

Immunoglobuline o anticorpi

(proteine che legano l'Ag)

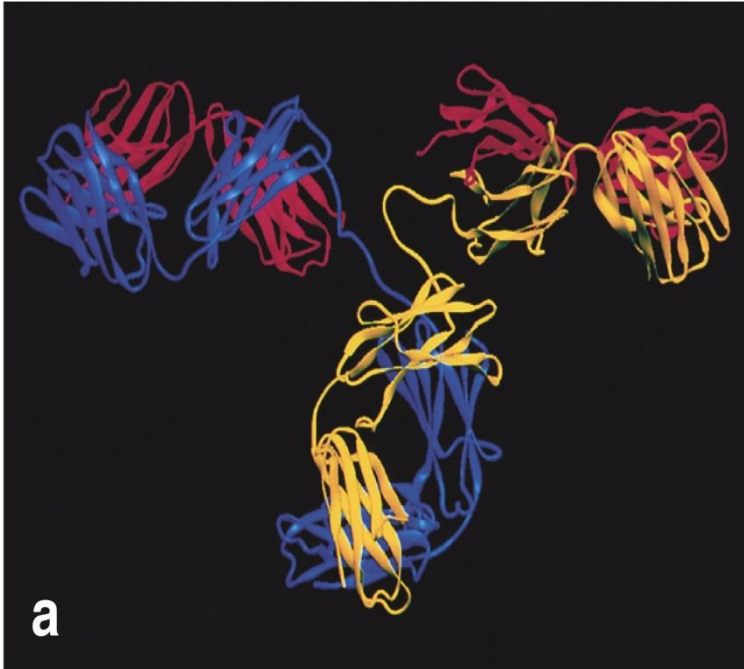


Figure 3-1 part 1 of 3 Immunobiology, 6/e. (© Garland Science 2005)

• *Effettori specifici della RI adattativa umorale*

- **Glicoproteine multimeriche**
- **Di membrana o secrete**

Anticorpo: termine coniato da Karl Landsteiner nel 1900 per definire la sostanza che reagiva in maniera specifica con i batteri

- **Esiste componente nel siero in grado di legare e precipitare le tossine ed agglutinare i batteri: (antitossina, precipitina, agglutinina)**

L'importanza degli anticorpi: la sieroterapia

Emil Von Behring (premio Nobel 1901)

e Shibasaburo Kitasato Berlino: siero di conigli precedentemente immunizzati per la tossina tetanica potevano trasferire la loro immunità ad animali non immunizzati

Paul Ehrlich studio analogo sulla difterite

Emile Roux (Istituto Pasteur) dimostra efficacia dell'antitossina nel trattamento dei bambini esposti al contagio da bacillo difterico



Balto



- un cane da slitta che prese parte ad una staffetta effettuata nell'inverno del 1925 per consegnare un medicinale alla città di Nome, in Alaska, nella quale era in corso un'epidemia di difterite

1939 A. Tiselius E.A. Kabat

• **Prima evidenza che gli anticorpi sono contenuti in una particolare frazione delle proteine sieriche.**

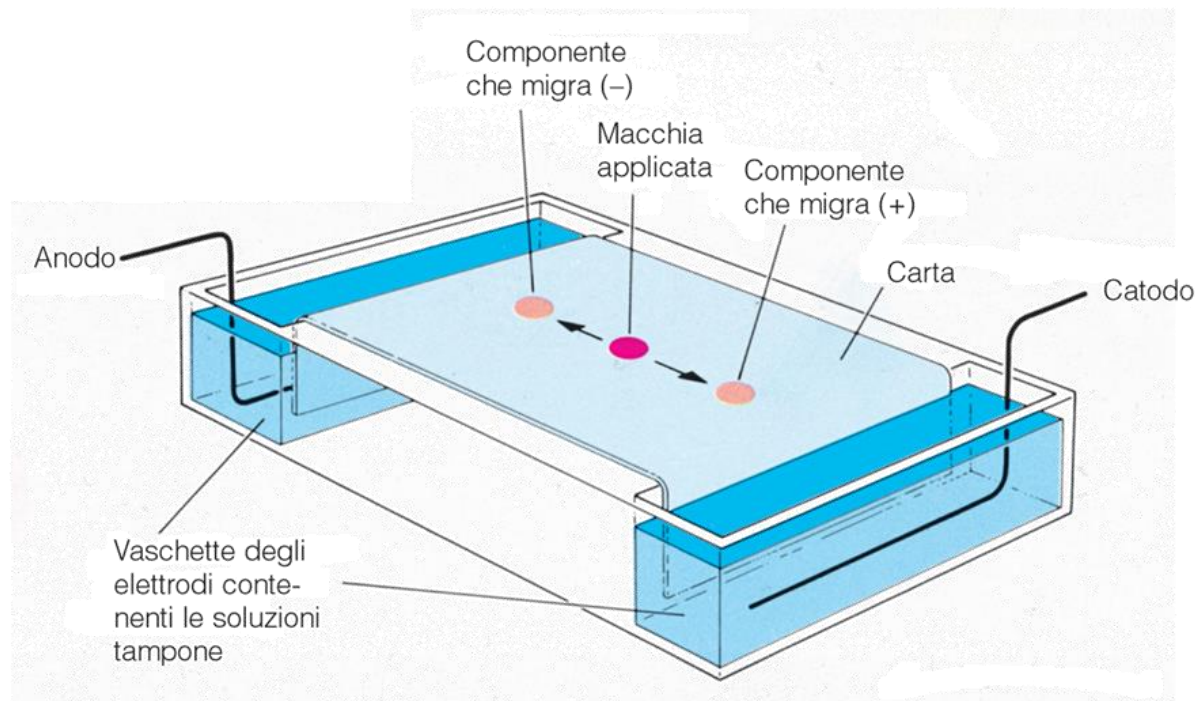
➤ **Elettroforesi su carta**

➤ **Molecole con carica netta positiva → catodo (-)**

➤ **Molecole con carica netta negativa → anodo (+)**

➤ **La mobilità elettroforetica dipende da:**

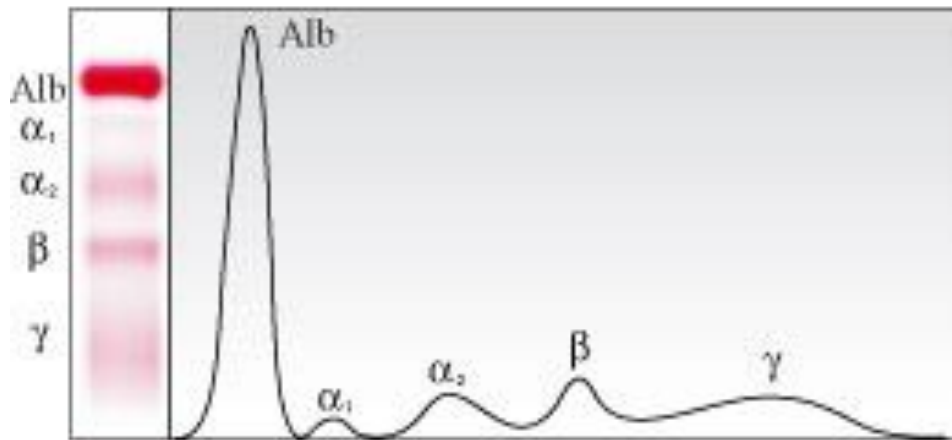
- **Intensità del campo elettrico**
- **Coefficiente frizionale (dimensione e carica della particella)**



➤ Elettroforesi delle proteine del siero

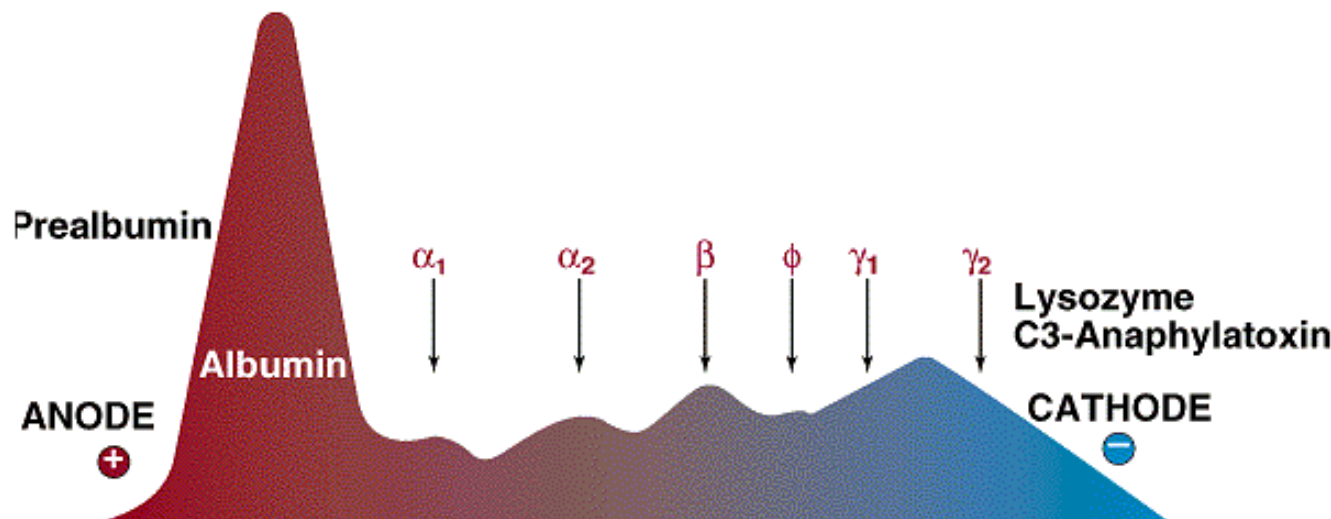
➤ Siero, non plasma, per eliminare l'interferenza del fibrinogeno

➤ Separazione delle proteine in base alla loro carica



- Questa tecnica ha permesso di separare le albumine e le altre frazioni del siero, le alfa, beta e gamma globuline

in ordinata i valori dell'assorbanza ed in ascissa la posizione delle bande.



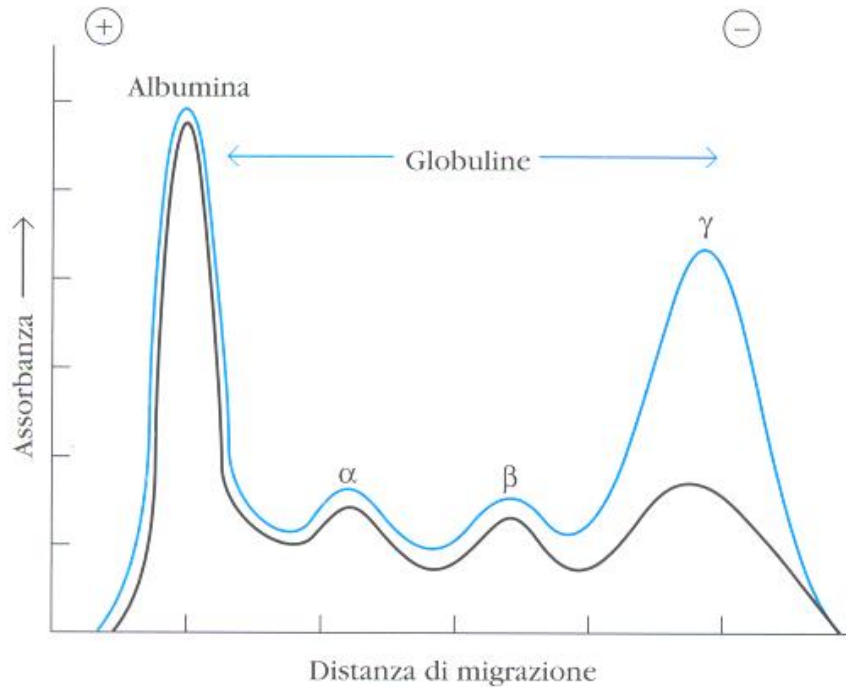


FIGURA 4-1 Dimostrazione sperimentale che gli anticorpi sono presenti nella frazione γ -globulinica delle proteine sieriche. Alcuni conigli sono stati immunizzati con ovalbumina (OVA) e i loro antisieri sono stati uniti e sottoposti a elettroforesi, che separa le proteine del siero sulla base della loro carica elettrica. La linea blu mostra il quadro elettroforetico dell'antisiero non trattato. La linea nera mostra il quadro elettroforetico dell'antisiero dopo che questo è stato incubato con OVA per rimuovere gli anticorpi anti-OVA. [Adattato da A. Tiselius e E. A. Kabat, 1939, *J. Exp. Med.* **69**:119.]

