

# 13. Anticorpi

II edizione



(vedi singoli sottocapitoli)

13. Anticorpi.....	417	13.3.2. Funzioni biologiche più importanti dei diversi isotipi umani.....	430
13.1. STRUTTURA DEGLI ANTICORPI ED I GENI DELLE IMMUNOGLOBULINE ..	419	13.3.3. Localizzazione dei diversi isotipi umani.....	430
13.1.1. Struttura/funzione degli anticorpi.....	420	13.3.4. Diverse catene pesanti equivalgono a diverse proprietà.....	431
13.1.2. Domini strutturali delle molecole anticorpali.....	420	13.3.5. Legame con il complemento.....	431
13.2. LA STRUTTURA TIPICA DELL'ANTICORPO .....	421	13.3.6. Le IgM e le IgA possono formare polimeri.....	432
13.2.1. Siti di legame e determinanti antigenici.....	421	13.3.7. IgM e complemento.....	432
13.2.2. Idiotipi e rete idiotipica.....	421	13.4. LE IMMUNOGLOBULINE DI MEMBRANA .....	433
13.2.3. Isotipi.....	422	13.4.1. Il BCR (recettore dei linfociti B) e l'attivazione dei linfociti B .....	433
13.2.4. La generazione della diversità durante la risposta umorale.....	424	13.4.2. Attivazione dei linfociti B.....	434
13.2.5. Teoria attuale: mutazione somatica e selezione clonale.....	425	13.4.3. Attivazione dei linfociti T.....	435
13.2.6. Generazione della diversità dei siti di legame per l'antigene delle molecole anticorpali.....	427	13.4.4. I linfociti T helper sono necessari per le risposte dei linfociti B verso la maggior parte degli antigeni.....	435
13.3. STRUTTURA DELLE REGIONI COSTANTI DELLE IMMUNOGLOBULINE ...	428	13.4.5. Funzione del BCR nell'interazione con i linfociti T helper.....	435
13.3.1. Proprietà fisiche più importanti dei diversi isotipi umani.....	429	13.4.6. Le cellule dendritiche follicolari.....	436
		13.5. PRINCIPALI FONTI UTILIZZATE.....	437



### 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

Immagine della struttura [pdb\\_1HZH](#) (PDB, protein data bank), Saphire (2001) ottenuta con [Jmol](#) e [PovRay](#)

- 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
- L'anticorpo è formato da due coppie di catene polipeptidiche differenti chiamate catena pesante e catena leggera

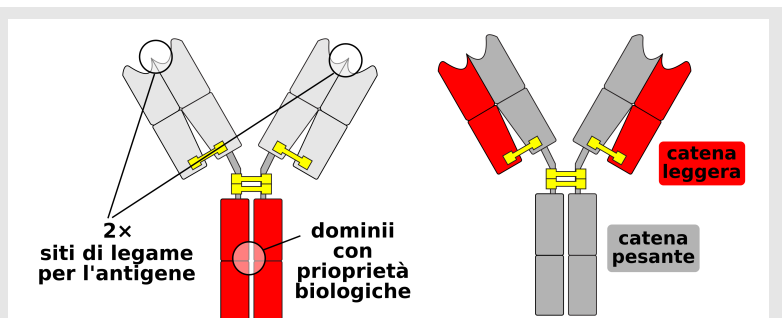


Figura 13.1. Struttura di base di un anticorpo. In giallo i ponti disolfuro

#### 13.1.1. STRUTTURA/FUNZIONE DEGLI ANTICORPI

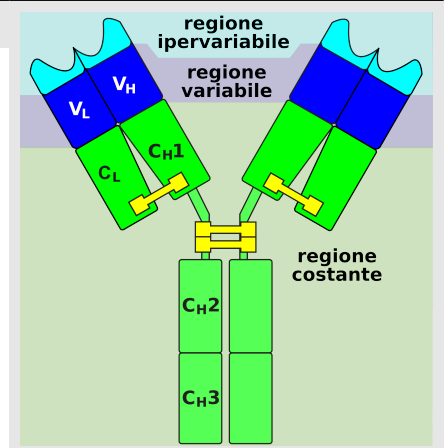
Figura 13.2. Regioni iper-variabili, variabili e costanti della molecola anticorpale

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  $V_H$ ,  $C_{H1}$ , 2, 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 legame 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 ( $\mu$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$ ,  $\alpha$ , ed  $\epsilon$ , rispettivamente). Le loro distinte proprietà funzionali derivano dalla metà carbossi-terminale della catena pesante, parte costante non associata alla catena leggera.

