

Modulo 4

Funzione delle proteine

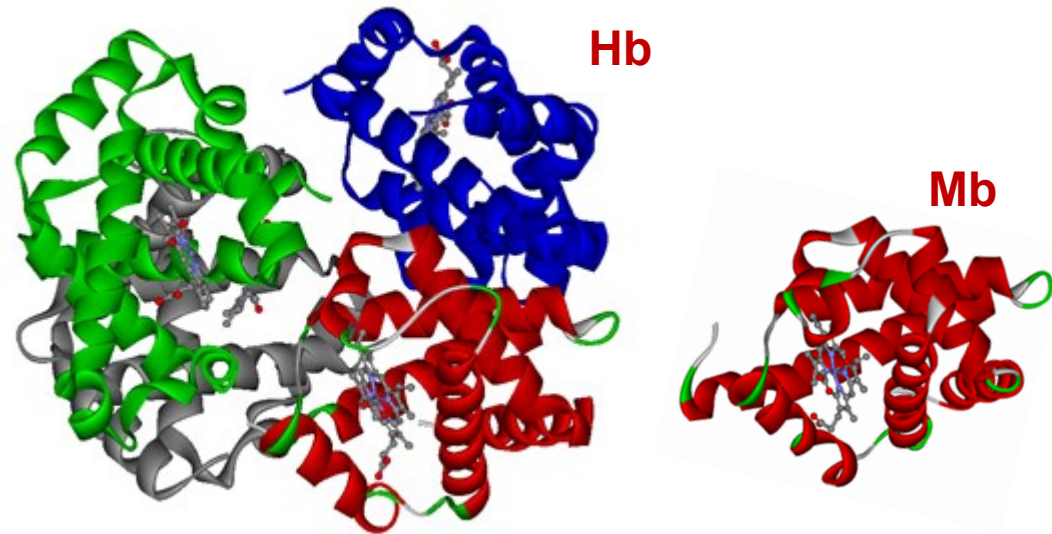


*Struttura dal titolo Heart of Steel,
basata sulla struttura dell'emoglobina
J. Voss-Andrea 2005*

2022-23

MIOGLOBINA ed EMOGLOBINA: proteine in azione

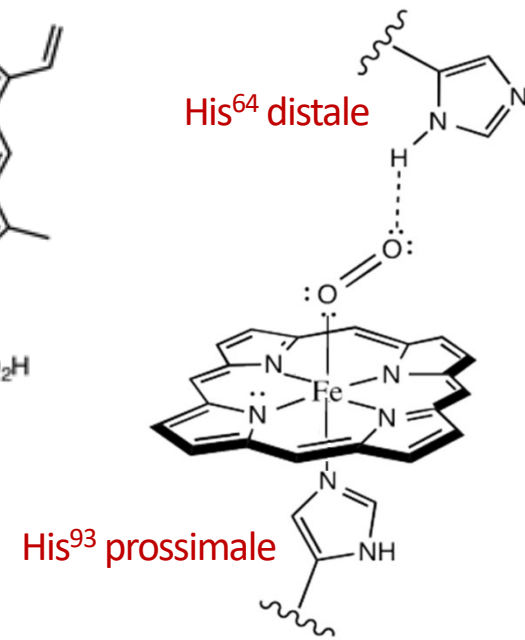
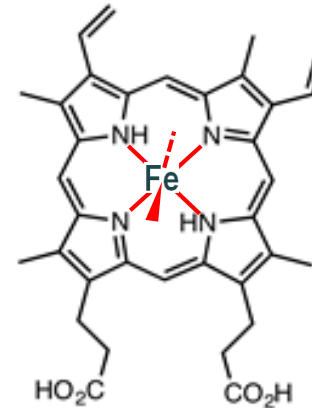
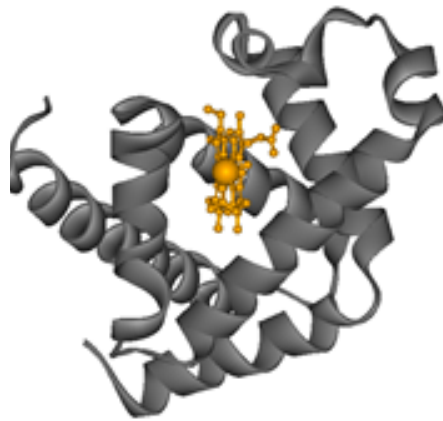
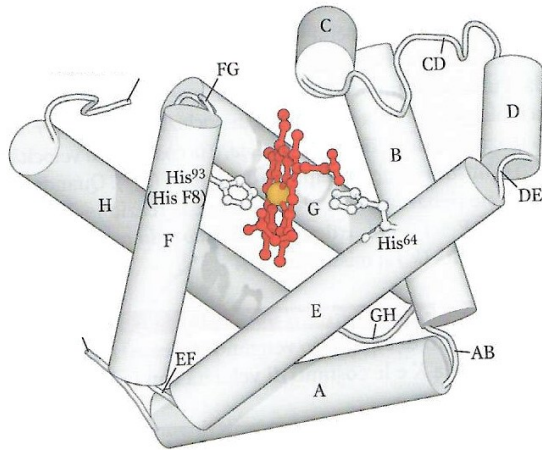
- ▶ La mioglobina (Mb) e l'emoglobina (Hb) sono fra le proteine meglio caratterizzate
 - a livello **strutturale e funzionale** (prime strutture cristallografiche, **fine anni '50**)
 - sono state cruciali nell'**evoluzione della vita aerobica**
 - servono per **legare e poi rilasciare l'ossigeno molecolare (O_2)**
 - nei mammiferi **Hb** lo **trasporta** dai polmoni ai tessuti negli **eritrociti (globuli rossi)**
 - **Mb** lo **immagazzina** nel muscolo
 - **Hb** è un **etero-tetramero** ($2\alpha\ 2\beta$)
 - **Mb** è un **monomero**
 - **O_2** ha una **bassa solubilità** in acqua ($\sim 3\text{ml/L}$ nel sangue)
 - l'uomo a riposo ne richiede ~ 250 ml di O_2/min .
 - Hb e Mb si sono evolute per legare O_2 e trasportarlo in sufficiente quantità ai tessuti



Mioglobina: caratteristiche strutturali

► La mioglobina è la proteina che lega l'ossigeno nei muscoli

- **muscolo cardiaco e striato** dei vertebrati (abbondante in mammiferi marini)
- **struttura compatta, globulare**, con singola catena di 153AA (16.7 kDa)
- **composta da 8 α -eliche** (indicate da A a H) connesse da loop
- il **gruppo prostetico «eme»** (protoporfirina IX) lega in una infossatura della proteina

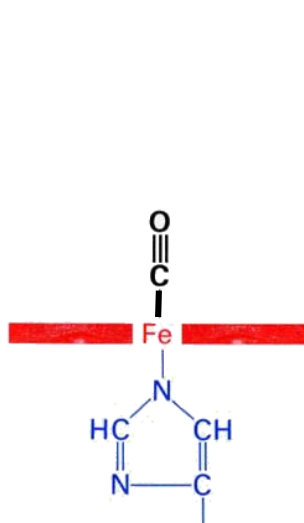
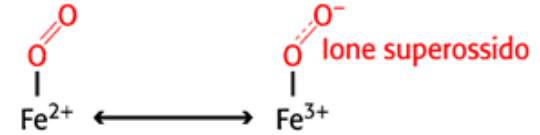


- lo ione **Fe²⁺** forma **6 legami di coordinazione**; 4 con l'eme e il 5° con His⁹³ (**prossimale**, elica F), ma è troppo distante per legare His⁶⁴ sull'altro lato (**distale**, elica E) e forma il 6° con O₂
- **O₂** non si lega in modo assiale, e forma un **legame-H con His⁶⁴**, che stabilizza il legame e protegge dall'ossidazione ed inattivazione dell'eme

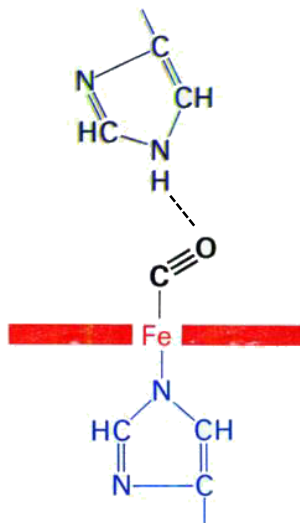
Mioglobina: protezione dalla ossidazione e inattivazione

► La struttura proteica della Mb stabilizza il complesso con l'ossigeno in modo da rilasciare O_2 ed evitando l'ossidazione di Fe^{2+} a Fe^{3+}

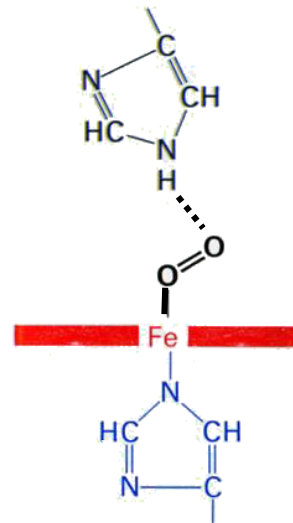
- il legame di O_2 a Fe è dato da due **strutture di risonanza**
- Il **legame-H con His64 stabilizza il legame di O_2** ($\times 500$), impedisce il rilascio di superossido (tossico) e l'ossidazione a Fe^{3+} (ferrimioglobina)
- ferriMB non lega O_2 , ma lega H_2O (metamioglobina) che è inattiva. Il sito di legame è **protetto dal solvente**
- per ragioni steriche, **riduce l'affinità di CO** per Fe^{2+} dell'eme (molto superiore a O_2)



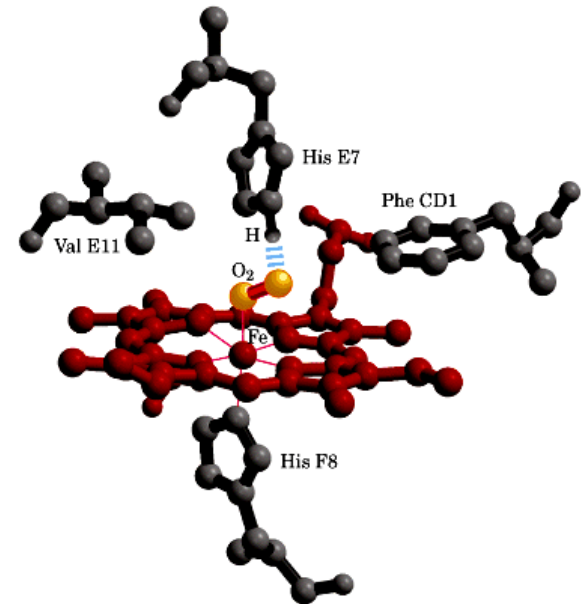
($\times 20.000$)



($\times \sim 200$)



1



Mioglobina: esempio di legame reversibile con un ligando

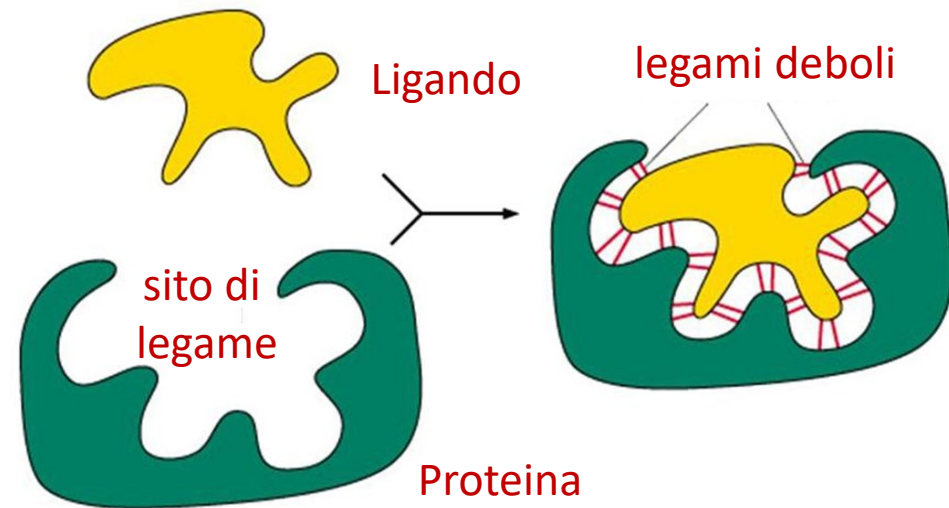
► La funzione di molte proteine globulari è mediata dall'interazione reversibile con altre molecole dette *ligandi* (possono essere piccole molecole o macromolecole).

- il sito di contatto tra proteina (P) e ligando (L) è il **sito di legame**
- spesso si ha una **complementarietà di forma/dimensione e natura** (carica, carattere idrofilico o idrofobico); questo rende il **legame specifico**.

- Il legame è definito dall'**equilibrio chimico**



dove K_D è la *costante di dissociazione*



- la forza di legame di una proteina per il suo ligando è definita **affinità** (K_A) $\propto 1/K_D$
- più basso è il valore di K_D , più saldo il legame, maggiore è l'affinità di L per P

$K_D \downarrow$ **affinità $\uparrow$**

Mioglobina: curva di saturazione

► Il legame reversibile di O_2 a Mb è descritto dall'equilibrio $Mb + O_2 \rightleftharpoons MbO_2$

la frazione di Mb legata ad O_2 varia con $[O_2]$

$$K_d = \frac{[Mb][O_2]}{[MbO_2]}$$

Y = la saturazione frazionale

$$Y = \frac{\text{siti di legame occupati}}{\text{siti di legame totali}}$$

$$Y = \frac{[MbO_2]}{[MbO_2] + [Mb]}$$

$$0 < Y < 1 \quad (Y_{\max})$$

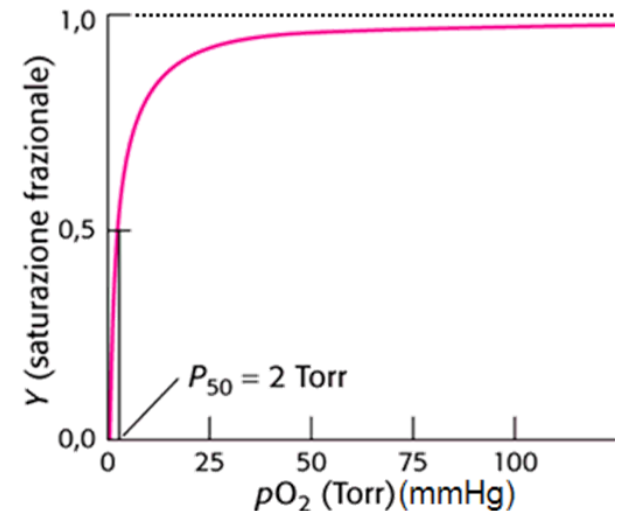
- combinando le due equazioni, si ricava:

$$Y = \frac{[O_2]}{[O_2] + K_d}$$

ma $[O_2]$ trattandosi di un gas viene espressa come pO_2 (*pressione parziale di O_2*)

$$Y = \frac{pO_2}{pO_2 + K_d}$$

questa è una equazione per una **iperbola regolare**

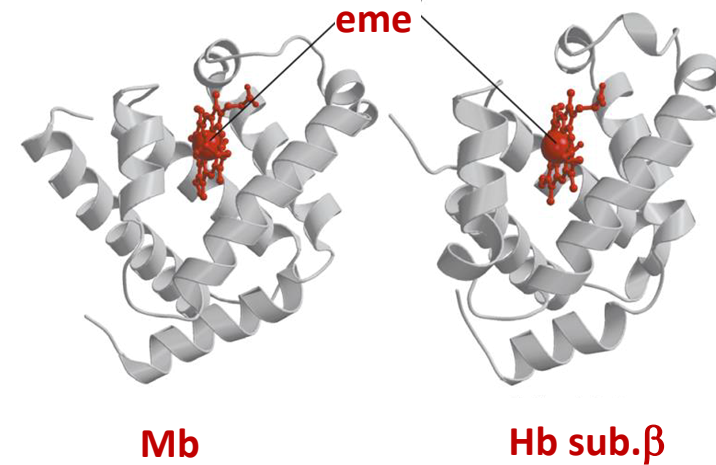
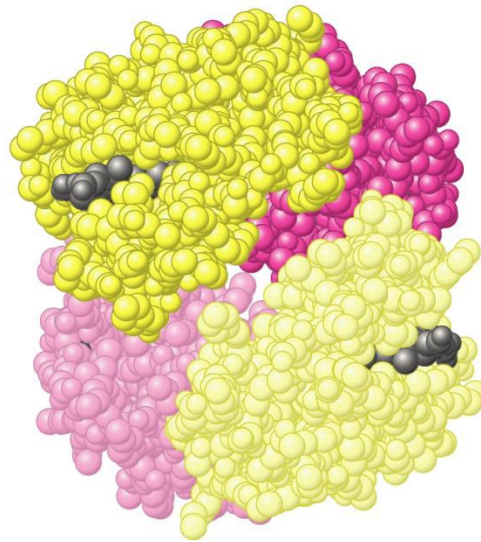
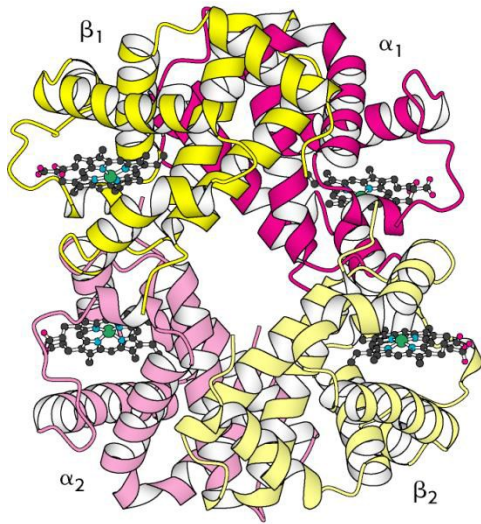


