

I batteri come «fabbrica» di proteine utili in ambito biomedico



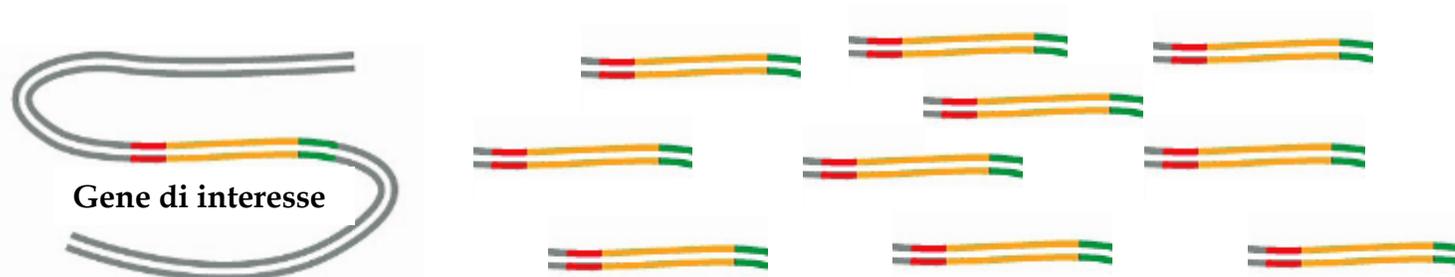
*Scopriamo chi ha l'influenza
con il test ELISA*



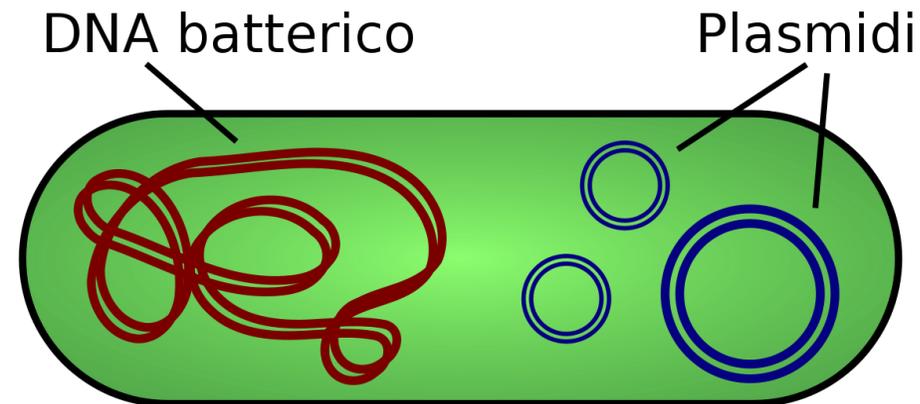
Tecnologie del DNA ricombinante : insieme di tecniche di laboratorio che consentono di inserire una sequenza di DNA di un particolare organismo all'interno di una cellula ospite, in modo da farle esprimere la proteina di interesse.

Fasi di lavoro

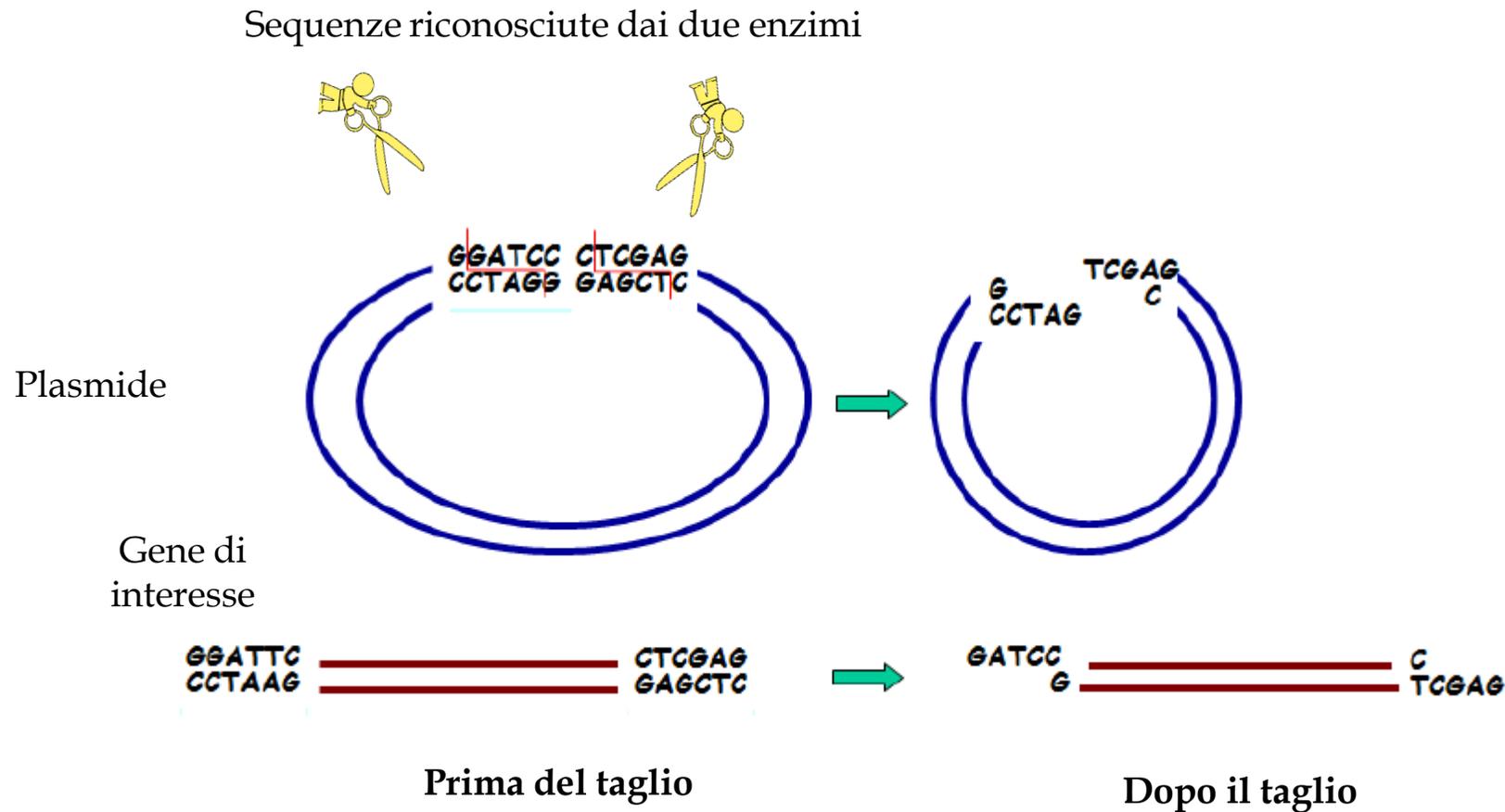
1) Isolamento del gene di interesse attraverso la reazione polimerasi a catena (PCR). Tale tecnica, come una «stampante», permette di ottenere molte copie di una particolare sequenza di DNA, ad esempio di un gene che codifica per la proteina che vogliamo produrre in laboratorio.