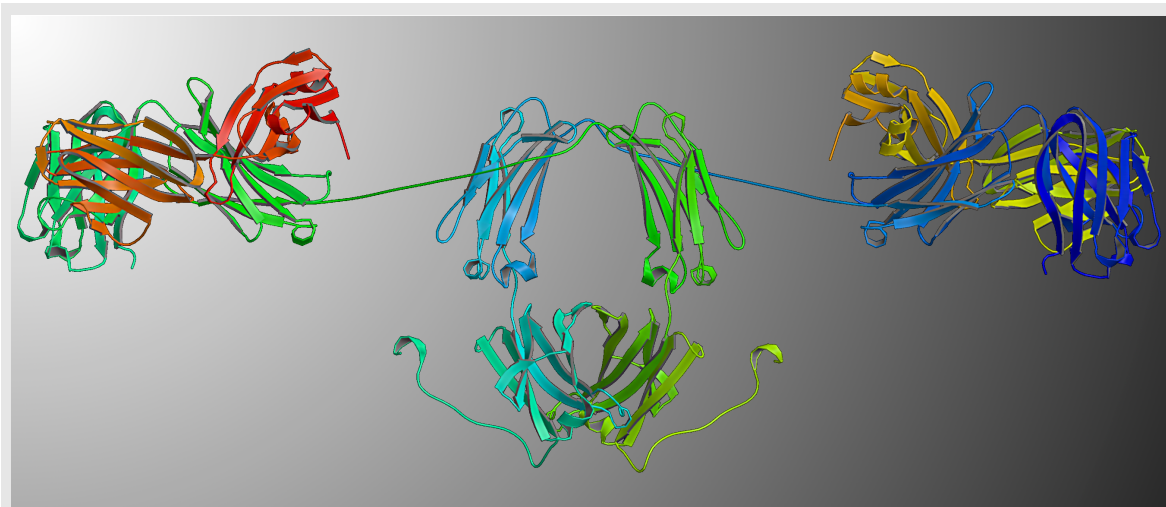


Figura 13.3. Struttura di una IgA.

Rendering di 1IGA.pdb (Bohem, 1999) ottenuto con molscrip<sup>®</sup> (Kraulis, 1991) e Raster3D<sup>®</sup> (Merrit, 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 UMOREALE

- ☞ 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.

I 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

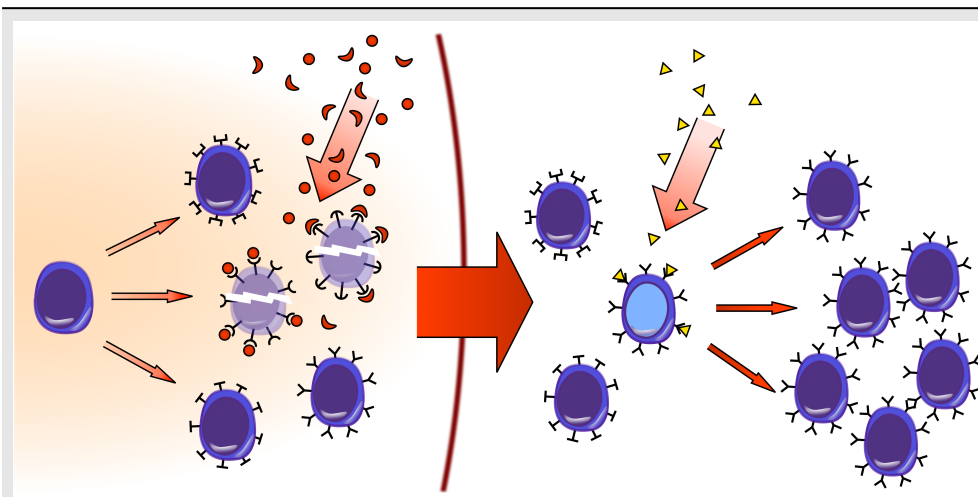


Figura 13.4. Selezione clonale. Liberamente tratto da un disegno originale common domain di Ilmari Karonen (2006) in: [wikipedia.org/Clonal\\_selection](http://wikipedia.org/Clonal_selection)