- ad un certo valore di pO_2 $Y \rightarrow \frac{1}{2}Y_{\max}$, ovvero il 50% dei siti di legame è occupato.
- questo valore di pO_2 è il P_{50} che per la mioglobina + ~ 2 Torr
- il pO_2 fisiologico (capillari) è ~20 Torr, quindi $Y \rightarrow 0.98$, è **~93% satura nel muscolo**

Emoglobina: caratteristiche strutturali

► Le subunità α e β nell'Hb sono strutturalmente simili a Mb

- quasi tutto l'**ossigeno** presente nei vertebrati è legato e **trasportato da Hb**
- è presente negli **eritrociti** (globuli rossi) e ne costituisce $> 30\%$ del peso
- è composta da **4 catene** (~ 65 kDa) con 2 subunità α e 2 β risp. di 141 e 146 AA



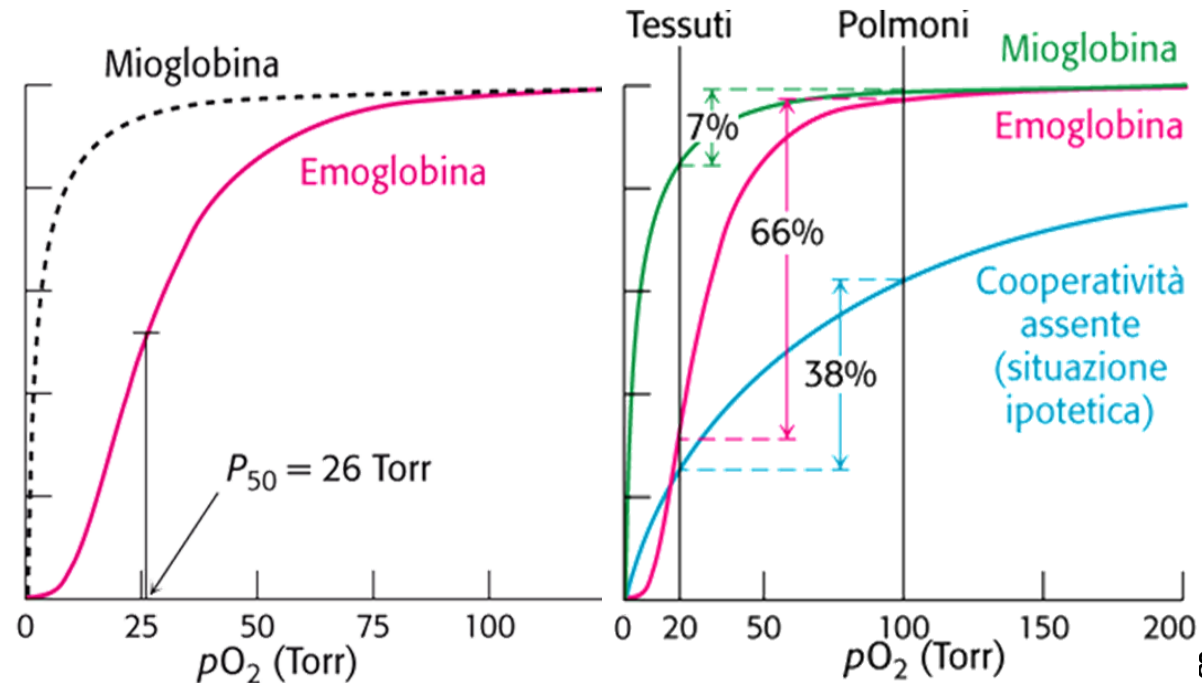
- le subunità sono connesse da multipli legami non-covalenti, che coinvolgono le diverse subunità con gruppi eme distanziati di $\sim 30\text{-}40$ Å
- hanno $\sim$ il 25% di residui identici nelle loro sequenze e strutture 3D molto simili
- residui cruciali per il legame con O_2 e per la sua regolazione sono tutti conservati.

Emoglobina: la curva di saturazione è diversa dalla mioglobina

- La Hb lega $4O_2$; è molto più complessa e sensibile a fattori esterni della Mb
- la curva di legame di O_2 a Hb ha **forma sigmoide**, quella a Mb è una **iperbole**
- ciò indica un **effetto cooperativo**: a basse pO_2 l'affinità è bassa, ad elevate pO_2 l'affinità aumenta, e questo avviene in uno stretto intervallo di pO_2
- questo suggerisce che il legame di O_2 ai 4 siti non è tra loro indipendente
- P_{50} (pO_2 alla quale $Y = 0,5$, ovvero 50% saturazione) ~ 26 Torr ; Mb ha maggiore affinità

► La cooperatività ha un significato fisiologico

- Hb è 98% satura nei polmoni, 32% nei tessuti, scarica il 66%
- Senza cooperatività scarichebbe solo il 38% dell' O_2
- O_2 scaricato è captato da Mb



Emoglobina: meccanismo allosterico della cooperatività

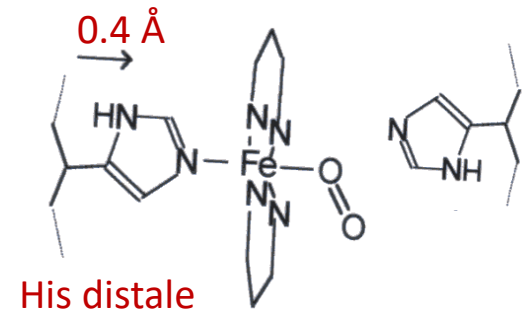
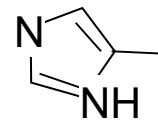
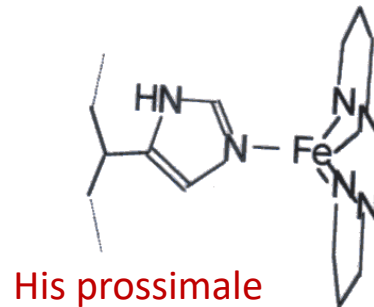
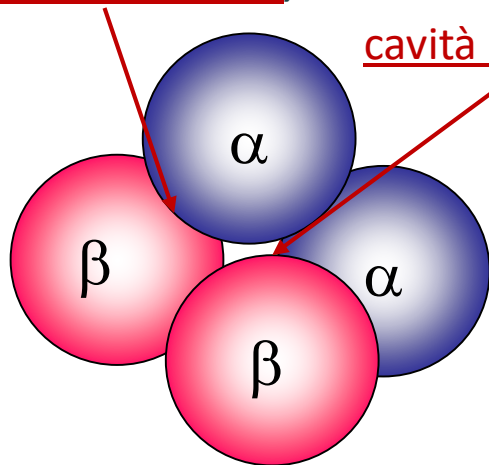
► Nell'Hb, due conformazioni alternative sono in equilibrio tra loro

conformazione (stato) Rilassata **R** $\rightleftharpoons$ **T** conformazione (stato) Tesa

- lo stato **T** è favorito nella deossiHb
- lo stato **R** è favorito nella ossiHb
- lo stato **T** ha minore affinità per O_2 ma il legame di O_2 ad una subunità α di deossiHb (le sole accessibili a O_2 allo stato T) induce la transizione allo stato R
- il legame di O_2 con Fe ne riduce il diametro e lo ione entra nel piano dell'eme; questo sposta la His prossimale e il movimento si propaga lungo la catena, amplificandosi
- la variazione conformazionale si trasmette alle regioni di scorrimento con le altre subunità, altera i contatti e si trasmette alle altre subunità che passano allo stato R - è una forma di **allosterismo** (*allos* = altro *steros* = struttura)

zone di contatto, ricche in legami-H e ionici (regioni di scorrimento con contatti slittanti).

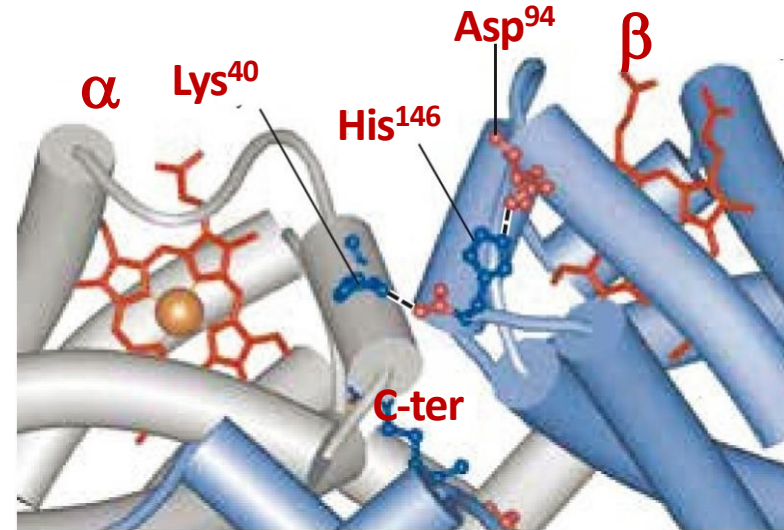
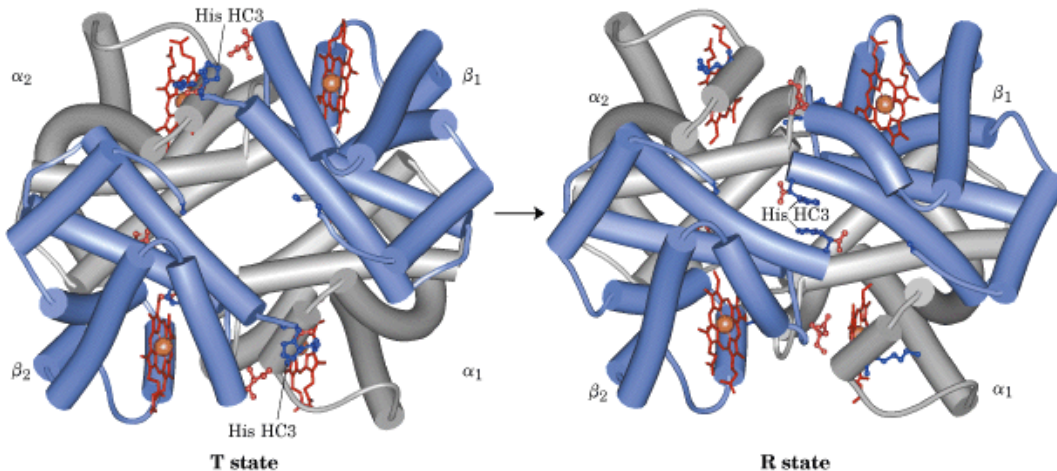
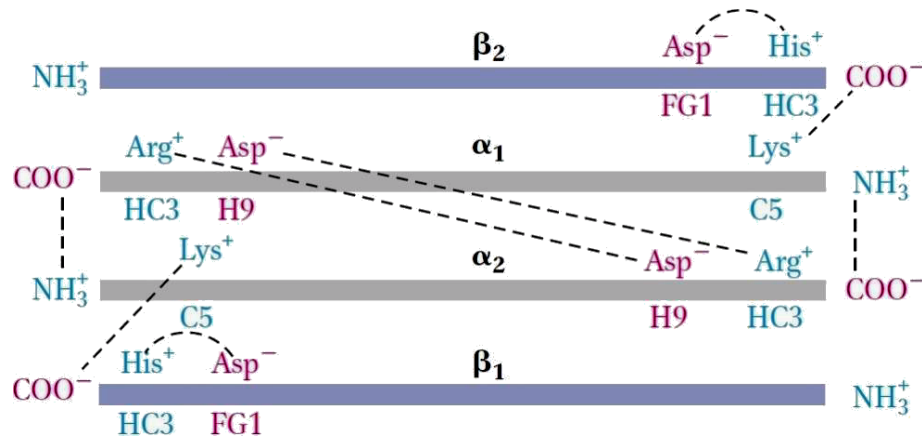
cavità centrale: N- e C terminali delle catene, **contatti elettrostatici**



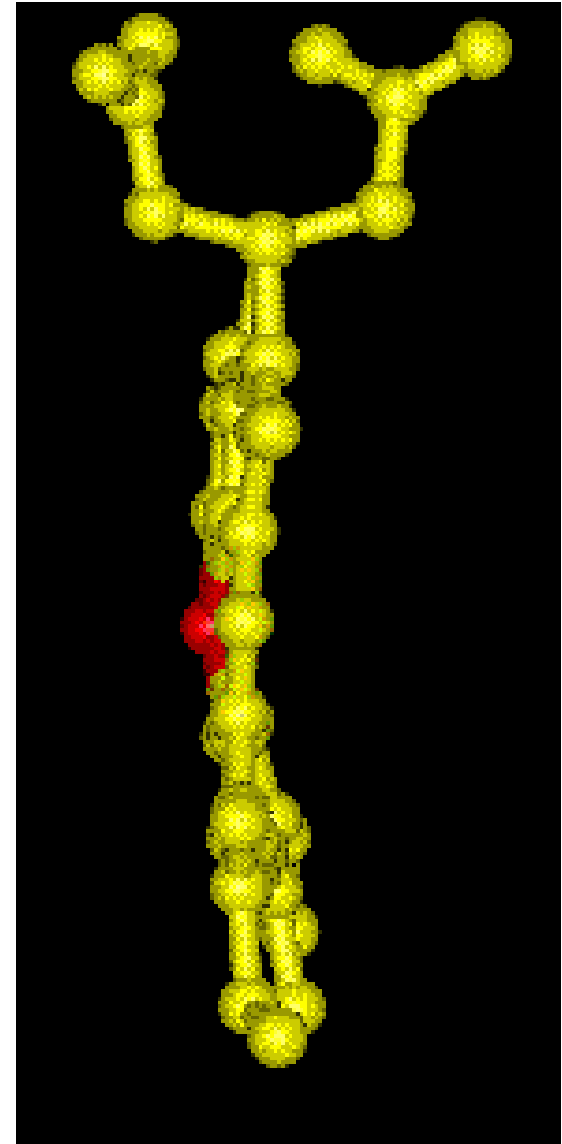
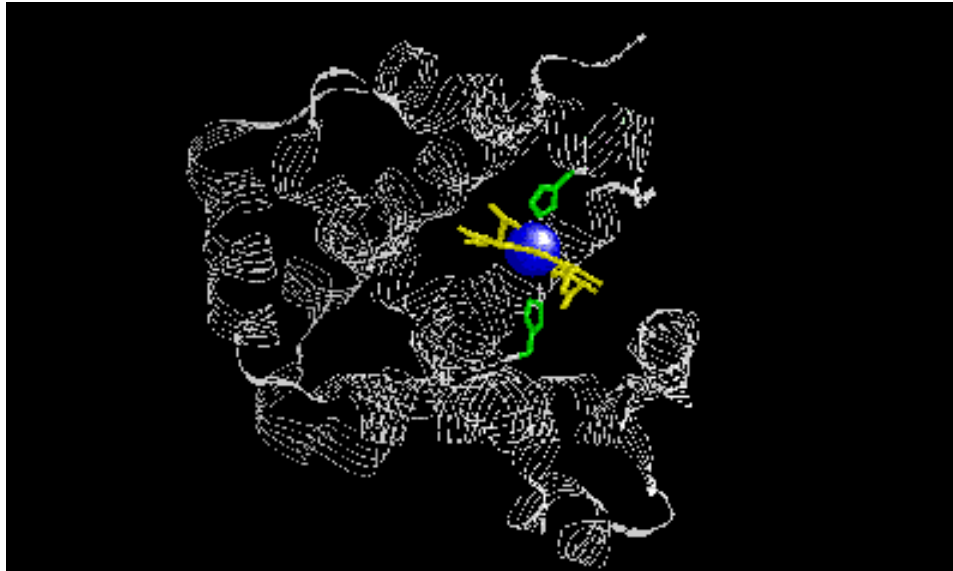
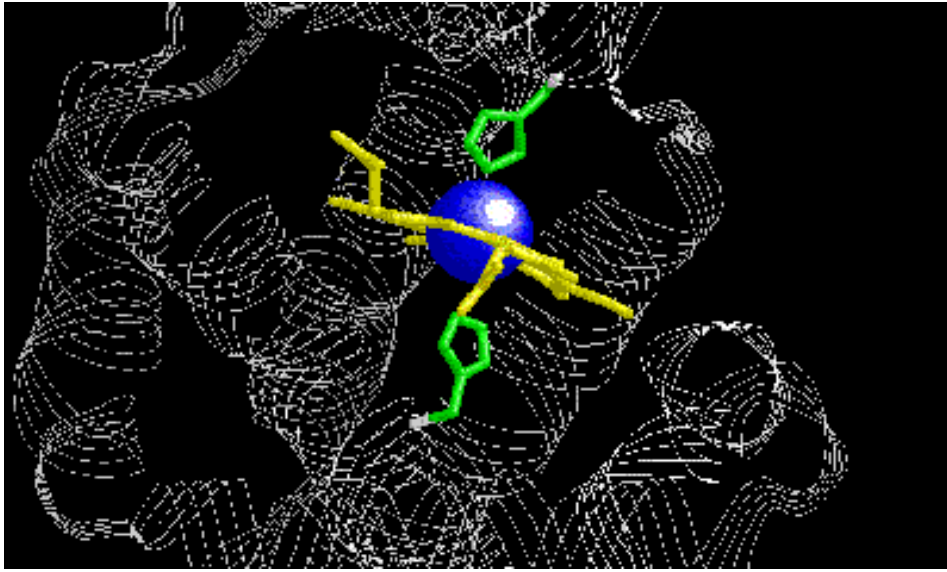
Effetto allosterico del legame dell'ossigeno nell'emoglobina

