

13. Anticorpi

I edizione



(vedi singoli sottocapitoli)

13. Anticorpi.....	1	13.3.3. Localizzazione dei diversi isotipi umani.....	14
13.1. STRUTTURA DEGLI ANTICORPI ED I GENI DELLE IMMUNOGLOBULINE	3	13.3.4. Diverse catene pesanti equivalgono a diverse proprietà.....	15
13.1.1. Struttura/funzione degli anticorpi.....	4	13.3.5. Legame con il complemento.....	15
13.1.2. Dominii strutturali delle molecole anticorpali.....	4	13.3.6. Le IgM e le IgA possono formare polimeri.....	16
13.2. LA STRUTTURA TIPICA DELL'ANTICORPO	5	13.3.7. IgM e complemento.....	16
13.2.1. Siti di legame e determinanti antigenici.....	5	13.4. LE IMMUNOGLOBULINE DI MEMBRANA	17
13.2.2. Idiotipi e rete idiotipica.....	5	13.4.1. Il recettore dei linfociti B e la loro attivazione	17
13.2.3. Isotipi.....	6	13.4.2. Attivazione dei linfociti B.....	18
13.2.4. La generazione della diversità durante la risposta umorale.....	8	13.4.3. Attivazione dei linfociti T.....	19
13.2.5. Teoria attuale: mutazione somatica e selezione clonale.....	9	13.4.4. I linfociti T helper sono necessari per le risposte dei linfociti B verso la maggior parte degli antigeni.....	19
13.2.6. Generazione della diversità dei siti di legame per l'antigene delle molecole anticorpali.....	11	13.4.5. Funzione del recettore dei linfociti B nell'interazione con i linfociti T helper	20
13.3. STRUTTURA DELLE REGIONI COSTANTI DELLE IMMUNOGLOBULINE	12	13.4.6. Le cellule dendritiche follicolari.....	20
13.3.1. Proprietà fisiche più importanti dei diversi isotipi umani.....	13	13.5. PRINCIPALI FONTI UTILIZZATE.....	21
13.3.2. Funzioni biologiche più importanti dei diversi isotipi umani.....	14		



13.1. Struttura degli anticorpi ed i geni delle immunoglobuline

- Gli anticorpi sono le proteine antigene-specifiche delle cellule B: linfociti B e plasmacellule
- Gli anticorpi costituiscono una famiglia di proteine plasmatiche conosciuta col nome di immunoglobuline
- Gli anticorpi sono costituiti da una unità strutturale di base presente sotto forme diverse in svariate molecole appartenenti sia al sistema immunitario che ad altri sistemi biologici di riconoscimento

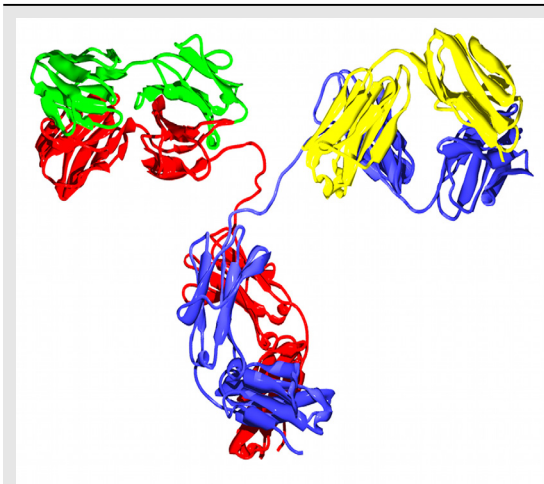


Figura 13.1. Struttura tridimensionale di una immunoglobulina G. Dati da Harris, 1997

- L'anticorpo è formato da due coppie di catene polipeptidiche differenti chiamate catena pesante e catena leggera
- Ciascuna immunoglobulina è formata da due catene pesanti e due leggere: ponti disolfuro uniscono la catena pesante e quella leggera e le due catene pesanti fra loro