- La frazione delle gamma globuline era presente in quantità più elevata nei sieri di animali immunizzati.

Le immunoglobuline sono presenti nella frazione delle gamma globuline del siero

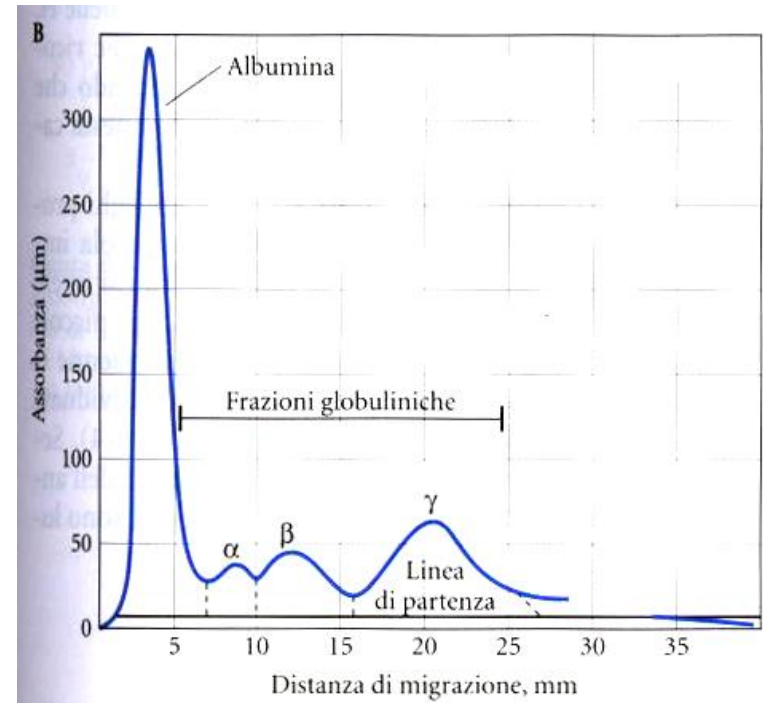
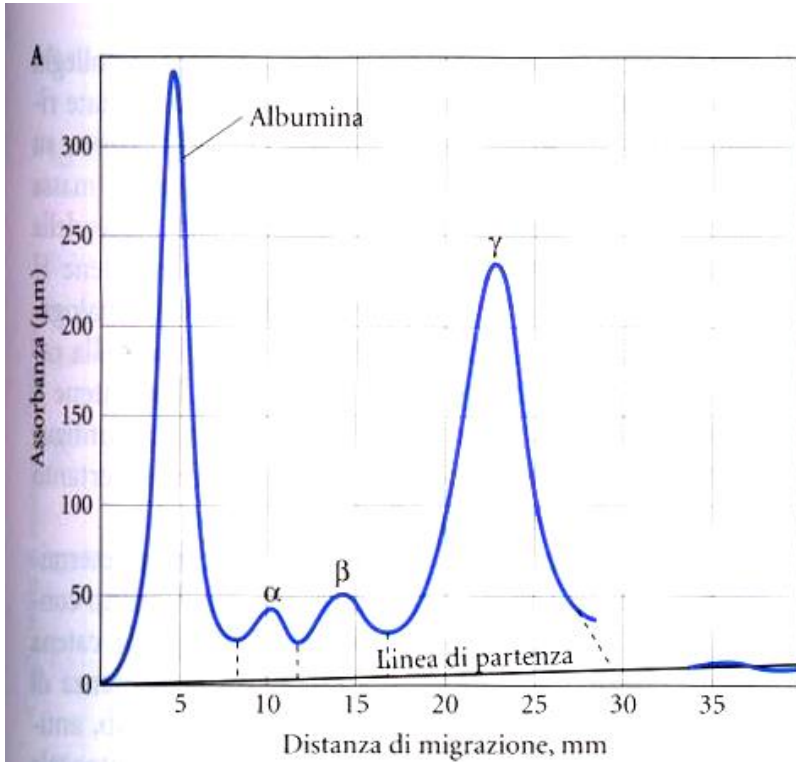


Figura 6.1 Elettroforesi di un antisiero di coniglio contenente immunoglobuline anti-ovalbumina prima (A) e dopo (B) incubazione con ovalbumina. Le immunoglobuline sono presenti nella frazione delle gamma globuline come dimostrato da un calo del picco corrispondente a questa frazione dopo incubazione con ovalbumina. Riprodotto da A. Tiselius e E.A. Kabat, *J. Exp. Med.* 69:119-131, 1939.

Bande α , β e γ

α_1

α_1 -Acid glycoprotein
 α_1 -T Glycoprotein
 α_1 -Antitrypsin
Transcortin
 α_1 -Antichymotrypsin
 α_1 -B Glycoprotein
9,5 S- α_1 -glycoprotein
Vitamin D-binding protein
 α_1 -Lipoproteins

β_1

Hemopexin
Steroid-binding β -globulin
Transferrin
Pregnancy-specific β_1 -glycoprotein
Cold insoluble globulin
Factor V (Accelerin)
Factor VII (Proconvertin)
Factor IX (Christmas)
Plasminogen
C3 Proactivator
Transcobalamin II
 β -Lipoproteins
C1r, C2
C4, C5

α_1 / α_2

Thyroxine-binding globulin
Zn- α_2 -glycoprotein
Gc globulin
Ceruloplasmin
Inter- α -trypsin inhibitor
Antithrombin III
Factor X (Stuart-Prower)
Transcobalamin I
C9

β_2

β_2 -Microglobulin
 β_2 -Glycoprotein III
 β_2 -Glycoprotein I
Fibrinogen
Factor XI (PTA)
Factor XII (Hageman)
Factor XIII (FSF)
C3, C6, C7
C3 Activator (β_2 II)

α_2

Retinol-binding protein
 α_2 HS glycoprotein
Histidine-rich 3,8 S- α_2 -glycoprotein
Haptoglobin
Pregnancy zone protein
 α_2 -Macroglobulin
Prothrombin
Antihemophilic factor
C1 inactivator
C1s

γ_1

IgG
IgA
IgD
IgE
IgM
Amylase

α_2 / β_1

Serum cholinesterase
8 S- α_3 -glycoprotein
4 S- α_2 , β_1 -glycoprotein
Transcobalamin III

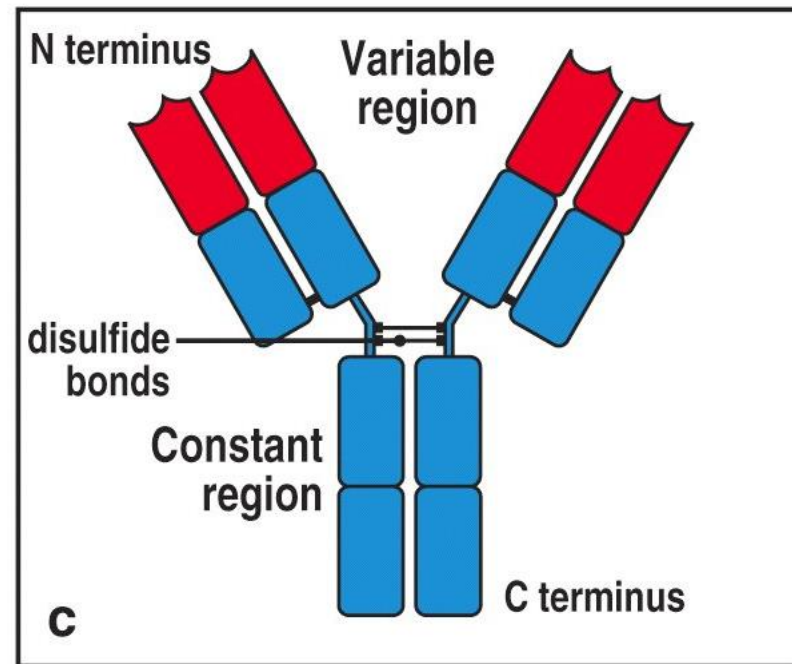
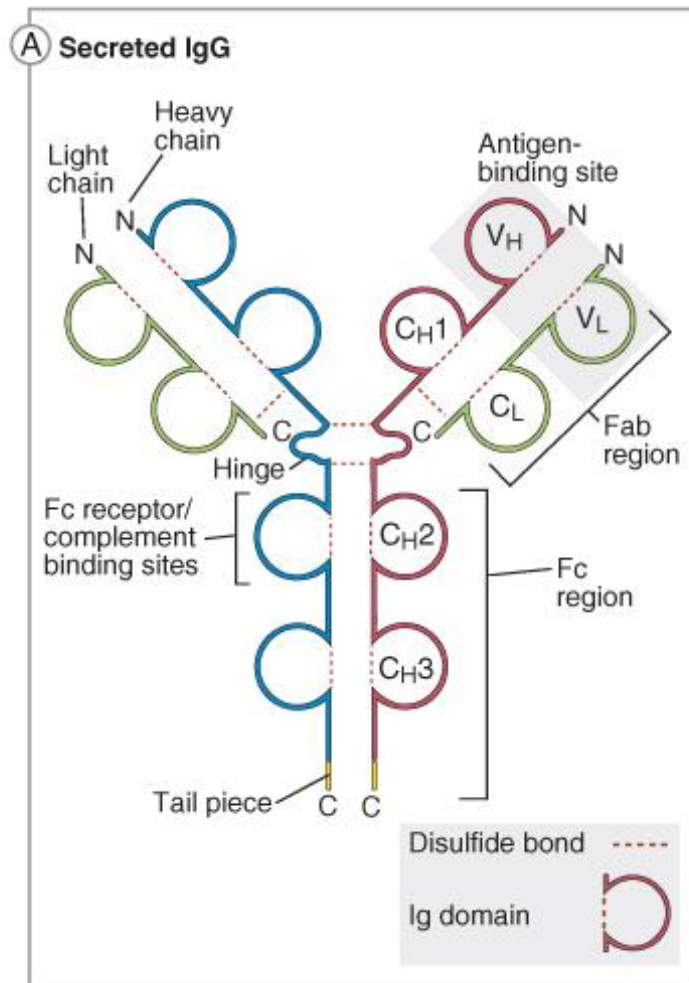
γ_2

IgG
Clq
Properdin

- Gli anticorpi presenti in questa frazione di globuline immuni sono stati chiamati immunoglobuline