► La conformazione T è stabilizzata da legami ionici (ponti salini) assenti nella forma R

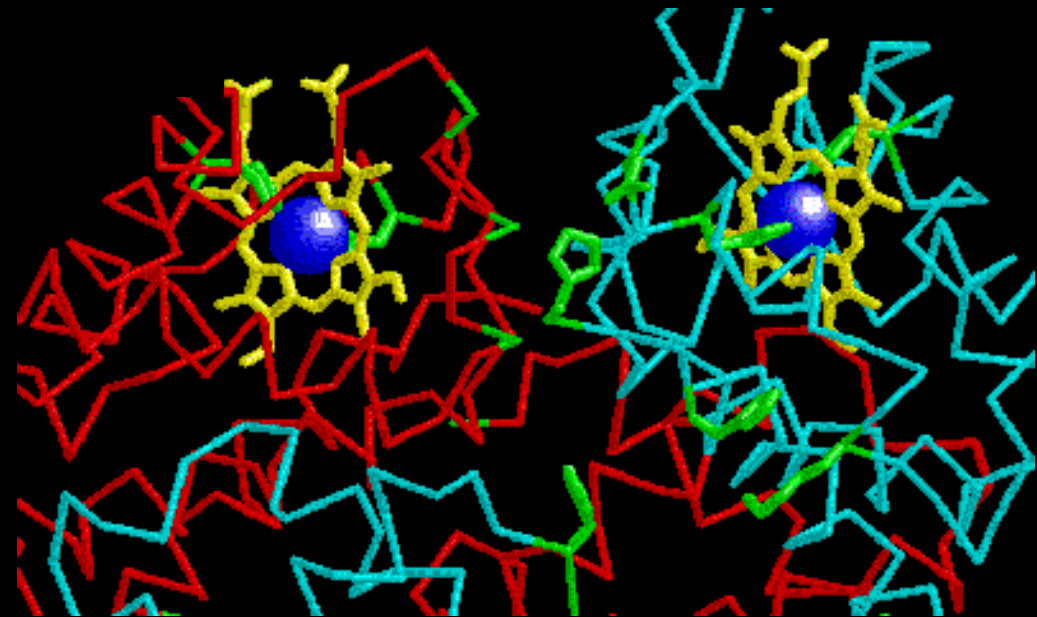
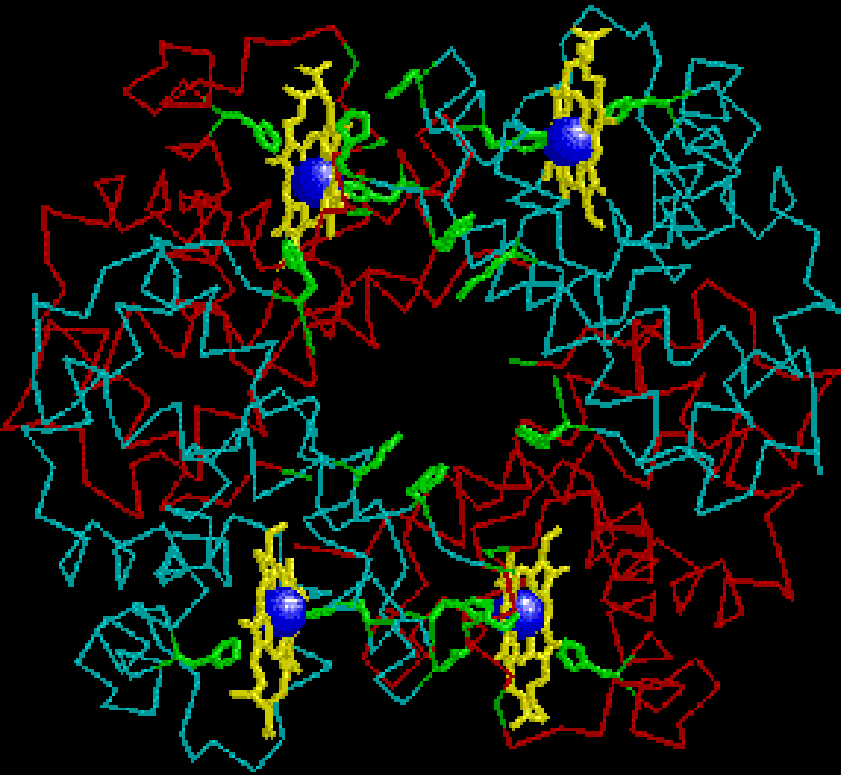
- per esempio (C-ter β)COO⁻ con Lys⁴⁰(C α); His¹⁴⁶(β) con Asp⁹⁴(β)
- Il legame con O₂ ad una delle subunità innesca la variazione conformazionale che provoca la rottura dei ponti salini che favoriscono la transizione T $\rightarrow$ R



Effetto allosterico del legame dell'ossigeno nell'emoglobina



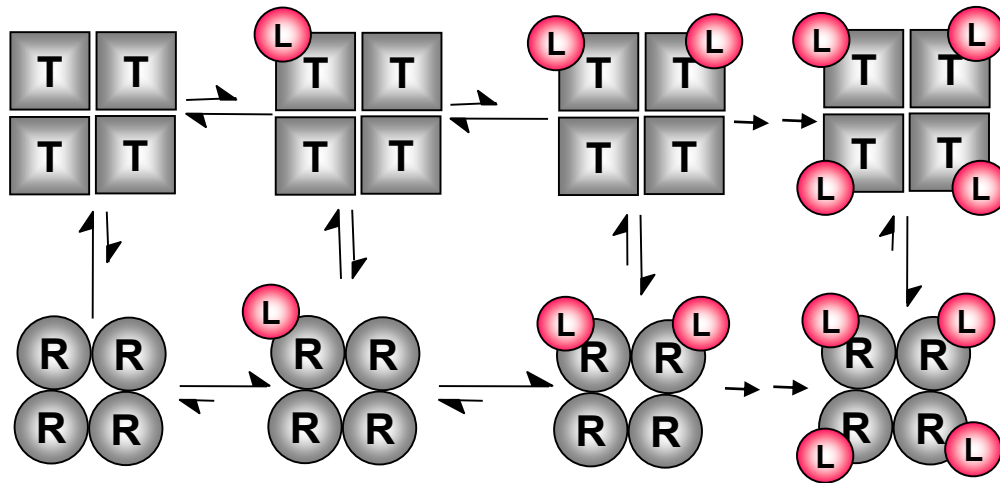
Effetto allosterico del legame dell'ossigeno nell'emoglobina



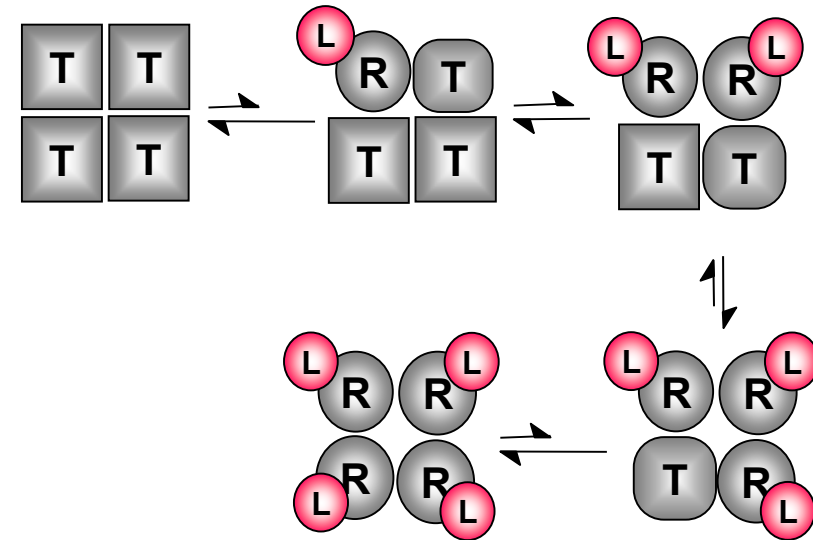
Modelli per l'effetto allosterico

► Sono stati proposti due modelli per il comportamento di proteine allosteriche

- nel **modello concertato** (MWC, simmetrico, *tutto o nulla*) tutte le subunità hanno la stessa conformazione, T o R, e l'equilibrio si sposta man mano che si lega il ligando (L)
- Nel **modello sequenziale** (K) il legame di un ligando aumenta l'affinità di legame di un'altra subunità, senza indurre la conversione completa della molecola.



modello concertato



modello sequenziale

- Questi sono **modelli «limite»**, il comportamento reale è una via di mezzo
- **Hb si conforma** più al **modello concertato**, che spiega la curva sigmoide

Diversi tipi di allosterismo: regolatori dell'emoglobina

▶ allosterismo *omotropico*

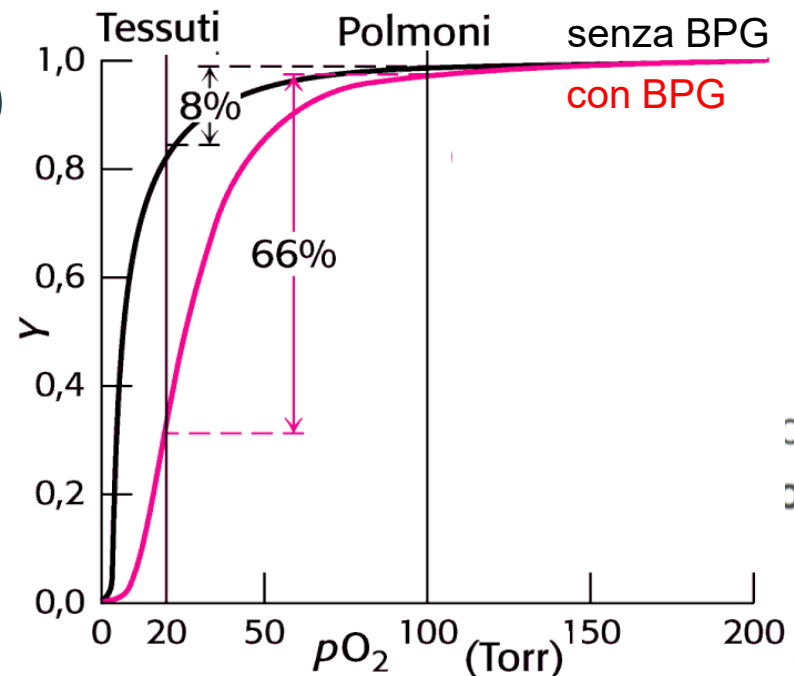
- Il legame di un ligando (substrato) al **sito attivo** di una proteina (enzima) aumenta l'affinità per i siti attivi in altre subunità (es. legame dell'O₂ nell'Hb)

▶ allosterismo *eterotropico*

- Il legame di una molecola regolatoria (diversa dal ligando/substrato) che lega ad un **sito regolatorio** di una proteina (enzima) **diverso dal sito attivo**, modula (aumenta o diminuisce) l'affinità per il sito attivo

▶ L'affinità per l'ossigeno nella Hb viene modulata da diversi regolatori eterotropici

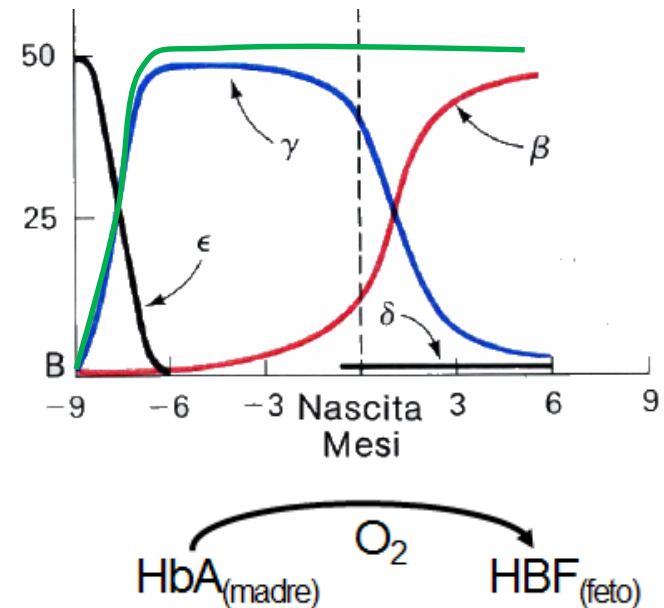
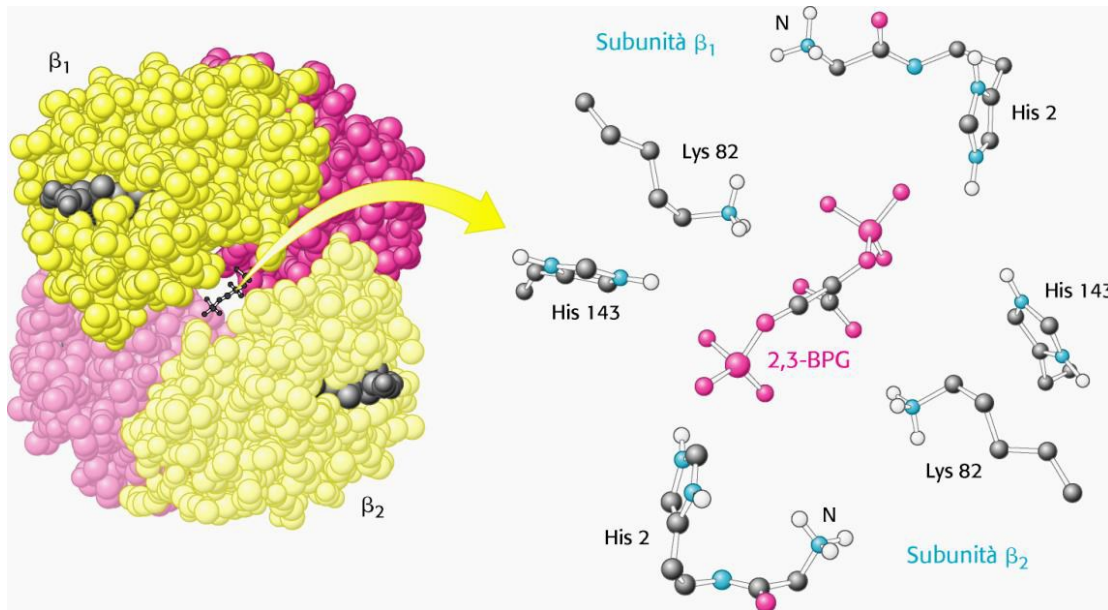
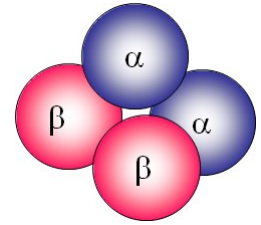
- Il **2,3-bisfosfoglicerato (2,3-BPG)** è presente nei globuli rossi a concentrazione pari a Hb (~2 mM)
- **stabilizza la forma T** dell'emoglobina
- **favorisce il rilascio di O₂** a livello tissutale
- senza regolatori solo 8% di O₂ e scaricato nei tessuti, con 2,3-BPG il 66%
- [2,3-BPG] aumenta rapidamente per compensare l'altitudine (**acclimatazione**) o altre condizioni di ipossia