- 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

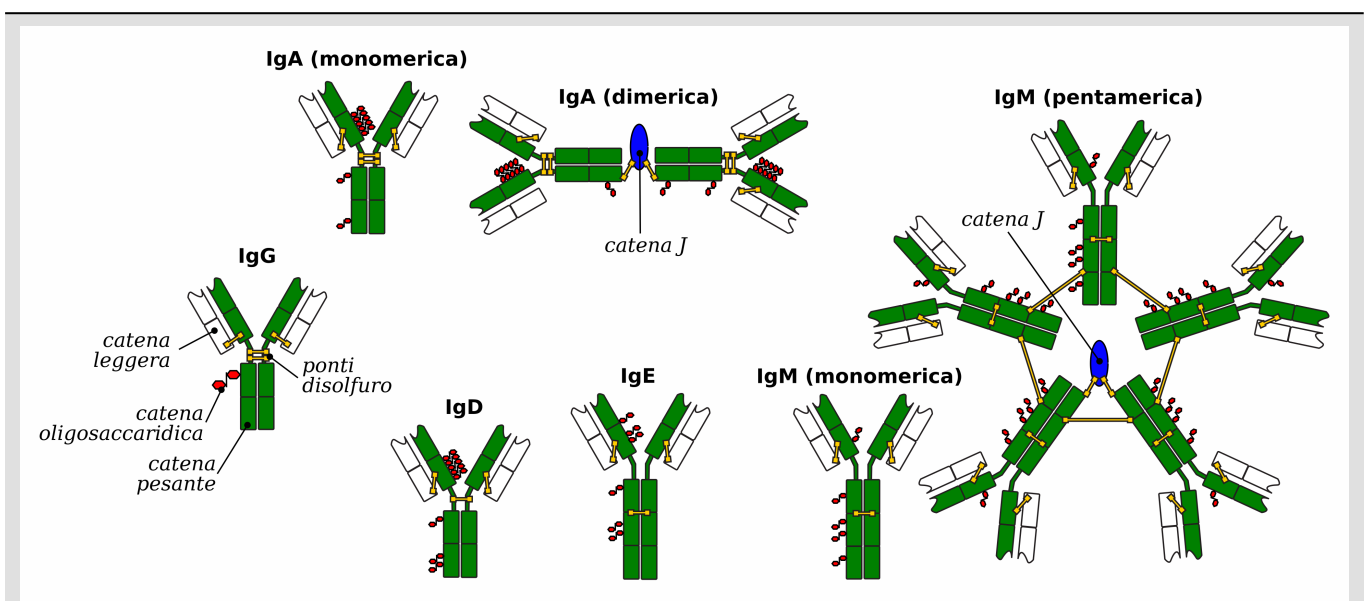



Figura 13.5. Schema della struttura delle diverse classi di anticorpi. In bianco le catene leggere, in verde le catene pesanti. Liberamente tratto da Jenaway (1994)

### 13.3.1. PROPRIETÀ FISICHE PIÙ IMPORTANTI DEI DIVERSI ISOTIPI UMANI

Tabella 13.19: Anticorpi: proprietà fisiche dei vari isotipi umani

	Anticorpo (isotipo)								
	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4	IgM	IgA1	IgA2	IgD	IgE
catena pesante	γ1	γ2	γ3	γ4	μ	α1	α1	δ	ε
peso molecolare (kDa)	146	146	165	146	970	160	160	184	188
concentrazione serica (mg ml <sup>-1</sup> )	9	3	1	0.5	1.5	3.0	0.5	0.03	5×10 <sup>-5</sup>
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 13.20: Anticorpi: funzione e distribuzione dei vari isotipi umani

Funzione	Anticorpo (isotipo)								
	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 13.21: Anticorpi: distribuzione dei vari isotipi umani

Distribuzione	Anticorpo (isotipo)								
	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4	IgM	IgA	IgD	IgE	
Trasporto attraverso gli epitelii	-	-	-	-	+	+++	-	-	
Trasporto trans-placentare	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-	
Diffusione extra-vascolare	+++	+++	+++	+++	-	++	-	++	
Concentrazione serica (mg ml <sup>-1</sup> )	9	3	1	0.5	1.5	3.5	0.03	3×10 <sup>-5</sup>	

### 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 (frammento cristallizzabile, in quanto a composizione costante)

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

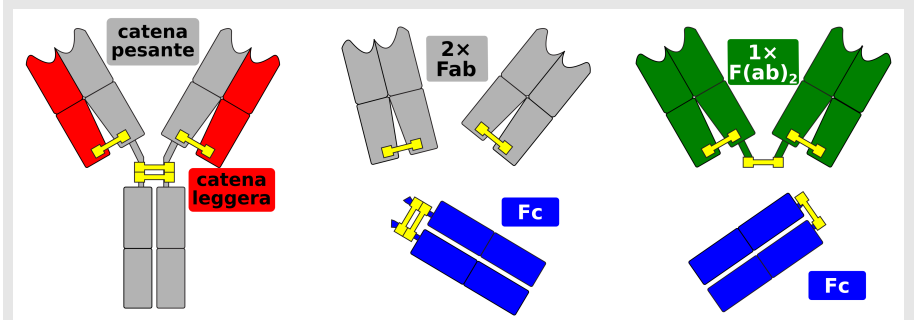


Figura 13.6. Frammenti Fab (*antigen binding*) e Fc (*constant*). A seconda della posizione del taglio rispetto ai legami disolfuro possiamo avere un frammento legante l'antigene bivalente o due frammenti leganti l'antigene divisi tra loro