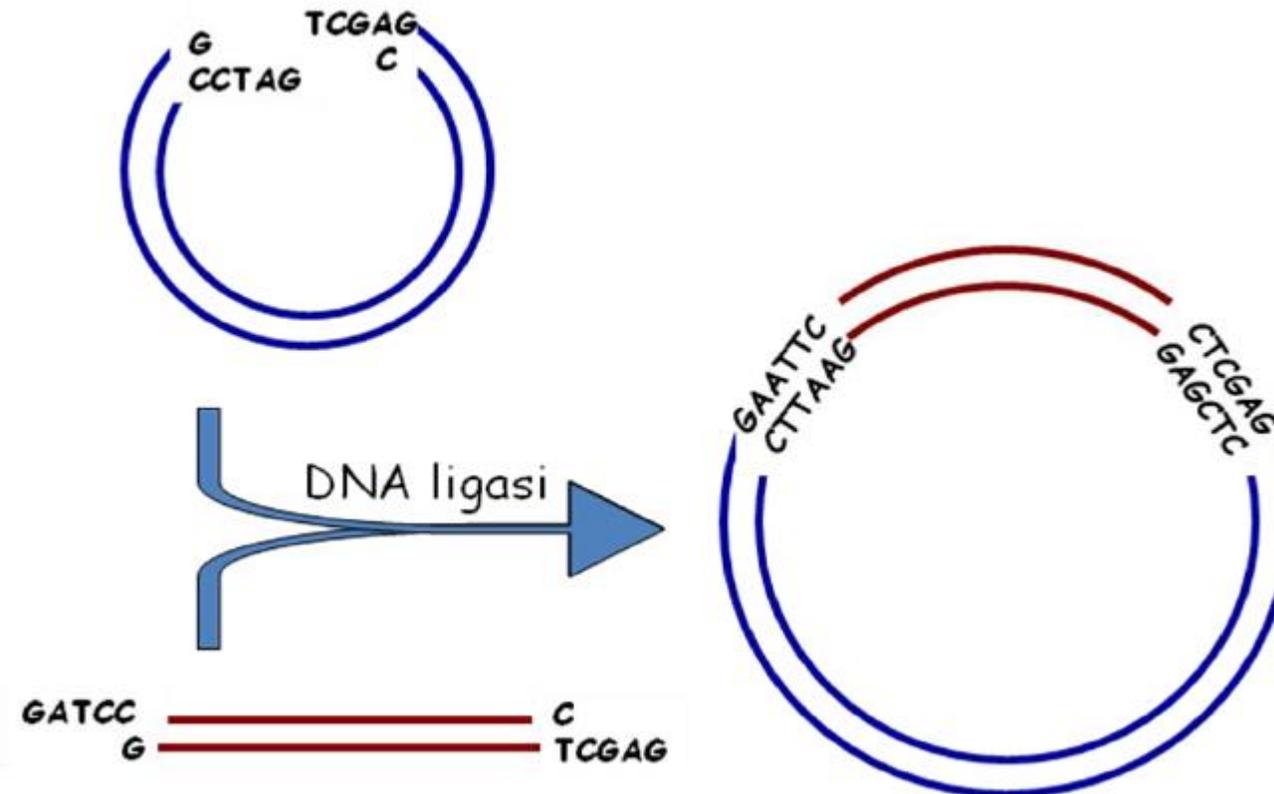
2) Inserimento del gene di interesse all'interno di un opportuno vettore, capace di veicolare la sequenza di DNA all'interno di una cellula ospite. I vettori più utilizzati sono i plasmidi, piccole molecole circolari di DNA a doppio filamento presenti all'interno dei batteri, capaci di conferire alla cellula che li possiede particolari vantaggi, come la resistenza ad un antibiotico. I plasmidi possiedono un'origine di replicazione propria in modo da duplicarsi indipendentemente dal cromosoma batterico.



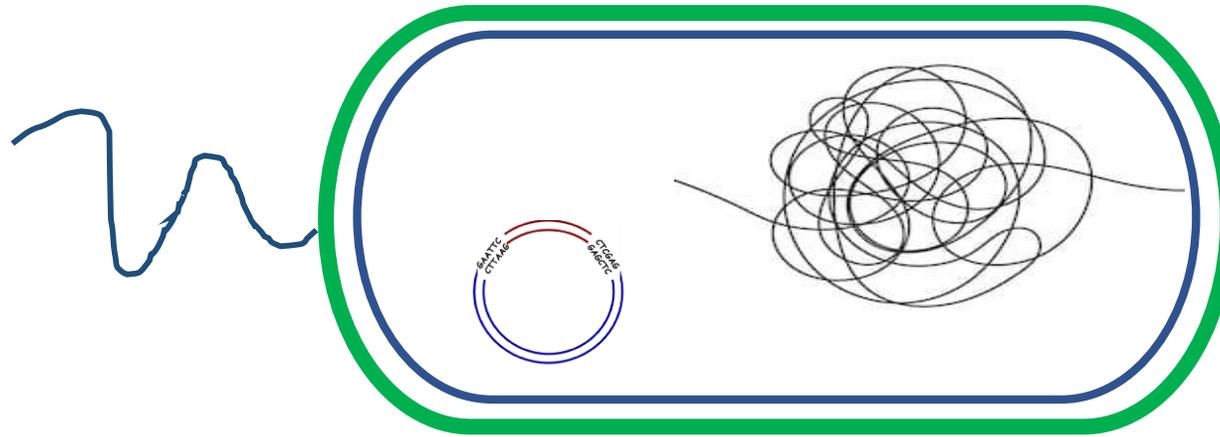
3) «Digestione» del plasmide isolato dai batteri e del gene di interesse con gli stessi enzimi di restrizione. Tali enzimi, proprio come delle «forbici molecolari», sono capaci di tagliare il DNA all'interno di sequenze specifiche creando delle estremità sfalsate.



