ma costituisce una prima linea di difesa rapida e potente.

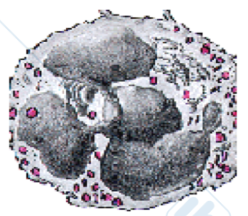
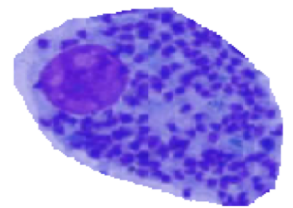
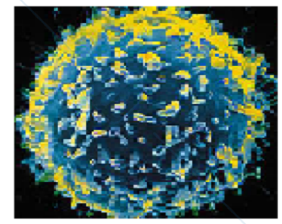
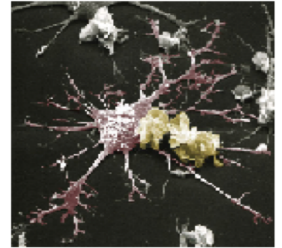
immunità adattiva (acquisita, specifica)

- E' mediata principalmente da linfociti
- Richiede l'esposizione alla sostanza non self per essere innescata (priming).
- A sua volta può essere mediata da cellule ed umorale.

Risposta immunitaria



Cellule dell'immunità naturale

cellule	 granulociti	 macrofagi	 cellule NK	 dendriti
funzioni	<ul style="list-style-type: none">• fagocitosi• peptidi antimicrobici (defensine e catelecidine)	<ul style="list-style-type: none">• fagocitosi• mediatori dell'infiammazione• Citochine• Complemento• O₂ attivo• NO• Prostaglandine• Attivazione linfociti B• presentazione Ag	<ul style="list-style-type: none">• lisi cellulare• Interferone• Attivazione dei macrofagi	<ul style="list-style-type: none">• presentazione antigeni• Interferone• attivazione macrofagi• citochine

Cellule dell'immunità innata

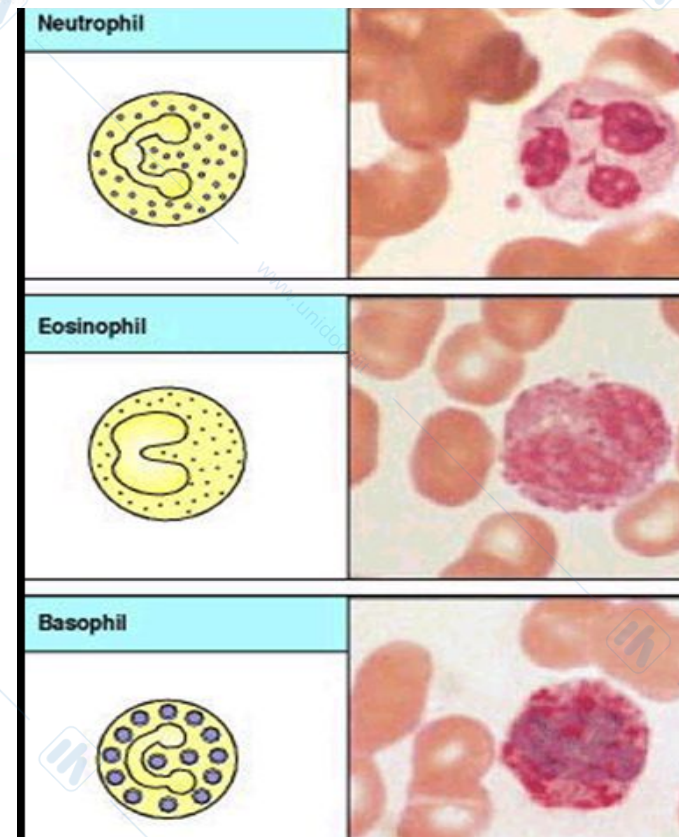
Granulociti

Polimorfonucleati (PMN) o granulociti sono cellule fagocitiche (*short-lived*) che contengono granuli (lisosomi) in cui vengono prodotti enzimi idrolitici, radicali perossidi e superossidi (tossici per qualsiasi microrganismo) e anche proteine battericide come la lattoferrina.

I PMN giocano il ruolo di protezione maggiore contro le infezioni.

La mancata funzionalità dei PMN è accompagnata da infezioni croniche e ricorrenti.

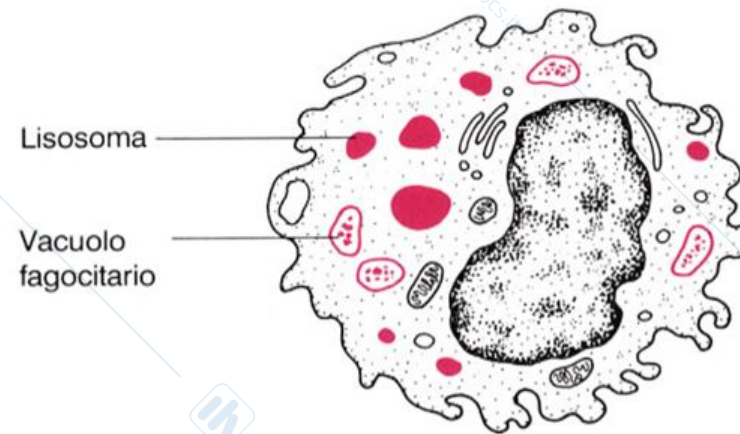
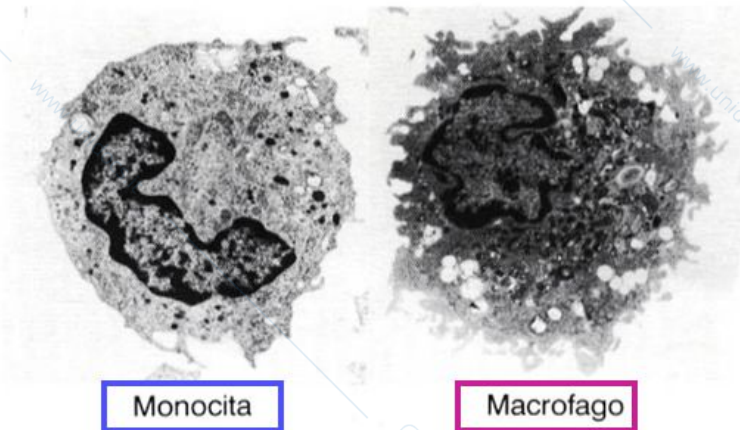
- **Neutrofili** - fagocitosi detriti/patogeni
- **Eosinofili** - agiscono sui parassiti
- **Basofili** - importanti nelle allergie (IgE)



Cellule dell'immunità innata

Macrofagi

- Derivano dai monociti che circolano nel sangue continuamente e poi migrano nei tessuti dove differenziano in macrofagi
- Insieme con i granulociti e le cellule dendritiche, costituiscono i *fagociti* del sistema immune
- Svolgono funzioni sia nella risposta innata che in quella adattativa
 - Fagocitosi di microrganismi nella risposta innata, eliminazione di patogeni attaccati dalla risposta adattativa
 - Presentano l'antigene alle cellule della risposta adattativa
- Oltre alla fagocitosi inducono la risposta infiammatoria e producono citochine regolatorie
- Aldilà della funzione nell'immunità, sono spazzini generali dei nostri tessuti

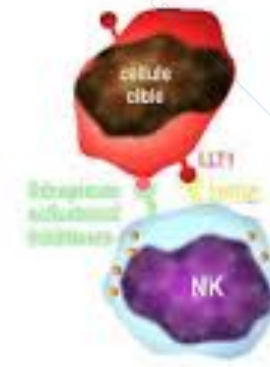


Cellule dell'immunità innata

Cellule NK (Natural killer)

Sono grossi linfociti granulari (LGL) che hanno il compito di eliminare le cellule tumorali e quelle infettate da virus tramite lisi cellulare.