Meccanismo d'azione del 2,3-BPG

► 2,3-BPG lega nella cavità centrale del tetramero

- I terminali delle subunità β sono ricche di residui cationici
- sono esposti nella cavità della forma T formando una tasca cationica
- una sola molecola di 2,3-BPG forma legami ionici che stabilizzano la forma T nei tessuti, promuovendo la liberazione dell' O_2
- nei polmoni il legame di O_2 favorisce la forma R, che perde affinità per 2,3-BPG



- **Hb fetale** ($HbF \alpha_2\gamma_2$) ha maggior affinità verso l' O_2 rispetto a quella dell'adulto ($HbA \alpha_2\beta_2$)
- presenta due cariche positive in meno nella tasca centrale per interazione con il 2,3 BPG

Diversi tipi di allosterismo: effetto di CO₂ e del pH

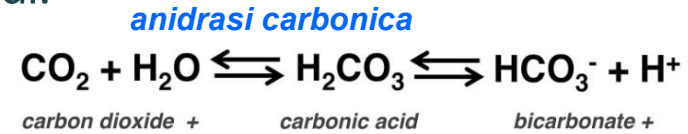
► Anche H⁺ e CO₂ sono effettori allosterici che regolano l'affinità per l'O₂

- CO₂ agisce come regolatore allosterico di Hb in due modi:

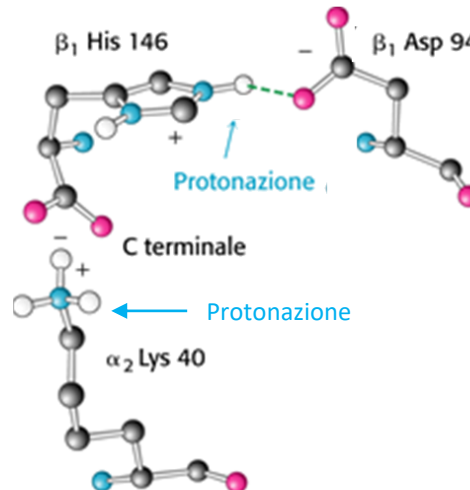
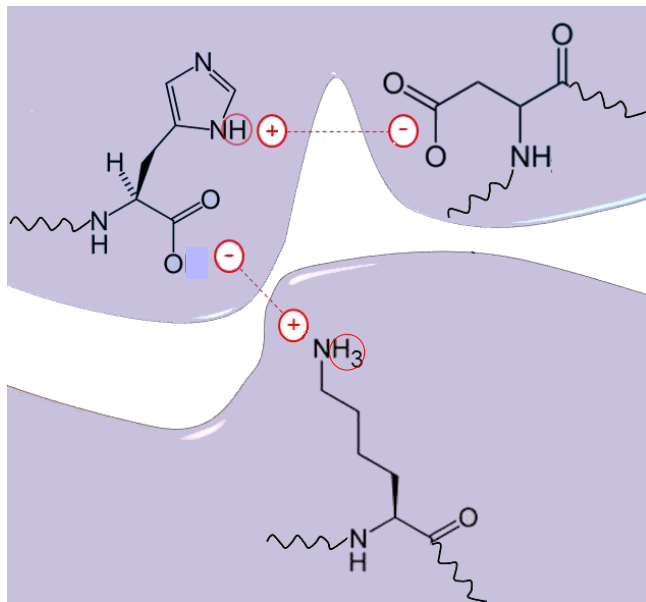
1) **riduce il pH nei tessuti (Effetto Bohr):**

2) **forma carbammato** con gli N-terminali

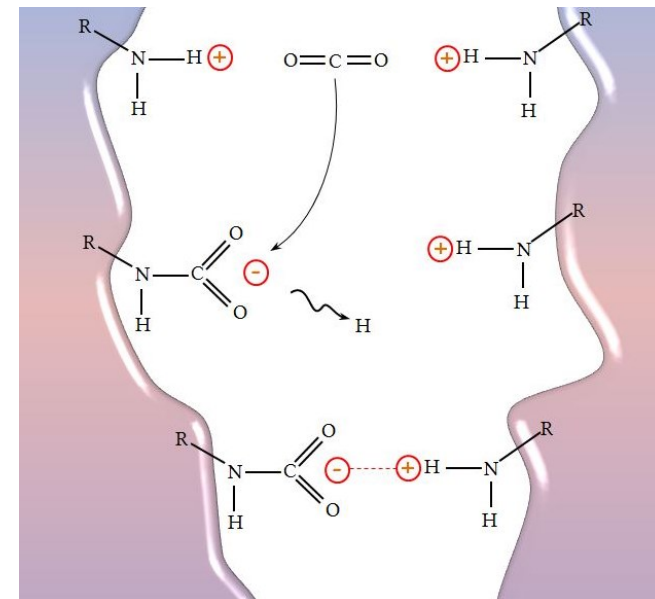
delle catene α e β nella cavità interstiziale.



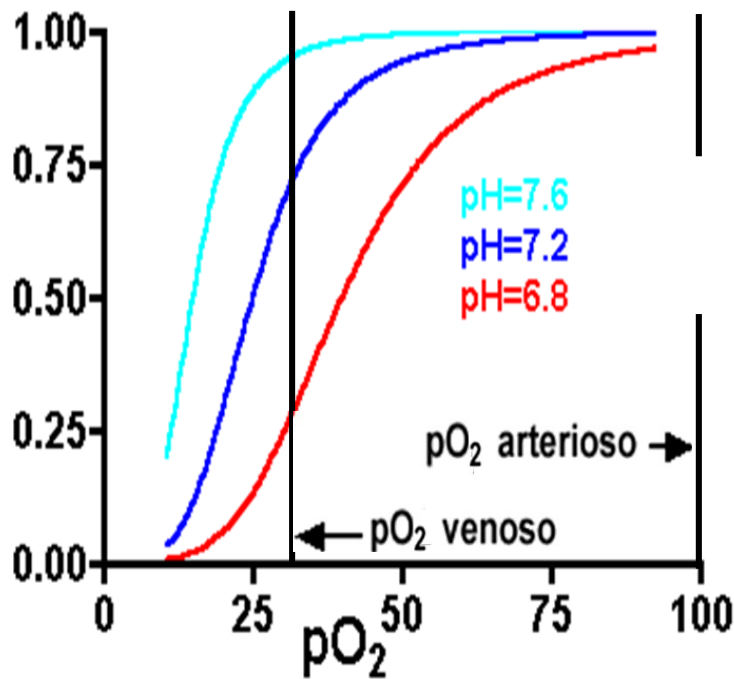
- si formano ponti salini aggiuntivi, che favoriscono la forma T, causando il rilascio di O₂
- Hb rilascia maggiori quantità di ossigeno dove ce ne è più bisogno, i tessuti a rapido metabolismo che producono H⁺ e CO₂.
- CO₂ viene trasportata di ai polmoni anche dall'Hb



+

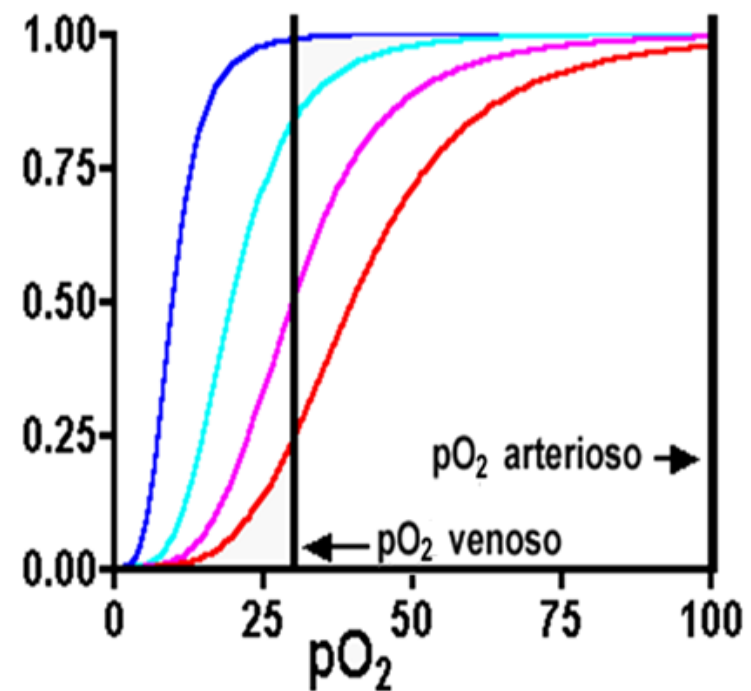


Effetto combinato del controllo allosterico



Effetto del pH

- Hb pH 7.6 (polmoni) ■ Hb pH 7.2 (tessuti a riposo)
- Hb pH 7.2 + CO₂ ■ Hb pH 6.8 (muscolo attivo)



Effetto di CO₂ e 2,3-BPG

- Hb ■ Hb + CO₂ ■ Hb + BPG
- Hb + CO₂ + BPG

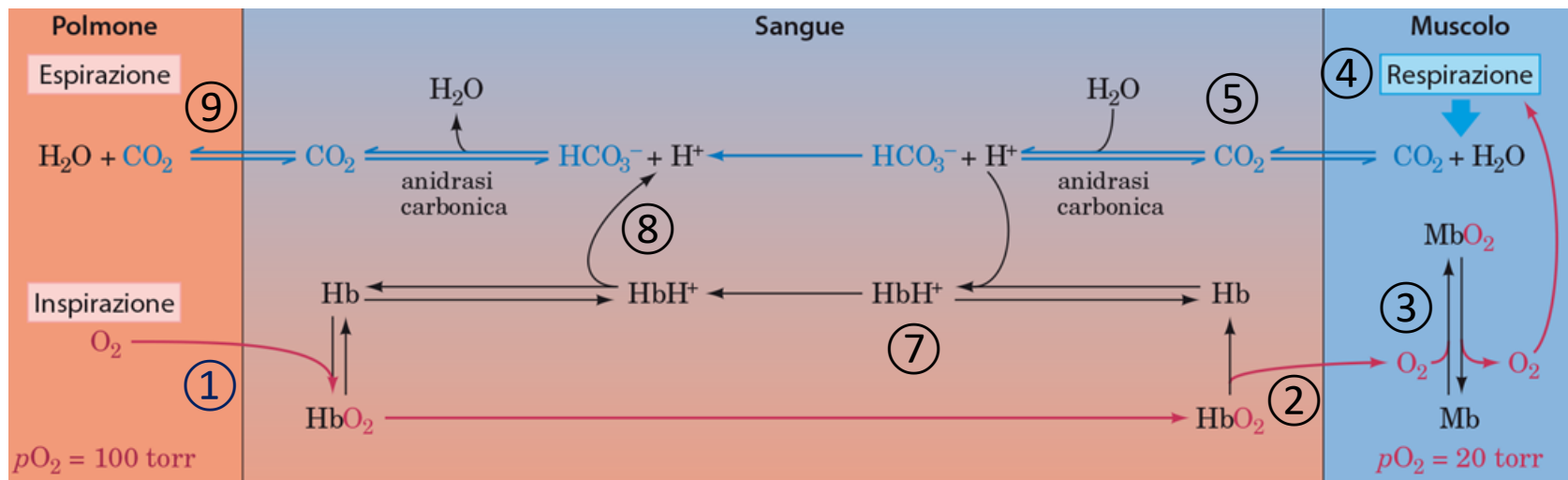
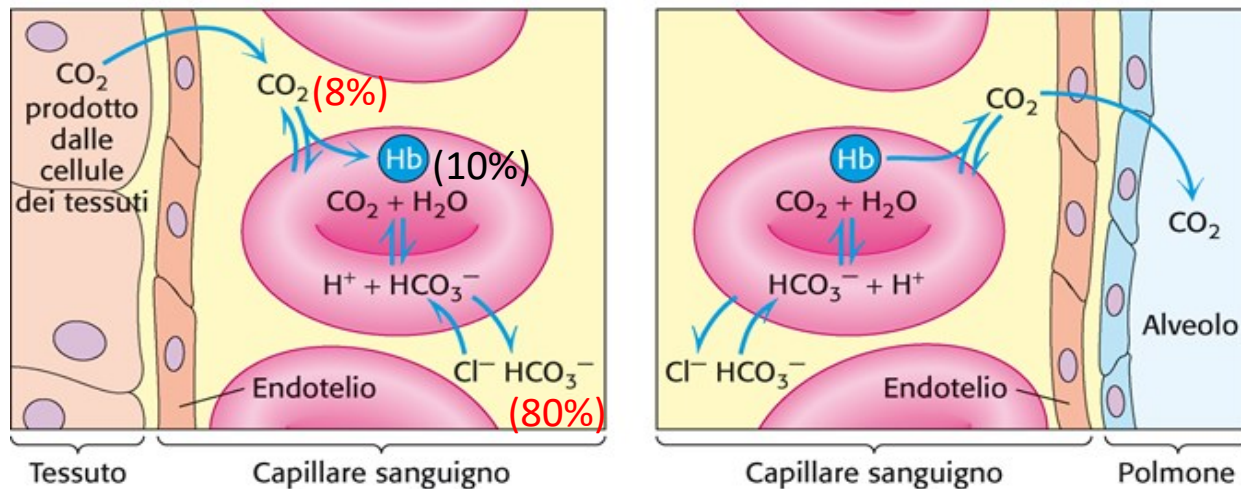
- **esercizio intenso:** riduzione del pO_2 a < 20 mm Hg $\rightarrow$ $< 20\%$ saturazione
- **effetto di CO₂:** $\sim 8\%$ va in soluzione nel siero, 80% convertito in acido carbonico ($pH \downarrow$)
 $\sim 10\%$ si lega all'Hb (come carbammato, trasportato ai polmoni)
- **effetto di CO:** anche se lega solo 1 solo CO ad un sito di legame $\rightarrow$ forma R permanente (non scarica più O₂)

Ciclo di trasporto di O_2 e CO_2 tra polmone e tessuti

► CO_2 prodotta nei tessuti: due principali meccanismi di trasporto

- 1) come ione HCO_3^- (~80%)
- 2) legata all'Hb (carbammato, ~10%)

- l'*anidrasi carbonica* degli eritrociti accelera la reaz. $CO_2 \rightarrow H_2CO_3 \rightarrow HCO_3^- + H^+$