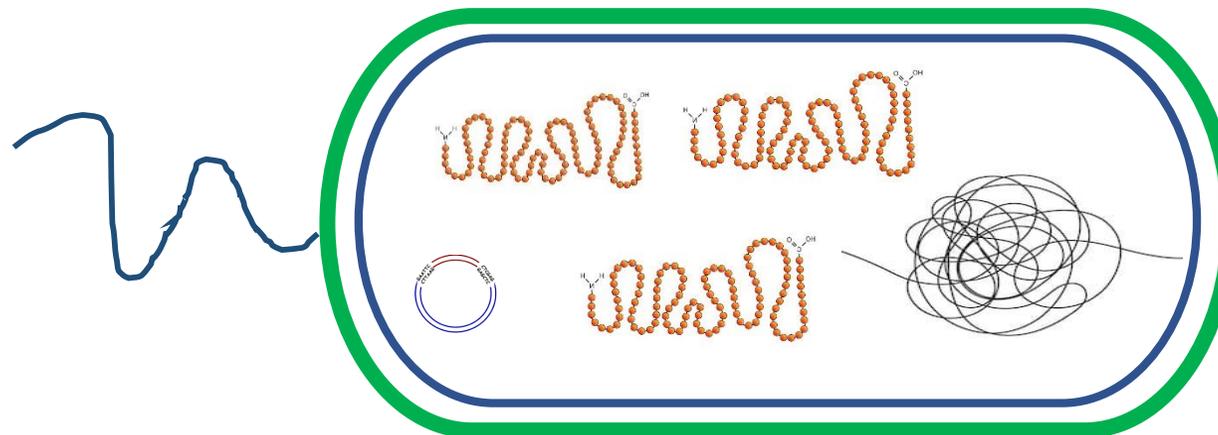
4) Produzione del plasmide ricombinante. Grazie alle «code coesive» complementari, create dagli enzimi di restrizione, il gene di interesse viene «cucito» all'interno del plasmide ad opera di un enzima, la DNA ligasi.



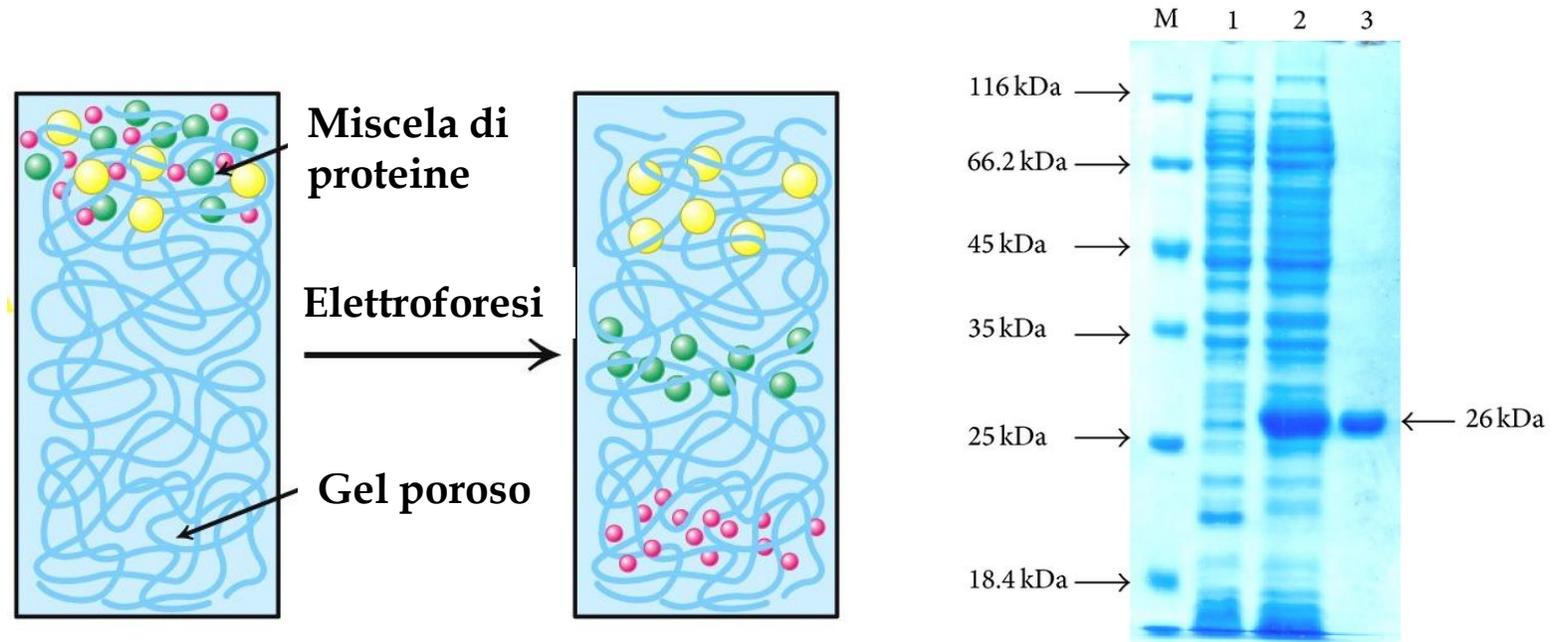
5) Inserimento del plasmide ottenuto all'interno dei batteri



che, come una fabbrica, produrranno tante copie della proteina di interesse



Le cellule batteriche vengono «lisate», distruggendo la parete cellulare e la membrana plasmatica e la proteina di interesse viene isolata dalle altre componenti cellulari mediante opportune tecniche di laboratorio. Il corretto isolamento della proteina di interesse viene monitorato in laboratorio grazie all'elettroforesi su gel di poliacrilammide (SDS-PAGE), che permette di separare le proteine in base al loro peso molecolare.



M = miscela di proteine a peso molecolare noto (kDa = kiloDalton).

1 = proteine sintetizzate da cellule batteriche nelle quali non è stato inserito il plasmide ricombinante (ciò vuol dire che tali cellule non potranno esprimere la proteina ricombinante di interesse).

2 = proteine sintetizzate da cellule batteriche nelle quali è stato inserito il plasmide ricombinante; la banda più evidente rappresenta la proteina ricombinante di interesse.

3 = proteina ricombinante di interesse isolata dalle altre proteine cellulari mediante opportune tecniche di laboratorio.

Applicazioni

Farmaci biotecnologici

I primi farmaci messi a punto con le tecnologie del DNA ricombinante furono l'insulina nel 1978 e l'ormone della crescita nel 1979, utilizzati per curare rispettivamente il diabete ed il nanismo. Prima dell'avvento di tali tecniche, l'insulina veniva estratta dal pancreas bovino o suino ed erano necessari circa 3500 kg di pancreas animali per produrre circa 0.5 kg di insulina, comportando quindi uno sforzo enorme. L'ottenimento di una molecola perfettamente identica a quella umana, tramite ingegneria genetica, ha permesso di evitare i problemi legati alle reazioni allergiche all'insulina animale da parte di alcuni pazienti affetti da diabete. L'ormone della crescita umano, invece, veniva inizialmente estratto dalle ghiandole pituitarie di cadaveri di uomini o scimmie, a costi elevatissimi e con considerevoli problemi pratici e sanitari.