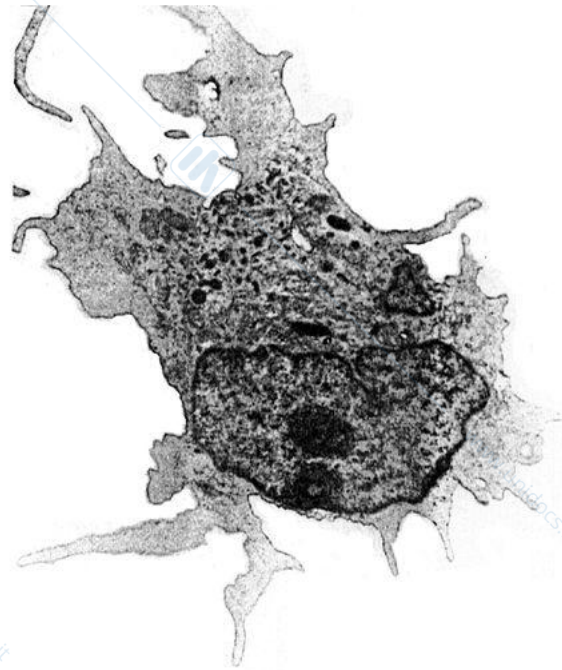
- Provengono dalla differenziazione delle cellule staminali linfoidi prodotte nel midollo osseo.
- Rappresentano dal 5 al 16% della popolazione totale dei linfociti umani.
- Producono interferone gamma
- Inducono l'attivazione dei macrofagi



Cellule dell'immunità innata

Cellule dendritiche (APC)

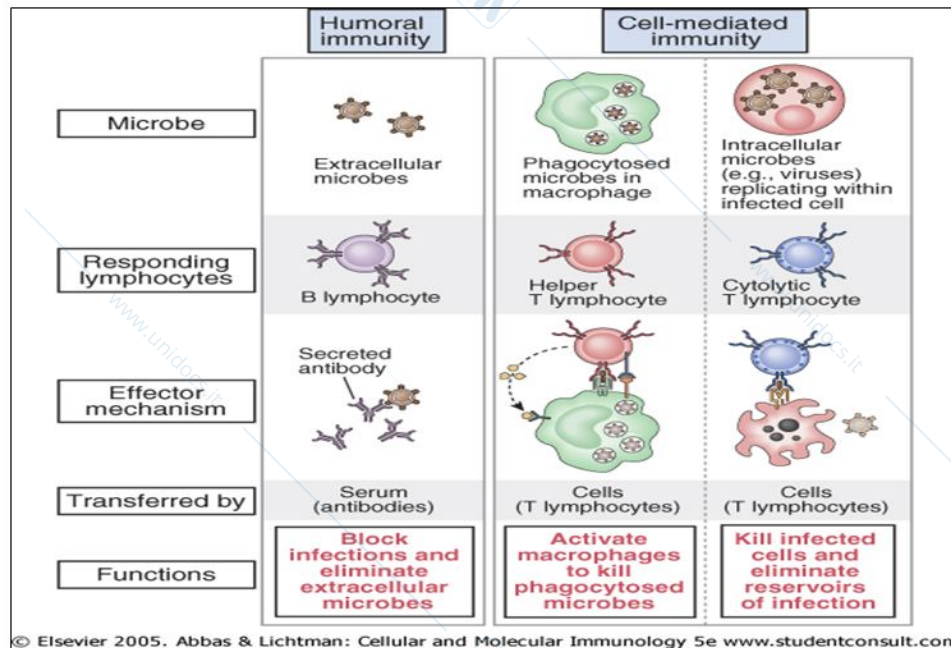
- Derivano dai monociti, localizzate sull'epitelio della pelle, del tratto respiratorio e dell'intestino. Dopo aver preso l'antigene per pinocitosi o fagocitosi attivano il rilascio di citochine e migrano verso i linfonodi per presentare l'antigene ai linfociti T localizzati nella corteccia dei linfonodi.



Immunità adattiva

Immunità mediata cellule: è attribuita principalmente all'azione dei **linfociti T** che interagiscono con sostanze estranee (**antigeni**) in modo specifico e mettono in atto una serie di processi immunologici

Immunità umorale: è mediata principalmente da proteine solubili, dette **anticorpi**, che circolano nel sangue e permeano la maggior parte degli organi. Possono anche essere presenti sulla superficie cellulare dove fungono da recettori di antigene e proteine di legame.

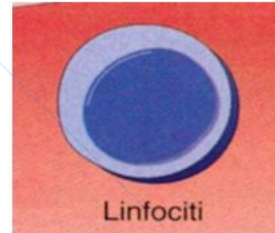


Gli **anticorpi** sono prodotti dai **linfociti B** (sotto l'influenza di altri tipi di cellule x es. linfociti T helper). Le cellule B al termine della loro differenziazione, dette **plasmacellule**, sono le più potenti secretrici naturali di anticorpi.