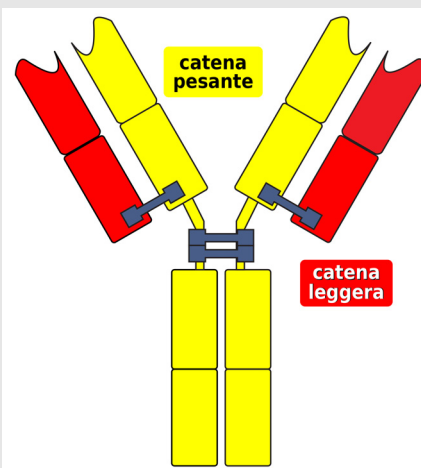


Figura 13.2. Struttura di base di un anticorpo. Catena pesante in giallo; catena leggera in rosso; in grigio i ponti disolfuro

13.1.1. STRUTTURA/FUNZIONE DEGLI ANTICORPI



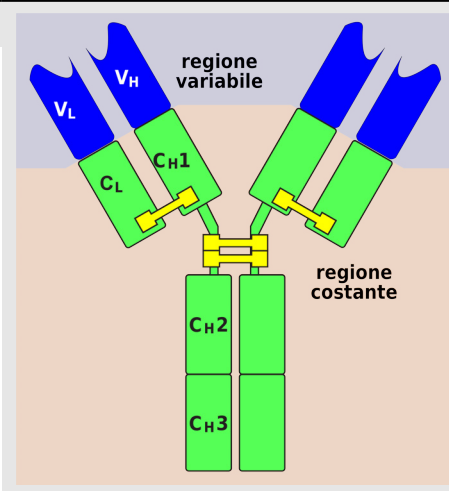
Figura 13.3. Regione variabile e regione costante della molecola anticorpale

La molecola anticorpale ha due funzioni distinte:

- legare specificamente le molecole di antigene che hanno indotto la risposta immunitaria
- reclutare altre cellule ed altre molecole per eliminare l'antigene una volta che l'anticorpo lo abbia legato

Queste funzioni sono strutturalmente separate:

- una parte riconosce specificamente l'antigene (regione variabile, diversa per ogni antigene)
- l'altra attiva i meccanismi effettori che favoriscono l'eliminazione dell'antigene legato (regione costante, indipendente dalla specificità antigenica)



13.1.2. DOMINII STRUTTURALI DELLE MOLECOLE ANTICORPALI



Le catene pesanti (H per *heavy*) e quelle leggere (L per *light*) di una immunoglobulina possono essere divise in sotto-regioni, o domini, sulla base di caratteristiche strutturali dipendenti dalle omologie di sequenza

- il dominio ammino-terminale (N-terminale) di ciascuna catena ha una sequenza differente nelle diverse molecole di anticorpo; gli altri domini sono costanti
- i due domini della catena leggera sono denominati V_L e C_L (V per variabile, C per costante)
- i quattro domini della catena pesante sono chiamati V_H, C_{H1}-n

13.2. La struttura tipica dell'anticorpo

13.2.1. SITI DI LEGAME E DETERMINANTI ANTIGENICI

 Gli anticorpi legano gli antigeni in una tasca formata dalle regioni variabili delle catene pesanti e leggere: due tasche quindi per ogni unità strutturale base di anticorpo

La tasca di legame è relativamente piccola e quindi lega piccoli domini strutturali:

- nel caso di antigeni piccoli tutto l'antigene vien legato nella tasca
- nel caso di antigeni grandi, come batteri o proteine, solo una struttura delle tante che costituiscono la molecola antigenica complessa viene legata (**determinante antigenico** o **epitopo**)
- un antigene grande può avere molti determinanti antigenici, anche diversi tra loro

13.2.2. IDIOTIPI E RETE IDIOTIPICA

 Un caso speciale di riconoscimento è dato dal legare di un anticorpo specifico per la regione variabile di un altro anticorpo

Questi sono definiti **idiotipi**

- ciascun individuo produce una risposta immunitaria tollerante contro i propri idiotipi, dato che ciascun idiotipo costituisce una nuova specificità antigenica che il sistema immunitario non ha mai incontrato
- gli anticorpi anti-idiotipo così prodotti sono portatori dei propri idiotipi che possono indurre la produzione di altri anticorpi

Questo fenomeno è stato definito il *network* degli idiotipi

Il problema di chi sia l'antigene e chi l'anticorpo è di pertinenza più di un filosofo che di un immunologo