Vaccini ricombinanti

Il primo vaccino ricombinante autorizzato fu quello contro il virus dell'epatite B che, oltre che a causare la cirrosi epatica, è anche una delle cause dell'insorgenza del tumore al fegato. Il gene che codifica per una proteina del capsido virale è stato clonato in un plasmide ed il plasmide ricombinante ottenuto è stato inserito in cellule di lievito, in modo produrre la relativa proteina virale ed utilizzarla per la preparazione del vaccino.

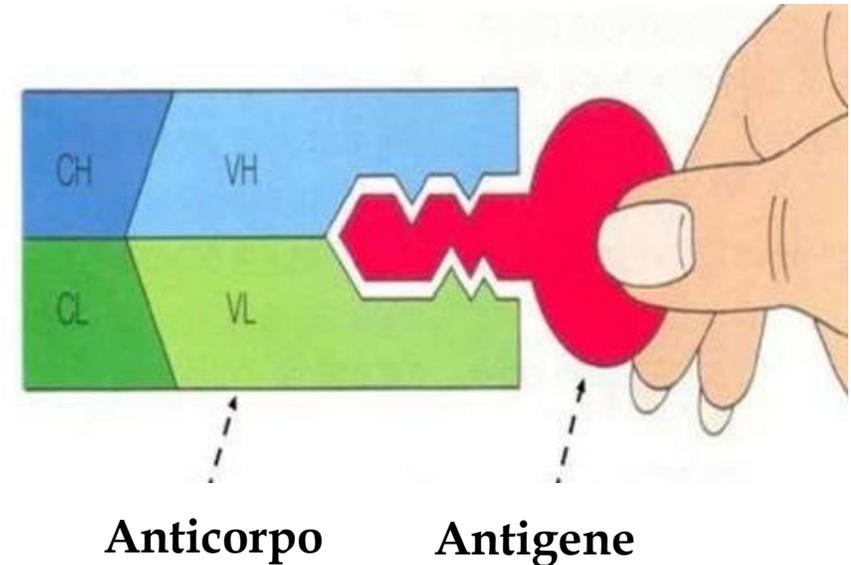
□ *Produzione di kit diagnostici, come il test ELISA.*

ELISA è l'acronimo dell'espressione inglese *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* e rappresenta un metodo di analisi immunologica usato in biochimica per la rivelazione e il dosaggio di antigeni o anticorpi (test ELISA diretto o indiretto).

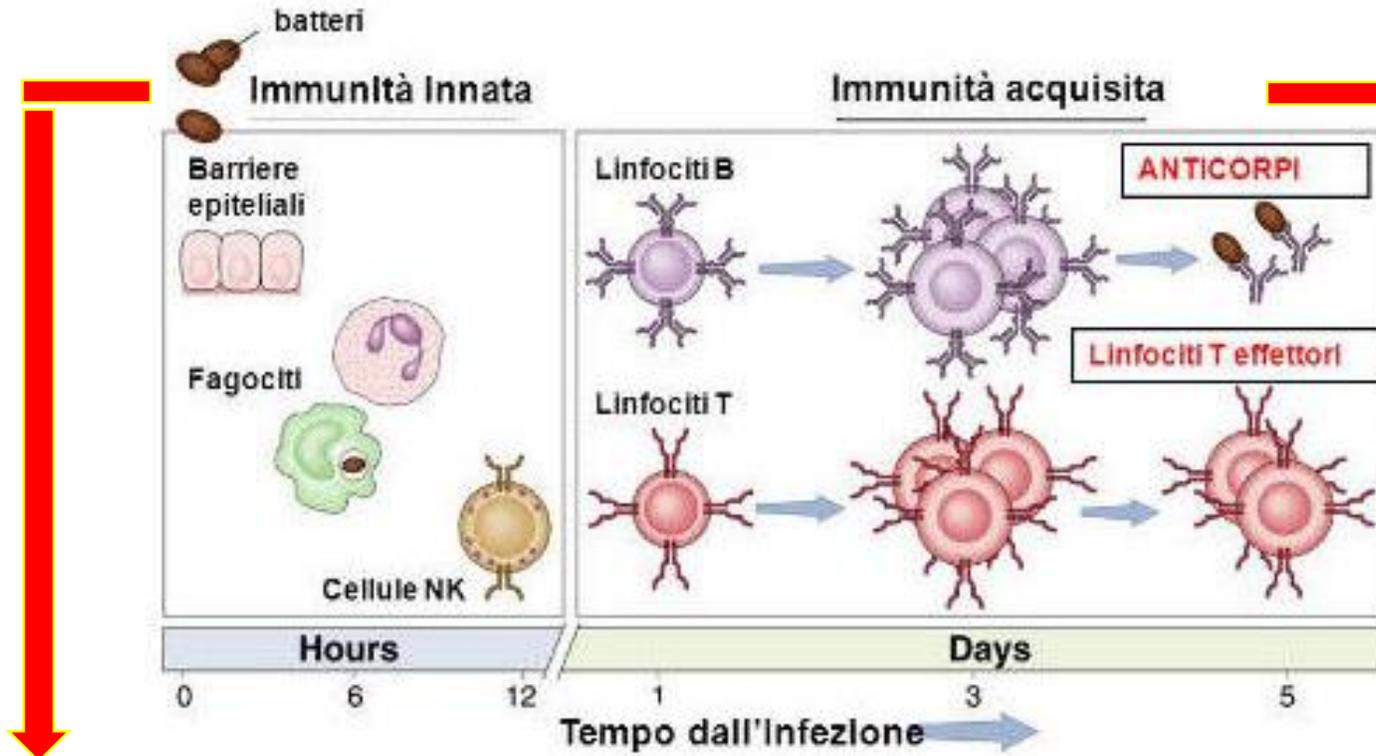
Antigene: sostanza estranea all'organismo (solitamente una proteina) che, una volta al suo interno, è capace di provocare la formazione di anticorpi e di reagire in modo specifico con essi inducendo una risposta immunitaria.

Il legame tra un antigene ed il corrispondente anticorpo porta alla formazione di quello che viene definito **immunocomplesso**.

Tale unione è altamente specifica, per questo viene paragonata al sistema chiave-serratura, ed è regolata da forze di tipo chimico-fisico: forze di Coulomb, forze di Vander Waals, legami ad idrogeno. La formazione dell'immunocomplesso determina una serie di eventi finalizzata alla definitiva neutralizzazione dell'antigene.



Le difese immunitarie ci proteggono dall'aggressione di agenti infettivi, come virus e batteri. Il sistema immunitario è dotato di due comparti difensivi, deputati a compiti ben precisi.