Cellule dell'immunità adattiva

Linfociti

Linfociti T 70-75%
Linfociti B 10-15%



Immunità umorale → **linfociti B**

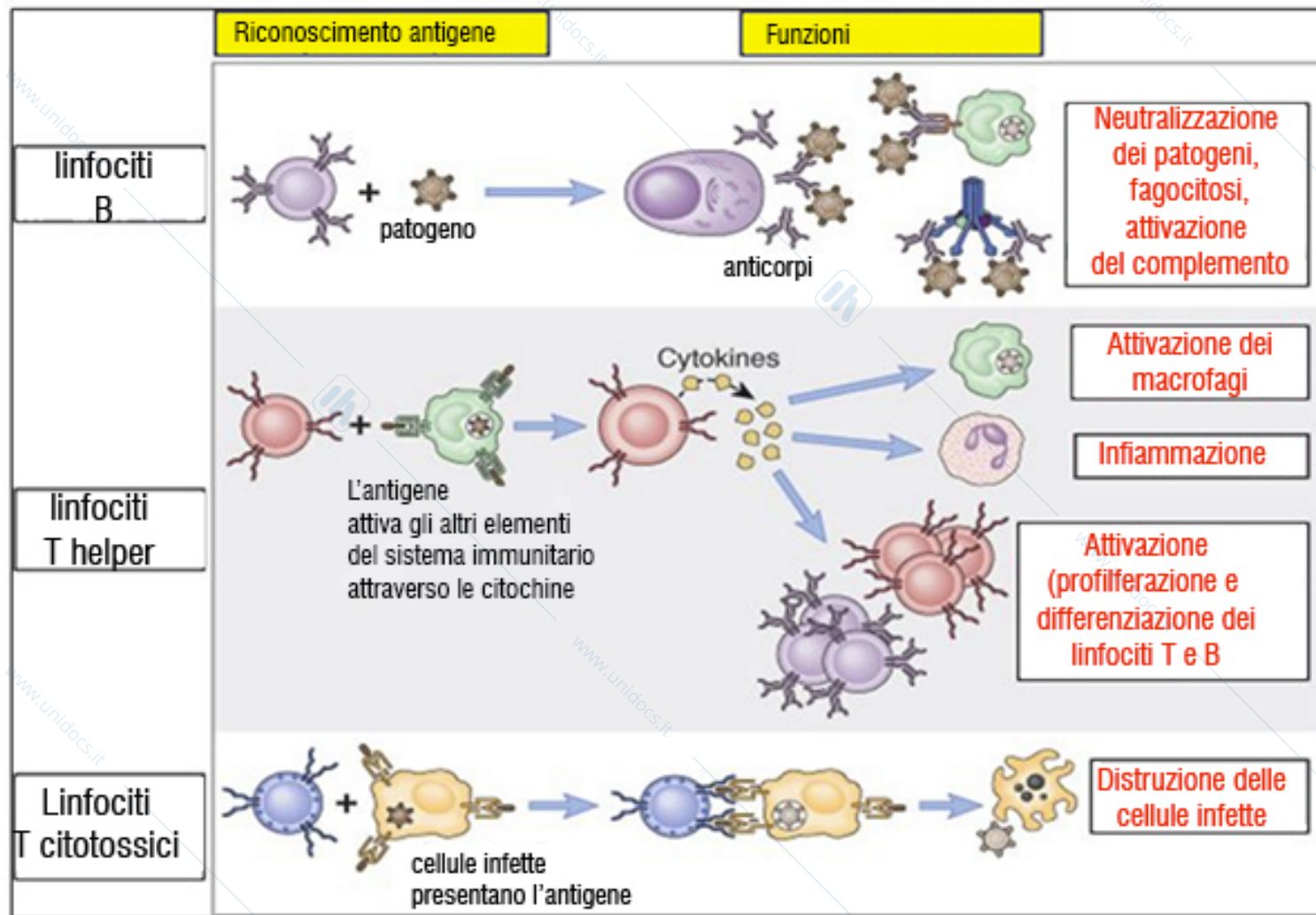
- Si formano e divengono immunocompetenti nel midollo osseo
- Responsabili della risposta immunitaria umorale
- Possono differenziare in *Plasmacellule* e produrre anticorpi

Immunità cellulo-mediata → **linfociti T**

- Migrano dal midollo osseo al Timo dove maturano.
- Costituiscono la risposta cellulo-mediata del sistema immunitario.

- **T Citotossici**: contatto diretto ed uccisione cellule estranee o infetti
- **T Helper**: inizio e sviluppo della risposta immunitaria
- **T suppressor**: soppressione della risorsa immunitaria