13.2.3. ISOTIPI

 5 classi (**isotipi**) degli anticorpi (**immunoglobuline**, Ig) possono essere distinte fra di loro biochimicamente e funzionalmente

- IgA
- IgD
- IgE
- IgG
- IgM

- 
- le classi di anticorpi si differenziano per la presenza di distinte regioni costanti delle catene pesanti
 - la parte costante delle catene pesanti è unica all'interno di ogni singola classe
 - le proprietà biologiche sono diverse per ogni singola classe
 - le differenze nella regione variabile sono responsabili per la specificità del legame antigenico e non influiscono sulle proprietà biologiche
 - le differenti classi conferiscono diverse proprietà biologiche ad anticorpi con la stessa specificità antigenica: proprietà biologiche e specificità antigenica sono due variabili indipendenti

- ☞ Vi sono cinque classi principali di catene pesanti, o isotipi, che determinano l'attività funzionale di un anticorpo. Le catene pesanti delle cinque classi funzionali di immunoglobuline (IgM, IgD, IgG, IgA, IgE) sono designate con la corrispondente lettera minuscola greca (μ , δ , γ , α , ed ϵ , rispettivamente). Le loro distinte proprietà funzionali derivano dalla metà carbossi-terminale della catena pesante, parte costante non associata alla catena leggera.

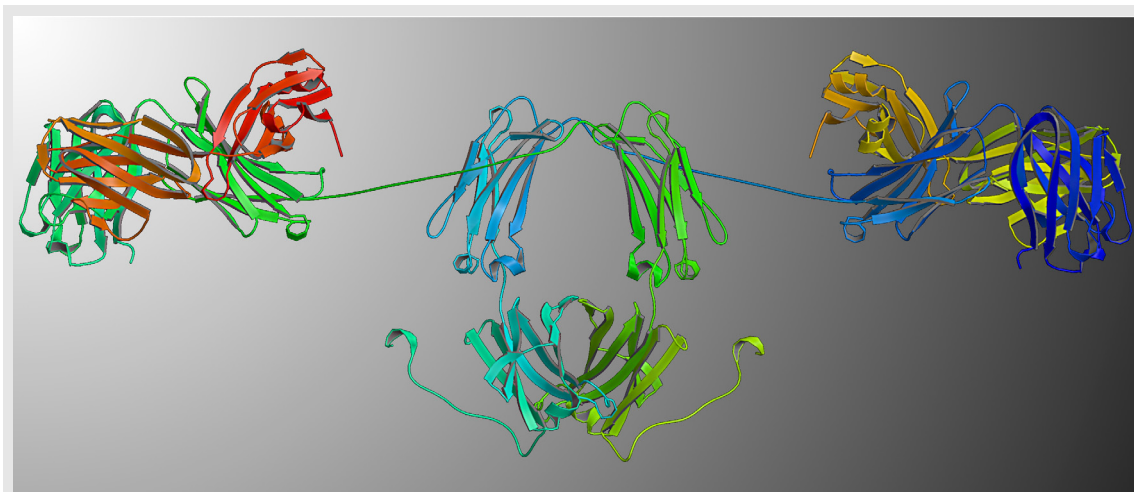


Figura 13.4. Struttura di una IgA.

Rendering di 1iga.pdb (Bohem, 1999) ottenuto con molscrip[®] (Kraulis, 1991) e Raster3D[®] (Meritt, 1997)

I tratti di catena peptidica non strutturati tra un dominio e l'altro garantiscono grande mobilità alla molecola di anticorpo. Questa capacità di cambiare conformazione permette di celare o mostrare regioni con capacità di riconoscimento verso altre molecole e di legare due determinanti antigenici a distanza variabile uno dall'altro.

13.2.4. LA GENERAZIONE DELLA DIVERSITÀ DURANTE LA RISPOSTA UMORALE

- ☞ L'insieme degli anticorpi con diversa specificità (e delle relative cellule che li producono) presenti in un singolo individuo è definita **repertorio anticorpale** e può assommare a più di 10^{10} molecole con distinte sequenze amminoacidiche.
- Ipotesi storiche principali che cercavano di spiegare l'origine della diversità anticorpale:
- *teoria della linea germinale*
 - *teoria della mutazione somatica*

Teoria della linea germinale

- ☞ Vi è un gene per ciascuna molecola di anticorpo e il repertorio è acquisito per eredità.
- non tiene conto del fatto che il numero di diversi anticorpi è tale da non poter essere contenuto nel genoma umano che codifica apparentemente per meno di 30,000 geni.