Struttura delle immunoglobuline

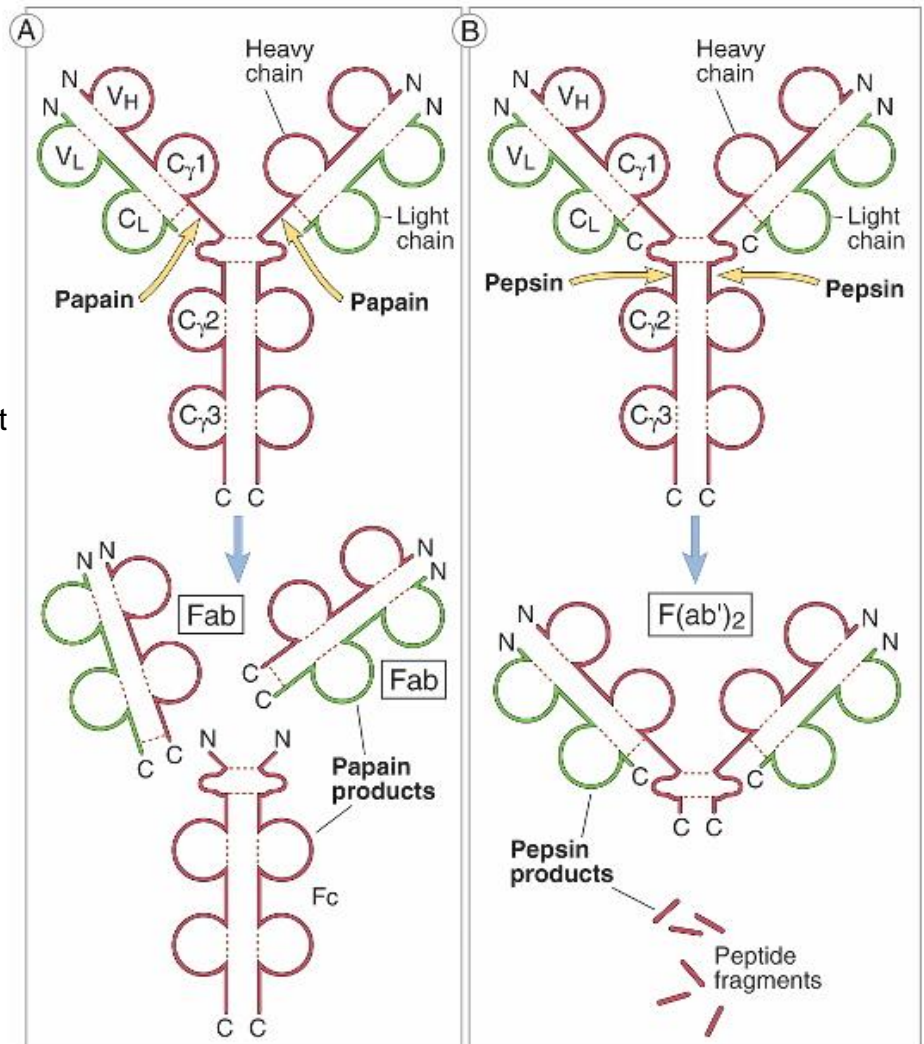
- 2 Catene leggere 25kD
- 2 Catene pesanti 50-70kD
- Proteina purificata: 150kD



Le unità funzionali degli anticorpi

Proteolytic fragments of an IgG molecule. IgG molecules are cleaved by the enzymes papain (A) and pepsin (B) at the sites indicated by arrows. Papain digestion allows separation of two antigen-binding regions (the Fab fragments) from the portion of the IgG molecule that binds to complement and Fc receptors (the Fc fragment). Pepsin generates a single bivalent antigen-binding fragment, F(ab')₂.

La digestione delle IgG con papaina o pepsina, ha permesso di costruire un modello di struttura delle Ig, perché a determinati frammenti proteolitici corrispondono funzioni ben definite



Sito di legame per l'antigene: Paratopo-epitopo

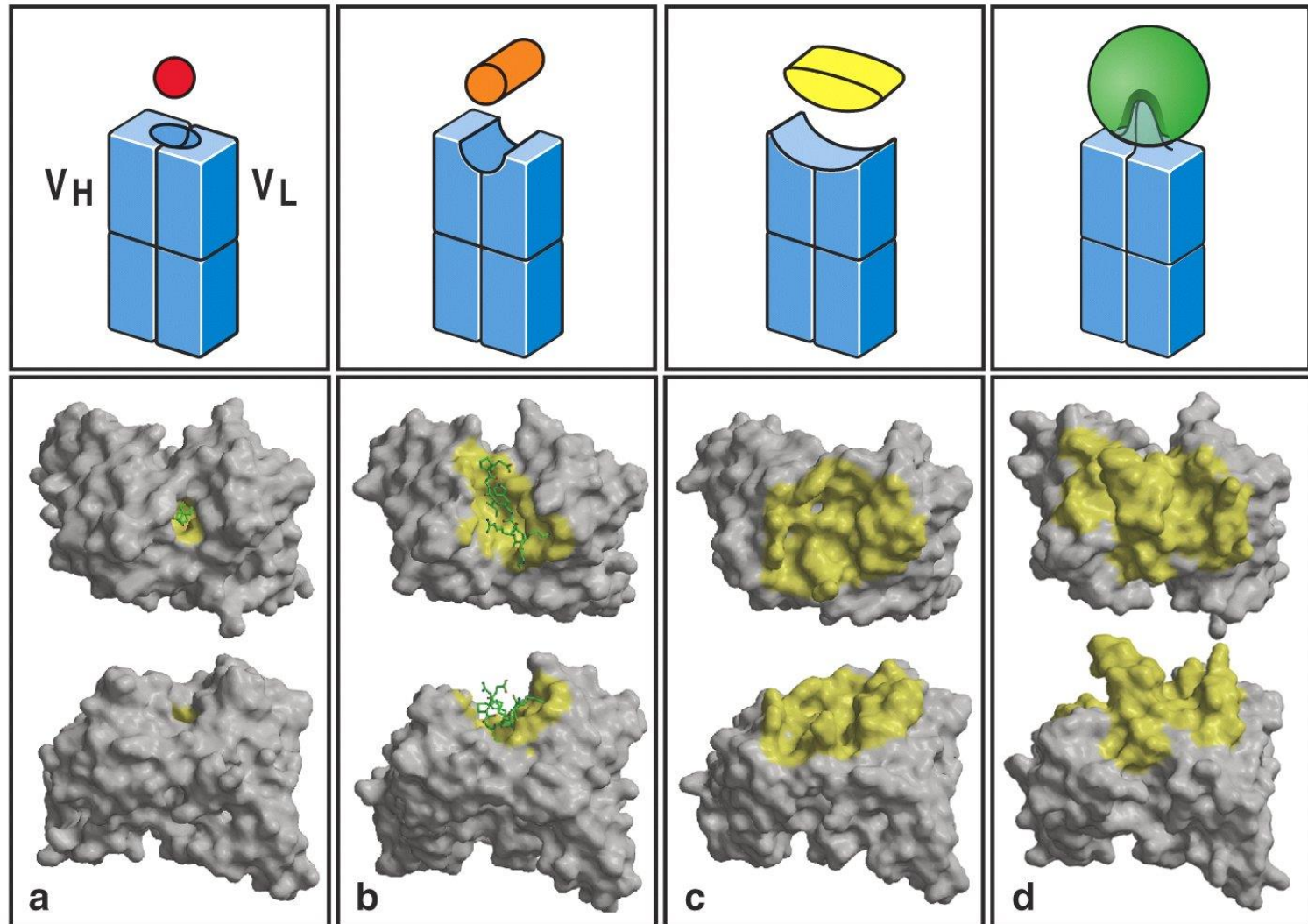
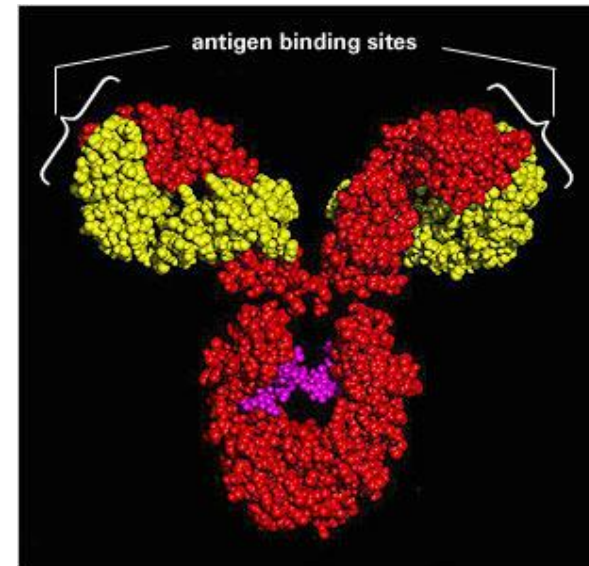


Figure 3-8 Immunobiology, 6/e. (© Garland Science 2005)

Le caratteristiche di specificità del paratopo

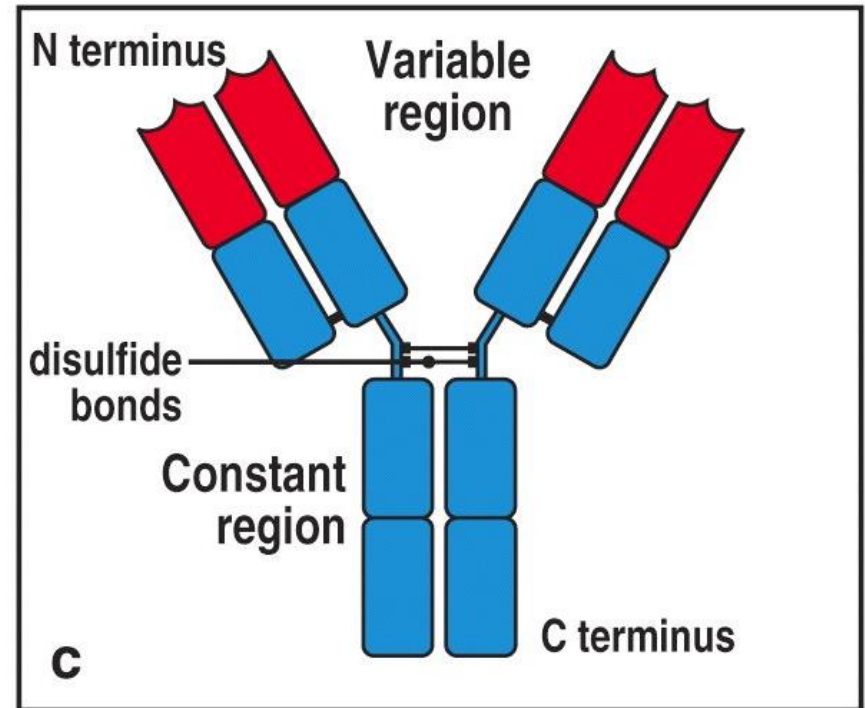
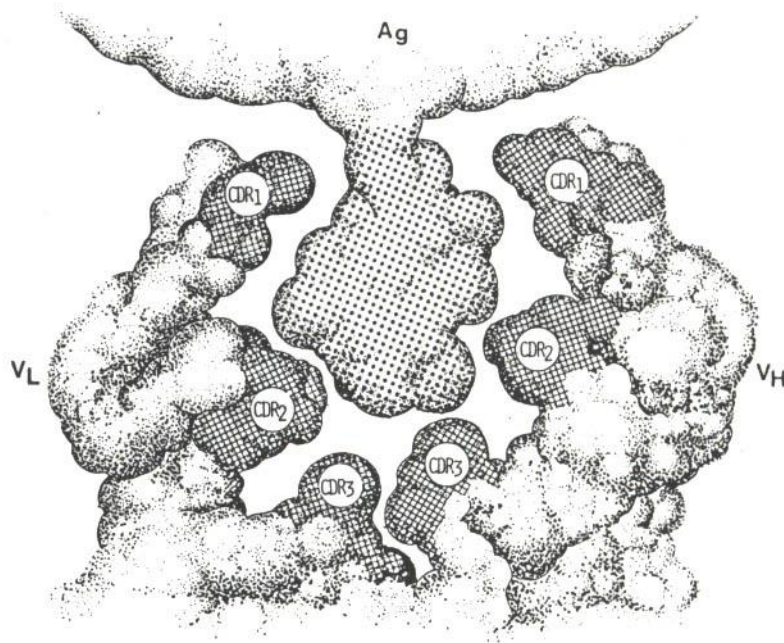
Gli Abs possono riconoscere come antigeni ogni tipo di molecola biologica:

- zuccheri
- lipidi
- acidi nucleici
- proteine



Ciascun anticorpo si lega solo ad una porzione delle macromolecole definita determinante antigenico o epitopo

Sito di legame per l'antigene



CDR Complementarity determining regions

Regioni variabili o cornice (FR1, FR2, FR3, FR4) ed ipervariabili (CDR1, CDR2, CDR3)

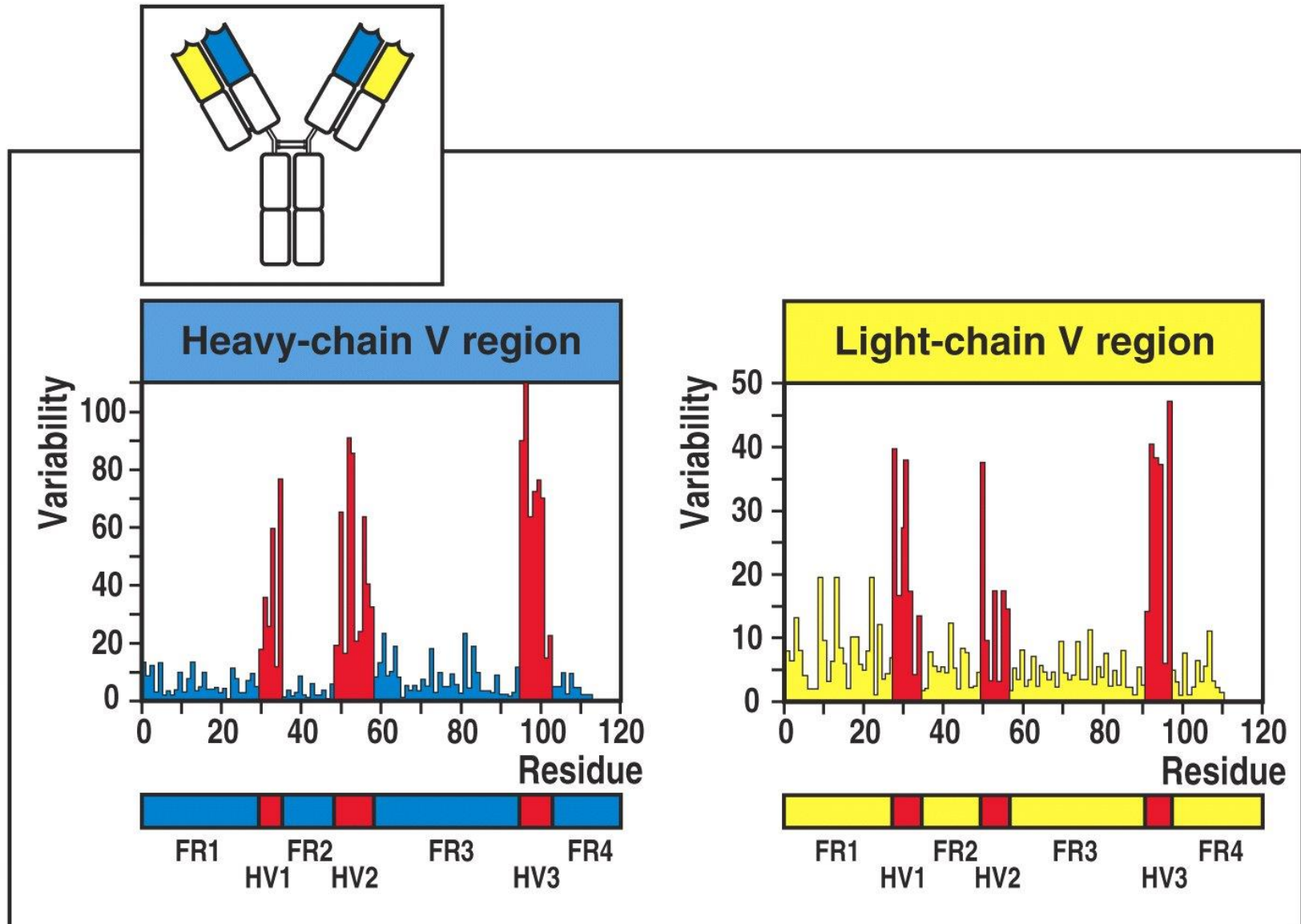
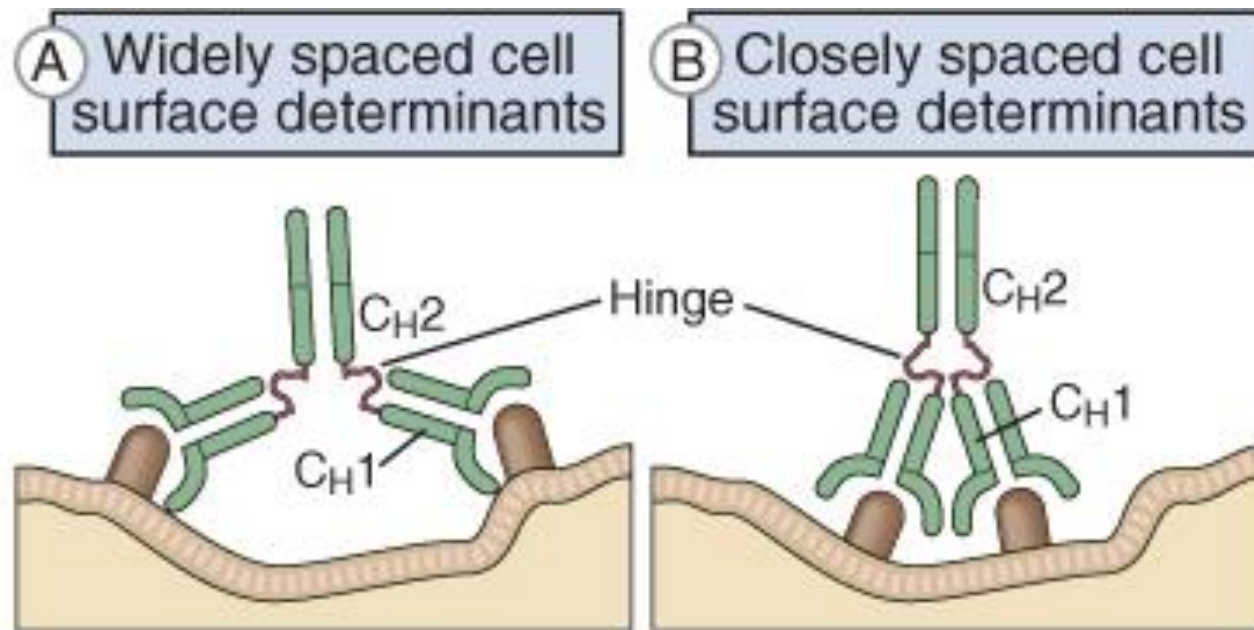


Figure 3-6 Immunobiology, 6/e. (© Garland Science 2005)

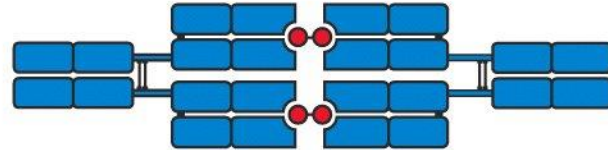
Flessibilità della regione cerniera

- Conferisce l'adattabilità della molecola alle diverse strutture antigeniche

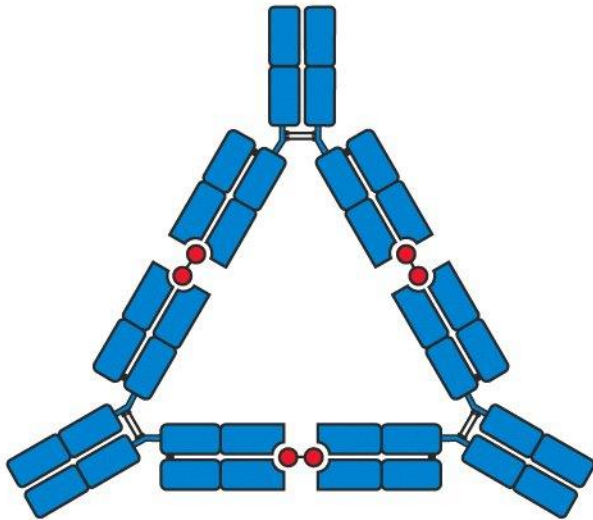




Angle between arms is 0°



Angle between arms is 60°



Angle between arms is 90°

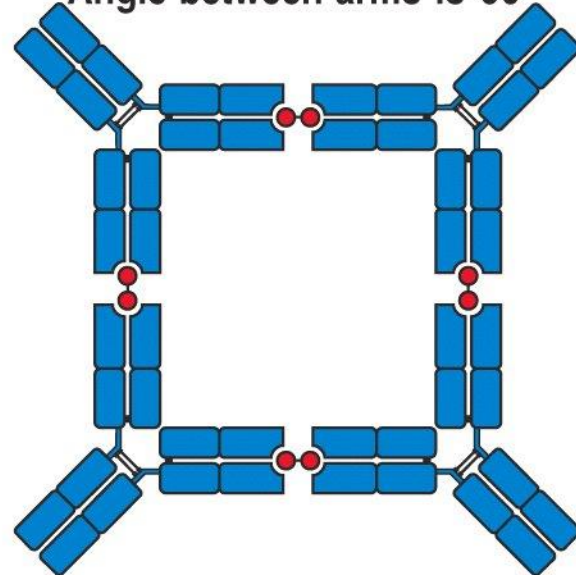
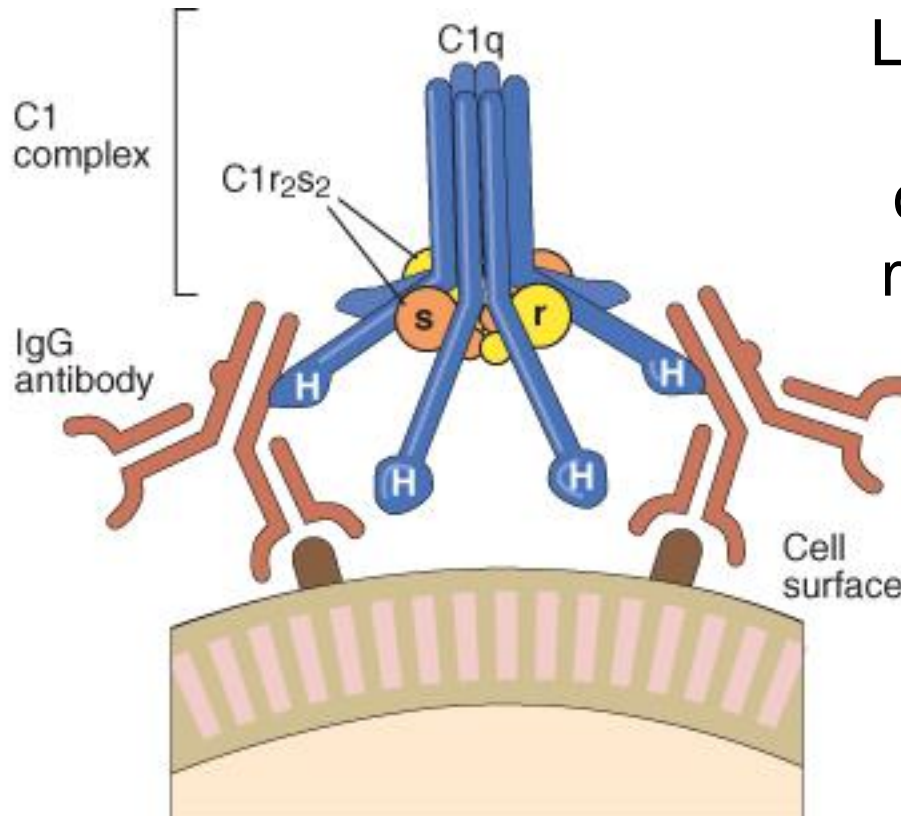