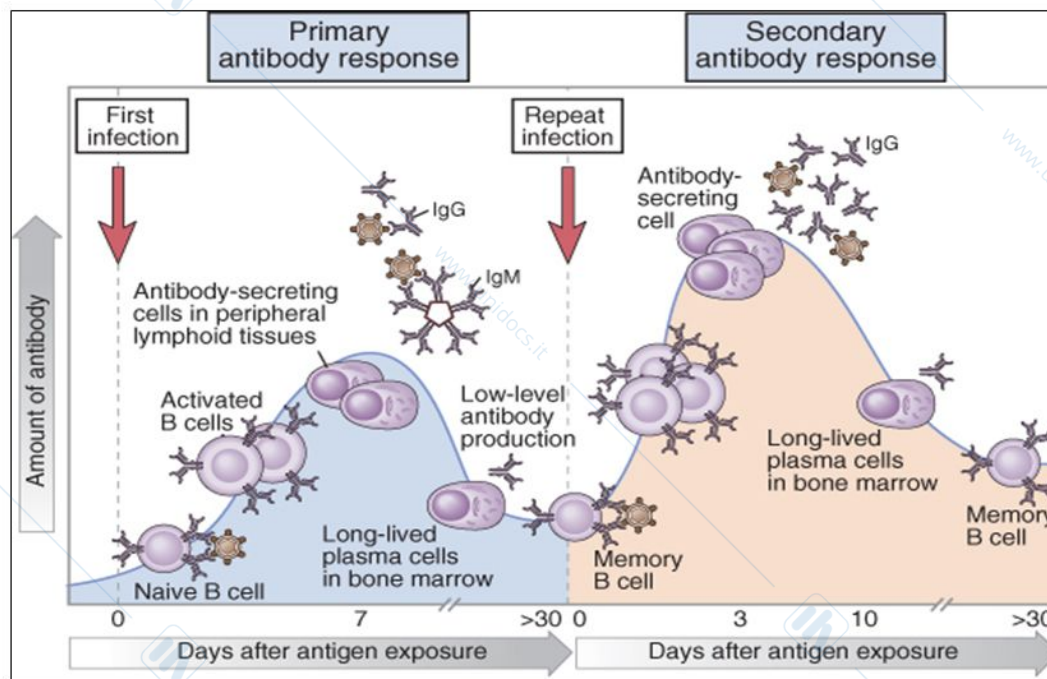
Cellule dell'immunità adattiva



Risposta immunitaria primaria e secondaria

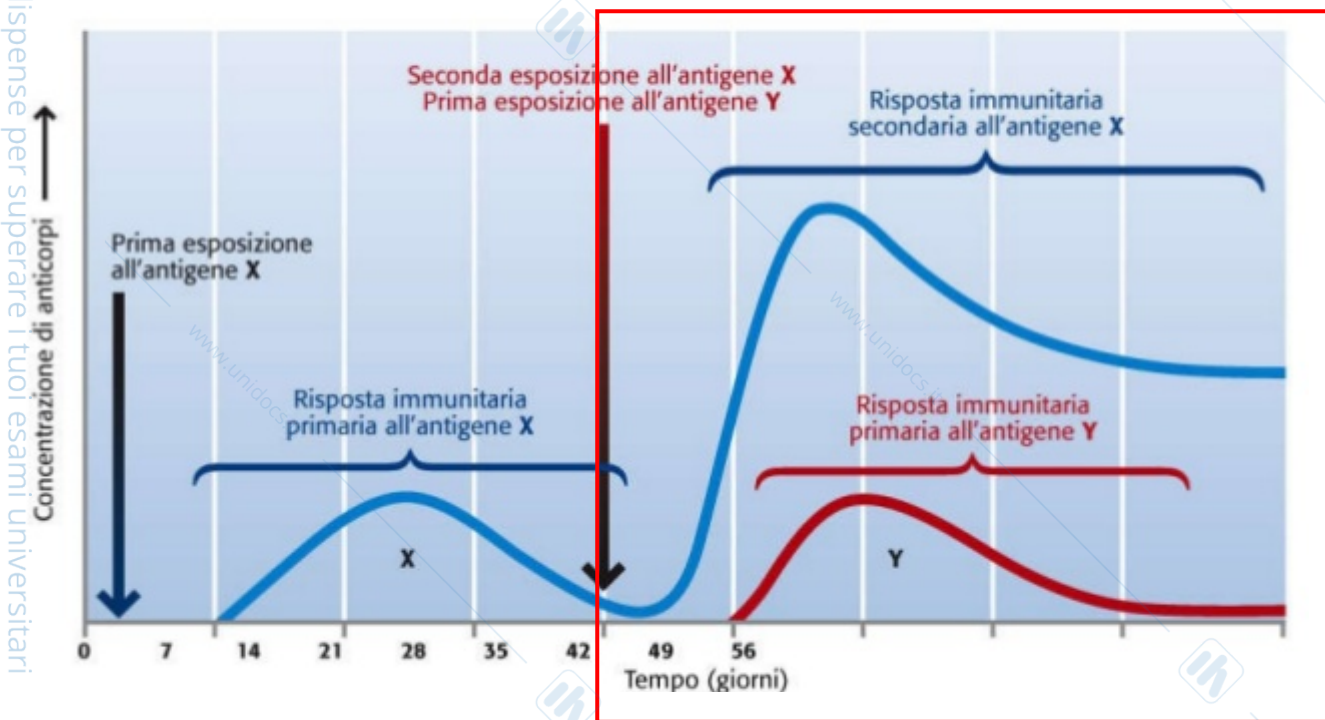
La risposta immunitaria acquisita **primaria** comprende una sequenza di fasi:

- fase riconoscimento dell'antigene
- fase di attivazione dei linfociti
- fase di eliminazione dell'antigene
- fase in cui la risposta declina progressivamente
- fase in cui si genera la memoria.



Risposta immunitaria primaria e secondaria

Alcune *plasmacellule* di lunga vita migrano nel midollo osseo e continuano a produrre piccole quantità di anticorpi anche per anni mentre altre cellule diventano **linfociti B di memoria**, non producono anticorpi ma sono pronte, in una successiva esposizione allo stesso antigene, a differenziarsi rapidamente (**risposta secondaria**) e a produrre anticorpi in grandi quantità e più specifici. Questa memoria consente una risposta molto rapida, specifica e quindi più efficiente.

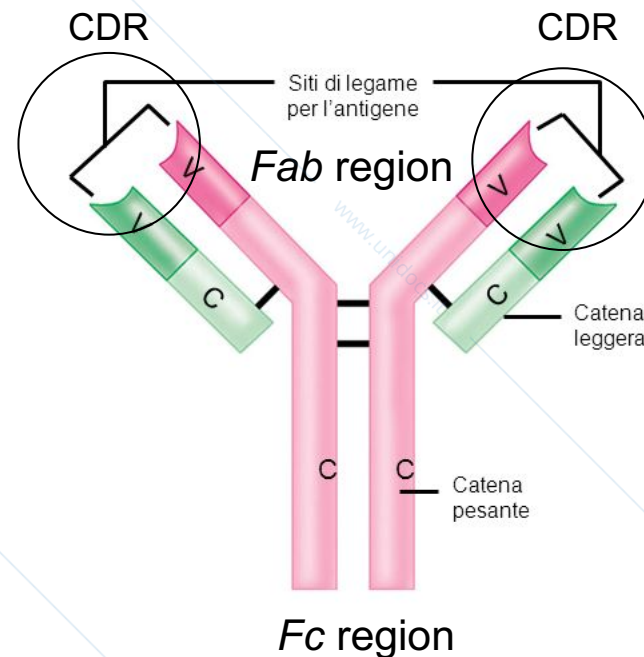


MEMORIA DEI
LINFOCITI B

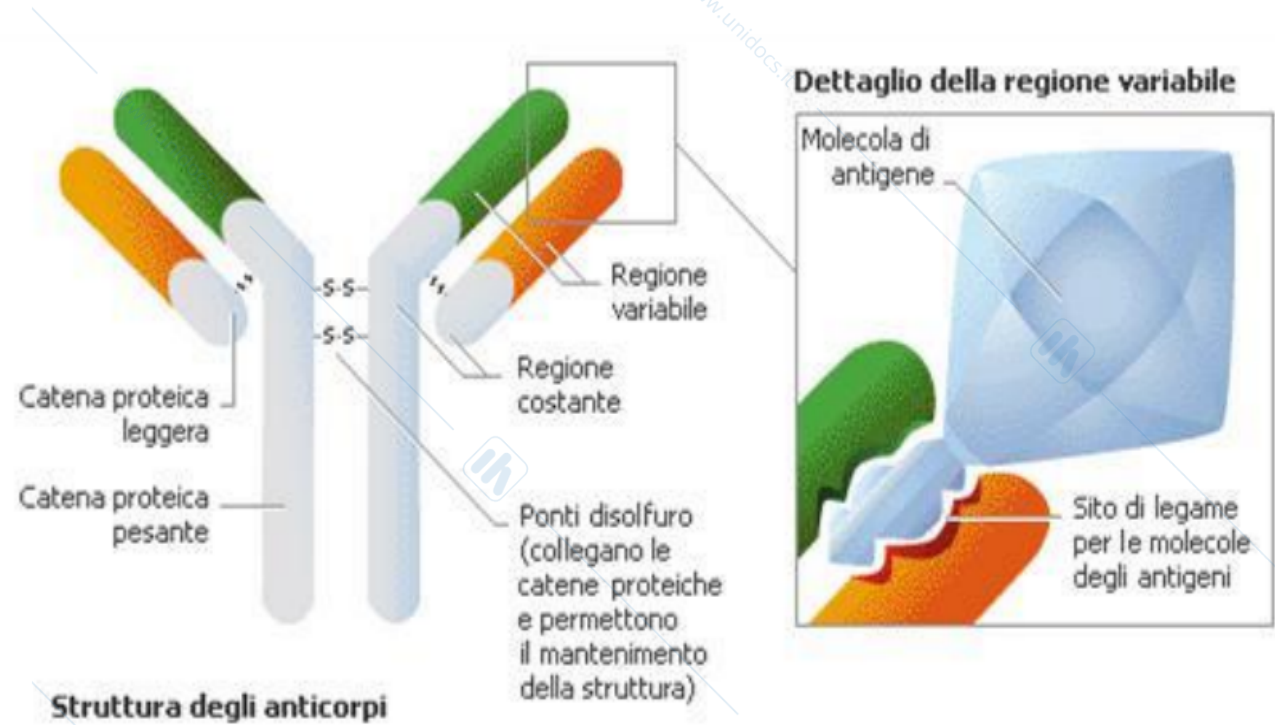
Gli anticorpi: struttura

Gli anticorpi sono proteine plasmatiche indicate anche con i termini di **immunoglobuline** (Ig) o gammaglobuline (γ G) e rappresentano, nell'uomo, circa il 20% del totale proteico del plasma. Sono presenti nei vertebrati e svolgono funzioni di difesa all'interno del sistema immunitario adattativo. Esistono 5 classi di Ig (IgM, IgG, IgA, IgD, IgE) e molte sottoclassi.