Teoria della mutazione somatica

- ☞ Si basava sull'assunto che un numero limitato di geni andasse incontro a mutazione durante la maturazione del linfocito B onde generare il repertorio osservato in ciascun individuo.

13.2.5. TEORIA ATTUALE: MUTAZIONE SOMATICA E SELEZIONE CLONALE

☞ Una teoria accettabile deve rendere conto della variabilità (repertorio) anticorpale e della capacità del sistema di produrre una risposta con sempre maggiore affinità (dinamica)

- il clonaggio dei geni che codificano per le immunoglobuline mostrò che il repertorio anticorpale è generato dalla presenza di un numero elevato ma comunque limitato di geni originari che subiscono un riarrangiamento
- la diversità fra le molecole anticorpali è aumentata grazie a fenomeni di iper-mutazione somatica che avvengono nelle cellule B

Queste modalità sono in grado di generare la diversità osservata

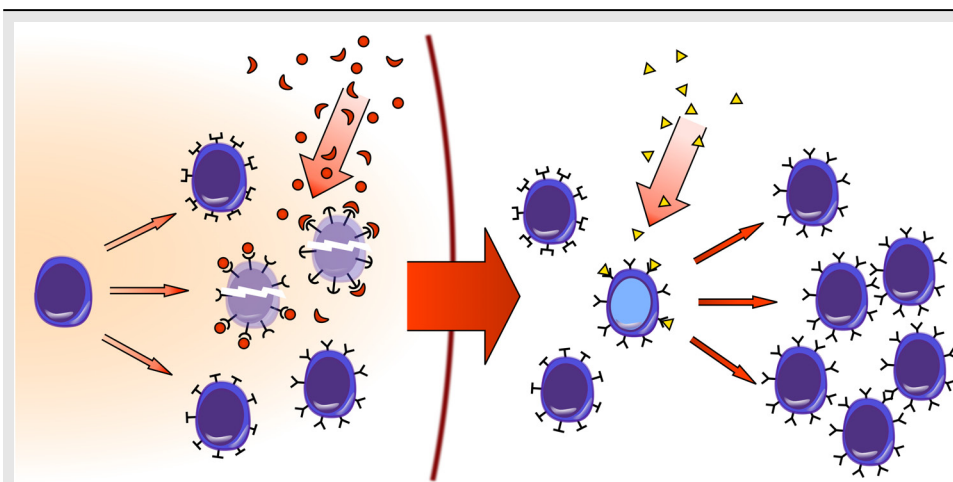


Figura 13.5. Selezione clonale. Da: en.wikipedia.org, ridisegnato

- La cellula staminale linfocitaria non possiede recettore per l'antigene
- Durante la maturazione negli organi linfatici primari acquisisce un recettore con specificità determinata dal riarrangiamento casuale
- Il passaggio successivo è rappresentato dall'induzione all'apoptosi di cloni eccessivamente auto-reattivi: solo cloni potenzialmente non autodistruttivi maturano ed escono dagli organi linfatici primari
- I cloni iniziali sono rappresentati da pochissime cellule circolanti (vergini)
- Quando un linfocita vergine incontra il suo antigene viene stimolato alla moltiplicazione, raggiungendo una numerosità che gli consente di avviare la risposta con tentativo di eliminazione dell'antigene
- Molti sono i cloni che con varia affinità possono reagire con un dato antigene con espansione clonale: risposta policlonale
- Ad un secondo incontro con lo stesso antigene avrà maggiore probabilità di essere stimolato il clone più affine
- La risposta secondaria quindi è rappresentata da cloni selezionati con maggiore affinità