Figure 3-4 Immunobiology, 6/e. (© Garland Science 2005)

Le funzioni effettrici mediate dal frammento Fc:

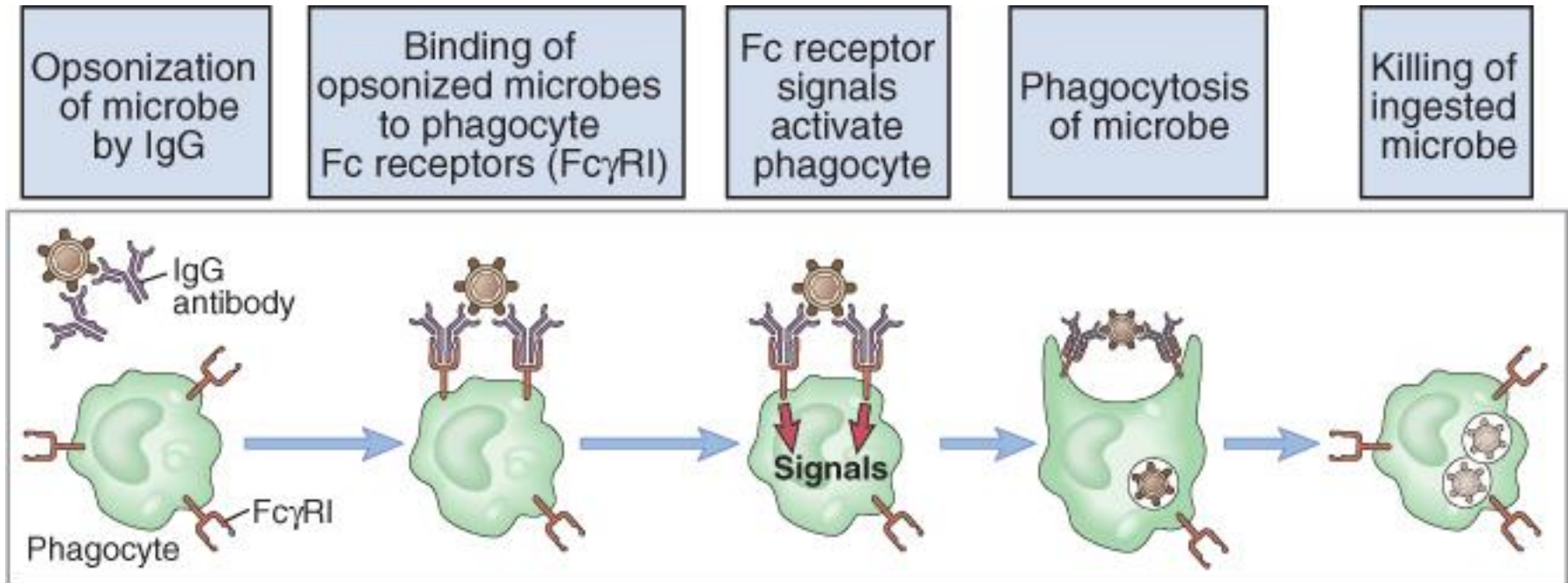
1. Fissazione del complemento



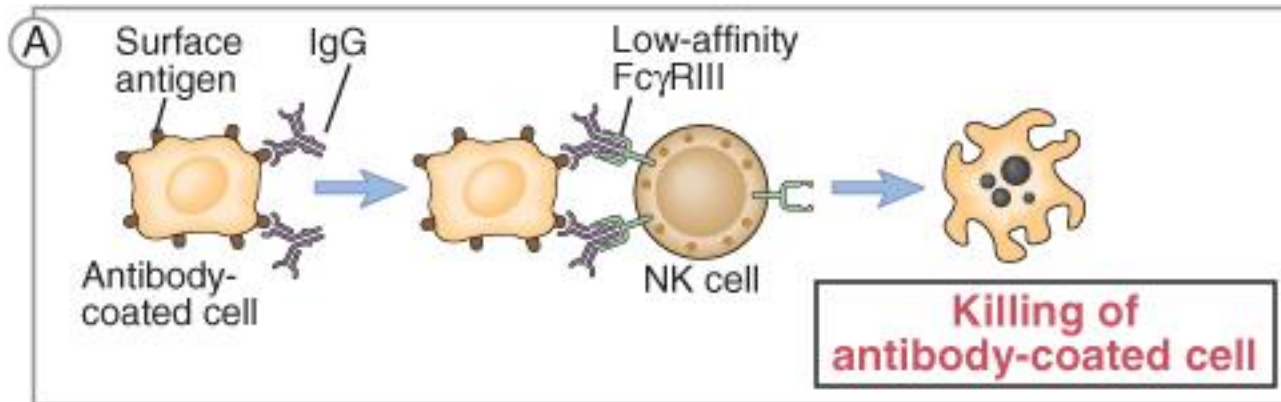
Le IgG espongono il sito di legame per il primo componente sulle C γ 2, mentre le IgM legano lo stesso componente attraverso il C μ 3.

Funzioni effettrici mediate dal frammento Fc:

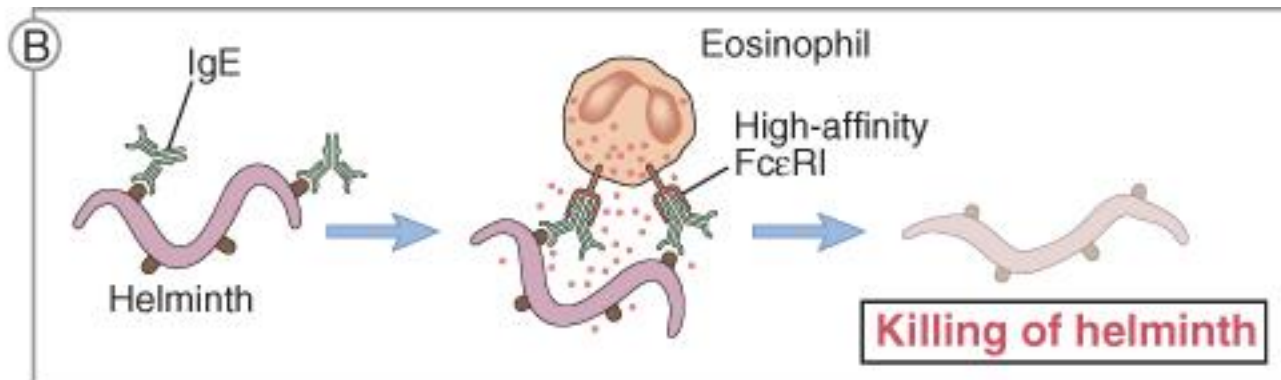
2. opsonizzazione



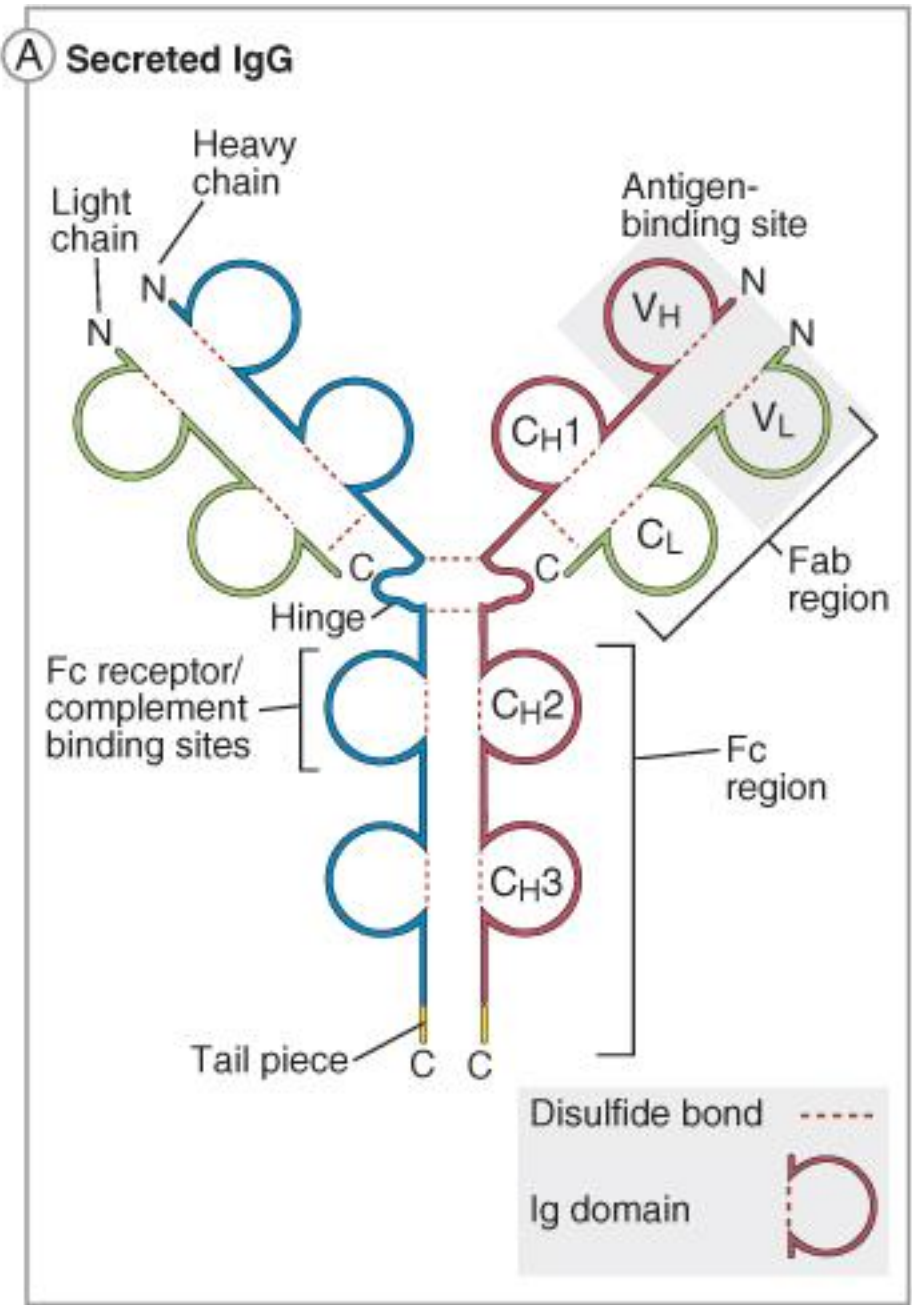
Funzioni effettrici mediate dal frammento Fc: ADCC (antibody dependent cell cytotoxicity)