Tutti gli anticorpi hanno una caratteristica struttura di base ad Y. All'estremità di ogni braccio ci sono due siti identici di legame per l'antigene (*Fab region*) mentre la regione della coda (*Fc region*) media altre attività dell'anticorpo (funzioni effettrici x es. la capacità di legarsi alle cellule fagocitiche e di attivare il sistema del complemento). La regione centrale a cerniera (*hinge region*) flessibile che permette di variare la distanza tra i due siti di legame per l'antigene



Gli anticorpi: struttura



Le 4 catene polipeptidiche che formano la struttura ad Y sono 2 catene pesanti (gamma γ) uguali tra loro e due catene leggere uguali tra loro. Ogni catena presenta una regione costante ed una regione variabile che combinandosi tra loro formano siti di riconoscimento sempre diversi. Ogni tipo di anticorpo può riconoscere un solo antigene.

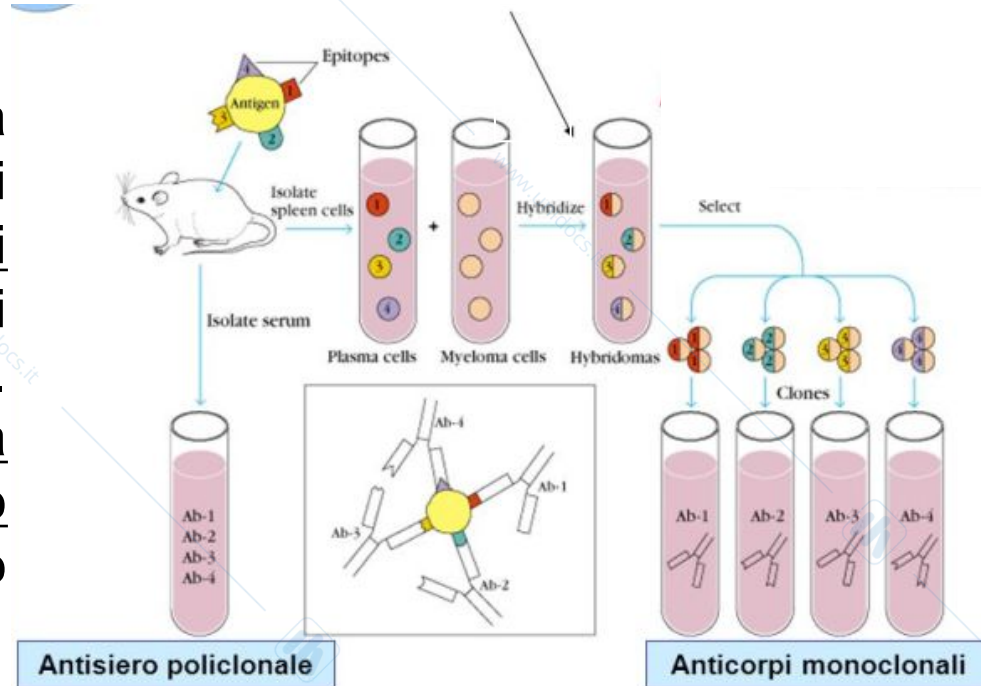
Come si ottiene un anticorpo in laboratorio

Il modo più semplice, economico e veloce per ottenere anticorpi in grado di riconoscere una certa sostanza è quello di immunizzare un animale con un **antigene** in grado di stimolare la reazione immunitaria ($PM > 1000Da$), ed estrarre gli anticorpi dal siero.



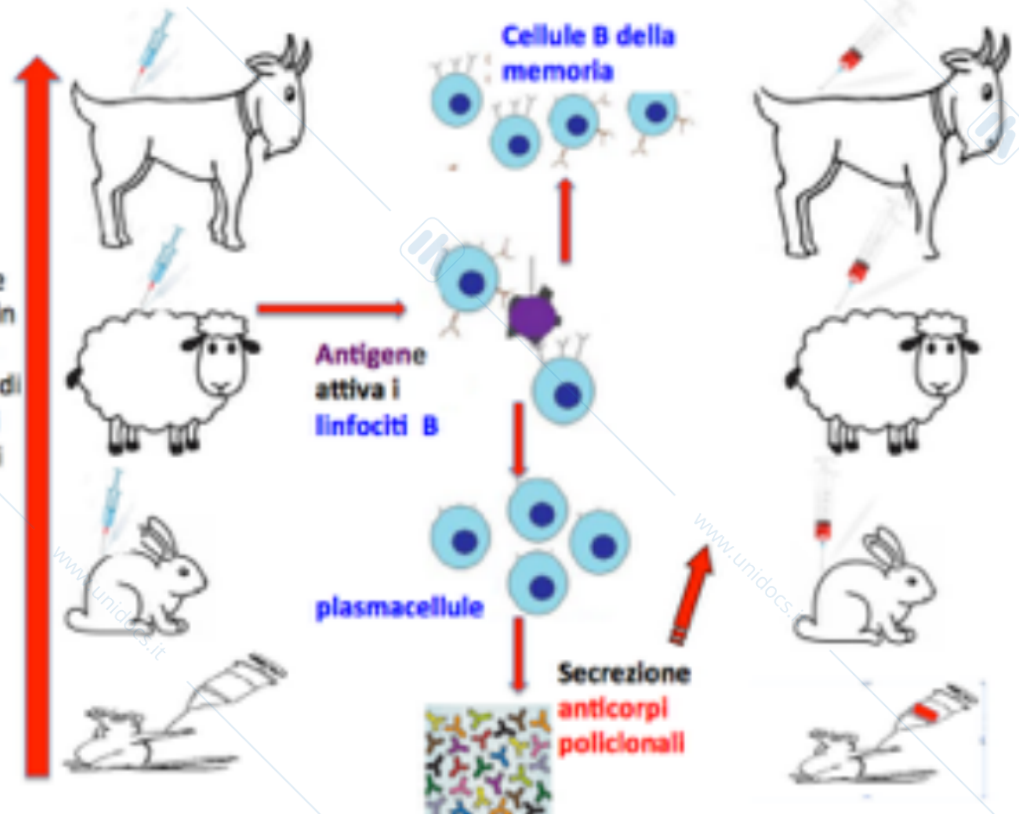
La regione di antigene che si trova in contatto diretto con l'anticorpo è detta **epitopo** o determinante antigenico.

L'antisiero che contiene una popolazione eterogenea di anticorpi diretti verso diversi epitopi dell'antigene prende il nome di antisiero/anticorpo **policlonale**. Mentre una popolazione omogenea di anticorpi diretti verso un unico epitopo prende il nome di anticorpo **monoclonale**.



Come si ottiene un anticorpo in laboratorio

Gli animali più usati sono: topi, conigli, pecore, capre.