13.2.6. GENERAZIONE DELLA DIVERSITÀ DEI SITI DI LEGAME PER L'ANTIGENE DELLE MOLECOLE ANTICORPALI

La diversità nelle molecole anticorpali deriva da fonti diverse

- la variabilità ereditabile è dovuta alla presenza nel genoma di segmenti genici multipli che codificano per le regioni variabili
- una variabilità aggiuntiva deriva dalla formazione del gene completo della regione variabile causata dalla ricombinazione casuale di frammenti genici
- la saldatura dei diversi segmenti è essa stessa una fonte di variabilità a causa dell'imprecisione dei punti di saldatura fra i segmenti genici
- una terza fonte di variabilità è data dalla associazione delle regioni variabili della catena pesante e di quella leggera per formare il sito di combinazione per l'antigene
- allorché un anticorpo è stato espresso viene sottoposto ad un'ulteriore diversificazione causata da iper-mutazione somatica
- la combinazione di queste fonti di variabilità genera un repertorio di specificità anticorpali molto vasto partendo da un numero relativamente ristretto di geni
- il gene finale nel linfocito maturo è stabile e non muta più

13.3. Struttura delle regioni costanti delle immunoglobuline

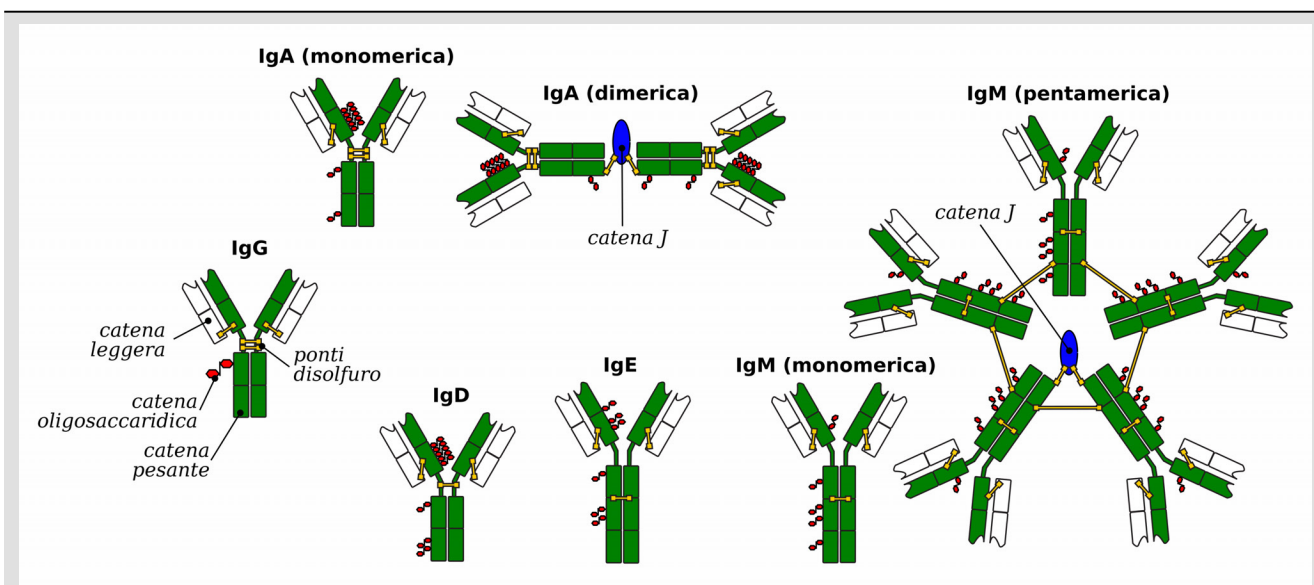


Figura 13.6. Schema della struttura delle diverse classi di anticorpi. In bianco le catene leggere, in verde le catene pesanti. Da Jenaway (1994) ridisegnato

13.3.1. PROPRIETÀ FISICHE PIÙ IMPORTANTI DEI DIVERSI ISOTIPI UMANI

Tabella 13.1: Anticorpi: proprietà fisiche dei vari isotipi umani

Anticorpo (isotipo)									
	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4	IgM	IgA1	IgA2	IgD	IgE
catena pesante	$\gamma 1$	$\gamma 2$	$\gamma 3$	$\gamma 4$	μ	$\alpha 1$	$\alpha 1$	δ	ϵ
peso molecolare (kDa)	146	146	165	146	970	160	160	184	188
concentrazione serica (mg ml ⁻¹)	9	3	1	0.5	1.5	3.0	0.5	0.03	5×10^{-5}
emivita nel sangue (d)	21	20	7	21	10	6	6	3	2