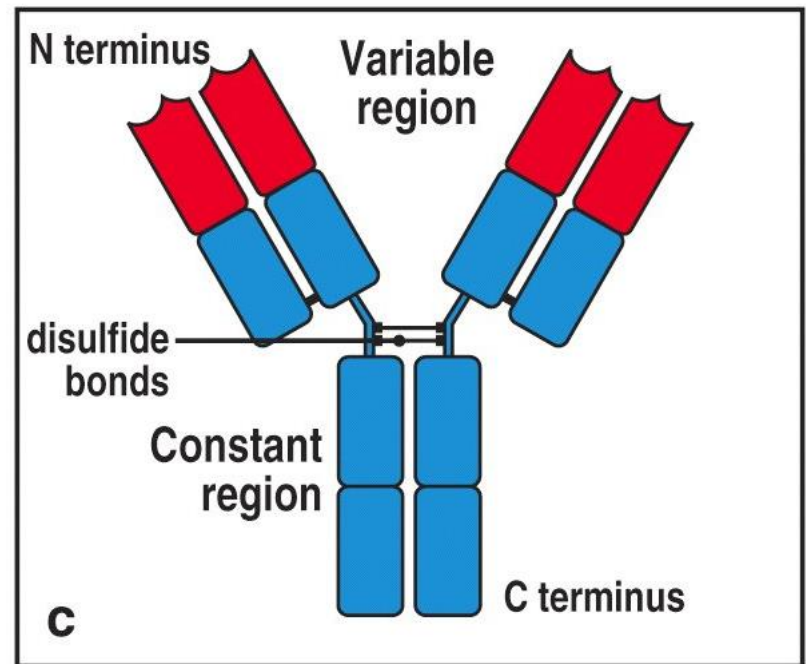
© Elsevier 2005. Abbas & Lichtman: Cellular and Molecular Immunology 5e www.studentconsult.com



© Elsevier 2005. Abbas & Lichtman: Cellular and Molecular Immunology 5e www.studentconsult.com



- 2 Catene leggere 25kD
- 2 Catene pesanti 50-70kD

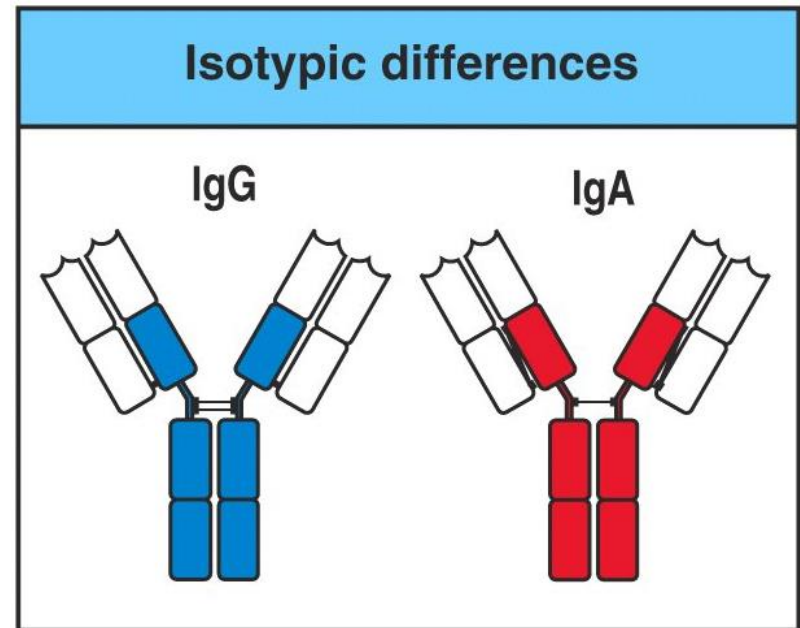


Classi (o isotipi) anticorpali

| classe | Catena pesante | sottoclassi | Catena leggera |
|--------|----------------|--|-------------------|
| IgG | γ | $\gamma 1, \gamma 2, \gamma 3, \gamma 4$ | κ, λ |
| IgM | μ | | κ, λ |
| IgA | α | $\alpha 1, \alpha 2$ | κ, λ |
| IgE | ϵ | | κ, λ |
| IgD | δ | | κ, λ |

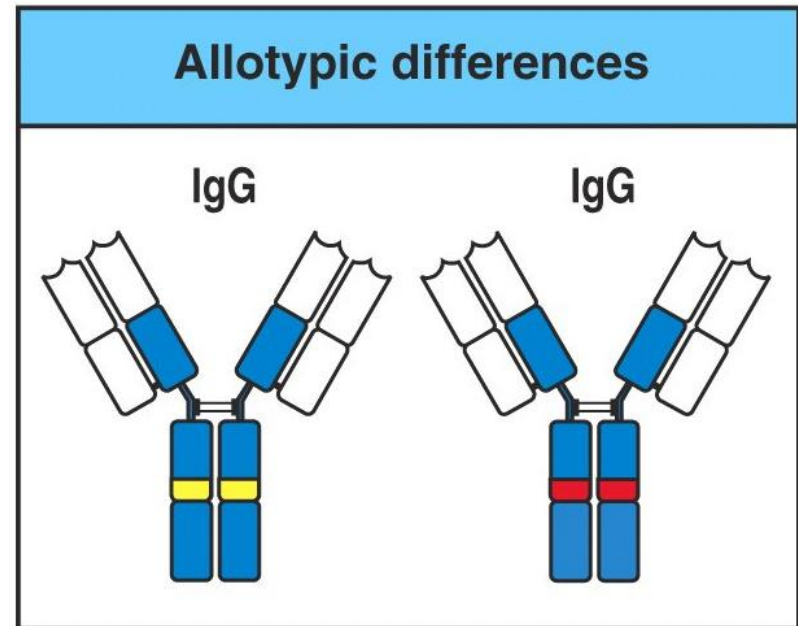
Markers isotipici:

- permettono di classificare le catene pesanti di una specie animale in classi e sottoclassi e quelle leggere in tipi e sottotipi.
- Se iniettati in un'altra specie si creano Ab.



Markers allotipici:

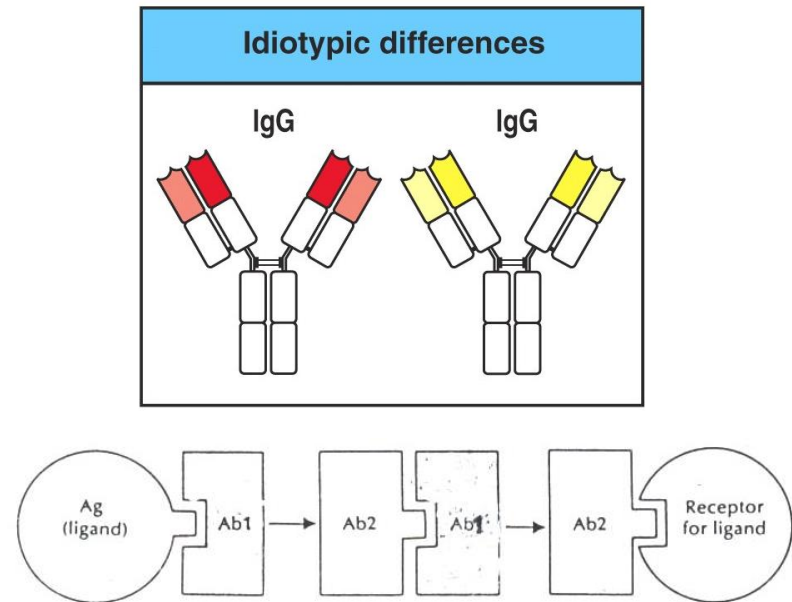
- esistono alleli multipli di geni isotipici, piccole differenze aa. Non si creano Ab in animali.
- Politrasfusi e poligravide vedono queste piccole differenze.



Markers idiotipici:

- **determinanti antigenici presenti sulle regioni variabili ed ipervariabili.**
- **Noi stessi fabbrichiamo Ab che riconoscono questi siti.**
- **Rete idiotipica.**

- Ab anti zona cornice
(inducono una modificazione conformazionale: azione inibitoria o nulla)
- Ab anti parte ipervariabile
(competono con Ag, possono inibire il legame)

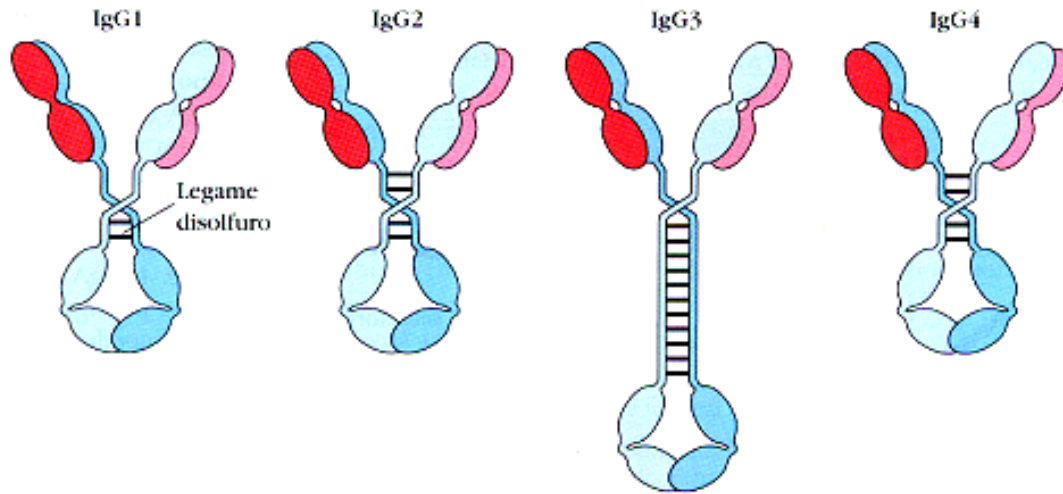


Network idiotipico

Struttura delle classi (o isotipi) anticorpali

| classe | Catena pesante | sottoclassi | Catena leggera |
|--------|----------------|--|-------------------|
| IgG | γ | $\gamma 1, \gamma 2, \gamma 3, \gamma 4$ | κ, λ |
| IgM | μ | | κ, λ |
| IgA | α | $\alpha 1, \alpha 2$ | κ, λ |
| IgE | ϵ | | κ, λ |
| IgD | δ | | κ, λ |

IgG



- PM 150.000 (7s)
- Concentrazione sierica 10 mg/ml
- 1/3 territori extravascolari
- Attivano il C
- Poco avida ma molto affini
- (rimuovono tossine e virus)

TABELLA 4-2 PROPRIETÀ E ATTIVITÀ BIOLOGICHE* DELLE CLASSI E SOTTOCLASSI DELLE IMMUNOGLOBULINE SIERICHE UMANE

| Proprietà/Attività | IgG1 | IgG2 | IgG3 | IgG4 | IgA1 | IgA2 | IgM [‡] | IgE | IgD |
|---|---------|---------|---------|---------|-----------------|-----------------|------------------|---------|---------|
| Peso molecolare† | 150.000 | 150.000 | 150.000 | 150.000 | 150.000-600.000 | 150.000-600.000 | 900.000 | 190.000 | 150.000 |
| Catena pesante | γ1 | γ2 | γ3 | γ4 | α1 | α2 | μ | ε | δ |
| Livello sierico normale (mg/ml) | 9 | 3 | 1 | 0,5 | 3,0 | 0,5 | 1,5 | 0,0003 | 0,03 |
| Emivita sierica in vivo (giorni) | 23 | 23 | 8 | 23 | 6 | 6 | 5 | 2,5 | 3 |
| Attivazione della via classica del complemento | + | +/- | ++ | - | - | - | +++ | - | - |
| Attraversamento della barriera placentare | + | +/- | + | + | - | - | - | - | - |
| Espressione sulla membrana dei linfociti B maturi | - | - | - | - | - | - | + | - | + |
| Legame ai recettori per l'Fc dei fagociti | ++ | +/- | ++ | + | - | - | ? | - | - |
| Trasporto mucosale | - | - | - | - | ++ | ++ | + | - | - |
| Degranulazione delle mastcellule | - | - | - | - | - | - | - | + | - |

* I livelli di attività sono indicati come segue: ++ = elevato; + = moderato; +/- = minimo; - = nessuno; ? = incerto.