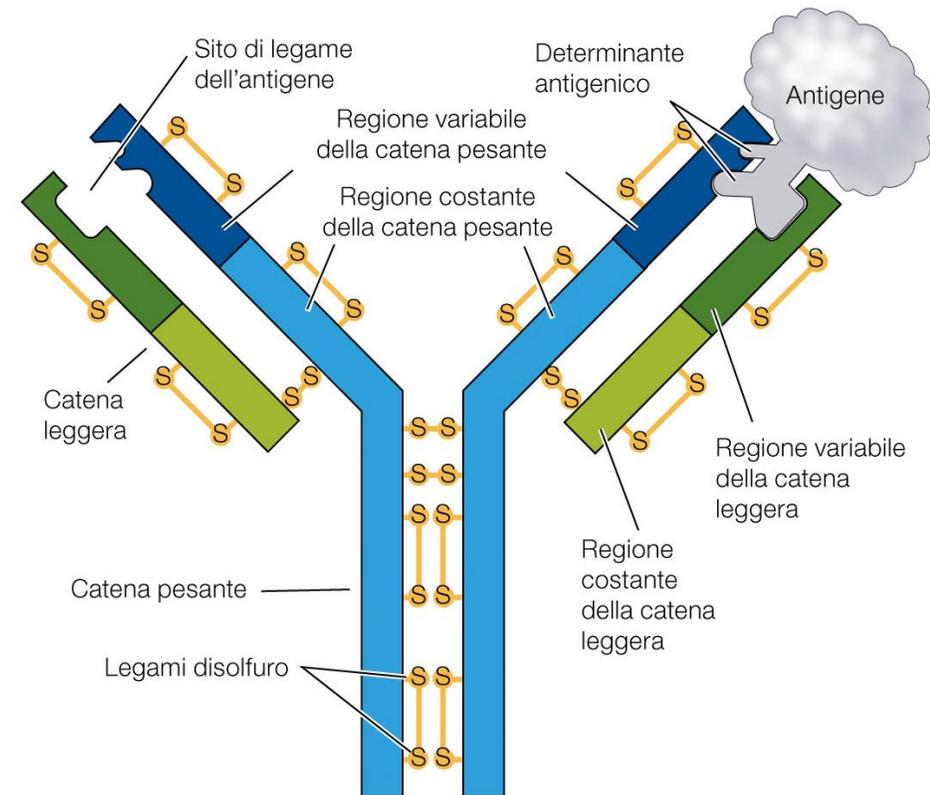
Quando i microrganismi patogeni riescono ad aggirare l'immunità innata, entra in gioco la seconda linea difensiva, costituita dall'immunità specifica, molto più raffinata e in grado di riconoscere tutti i possibili agenti dannosi per l'organismo grazie a meccanismi estremamente complessi che coinvolgono diversi tipi di cellule del sistema immunitario (linfociti T e B e le plasmacellule derivate dai linfociti B dopo opportuna stimolazione), gli anticorpi (prodotti dai linfociti B), nonché un'articolata cascata di composti dalle svariate funzioni, chiamati citochine (che mediano segnali fra linfociti, fagociti e altre cellule del corpo).

È presente fin dalla nascita, si instaura rapidamente, rappresentando di fatto una sorta di sistema d'allarme che segnala l'avvenuta aggressione dell'organismo, ma è poco efficiente e non possiede memoria.

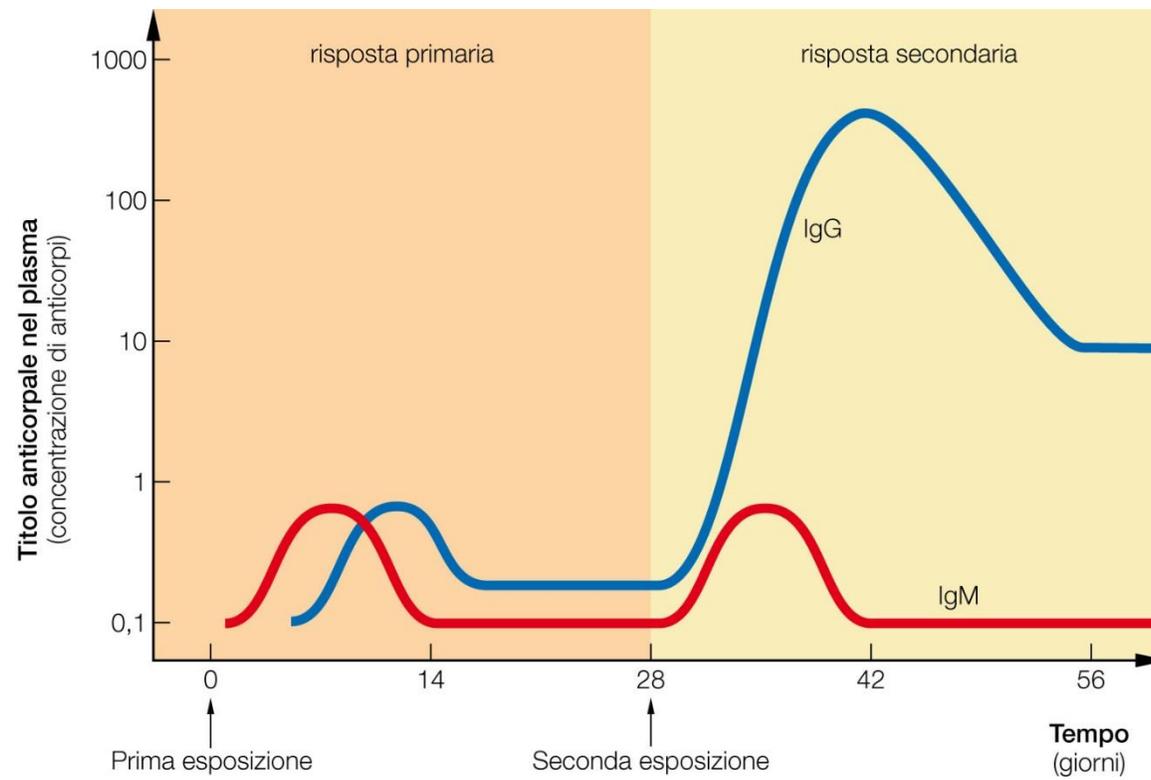
Gli **ANTICORPI** (Ab) o **IMMUNOGLOBULINE** (Ig), prodotti dai linfociti B, sono glicoproteine appartenenti alla famiglia delle globuline (proteine globulari del siero).

Si trovano in forma solubile o sono espresse sulle membrane dei linfociti B e sono classificate in diverse classi :IgG, IgA ,IgM, IgE,e IgD.