 Oltre alle cinque classi principali, esistono quattro sottoclassi di IgG: IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 e due sottoclassi di IgA monomeriche: IgA1 e IgA2

13.3.2. FUNZIONI BIOLOGICHE PIÙ IMPORTANTI DEI DIVERSI ISOTIPI UMANI

Tabella 13.2: Anticorpi: funzione e distribuzione dei vari isotipi umani

Anticorpo (isotipo)									
Funzione	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4	IgM	IgA	IgD	IgE	
neutralizzazione	++	++	++	++	+	++	-	-	
opsonizzazione	+++	-	++	+	-	+	-	-	
sensibilizzazione all'attacco delle NK	++	-	++	-	-	-	-	-	
sensibilizzazione dei mastociti	-	-	-	-	-	-	-	+++	
attivazione del complemento	++	+	++	-	+++	+	-	-	

13.3.3. LOCALIZZAZIONE DEI DIVERSI ISOTIPI UMANI

Tabella 13.3: Anticorpi: distribuzione dei vari isotipi umani

Anticorpo (isotipo)									
Distribuzione	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4	IgM	IgA	IgD	IgE	
Trasporto attraverso gli epiteli	-	-	-	-	+	+++	-	-	
Trasporto trans-placentare	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-	
Diffusione extra-vascolare	+++	+++	+++	+++	-	++	-	++	
Concentrazione serica (mg ml ⁻¹)	9	3	1	0.5	1.5	3.5	0.03	3×10^{-5}	

13.3.4. DIVERSE CATENE PESANTI EQUIVALGONO A DIVERSE PROPRIETÀ

➡ I diversi isotipi e sottoclassi legano diversi recettori e hanno proprietà funzionali diverse

Le funzioni effettrici dei diversi isotipi immunoglobulinici sono svolte dalle porzioni Fc della molecola, formata dai domini C_H2 e C_H3 (facendo riferimento alle IgG)

Il legame con l'antigene avviene tramite due identici Fab (*antigen binding fragment*, frammento legante l'antigene)

Le proprietà funzionali sono indipendenti dalla specificità antigenica

Si hanno:

- più classi di anticorpi con la stessa specificità
- più specificità diverse nella stessa classe di anticorpo

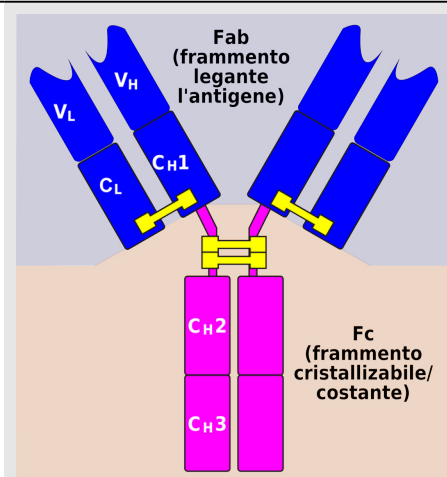


Figura 13.7. Frammenti Fab (antigen binding) e Fc (constant)

13.3.5. LEGAME CON IL COMPLEMENTO

➡ Le immunoglobuline sono capaci di legare ed attivare il sistema del complemento che contribuisce al reclutamento e all'attivazione dei fagociti e che può distruggere in modo diretto alcuni microrganismi

Il primo componente del sistema del complemento è la proteina denominata C1q che lega le IgM e le IgG in una regione ricca di amminoacidi con carica elettrica presente sul lato del dominio C_H2

13.3.6. LE IgM E LE IgA POSSONO FORMARE POLIMERI

- Le IgM e le IgA formano aggregati più grandi
- Le IgM formano soprattutto dei pentameri, mentre le IgA dei dimeri
- La polimerizzazione delle molecole di anticorpi è indotta da una catena di 15 kDa: catena J (*joining*)

➡ La polimerizzazione delle immunoglobuline sembra essere importante per il legame di antigeni con epitopi polimerici