† Le IgG, IgE e IgD sono sempre in forma monomerica; le IgA possono esistere come monomeri, dimeri o tetrameri.

Le IgM legate alla membrana sono monomeri, ma quelle secrete sono pentameri.

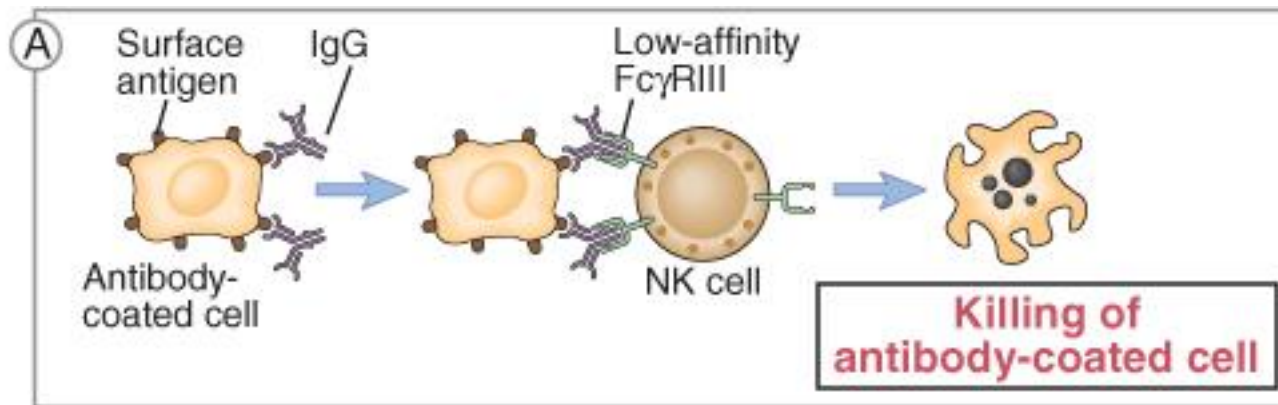
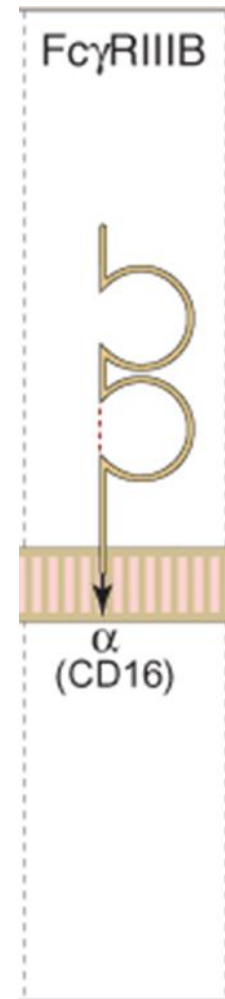
‡ Le IgM sono il primo isotipo prodotto dal neonato e durante la risposta immunitaria primaria.

Recettori Fc sui fagociti

| FcR | Affinità per l'immunoglobulina | Distribuzione cellulare | Funzione |
|----------------|--|--|---|
| FcγRI (CD64) | Elevata ($K_d \sim 10^{-9}$ M); lega IgG1 ed IgG3, può legare IgG monomeriche | Macrofagi, neutrofili; anche eosinofili | Fagocitosi; attivazione dei fagociti |
| FcγRIIA (CD32) | Bassa ($K_d \sim 0,6-2,5 \times 10^{-6}$ M) | Macrofagi, neutrofili; eosinofili, piastrine | Fagocitosi; attivazione cellulare (poco efficiente) |
| FcγRIIB (CD16) | Bassa ($K_d \sim 0,6-2,5 \times 10^{-6}$ M); Proteina GPI-legata | Neutrofili, altre cellule | Fagocitosi (poco efficiente) |

Recettore Fc su NK

| | | | |
|--------------------------|--|------------|--|
| Fc γ RIIIA (CD16) | Bassa ($K_d \sim 5 \times 10^{-5}$ M) | Cellule NK | Citotossicit  cellulare anticorpo-dipendente |
|--------------------------|--|------------|--|

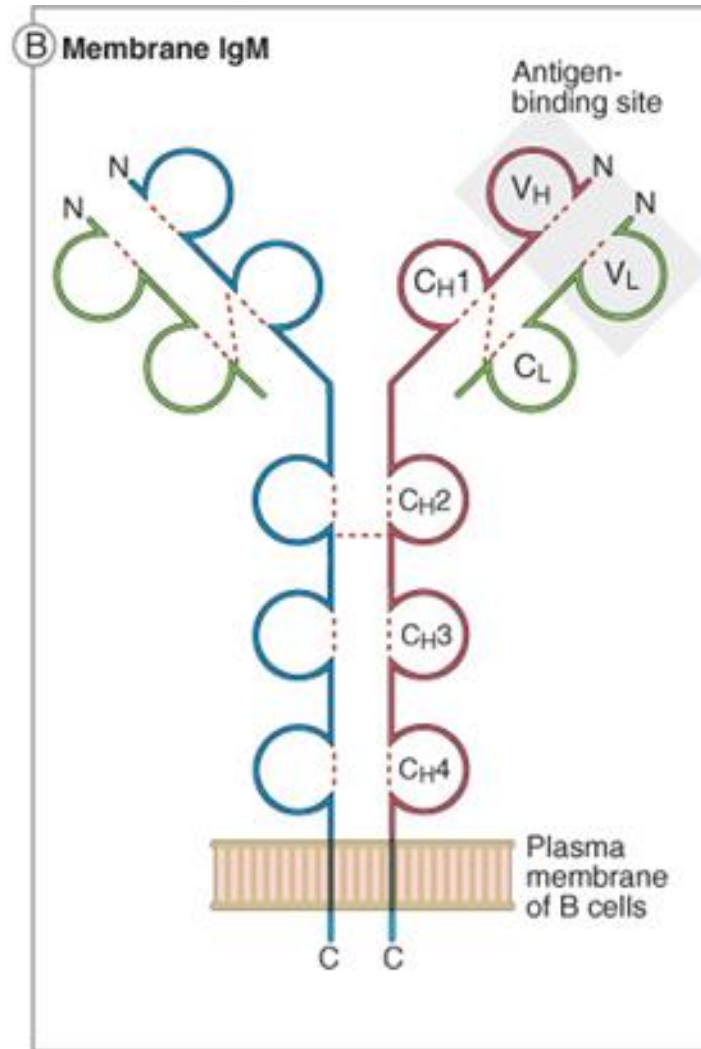


Recettore Fc sui Linfociti B

- Media funzioni regolatorie

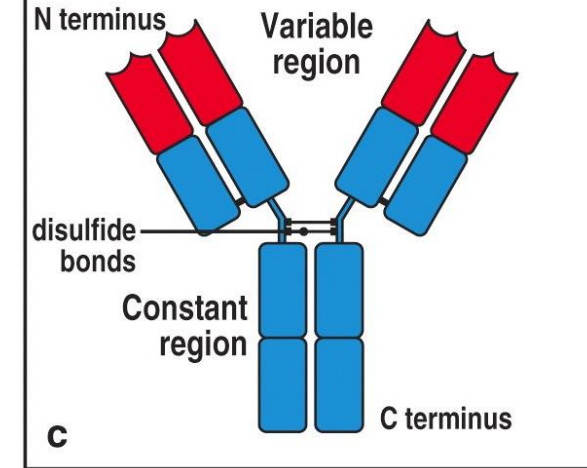


IgM



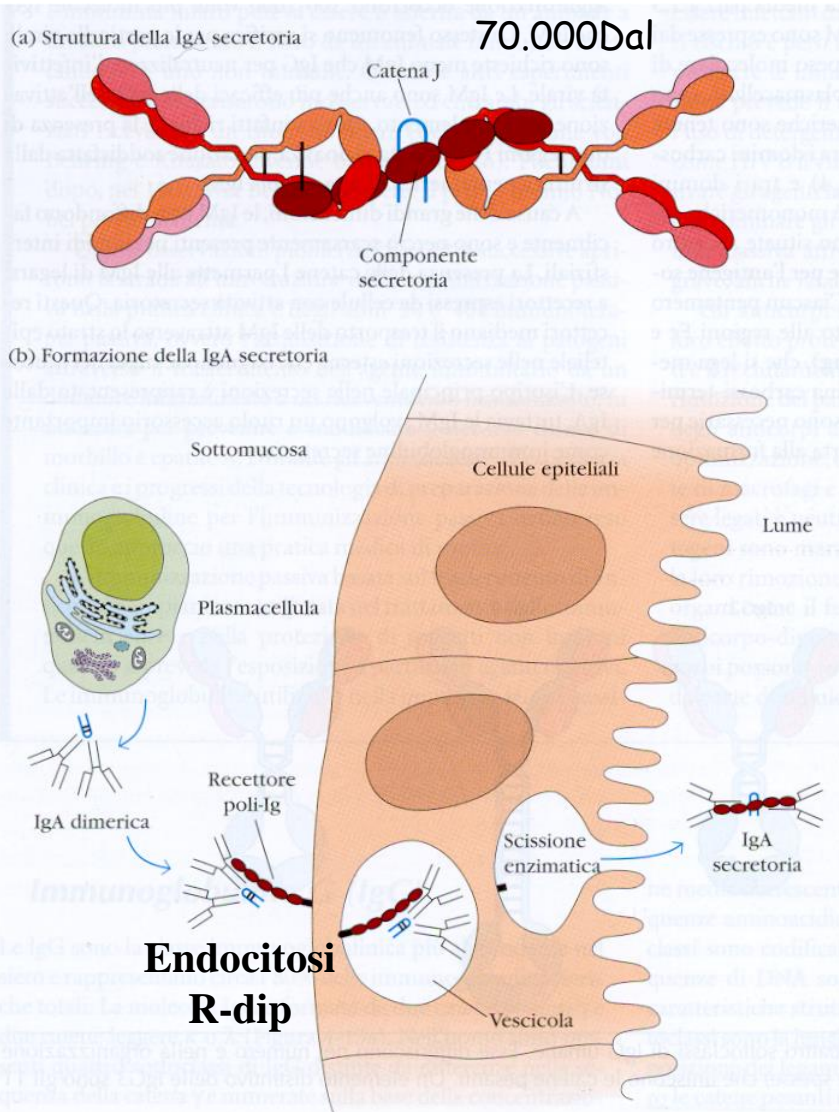
180.000 Da

IgA



- Concentrazione sierica: **3mg/ml**
- Le IgA monomeriche hanno un peso di 160.000-170.000 Dal perché sono molto glicosilate (8% zuccheri)
- 2 sottoclassi: IgA₁ e IgA₂.
 - IgA₂ circa 20aa in meno nella zona cerniera di IgA1
 - Protette nei confronti di enzimi proteolitici prodotti da diversi batteri (Streptococcus mutans, Neisseria meningitidis, Haemophilus influenzae)