Gli anticorpi strutturalmente più semplici sono le IgG, che rappresentano circa l'80% delle Ig presenti nel siero e sono costituite da due catene leggere identiche e due catene pesanti anch'esse uguali fra loro; la porzione costante è la stessa per tutti gli anticorpi della stessa classe, mentre la regione variabile rende ogni anticorpo unico, in grado di riconoscere uno specifico antigene.



Quando un organismo viene esposto a un antigene verso cui ha già sviluppato degli anticorpi si attiva la risposta secondaria, che è molto più rapida e intensa della risposta primaria.



Le IgM sono gli anticorpi che si producono nella fase acuta della malattia, quindi sono rilevabili sin da subito e restano attivi per tutta la durata dell'infezione, dopodiché i valori scendono progressivamente, la loro presenza può essere rilevata nel sangue per 3-4 mesi circa.

Le IgG vengono prodotte solo 1-2 settimane dopo che è avvenuta l'infezione e restano presenti nell'organismo per tutta la vita, come 'memoria' dell'infezione avvenuta, per questo sono sempre rilevabili nel sangue.

Possibili risultati di una ricerca anticorpale:

- IgG assenti ed IgM assenti: assenza esposizione.
- IgG presenti ed IgM assenti: infezione pregressa.
- IgG assenti ed IgM presenti: infezione in fase molto iniziale.
- IgG presenti ed IgM presenti: infezione acuta.

Esercizio: commentare i risultati delle seguenti analisi.

Analisi toxoplasmosi

ANALISI	RISULTATO	U.DI MISURA	VALORI DI RIFERIMENTO PER SESSO ED ETA'
<i>Met. Chemiluminescenza</i>			
TOXO IgG	2,00	IU/ML	< 7,2 Negativo 7,2 - 8,8 Dubbio > 8,8 Positivo
TOXO IgM	2,00	AU/mL	< 10 Negativo > 10 Positivo

Analisi rosolia

ANALISI	RISULTATO	U.DI MISURA	VALORI DI RIFERIMENTO PER SESSO ED ETA'
<i>COMPLESSO TORCH [Met. Chemiluminescenza]</i>			
<i>ROSOLIA</i>			
ROSOLIA IgG	* 20,70	IU/ML	< 9 Negativo 9 - 11 Dubbio > 11 Positivo
ROSOLIA IgM	<10.0	AU/mL	< 20 Negativo 20 - 25 Dubbio > 25 Positivo

Scopriamo chi ha l'influenza con il test ELISA

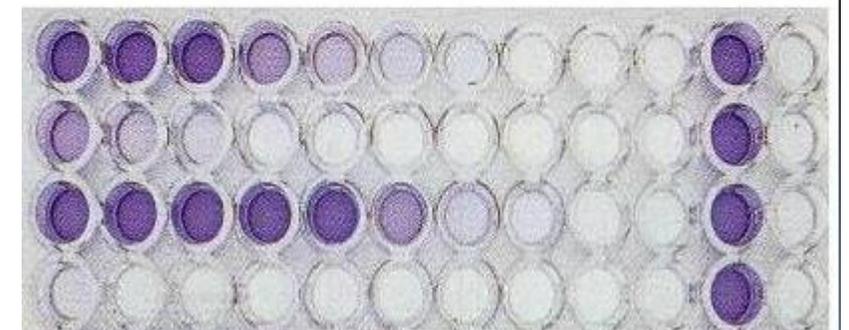
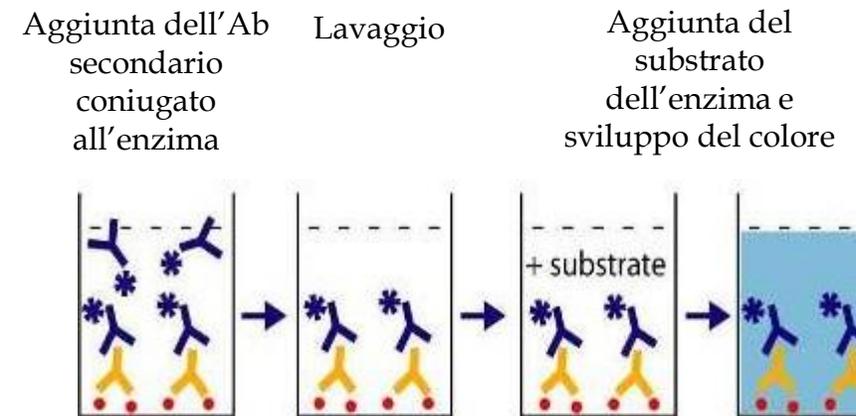
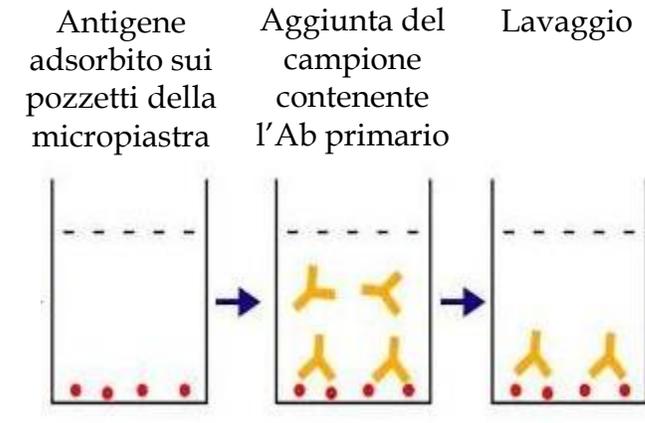


Test ELISA indiretto: viene utilizzato per rivelare in un campione complesso la presenza di un particolare anticorpo.

Il campione contenente l'anticorpo di interesse (anticorpo primario) viene aggiunto all'interno dei pozzetti di una micropiastro di polistirene, sul fondo dei quali è adsorbito lo specifico antigene.

Il legame antigene-anticorpo consente di separare l'anticorpo di interesse dalle altre componenti del campione, allontanate grazie ad una serie di lavaggi, al termine dei quali si aggiunge un secondo anticorpo (secondario) coniugato ad un'enzima, come la perossidasi, in grado di legare l'anticorpo primario.