Specie di produzione

- Monoclonale - topo, ratto
- Policlonale - uomo, coniglio pecora, ratto...

Anticorpi policlonali

La produzione di **anticorpi policlonali** (contenenti anticorpi reattivi contro più di un epitopo e per questo multispecifici) ad alto titolo, dipende da diversi fattori tra cui uno dei più importanti è la presenza degli antigeni in circolo per un periodo continuato di diverse settimane. Ciò può essere ottenuto in diversi modi:

- con iniezioni endovenose multiple con dosi crescenti di antigene (con tempi brevi tra un'iniezione ed un'altra per evitare la distruzione dell'antigene da parte del sistema immunitario).
- con iniezioni sottocutanee o intramuscolari: tale metodica garantisce un lento rilascio dell'antigene nel sangue assicurando, con un minor numero di iniezioni di richiamo, una presenza continua per diverse settimane.

Anticorpi policlonali

- 1) Immunizzazione ripetuta dell'animale con l'antigene
- 2) Il sangue è prelevato nel momento di picco di produzione dell'anticorpo ed è purificato il siero
- 3) Il "pool" degli anticorpi riconosce molti epitopi dell'antigene utilizzato per l'immunizzazione

Generalmente le procedure di immunizzazione più rapide portano ad un minor titolo ma ad una maggior specificità del siero immune, che viene chiamato **antisiero**.

Le principali globuline ottenibili con i normali metodi sono IgM ed IgG. Le prime sono le più adatte per le reazioni di agglutinazione; le seconde sono invece idonee per i test ELISA e per i saggi di immunofluorescenza .

Anticorpi monoclonali

Per anticorpi **monoclonali** si intende una popolazione omogenea di anticorpi prodotti da un clone cellulare (ibridoma) ottenuto per fusione di un linfocita B (proveniente dalla milza o dai linfonodi di un animale immunizzato e quindi in grado di produrre un anticorpo specifico, ma che ha una durata limitata di vita in coltura) con una cellula di mieloma (linea tumorale di plasmacellule che cresce in coltura continuamente).

La fusione tra le membrane delle due cellule si ottiene tramite un promotore (polietilenglicole).

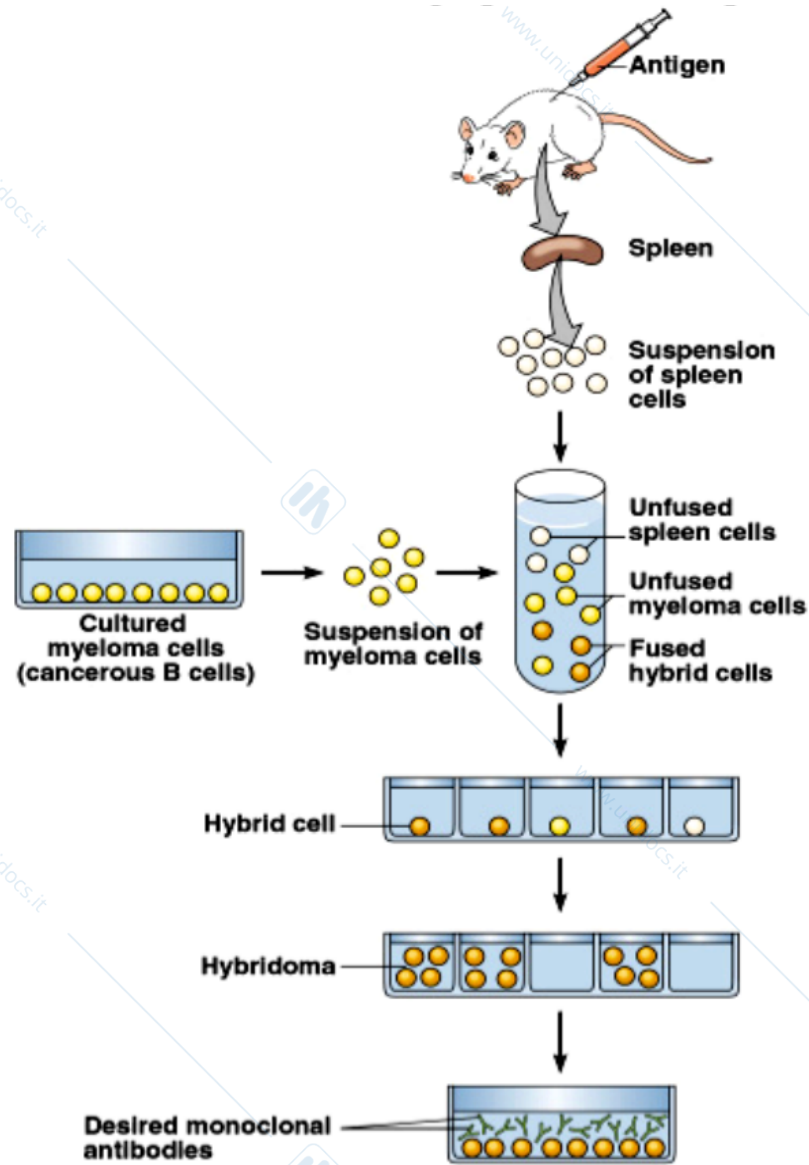
Dopo la fusione, si fanno crescere le cellule in un terreno di coltura selettivo (HAT*) in cui saranno in grado di crescere solo gli ibridomi.

Ogni ibridoma secerne un anticorpo monospecifico.

Gli ibridomi vengono sottoposti a screening per la ricerca degli anticorpi specifici di interesse e quelli scelti vengono avviati alla conservazione o alla produzione in massa.

*HAT=ipoxantina-aminopteridina-timidina

Anticorpi monoclonali



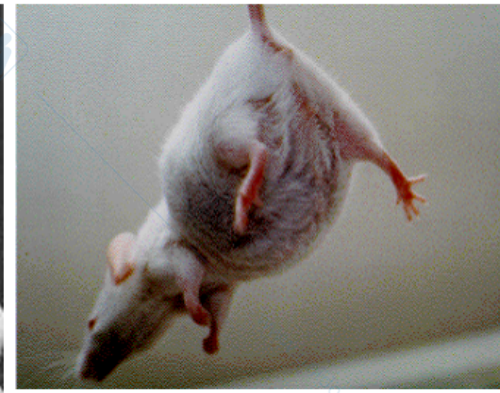
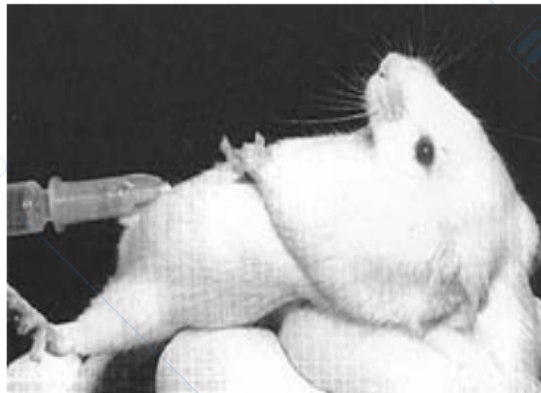
selezione in terreno HAT

i sopranatanti di coltura vengono sottoposti a screening: ELISA, citofluorimetria, Western Blot

selezioni di cloni ad elevata affinità

Anticorpi monoclonali

Rispetto alla produzione di anticorpi policlonali, il processo richiede più tempo e una tecnologia più costosa e raffinata, ma una volta ottenuto l'ibridoma può essere usato come sorgente di anticorpi monoclonali, sempre identici, praticamente indefinitamente



I livelli di produzione anticorpale delle cellule coltivate in vitro sono relativamente modesti, l'ibridoma può allora essere inoculato nella cavità peritoneale di un topo, e liquido che si forma (ascite) costituirà una ricca sorgente di anticorpi.