Il tasso di dissociazione di un antigene dal sito di legame dipende dalla forza del legame e dall'affinità del sito

Le IgM spesso interagiscono con epitopi ripetitivi, quali quelli espressi dai polisaccaridi della parete batterica; però il legame del singolo sito di legame è spesso di bassa affinità

L'aumento dell'avidità che si ottiene per la polimerizzazione delle molecole anticorpali è importante per aumentare l'efficienza di legame delle IgM

➡ La polimerizzazione è necessaria per il trasporto delle IgA attraverso gli epiteli da cui ricevono un ulteriore peptide che le protegge dalla degradazione proteolitica

13.3.7. IgM E COMPLEMENTO

➡ Le IgM pentameriche dopo aver legato un microrganismo attivano il sistema del complemento

L'attivazione del complemento è innescata dal legame della proteina plasmatica C1q alla porzione Fc dell'IgM

Il C1q possiede sei siti di legame per le immunoglobuline

Almeno due siti di legame devono essere occupati per determinare l'attivazione di componenti successivi

La IgM pentamerica ha cinque siti di legame per il C1q: basta una sola molecola di IgM per attivarlo

13.4. Le immunoglobuline di membrana

-  Gli anticorpi di ciascun isotipo possono essere prodotti sia nella forma secretoria che in quella di recettore di membrana
- nella forma molecolare che funge da recettore di membrana, la molecola possiede un dominio idrofobico trans-membrana che la ancora alla superficie del linfocito B, assente nella forma molecolare secreta
 - le immunoglobuline di superficie sono sempre monomeriche
 - le due diverse estremità carbossi-terminali delle catene pesanti nelle forme di membrana e secretoria sono codificate da esoni distinti
 - quale delle due forme sia prodotta dipende da *alternate splicing* dell'mRNA per la catena pesante

13.4.1. IL RECETTORE DEI LINFOCITI B E LA LORO ATTIVAZIONE

-  Prima di essere secreta, l'immunoglobulina matura svolge la funzione di recettore per l'antigene sulla superficie del linfocito B
- Le immunoglobuline presenti alla superficie cellulare dei linfociti B vengono chiamate recettori dei linfociti B
-  Il legame dell'antigene a queste immunoglobuline trans-membrana induce l'espansione clonale e la maturazione dei linfociti B in plasmacellule
- Il fenomeno viene definito attivazione dei linfociti B
- Per alcuni antigeni il semplice legame ai recettori è sufficiente per attivare i linfociti B
- Tuttavia, la maggior parte degli antigeni per indurre l'attivazione delle cellule B richiede l'intervento di altre cellule che forniscono segnali aggiuntivi

13.4.2. ATTIVAZIONE DEI LINFOCITI B

-  La trasmissione del segnale che parte dal legame dell'antigene con il recettore di superficie dipende da due catene associate alle immunoglobuline di membrana dei linfociti B chiamate Ig α e Ig β
- Queste catene accessorie permettono l'interazione della immunoglobulina di membrana con enzimi citoplasmatici che trasducono il segnale quando si lega l'antigene alla immunoglobulina stessa

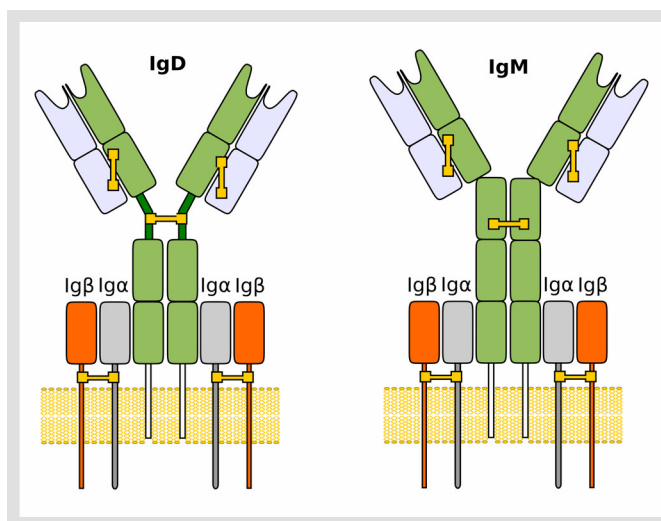


Figura 13.8. Immunoglobuline di membrana, proteine associate.
Da Jenaway (1994) ridisegnato