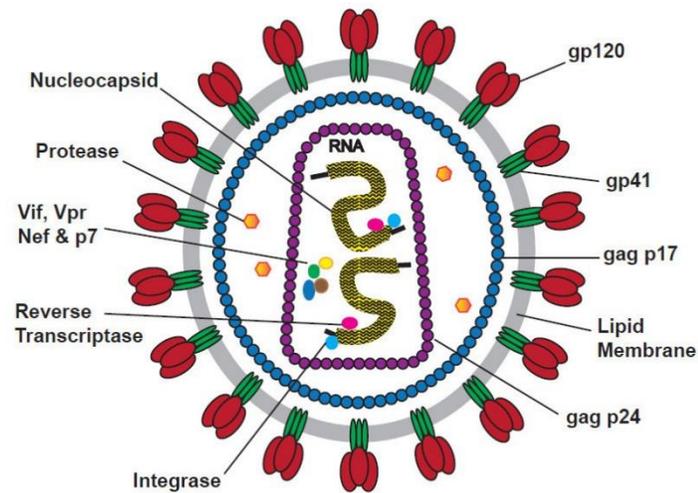
Dopo ulteriori lavaggi, volti ad eliminare l'eccesso di anticorpo che non si è legato, si aggiunge un opportuno substrato che viene convertito dalla perossidasi in un composto colorato. Lo sviluppo del colore è indicativo della presenza dell'anticorpo ricercato e l'intensità della colorazione è proporzionale alla quantità di anticorpo presente nel campione analizzato.



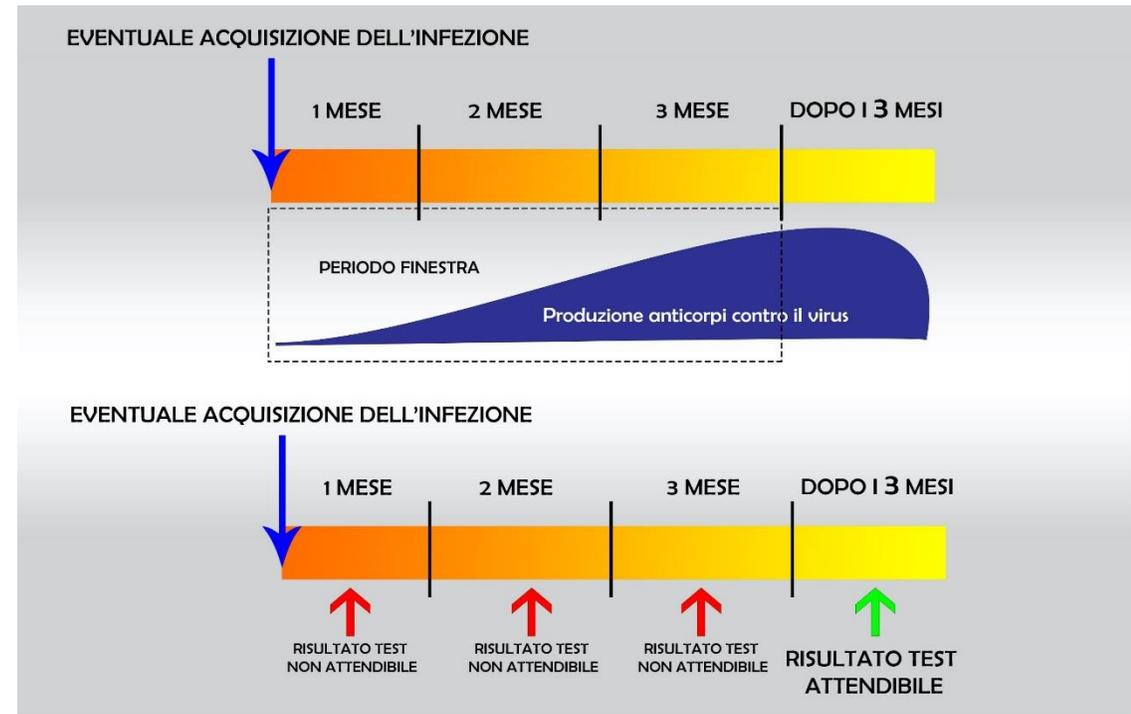
- Diagnosi di infezioni virali, come infezioni da HIV o da HBV (virus dell'epatite B) e batteriche, come le infezioni da salmonella.
- Individuazione della presenza di tossine o allergeni nel cibo.
- Determinazione dei livelli ormonali o di steroidi anabolizzanti (uso illecito).
- Identificazione di droghe, come cocaina, oppioidi, principi attivi della marijuana.
- Determinazione di una gravidanza in corso

Infezione da HIV

L' HIV è un retrovirus (ovvero un virus che utilizza la trascrittasi inversa per convertire il proprio genoma da RNA a DNA durante il proprio ciclo di replicazione) del genere lentivirus. In base alle conoscenze attuali, l'HIV è suddiviso in due ceppi: HIV-1 e HIV-2. Il primo dei due è prevalentemente localizzato in Europa, America e Africa centrale, HIV-2, invece, si trova per lo più in Africa occidentale e in Asia e determina una sindrome clinicamente più moderata rispetto a quella indotta dall' HIV-1. Il test ELISA rileva gli anticorpi anti-HIV che si sviluppano a seguito dell'infezione. Poiché l'organismo non produce immediatamente gli anticorpi, vi è un periodo in cui il test non è in grado di diagnosticare l'infezione (**Periodo Finestra**).