IgA secretoria

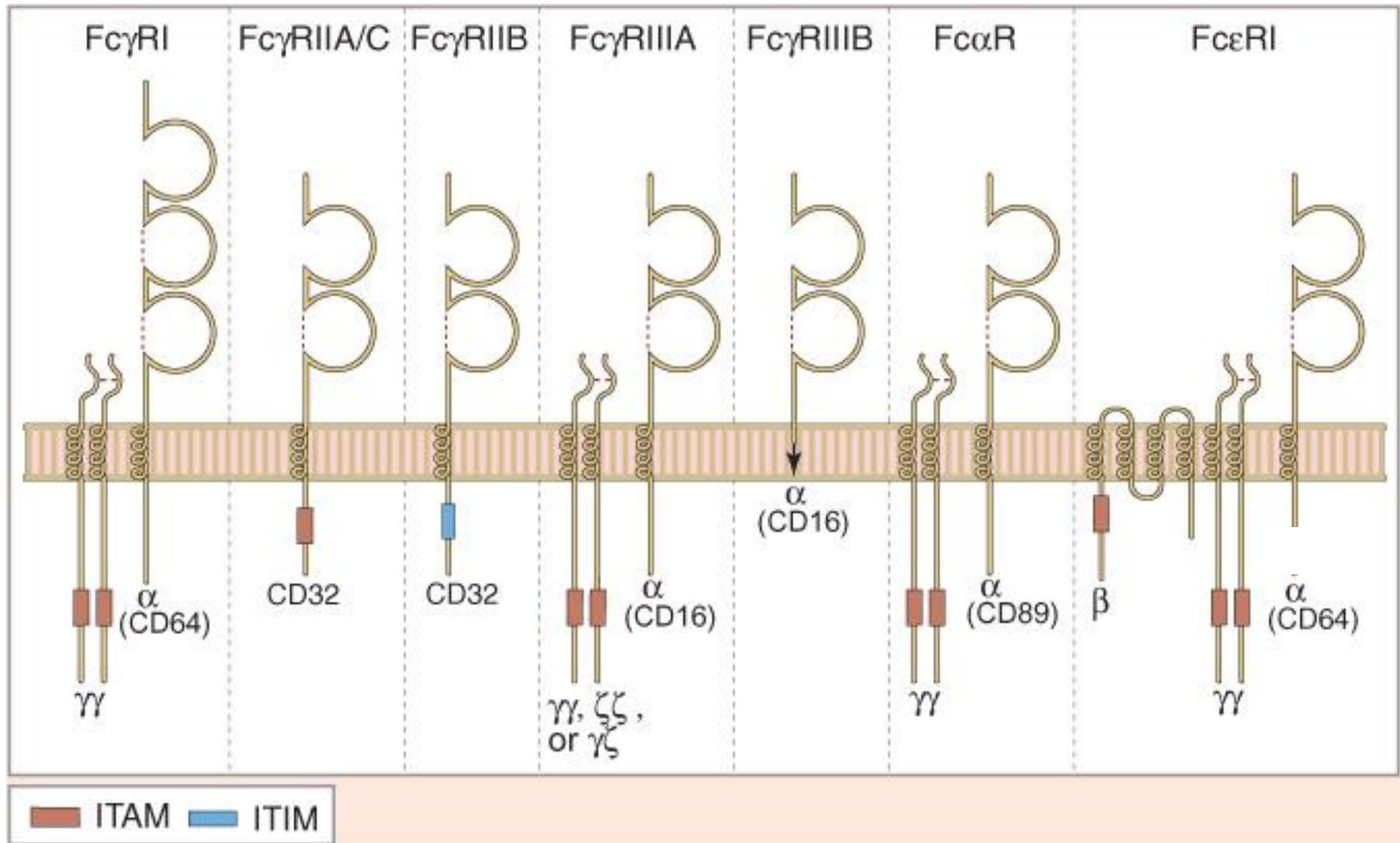


latte, saliva, lacrime, muco

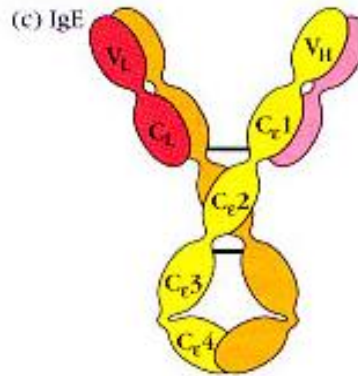
(dimeri 400.000 Dal o tetrameri 600.000 Dal)

Deficienze di IgA sono molto frequenti e sono state associate ad allergia ed autoimmunità

Recettori Fc dei leucociti



IgE



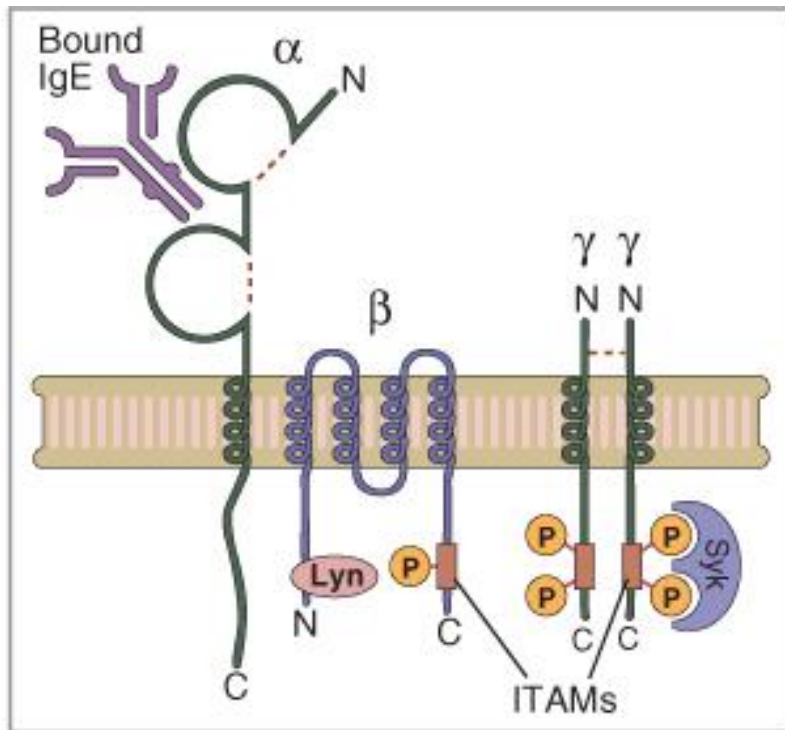
1u internazionale = 2,4 ng

80-100IU/ml

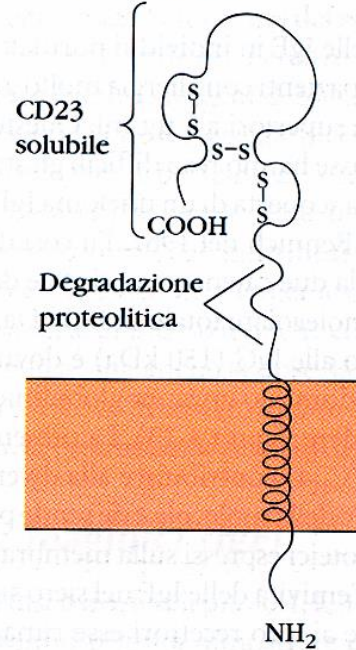
Difesa contro i parassiti

Allergie

Recettori Fc per le IgE

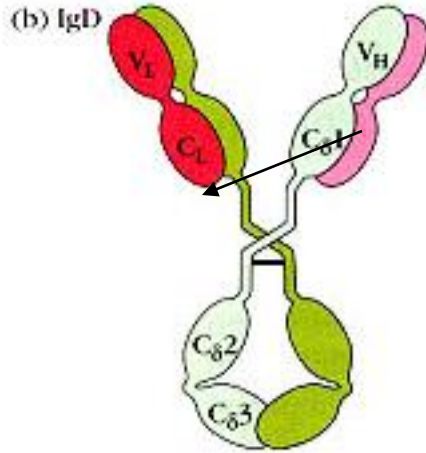


(b) FcεRII (CD23):
Recettore per le IgE a
bassa affinità



| | | | |
|------------------|---|--|---|
| FcεRI | Elevata ($K_d \sim 10^{-10}$ M); lega IgE monomeriche | Mastociti, basofili, eosinofili | Attivazione cellulare (degranulazione) |
| FcεRII (CD23) | Bassa ($K_d \sim 10^{-7}$ M) | Linfociti B, eosinofili, cellule di Langerhans | Sconosciuta |

IgD



Zona
cerniera

30 μ g/ml

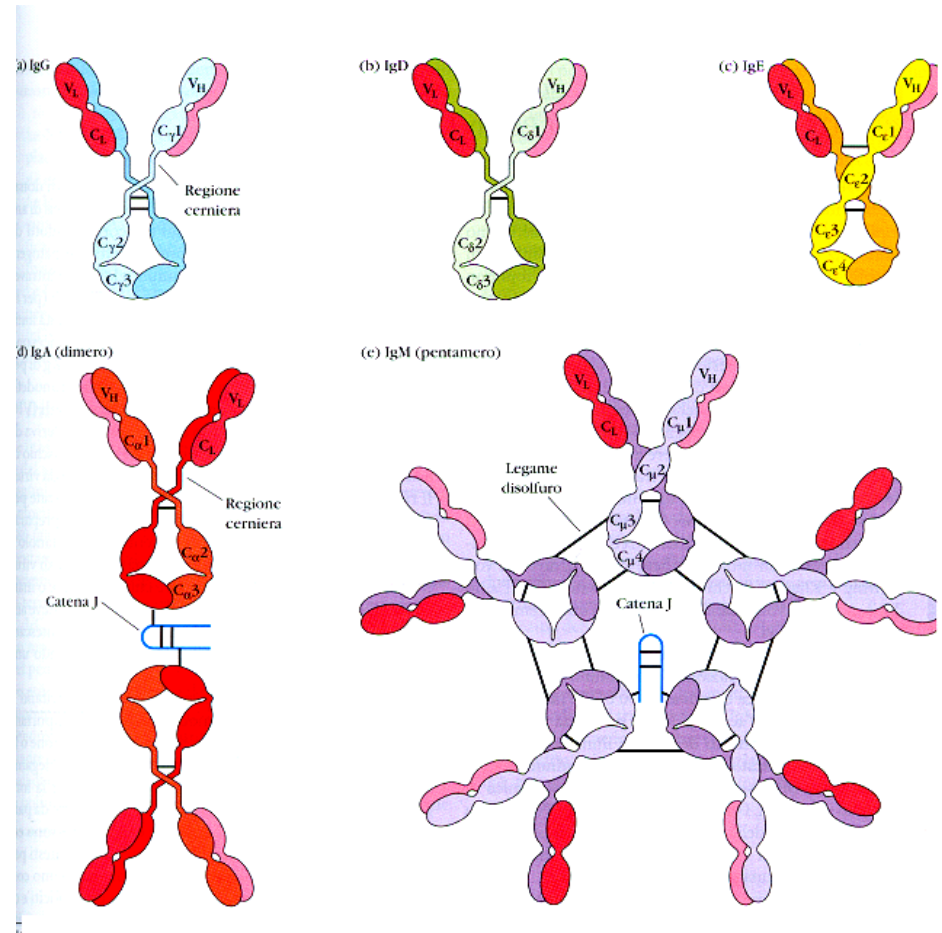
Nessuna funzione effettrice
nota

IgD on human basophils
Upregulates gene sets
Implicated in TH2 cell mediated
immunity, chemotaxis,
Inflammation and signalling

Nature Reviews Immunology |
<https://doi.org/10.1038/s41577-018-0080-9>

Regione cerniera

| IgA, IgD, IgG | IgE, IgM |
|------------------|------------------|
| C_{H1}/ C_{H1} | C_{H1}/ C_{H1} |
| Regione cerniera | C_{H2}/ C_{H2} |
| C_{H2}/ C_{H2} | C_{H3}/ C_{H3} |
| C_{H3}/ C_{H3} | C_{H4}/ C_{H4} |



Funzioni effettrici degli anticorpi