-  La cascata di reazioni intra-cellulari che fa seguito all'attivazione della tirosin-chinasi causa cambiamenti nell'espressione dei geni e induce la proliferazione e la maturazione dei linfociti B
- Questa sequenza che nel linfocito B unisce il legame del recettore all'attivazione dei regolatori della trascrizione specifici del linfocito B, viene impiegata da altre cellule per accoppiare ad un segnale di membrana i cambiamenti nell'espressione genica che saranno diversi a seconda del tipo di cellula attivata

13.4.3. ATTIVAZIONE DEI LINFOCITI T

 L'attivazione della cellula T segue meccanismi molto simili

 Sebbene il legame delle immunoglobuline di membrana possa dare inizio all'attivazione cellulare descritta, di per sé non è sufficiente per indurre la proliferazione e la maturazione del linfocito B

Infatti per ottenere questi effetti sono necessari i segnali indotti dai fattori di crescita secreti dalle cellule T *helper* e dai macrofagi

13.4.4. I LINFOCITI T HELPER SONO NECESSARI PER LE RISPOSTE DEI LINFOCITI B VERSO LA MAGGIOR PARTE DEGLI ANTIGENI

 La grande maggioranza degli antigeni non possiede epitopi identici multipli, oppure la loro densità non è sufficiente, e quindi non può attivare le cellule B per il legame contemporaneo e diretto di più recettori immunoglobulinici

Le risposte delle cellule B verso questi antigeni dipendono da una sotto-popolazione specializzata di linfociti T, le cellule T *helper*

 I linfociti T *helper* (TH2):

- riconoscono l'antigene presentato sulla superficie dei linfociti B
- producono segnali capaci di indurre l'attivazione dei linfociti B

13.4.5. FUNZIONE DEL RECETTORE DEI LINFOCITI B NELL'INTERAZIONE CON I LINFOCITI T HELPER

 La funzione cruciale del recettore per l'antigene del linfocito B è di

- catturare l'antigene per presentarlo alla cellula T *helper* antigene-specifica
- promuovere cambiamenti di membrana del linfocito B che favoriscono l'interazione col linfocito T

13.4.6. LE CELLULE DENDRITICHE FOLLICOLARI

 L'amplificazione della risposta anticorpale sembra dipendere da una seconda interazione fra cellule che avviene nei follicoli linfatici

Nei follicoli linfoidi vi sono cellule denominate cellule dendritiche follicolari specializzate nel trattenere l'antigene sulla loro superficie

I linfociti B attivate possono legare l'antigene esposto dalle cellule dendritiche e stabilire legami recettoriali multipli, con conseguente attivazione metabolica

13.5. Principali fonti utilizzate

Boehm, M.K., Woof, J.M., Kerr, M.A., Perkins, S.J. (1999) The Fab and Fc fragments of IgA1 exhibit a different arrangement from that in IgG: a study by X-ray and neutron solution scattering and homology modelling. *J. Mol. Biol.* 286, 1421-1447

Harris, L.J., Larson, S.B., Hasel, K.W., McPherson, A. (1997). Refined structure of an intact IgG2a monoclonal antibody. *Biochemistry* 36, 1581-1597

Haynes, B.F., Soderberg, K.A., Fauci, A.S. (2008) Introduction to the immune system. In: Fauci, A.S., Braunwald, E., Kasper, D.L., Hauser, S.L., Longo, D.L., Jameson, J.L., Loscalzo, J. (eds.) *Harrison's principles of internal medicine*. XVII ed. Mc Graw Hill, New York. Pp. 2019-2045

Janeway, C.A., Travers, O. (1994) *Immunobiology: the immune system in health and disease*. Garland, New York

Kraulis, P.J. (1991) MOLSCRIPT: a program to produce both detailed and schematic plots of protein structures. *J. Appl. Cryst.* 24, 946-950

Merritt, E.A., Bacon, D.J. (1997) Raster3D photorealistic molecular graphics. *Meth. Enzymol.* 277, 505-524

Siti web

en.wikipedia.org

visitato il 3/12/2007

accessibile il 22/06/2011