Effetto di mutazioni nell'Hb

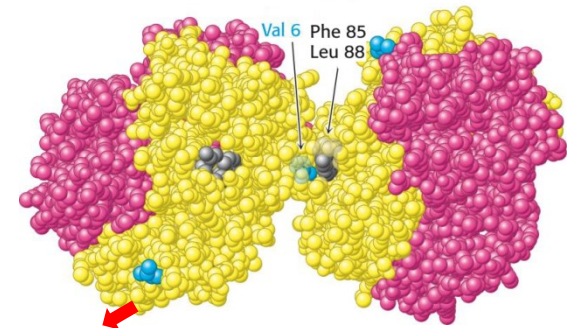
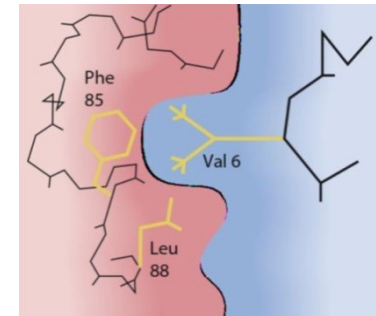
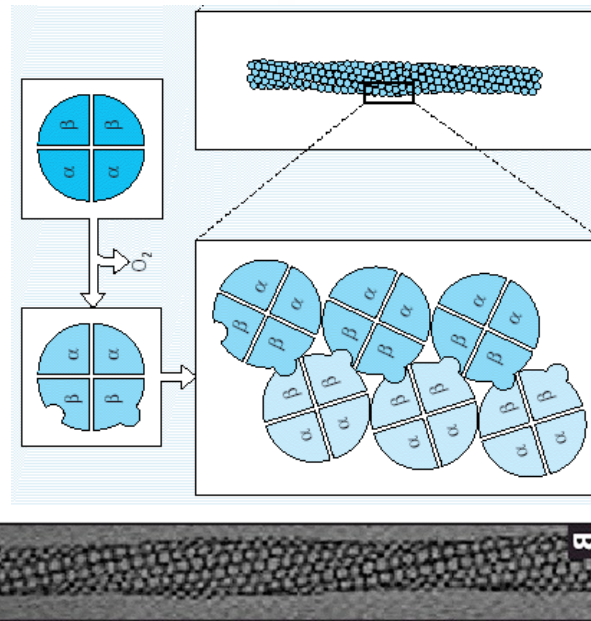
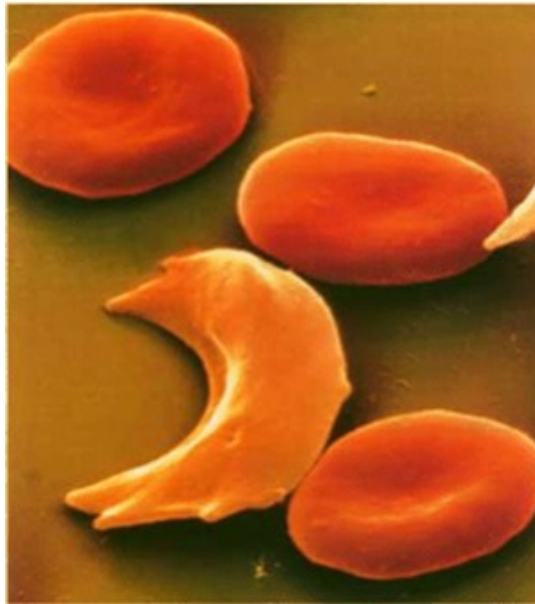
► L'anemia falciforme è la prima malattia genetica molecolare ad essere stata identificata

Catena β normale nell'adulto (HbA)

Nucleotide	CTG	ACT	CCT	GAG	GAG	AAG	TCT
Amino Acid	Leu	Thr	Pro	Glu	Glu	Lys	Ser
	3			6			9

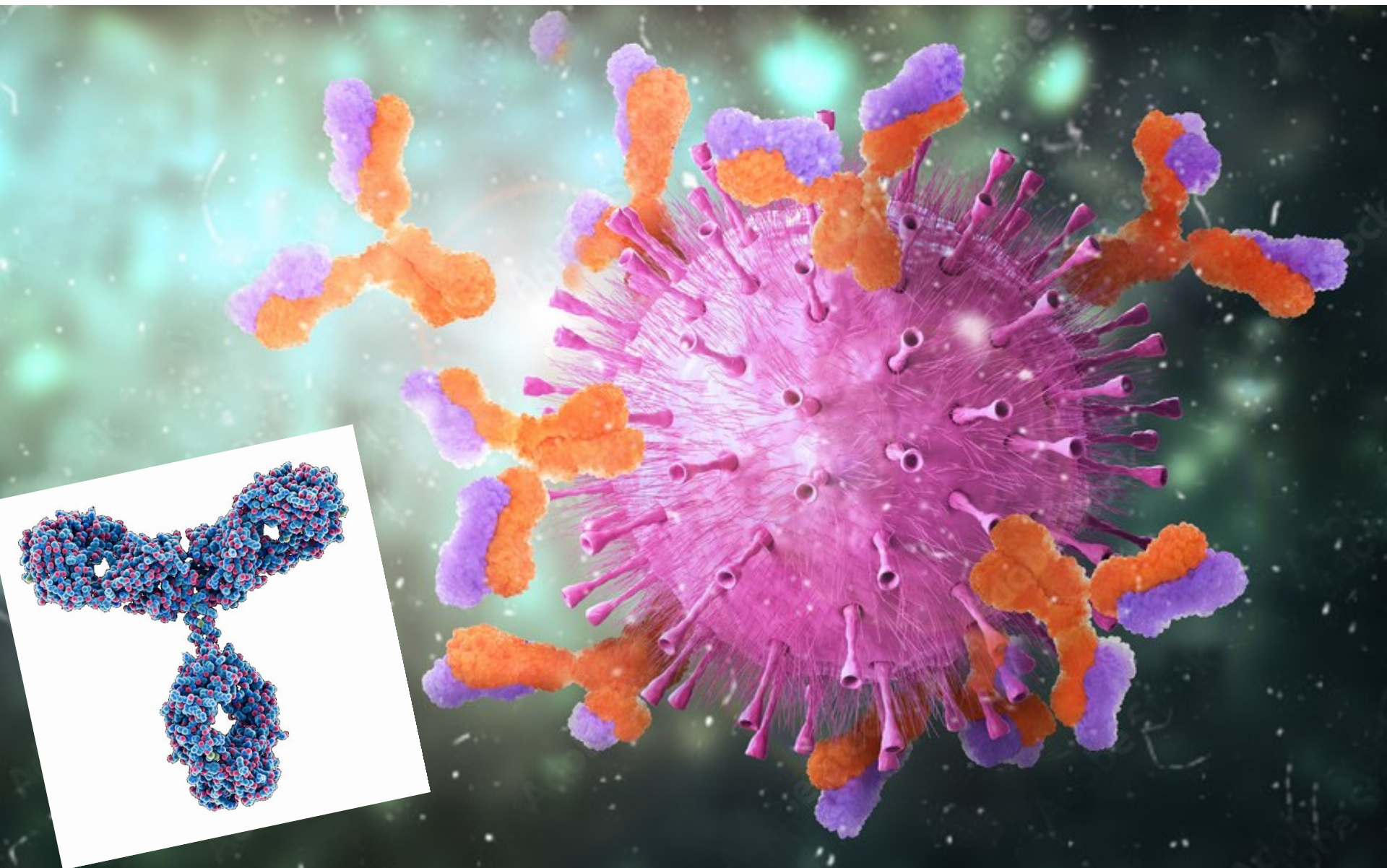
Catena β mutata nell'adulto (HbS)

Nucleotide	CTG	ACT	CCT	GTG	GAG	AAG	TCT
Amino Acid	Leu	Thr	Pro	Val	Glu	Lys	Ser
	3			6			9



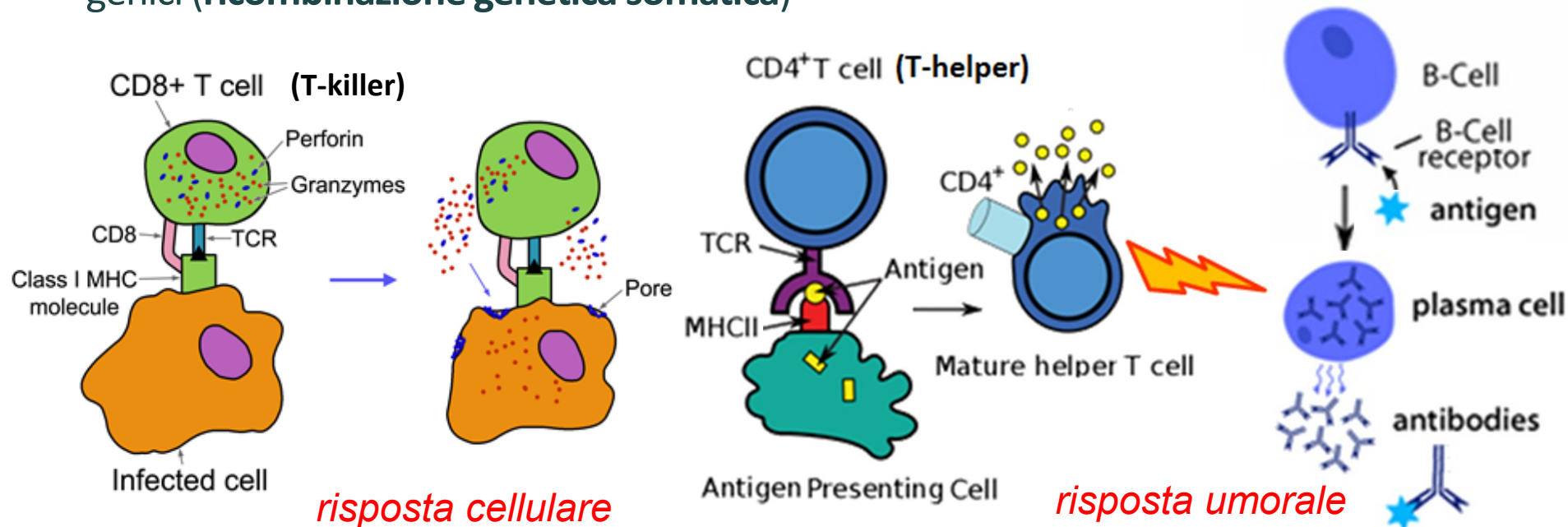
- Val⁶ è in superficie della subunità β in *deossi*HbS e interagisce con una tasca idrofobica di una subunità β in un'altra HbS, iniziando un processo anomalo di multimerizzazione (struttura 4^a aperta)
- si formano fibre insolubili di HbS non-funzionale, che alterano la morfologia degli eritrociti
- sono note > 1000 forme mutate di Hb (90% singoli AA), più o meno gravi (nel 5% della popolazione)

INTERAZIONE FRA PROTEINA E LIGANDO: LE IMMUNOGLOBULINE



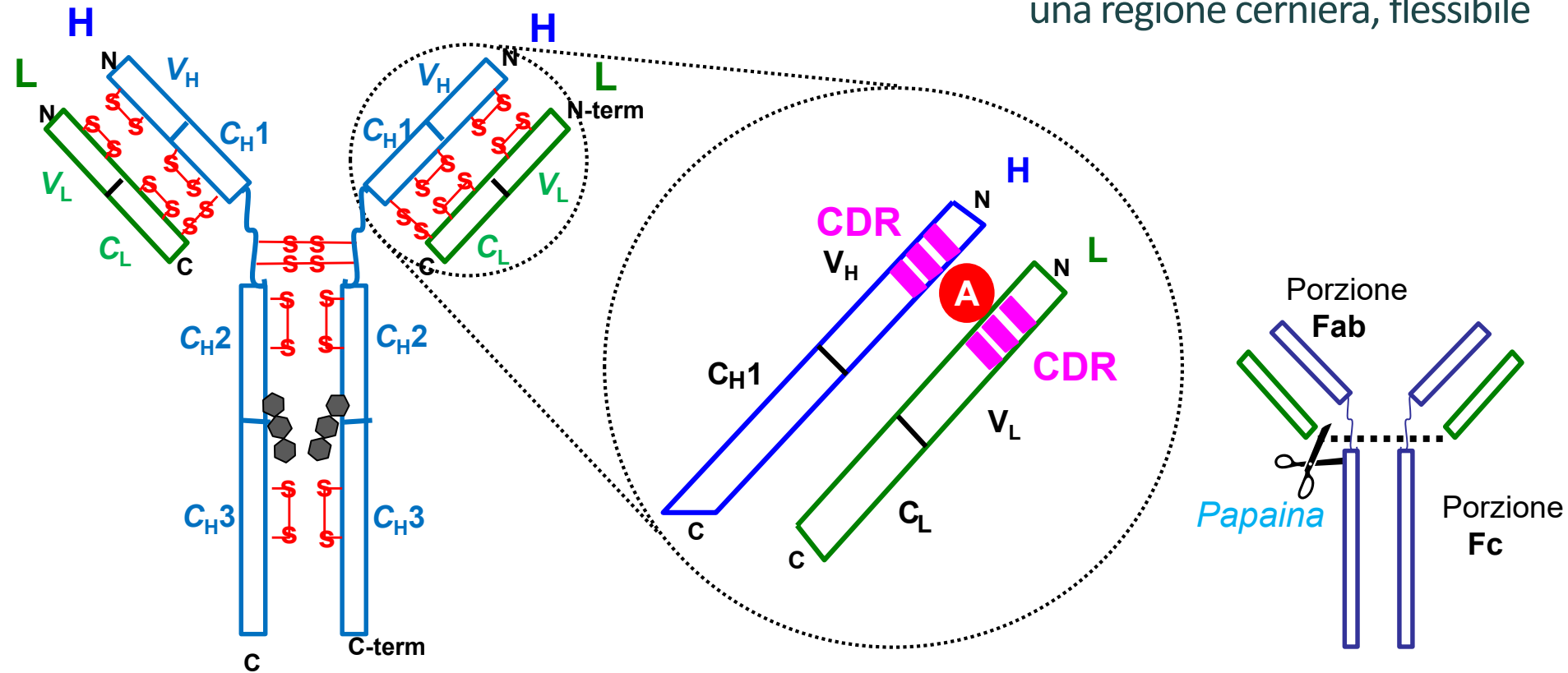
IMMUNOGLOBULINE

- Gli animali vertebrati hanno capacità di distinguere le molecole «proprie» (*self*) da quelle «estranee» (*non-self*).
- lo fanno mediante **recettori sui linfociti T (TCR)** e le **immunoglobuline (Ig)** prodotti dai **linfociti B attivati (plasmacellule)** (noti anche come *anticorpi*, Ab)
- fanno parte del **sistema immunitario «adattativo»**; la risposta immunitaria richiede il riconoscimento di innumerevoli molecole estranee (**antigeni, Ag**), tramite riconoscimento selettivo proteina -ligando (parte dell'antigene nota come **epitopo**)
- Ig sono il 20% delle proteine del sangue, e l'uomo è in grado di produrre $> 10^{10}$ Ig o TCR differenti; questa **enorme diversità** deriva dalla riorganizzazione casuale di segmenti genici (**ricombinazione genetica somatica**)



IMMUNOGLOBULINE: struttura primaria

- Prendendo IgG come esempio, le principali caratteristiche della struttura 1^a sono:
- proteine con **4 catene** (**2L** identiche e **2H** identiche) con **forma a Y** e grandezza **~150 kDa**
 - confrontando diverse Ig, ci sono parti delle catene **conservate (C)** e parti **variabili (V)**
 - catene **L** con **domini V_L** e **C_L** e catene **C** con **domini V_H** e **C_{H1}** sono connessi a **C_{H2}** e **C_{H3}** da una regione cerniera, flessibile



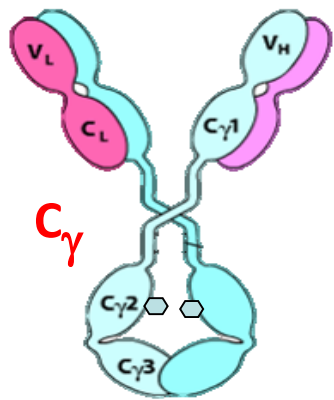
H = heavy chain (*catena pesante*) **L** = light chain (*catena leggera*) **C** = conserved **V** = variable

S-S ponti disolfuro **●●●** oligosaccaride **A** antigene **CDR** Complementarity Determining Region

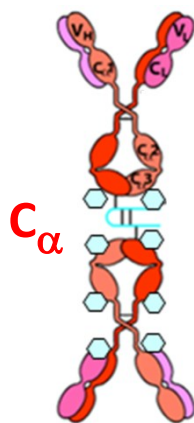
(Regione ipervariabile)