Anticorpi monoclonali

The Nobel Prize in Physiology or Medicine (1984)

“ for theories concerning the specificity in development and control of the immune system and the discovery of the principle for production of monoclonal antibodies ”



Georges J. F. Köhler



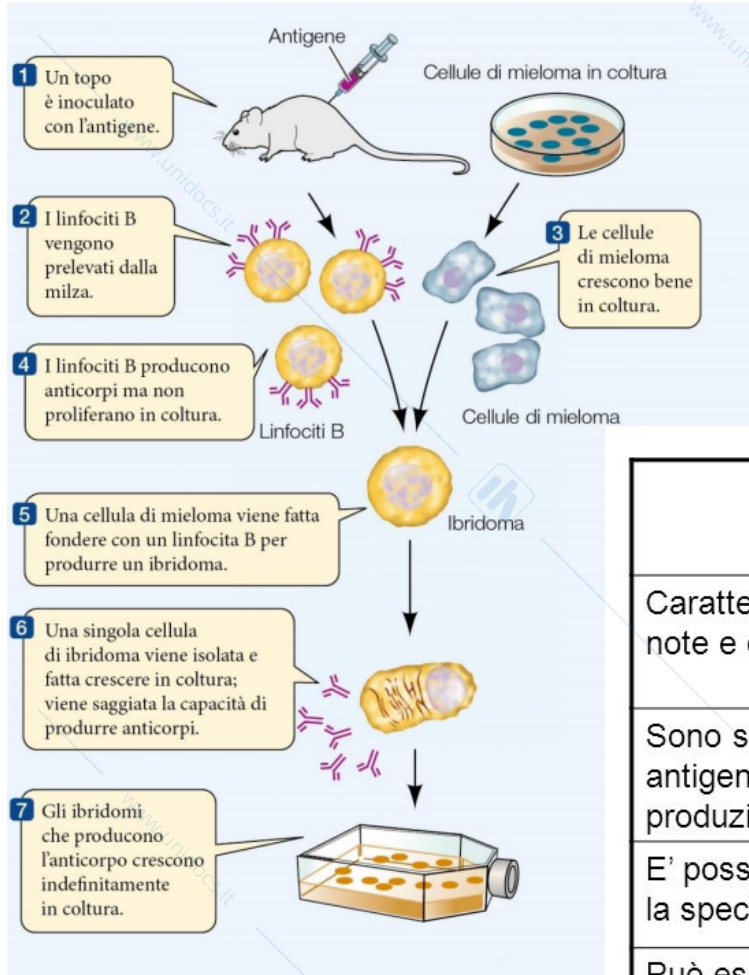
César Milstein

Kohler G, Milstein C.

Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity.

Nature. 1975 Aug 7

Anticorpi monoclonali



<u>Vantaggi</u>	<u>Svantaggi</u>
Caratteristiche (affinità e specificità) note e costanti	Potrebbero essere troppo specifici: (difficoltà nel legare forme diverse dell'antigene)
Sono sufficienti piccole quantità di antigene, anche impuro, per la loro produzione	Tecniche di produzione più sofisticate
E' possibile selezionare l'anticorpo con la specificità desiderata	Non sempre reagiscono con la proteina A
Può essere prodotto in quantità illimitata ed è semplice da purificare	Non formano precipitato in seguito al legame con l'antigene
Solitamente caratterizzati da elevata specificità	Spesso caratterizzati da bassa affinità

Applicazioni degli anticorpi monoclonali

In vitro (diagnostica)

- **Identificazione di popolazioni cellulari esprimenti marcatori specifici**

immunoistochimica
immunocitochimica
immunofenotipo

microscopio
ottico

citofluorimetria
a flusso

- **Identificazione e dosaggio**
- **di antigeni solubili**

Elisa, ria

In vivo (diagnostica o terapeutica)

- **Diagnostica per immagine**

- **Terapia (farmaci biologici)**

Metodologie diagnostiche che impiegano gli anticorpi monoclonali

IMMUNOISTOCHIMICA

IMMUNOCITOCHIMICA

Su vetrino

IMMUNOFENOTIPO

In sospensione

ELISA, RIA

Sezioni di tessuto

Midollo osseo

Sangue periferico

effusioni

sospensione cellulare

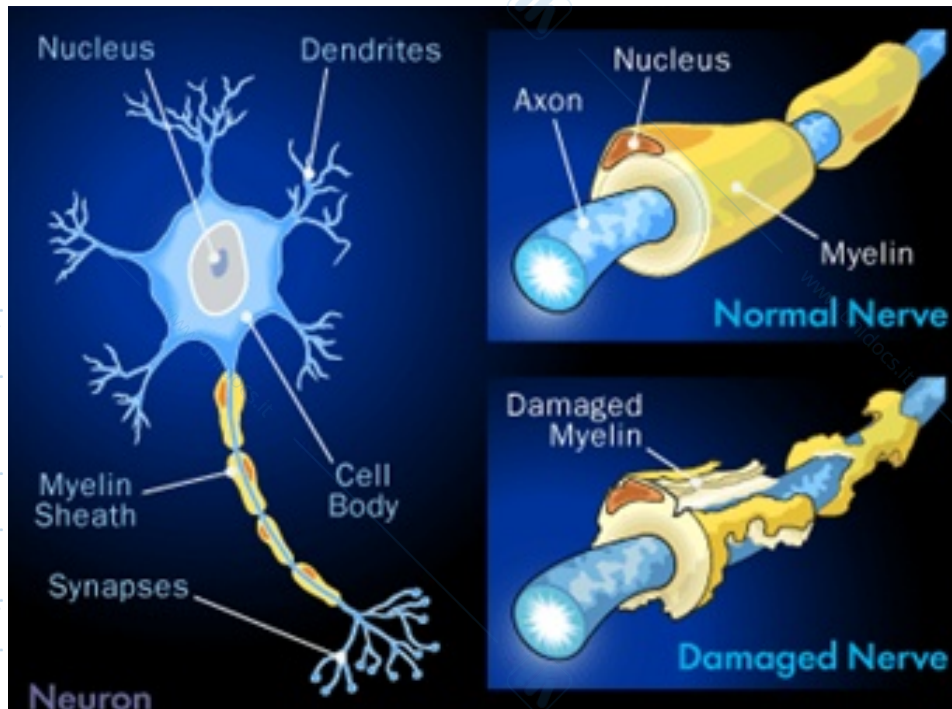
da tessuti solidi

Siero, Urina

La Sclerosi Multipla

La Sclerosi Multipla (SM) è una malattia **neurodegenerativa, demielinizzante autoimmune** a carico del sistema nervoso centrale descritta per la prima volta da Jean-Martin Charcot nel 1868.