Schema dell' HIV

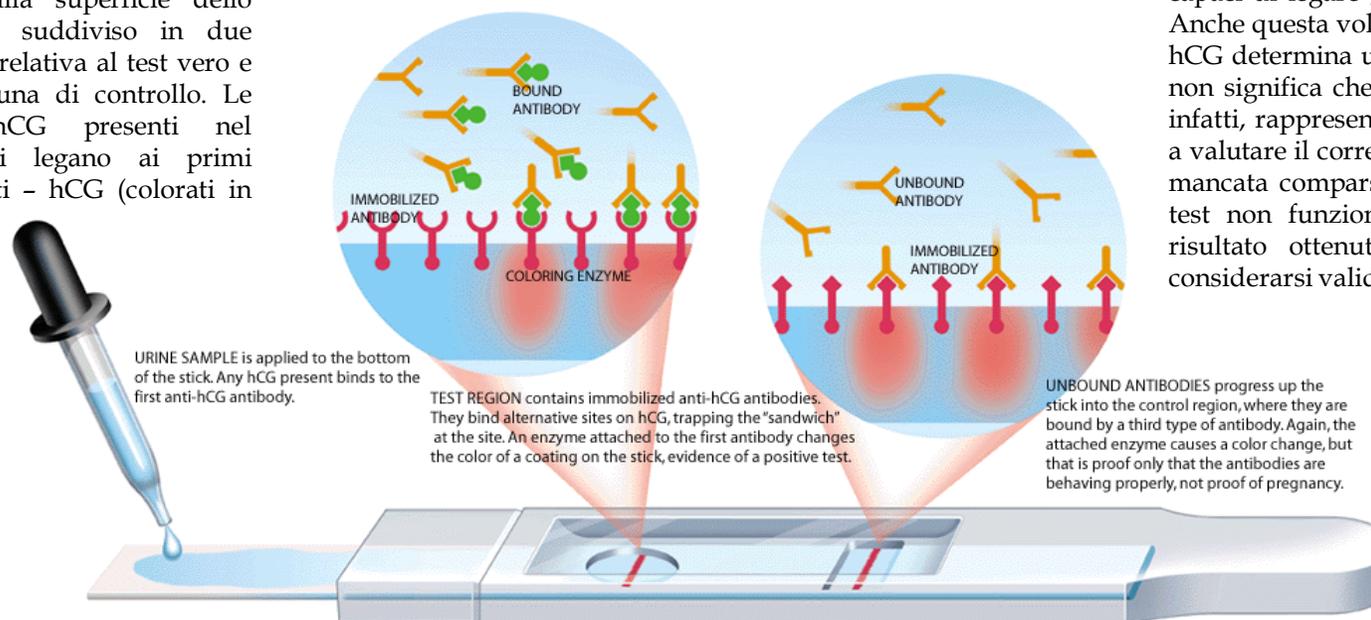


I test di gravidanza rilevano la presenza dell'ormone gonadotropina corionica umana (hCG) nelle urine. Tale ormone è una glicoproteina che viene prodotta dalla placenta poco tempo dopo la fecondazione. Nel corso di una normale gravidanza le hCG possono venir rilevate nel siero già sette giorni dopo il concepimento.

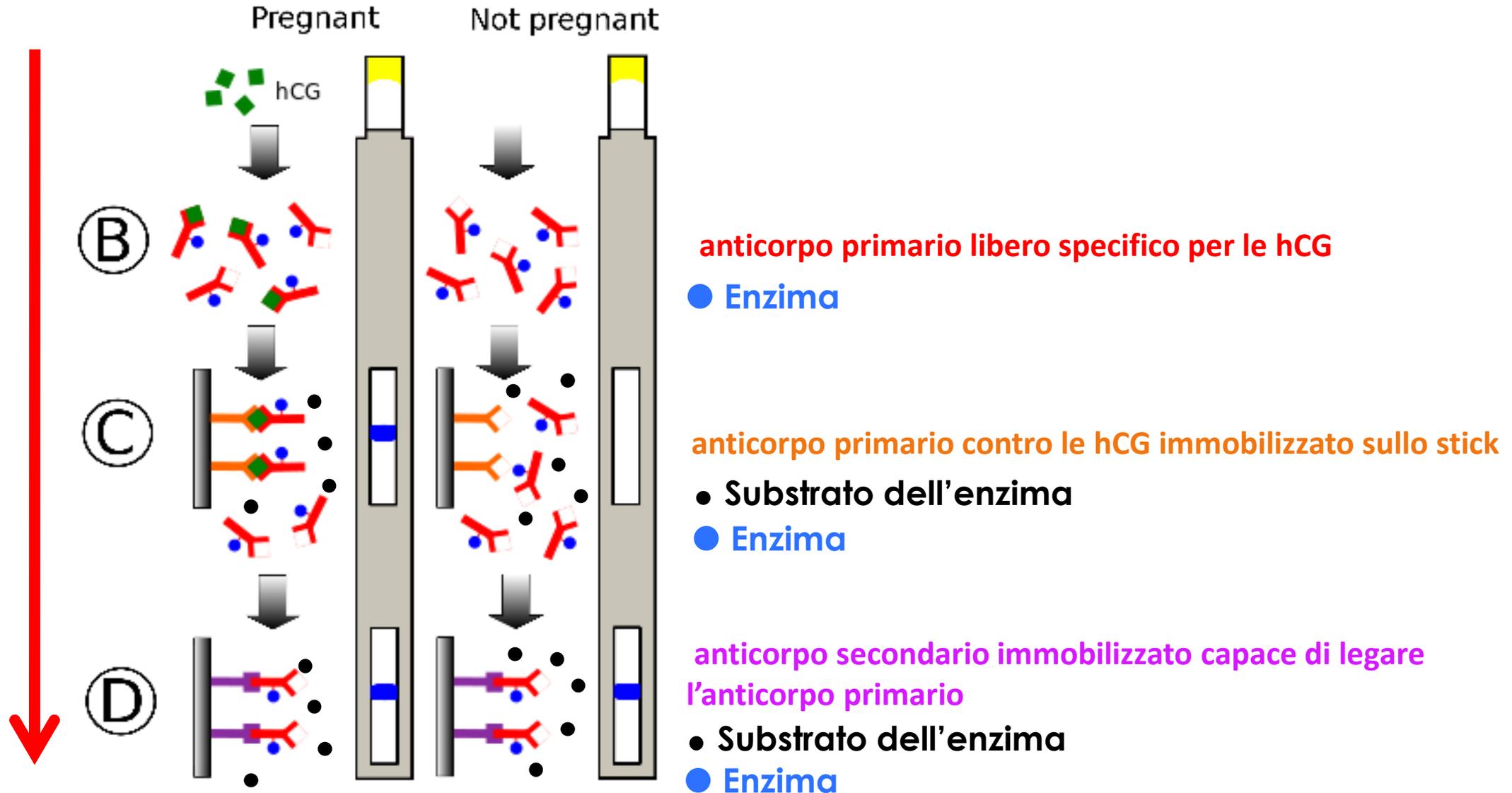
Il campione di urina viene applicato sulla superficie dello stick che è suddiviso in due regioni, una relativa al test vero e proprio ed una di controllo. Le eventuali hCG presenti nel campione si legano ai primi anticorpi anti - hCG (colorati in arancione).

Regione del test. Quest'area contiene anticorpi anti - hCG immobilizzati sullo stick (colorati in rosso), capaci di legare un sito diverso delle hCG rispetto a quello al quale si lega il primo anticorpo. Le hCG legate al primo anticorpo si legano anche all'anticorpo immobilizzato, generando una struttura a sandwich. L'enzima legato al primo anticorpo determina un cambio di colore sullo stick, indicando che il test è positivo.

Regione di controllo. Gli anticorpi che non hanno legato le hCG proseguono il «cammino» lungo lo stick, fino ad arrivare nella regione di controllo su cui è immobilizzata un'altra classe di anticorpi (in rosso) capaci di legare gli anticorpi anti-hCG (in arancione). Anche questa volta, l'enzima legato agli anticorpi anti-hCG determina un cambio di colore sullo stick, ma ciò non significa che il test è positivo!!!! Questa regione, infatti, rappresenta un controllo interno del test, volto a valutare il corretto funzionamento degli anticorpi. La mancata comparsa della striscia colorata indica che il test non funziona correttamente, di conseguenza il risultato ottenuto sulla prima regione non è da considerarsi valido.



MOVIMENTO PER CAPILLARITÀ





<https://media.hhmi.org/biointeractive/vlabs/immunology/index.html>