IMMUNOGLOBULINE: funzioni di F_{ab} e F_c

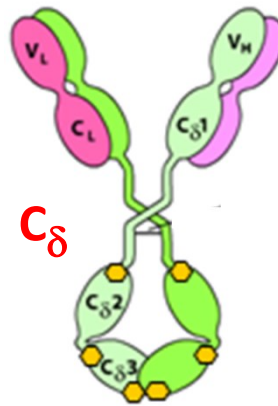
- ▶ La parte F_{ab} delle immunoglobuline riconosce l'antigene
 - il **sito di legame** è formato dalle **sequenze CDR** che legano l'epitopo nell'Ag
- ▶ La parte F_c media le funzioni effettrici a valle
 - interagisce con **recettori su cellule immunitarie** o con le **proteine del complemento**
- ▶ I linfociti B esprimono 5 diversi isotipi di Ig che variano nelle C_H ($C_{\alpha}H$, $C_{\delta}H$, $C_{\epsilon}H$, $C_{\gamma}H$, $C_{\mu}H$)
 - per **numero, sequenza, ponti disolfuro** e tipo di **glicosilazione** (●) delle catene H
 - esprimono **prima le IgM**, poi per il processo di **commutazione di classe** una delle altre
 - Il **tipo di C_H** conferisce **specializzazione funzionale** alle Ig



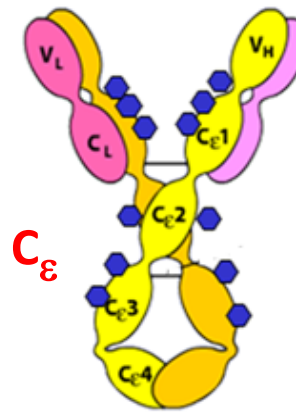
IgG (monomeriche)
siero (~ 80%)



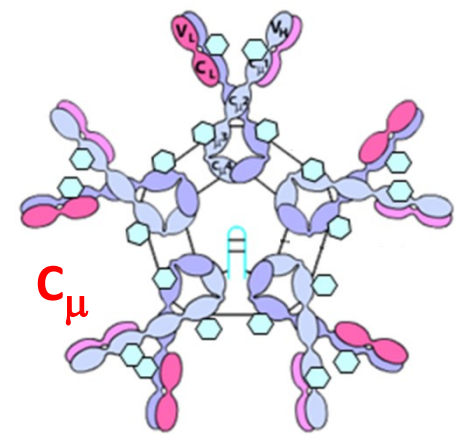
IgA (1-3-meriche)
secrez. esterne (~10%)



IgD (monomer.)
(?) ~0.1%



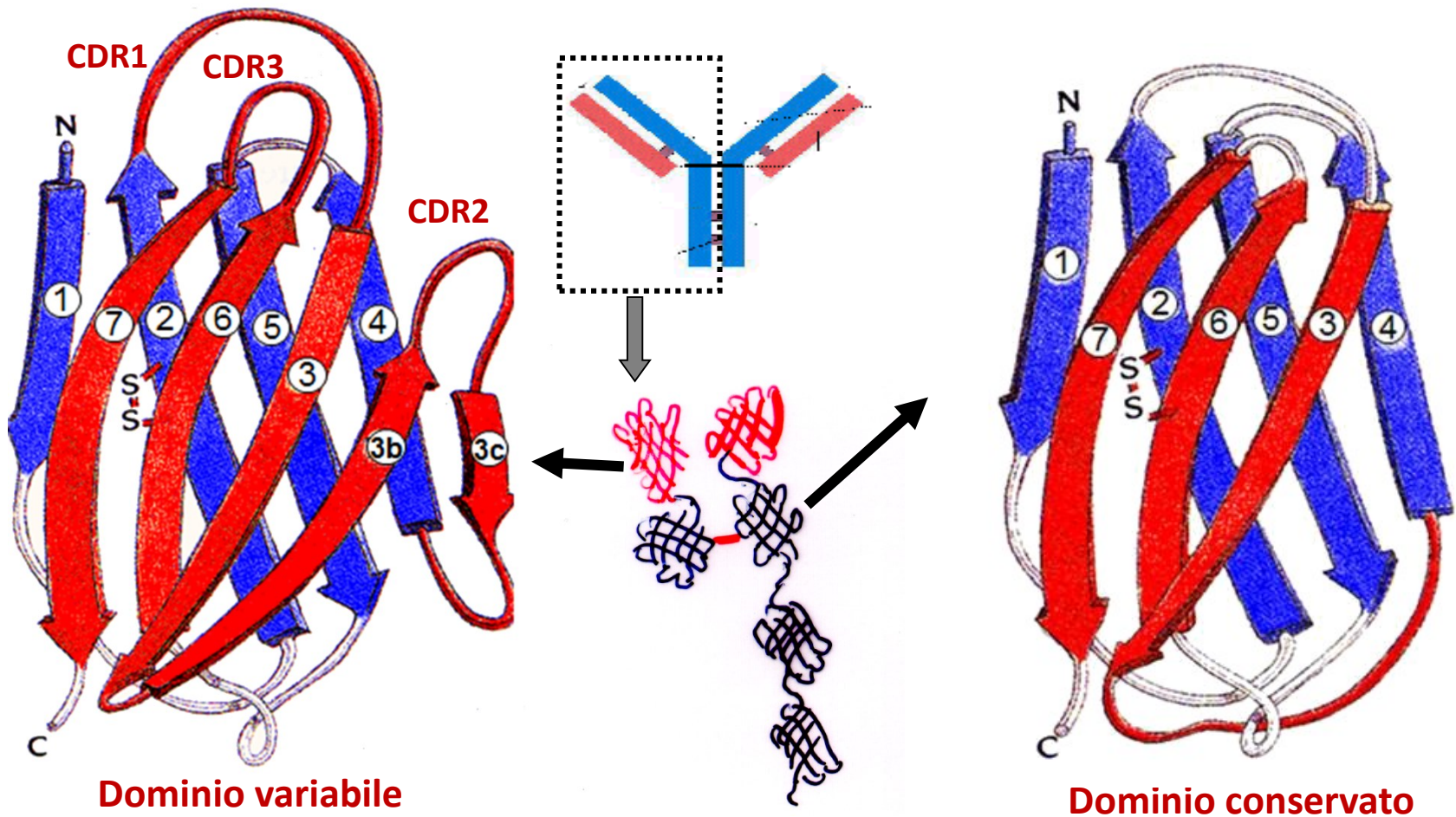
IgE (monomer.)
parassiti ~0.01%



IgM (pentameriche)
precoci ~10%

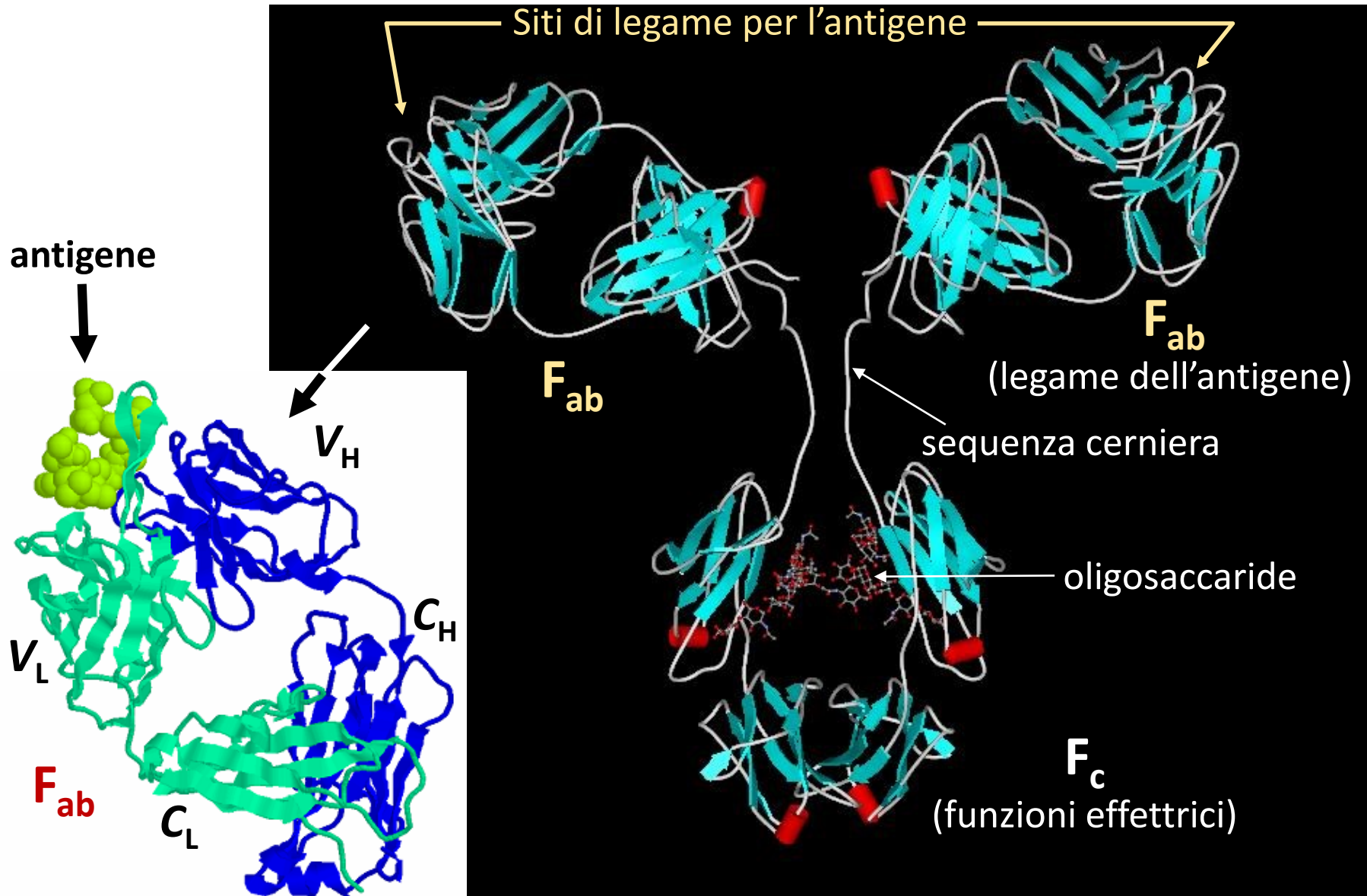
IMMUNOGLOBULINE: struttura 2^a

- Le immunoglobuline sono formate da domini con elementi strutturali comuni
- sono formate da β -foglietti sovrapposti di 7-9 filamenti con topologia a chiave greca, noti come «immunoglobulin fold»
- V_L ed H_L hanno i **2 filamenti in più**, e loop di connessione più lunghi che **corrispondono alle CDR**



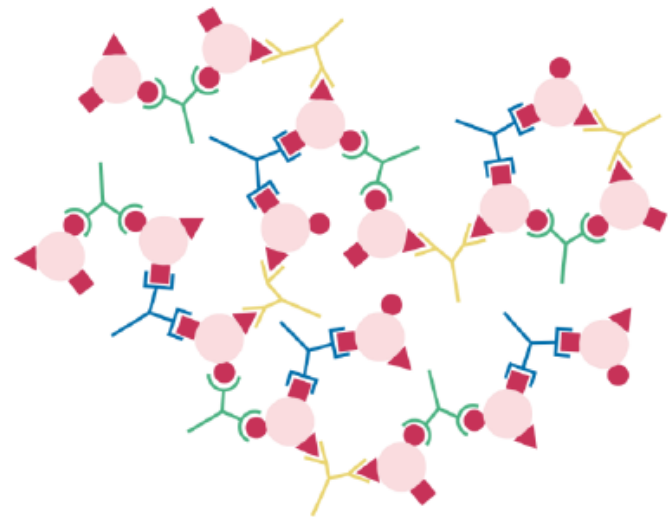
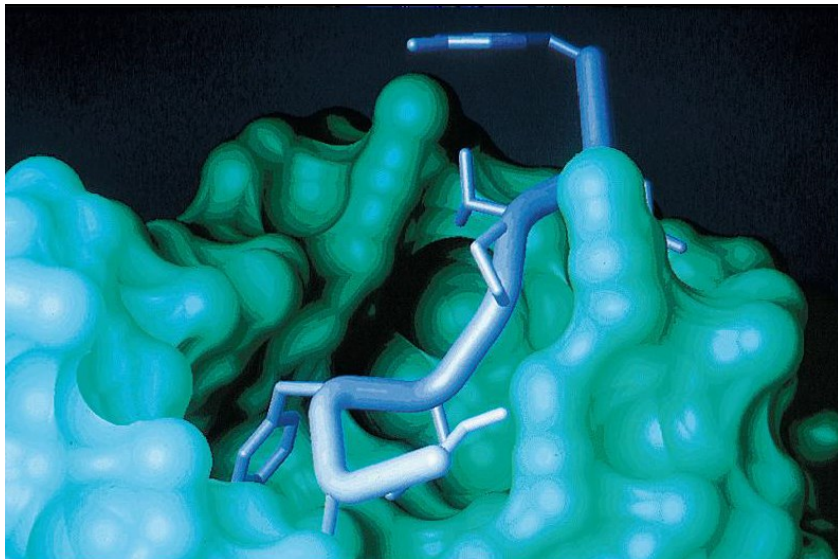
IMMUNOGLOBULINE: struttura 3^a

- Il sito di legame per l'antigene è formato dai domini V_L e V_H
- le Ig hanno una struttura 4^a?



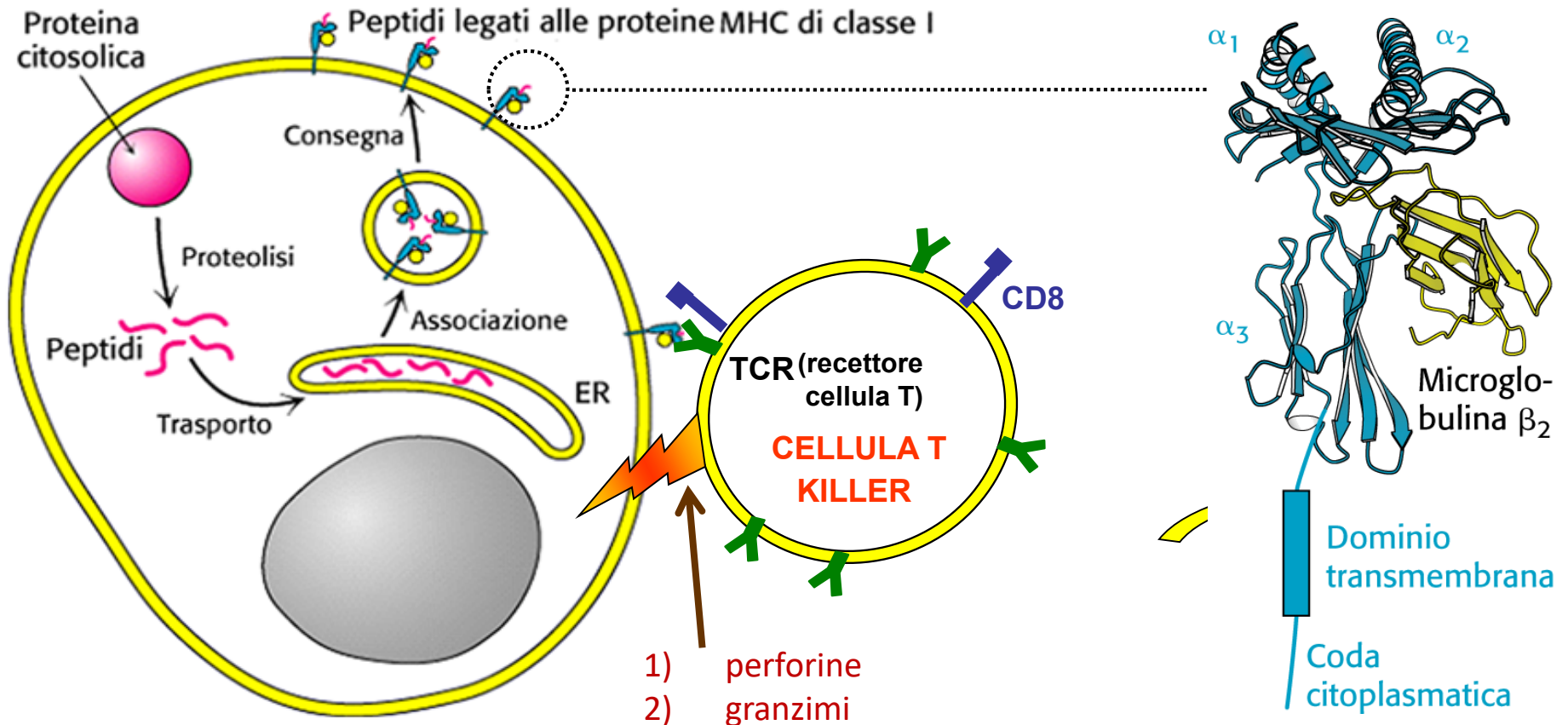
IMMUNOGLOBULINE: interazione fra antigene ed anticorpo

- Il legame Ig-Ag coinvolge interazioni deboli (vdW, idrofobiche, ioniche e legami-H)
- la forza di legame $K_D = 10^{-6} - 10^{-9} \text{ M}$ (meno forte per IgM)
- gli **Ig maturano durante l'espansione clonale** per un processo di evoluzione accelerata
- gli **antigeni** sono tipicamente **brevi tratti di polipeptide o polisaccaride** (anche combinati con lipidi o acidi nucleici)
- La **multivalenza** (l'Ig può legare **due o più Ag identici**, a seconda del tipo) permette di **formare ponti trasversali** fra Ag e reticolati estesi
- questo **accelera la loro eliminazione e stimola la proliferazione** delle cellule B.