☞ Si hanno:

- più classi di anticorpi con diverse proprietà biologiche ma con la stessa specificità antigenica
- più specificità antigeniche diverse nella stessa classe di anticorpo

### 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<sub>H2</sub>

### 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 epitelii 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
  - quale delle due forme sia prodotta dipende da *alternate splicing* dell'mRNA per la catena pesante

#### 13.4.1. IL BCR (RECELTTORE DEI LINFOCITI B) E L'ATTIVAZIONE DEI LINFOCITI B

-  Prima di essere secreta, l'immunoglobulina matura svolge la funzione di recettore per l'antigene sulla superficie del linfocito B: **BCR** (*B cell receptor*)

Il BCR di un dato linfocito è identico alla immunoglobulina che potrà produrre e secernere quando maturato a plasmacellula con l'unica differenza nella regione costante che presenta un dominio idrofobico che ne consente l'ancoraggio alla membrana


-  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

Alcuni antigeni multi-valenti (rispetto all'epitopo verso cui i BCR del linfocito sono specifici) sono in grado di attivare i linfociti B con il semplice legame ai BCR

Tuttavia, la maggior parte degli antigeni per indurre l'attivazione delle cellule B richiede l'intervento di altre cellule che forniscono segnali aggiuntivi (linfociti T *helper* in particolare, citochine e fattori di crescita)

#### 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  $Ig\alpha$  e  $Ig\beta$

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

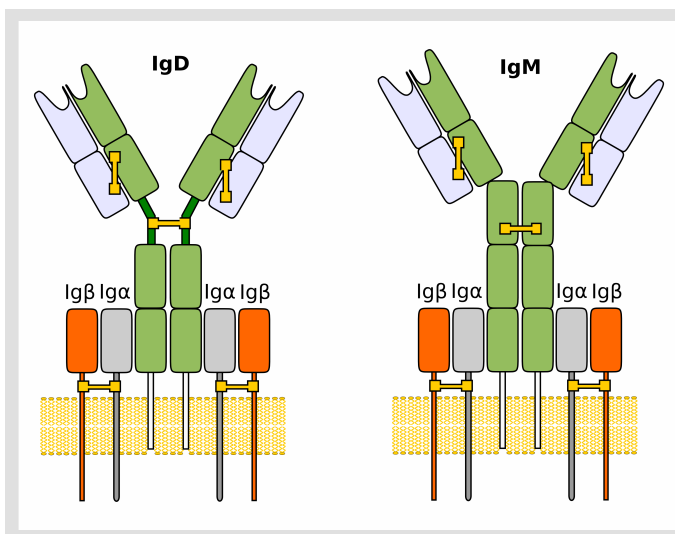




Figura 13.7. Immunoglobuline di membrana, proteine associate. Liberamente tratto da Jenaway (1994)

-  La cascata di reazioni intra-cellulari che fa seguito all'attivazione della tirosina-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


---

### 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 BCR NELL'INTERAZIONE CON I LINFOCITI T HELPER

---


 La funzione del BCR 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 attivati 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
- Licastro, F., Chiappelli, M. (2008) Quick review: immunologia. *EdiSES, Napoli*
- Merritt, E.A., Bacon, D.J. (1997) Raster3D photorealistic molecular graphics. *Meth. Enzymol.* 277, 505-524
- Saphire, E.O., Parren, P.W., Pantophlet, R., Zwick, M.B., Morris, G.M., Rudd, P.M., Dwek, R.A., Stanfield, R.L., Burton, D.R., Wilson, I.A. (2001) Crystal structure of a neutralizing human IGG against HIV-1: a template for vaccine design. *Science* 293, 1155-1159

#### Siti web

<a href="http://wikipedia.org/clonal_selection">wikipedia.org_clonal_selection</a>	visitato il 3/12/2007	accessibile il 30/06/2012
<a href="http://jmol.org">jmol.org</a>	visitato il 29/10/2011	accessibile il 30/06/2012
<a href="http://pdb.org/protein_data_bank_1HZH">pdb.org_protein_data_bank_1HZH</a>	visitato il 29/10/2011	accessibile il 30/06/2012
<a href="http://povray.org">povray.org</a>	visitato il 29/10/2011	accessibile il 30/06/2012