Le cellule immunitarie attaccano e danneggiano la guaina mielinica che ricopre gli assoni rendendoli in grado di trasmettere gli impulsi nervosi in maniera lenta e inefficace. Ciò provoca delle lesioni nel cervello e nel midollo spinale.



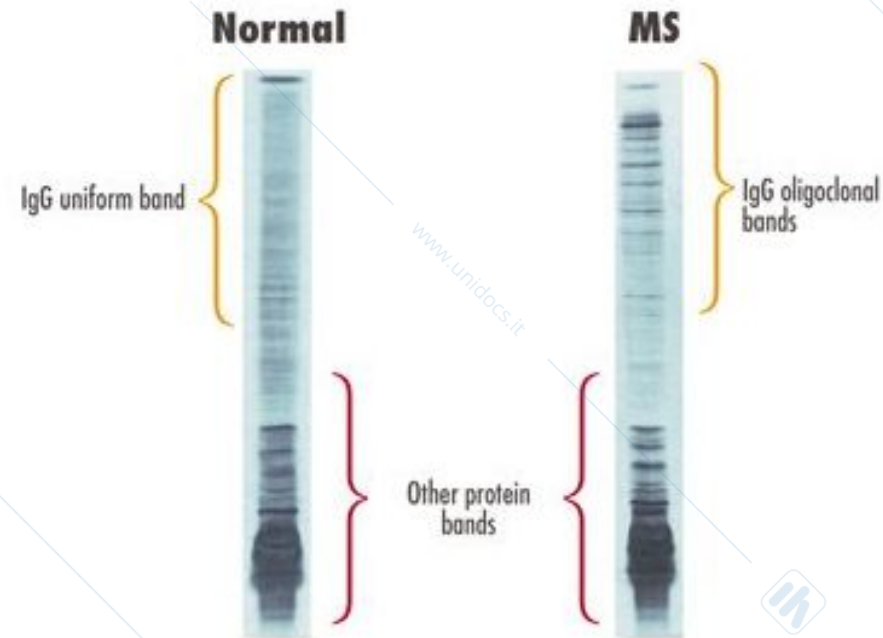
La causa precisa non è attualmente nota ma è causata da una combinazione di fattori genetici, ambientali ed infettivi.

La malattia può manifestarsi con diversi sintomi neurologici e portare a disabilità fisica e cognitiva

Le bande oligoclonali

Nella SM le IgG vengono prodotte in quantità maggiore del normale all'interno del SNC (sintesi intratecale). Questo significa che all'interno del SNC è in atto un processo infiammatorio. Nella SM questi anticorpi tutti uguali risultano all'elettroforesi come una o poche bande omogenee e strette (**bande oligoclonali**).

Le **Bande Oligoclonali** liquorali sono formate da immunoglobuline, generalmente IgG, che migrano nella regione γ in elettroforesi o nella regione catodica dell'isoelettrofocusing. Identificano la sintesi immunoglobulinica intratecale.



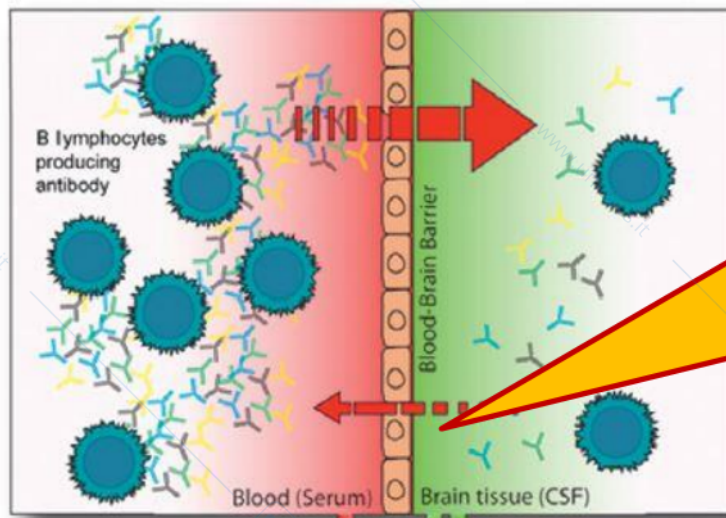
Le bande oligoclonali

Un aumento patologico della concentrazione di una sostanza nel liquor dipende dal verificarsi di due situazioni:

- Danno di barriera
- Sintesi intratecale

L'integrità della barriera determina il contenuto qualitativo e quantitativo totale delle molecole liquorali

Le IgG nel liquor provengono dal plasma dopo il transito attraverso la barriera emato-liquorale.

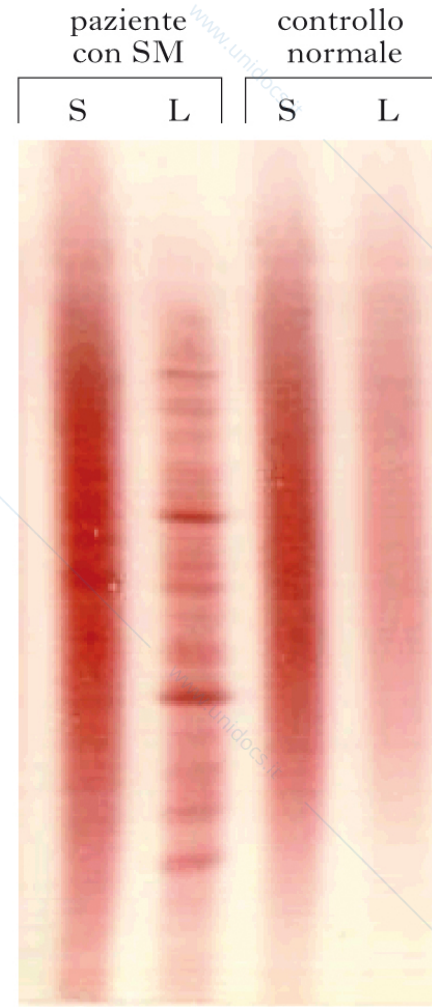


Le Bande Oligoclonali sono l'espressione dell'attività di pochi cloni plasmacellulari che si espandono nel compartimento liquorale, in quello sierico od in entrambi

Le bande oligoclonali

La tecnica di separazione raccomandata per la determinazione delle bande oligoclonali IgG è l'isoelettrofocusing dato essenziale per confermare o escludere un'attivazione immunitaria del s.n.c.

Un aumento delle proteine del CSF si trova in $\frac{1}{4}$ dei pazienti con SM



La presenza delle bande oligoclonali nel liquor tipico ma non esclusivo di SM. Si può infatti riscontrare anche nel corso di altre malattie autoimmuni, infettive e cerebrovascolari.