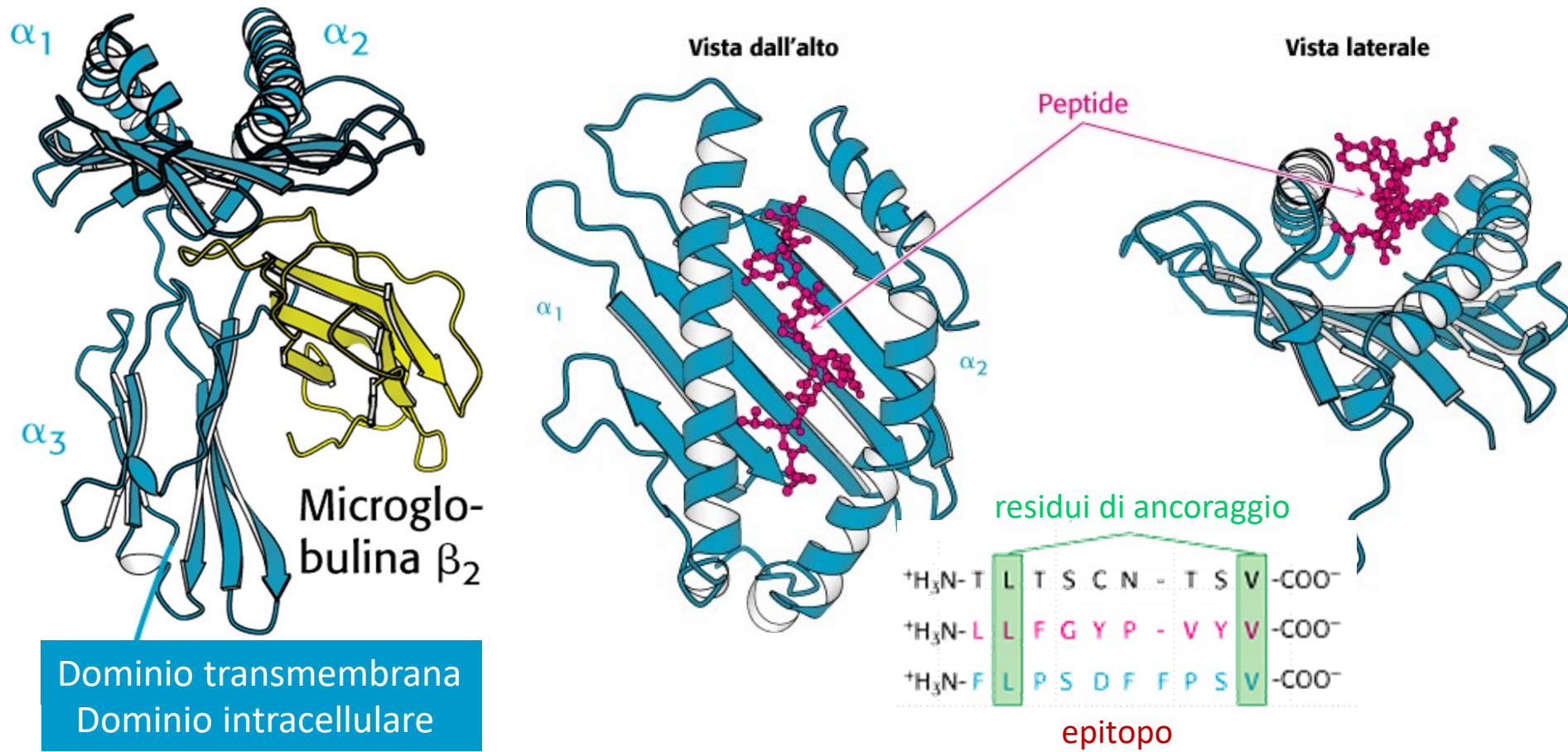
MAJOR HISTOCOMPATIBILITY COMPLEX: presentazione dell'antigene

- ▶ Le Ig legano selettivamente 1 epitopo – le MHC presentano molti epitopi
 - le MHC di classe I **presentano** frammenti di proteine citoplasmatiche sulla **superficie delle cellule** (meccanismo “*taglia-esponi*”), incluso frammenti di **patogeni intracellulari**
 - permettono ai linfociti **T-killer** di riconoscere **cellule infette**, che uccidono



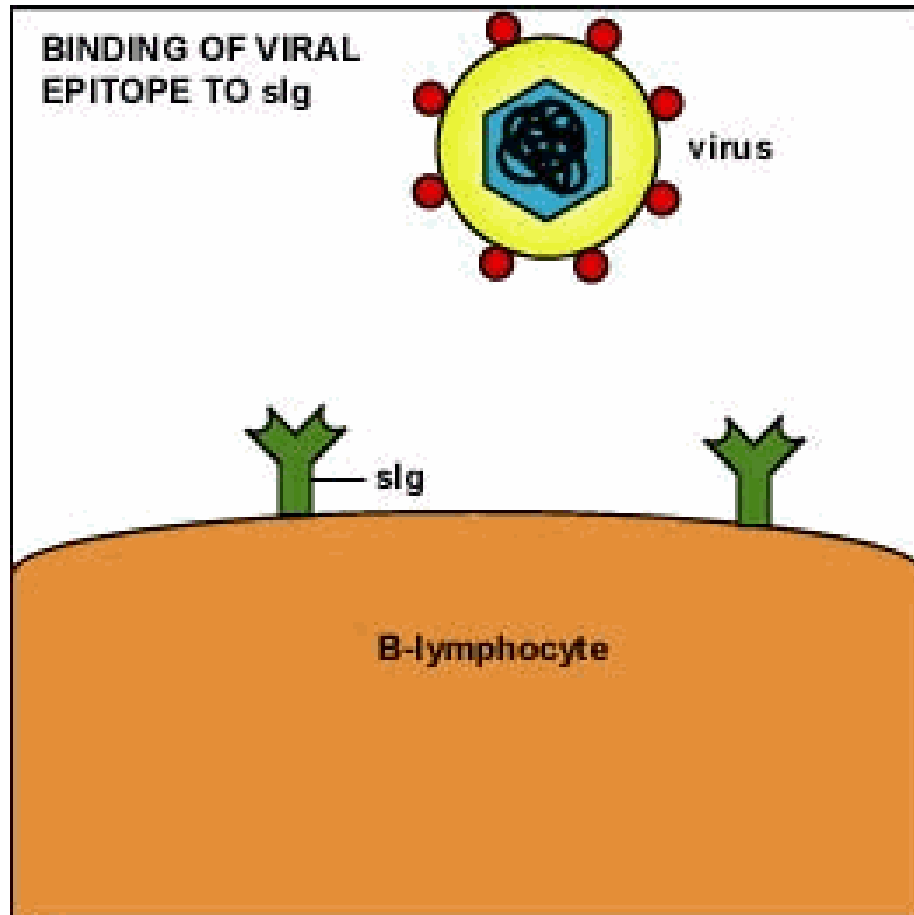
Major Histocompatibility Complex: struttura

- ▶ Le MHC sono formate da 4 domini extracellulari, uno transmembrana e uno intracellulare
 - Il sito di legame per l'Ag è una piattaforma recintata, formata da β -foglietto e 2 α -eliche
 - sono presentati peptidi di ~ 15 residui in forma estesa, ancorati da due residui alla loro estremità (possono presentare milioni di frammenti diversi)
 - MHC I espongono epitopi in cellule tissutali (per T-killer), MHC II in APC (per T-helper)

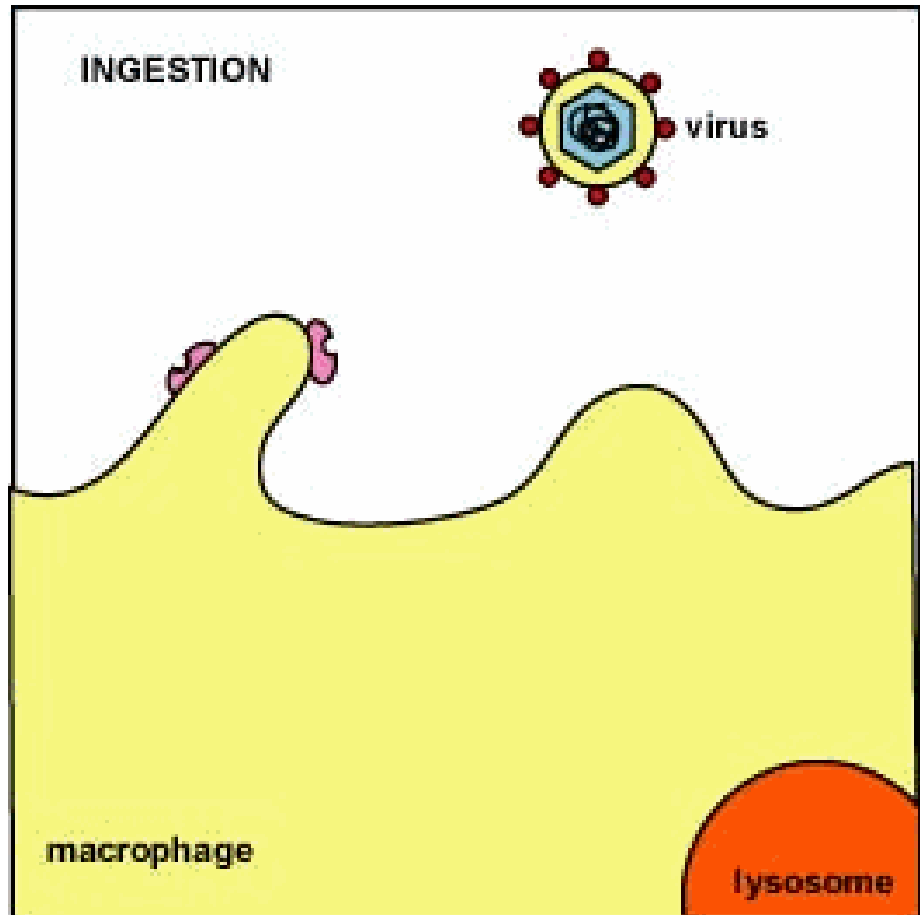


MHCII e le Antigen Presenting Cells (APC)

Linfociti B



Fagociti: macrofagi / cellule dendritiche



Gli anticorpi sono utilissimi strumenti sperimentali

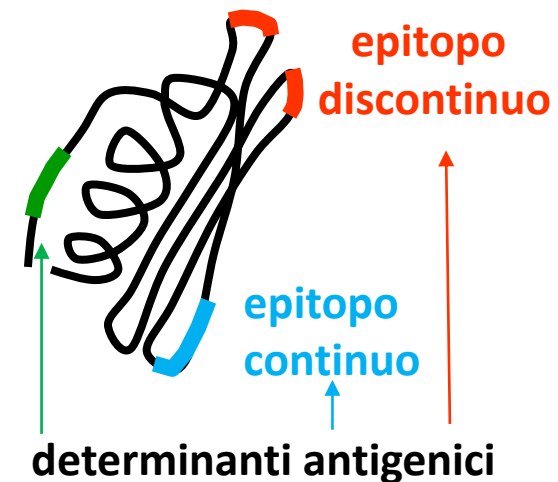
- ▶ Le Ig riconoscono determinanti antigenici (DA) in molecole bersaglio con elevata precisione
 - possono **identificare, isolare** o **eliminare** la molecola bersaglio (o la cellula che la esprime)
 - è però necessario disporre dell'**Ig specifica** – è possibile ottenerla identificando il DA
 - una volta preparato il DA deve essere reso **immunogenico**, legandolo ad una proteina carrier che lo presenti come antigene con DA multipli

Predirre il determinante antigenico

MVRGITVLAVALMVGANNIPKLV PDDHYVNRVVGGQEAE
GSAPYQVSLQVALWGHNQGG SILSERWVLTAAHCLVGTDAE
ELEVLVGTNSLKEGGQRYKADKLLYHSRYNSPQFHNDIGLV
RLATPIKFSSTVKSIEYSENVVPVNATVRLTGWGRTSAGGS
VPTKLQTI DLRTLSNEDGKKKSGNPGNVDIGHVVT LTRTGE
GAKNGDSGGPGTNE DKVIGVVNFGVPCALGYPDGFARVSYY
HDWIRTTIRNN

idrofobico

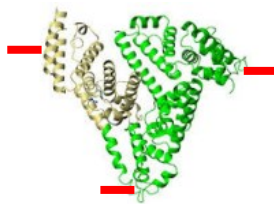
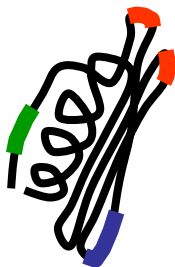
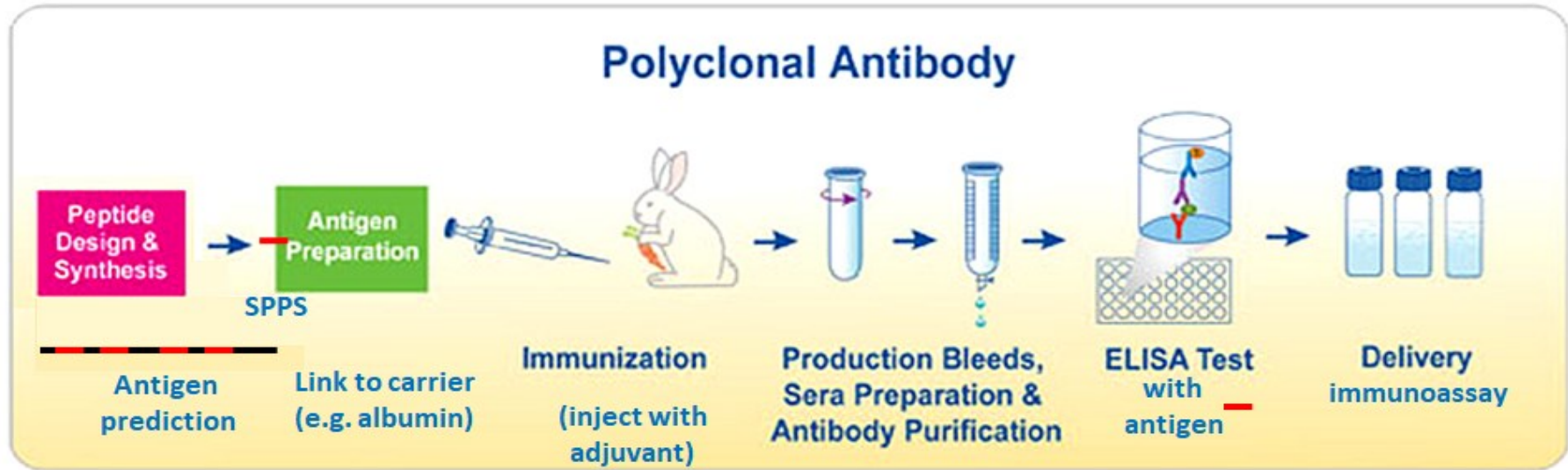
polare



Produzione di anticorpi policlonali

► Gli anticorpi policlonali non derivano da una unica linea di linfociti B

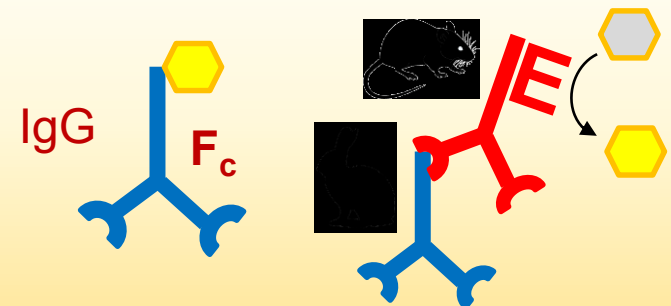
- alcune diverse linee di linfociti B riconoscono diverse parti dell'antigene
- sono comunque molto utili a scopo diagnostico



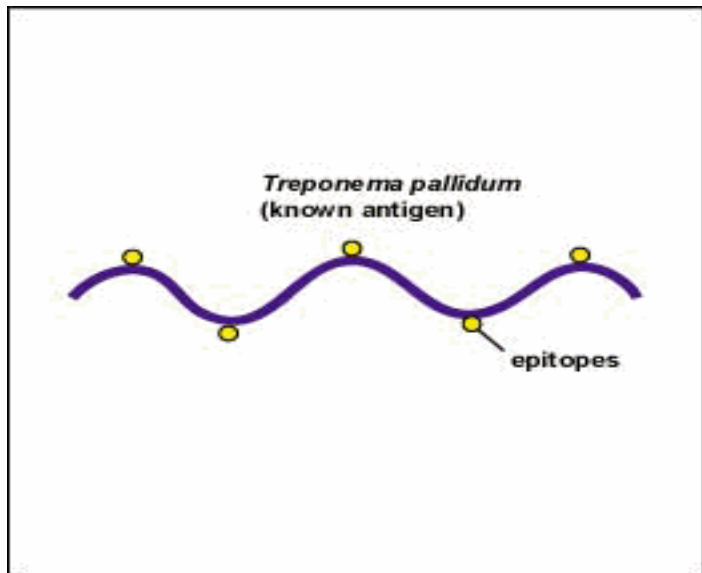
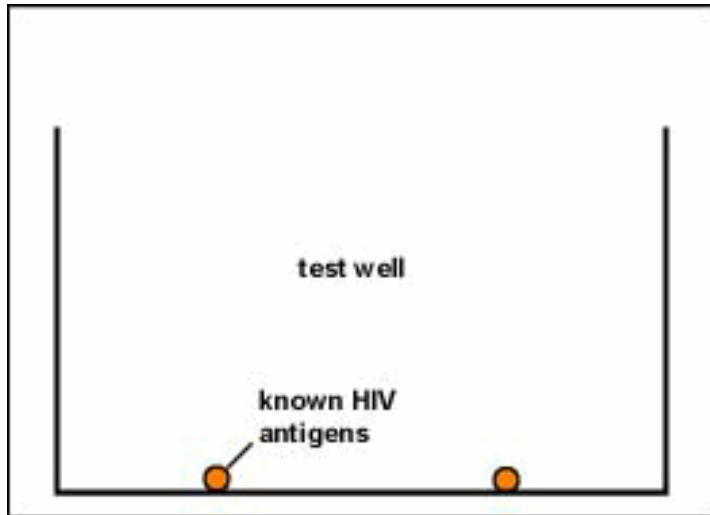
Affinity
Chromatography
With
Immobilized
antigen



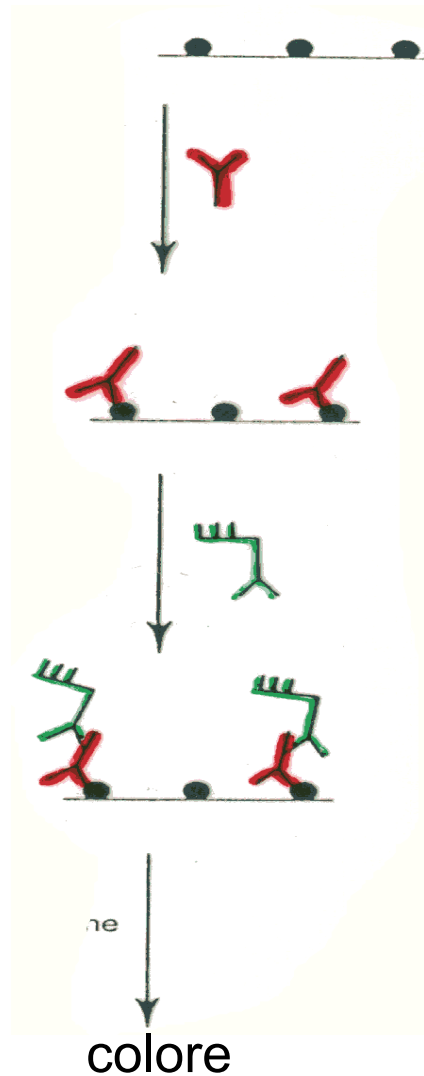
Evidenziare l'anticorpo



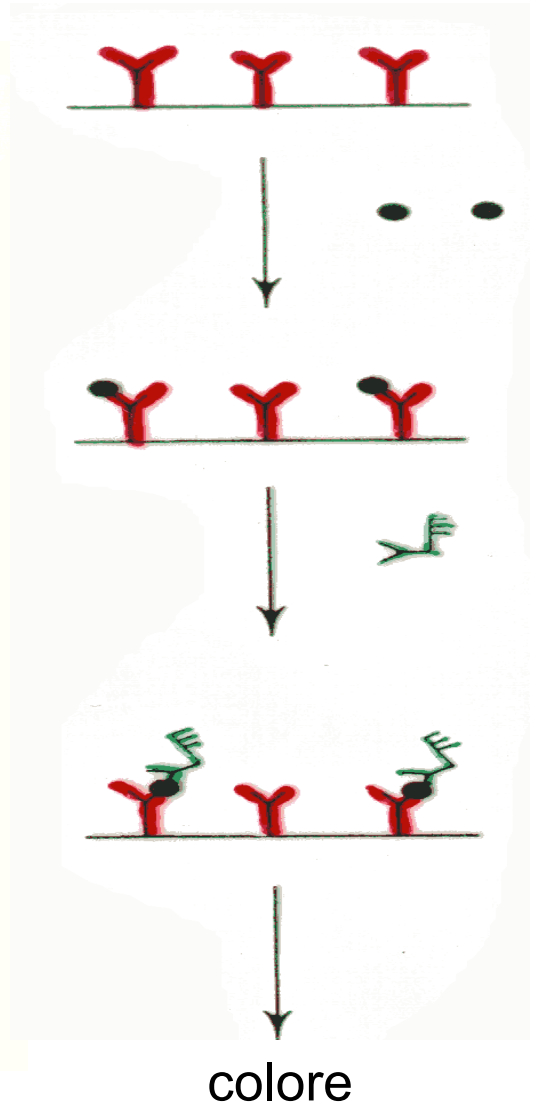
ELISA: Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay



ELISA indiretto



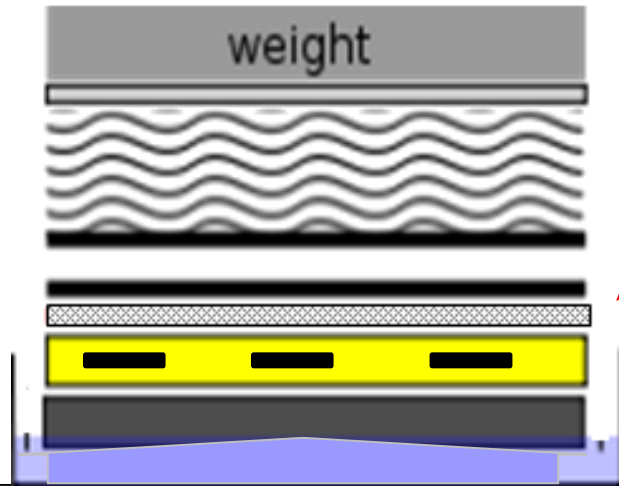
e a sandwich



Western Blot

- ▶ Anticorpi permettono di identificare in maniera selettiva proteine in gel SDS-PAGE

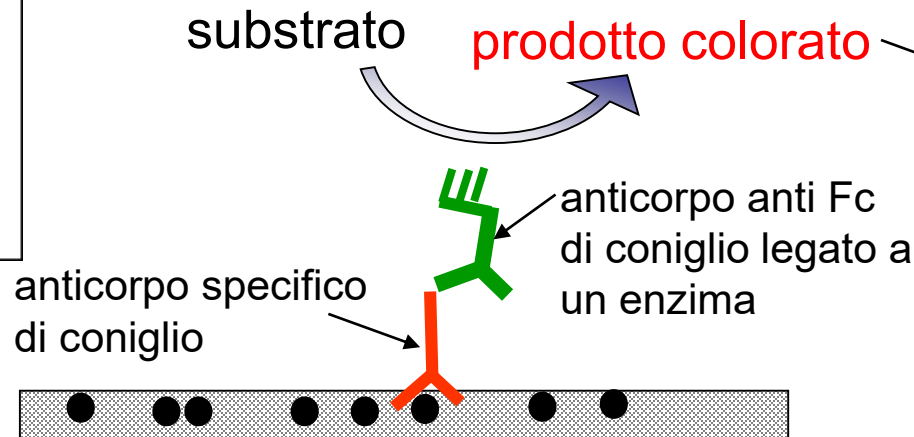
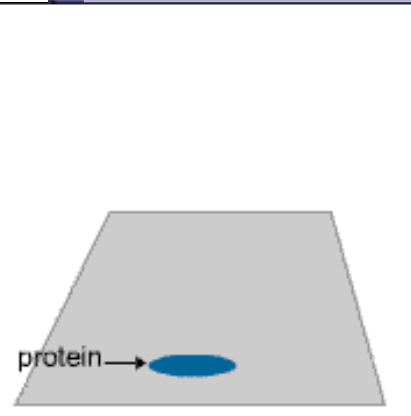
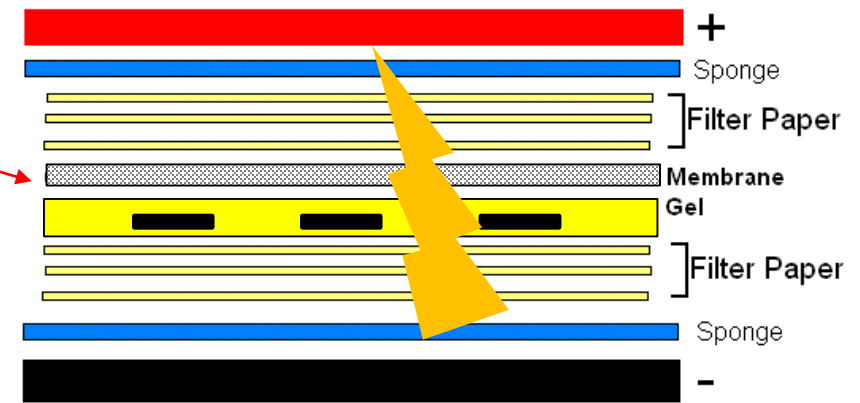
Blot a capillarità



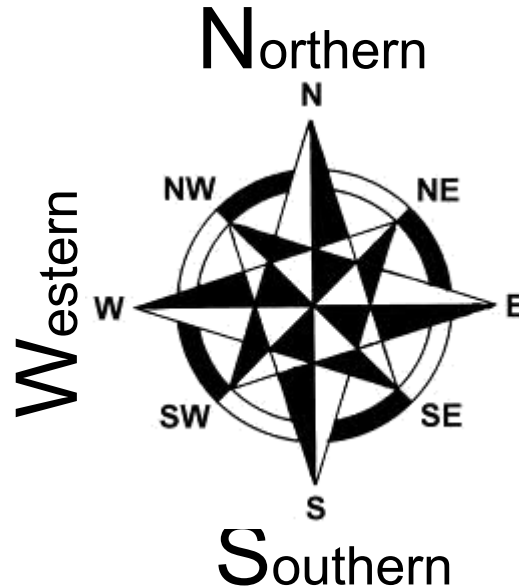
membrana di
nitrocellulosa

Elettro blot

Transfer Stack



SDS-PAGE – tipi di blotting



Southern blot: identifica un **filamento di DNA** utilizzando **DNA complementare** (utilizzato per identificare/isolare geni da DNA genomico)

Northern blot: identifica un **filamento di RNA** utilizzando **RNA/DNA complementare** (utilizzato per determinare il livello di trascrizione di un gene)

Western blot: identifica una **proteina** utilizzando un **anticorpo specifico** (utilizzato per determinare il livello di espressione di una proteina).

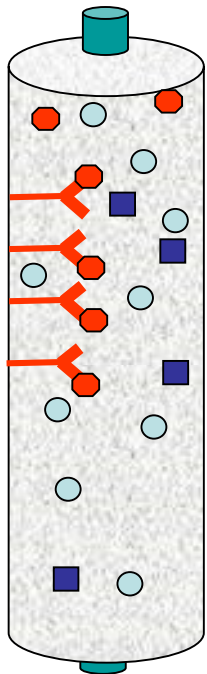
Gli anticorpi come strumenti sperimentali

Epitopo + Ig → elevata affinità e selettività

interazione

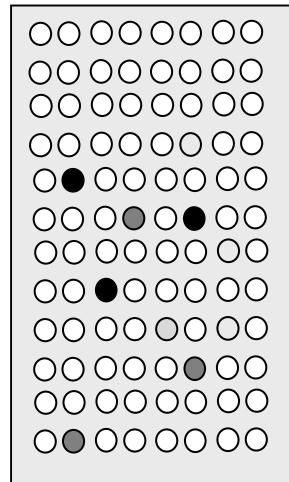
separazione

colonne di affinità



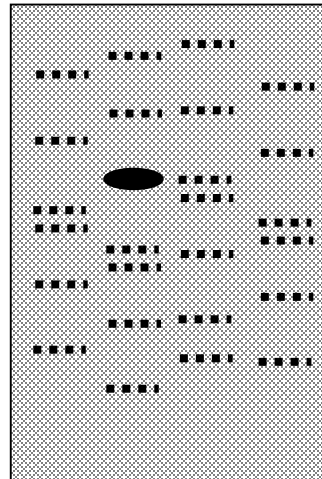
identificazione
diagnostica

saggi ELISA

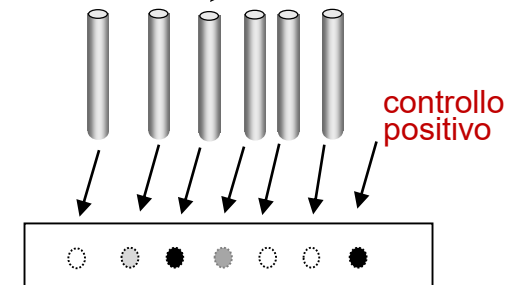
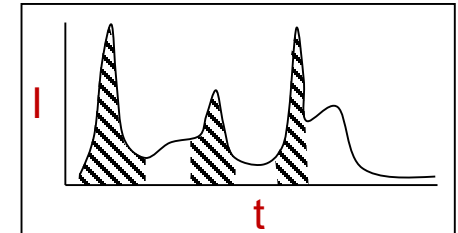


Identificazione dell'antigene
sperimentale

Western blot
(SDS-PAGE)



Dot blot
(cromatografia)



Glossario

Antigene: macromolecola capace di reagire con i prodotti del sistema immunitario

Determinante antigenico (detto anche **epitopo**): Piccola parte di antigene che lega un anticorpo specifico. Una singolo antigene può contenere molti epitopi simili riconosciuti da un particolare anticorpo, e anche molti epitopi differenti riconosciuti da anticorpi diversi

Antigenicità: Capacità dell'antigene di combinarsi specificamente con un anticorpo (specificità antigenica)

Immunogenicità (potere "immunogeno"): Capacità dell'antigene di indurre una risposta immunitaria

Aptene: piccola molecola (<10 kDa) antigenica ma non immunogena. Diventa immunogena se legata a macromolecola *carrier*

Adiuvante: sostanza in grado di stimolare e aumentare la risposta ad un antigene, senza manifestare essa stessa proprietà antigeniche.

Anticorpi policlonali: miscela di anticorpi diversi fra loro ottenuti dall'immunizzazione di un animale con un antigene che contiene diversi epitopi. Ogni anticorpo deriva da un diverso clone di cellule B.

Anticorpi monoclonali: anticorpi identici fra loro prodotti da linee cellulari provenienti da (mAb) un solo clone di cellule B (isolate specificatamente). I linfociti B sono immortalizzati fondendoli con cellule trasformate (ibridomi)