

Modulo 4

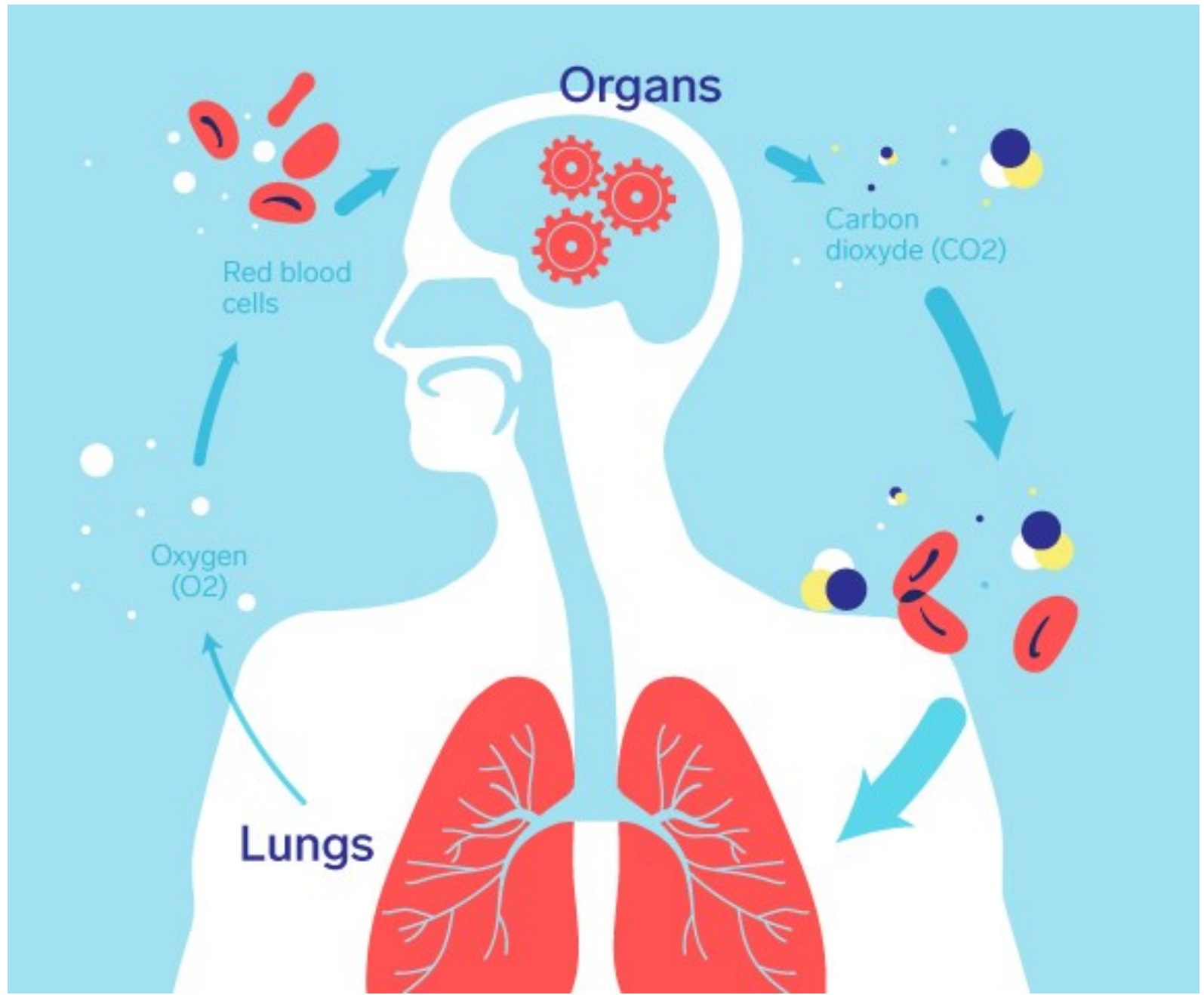
Funzione delle proteine



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

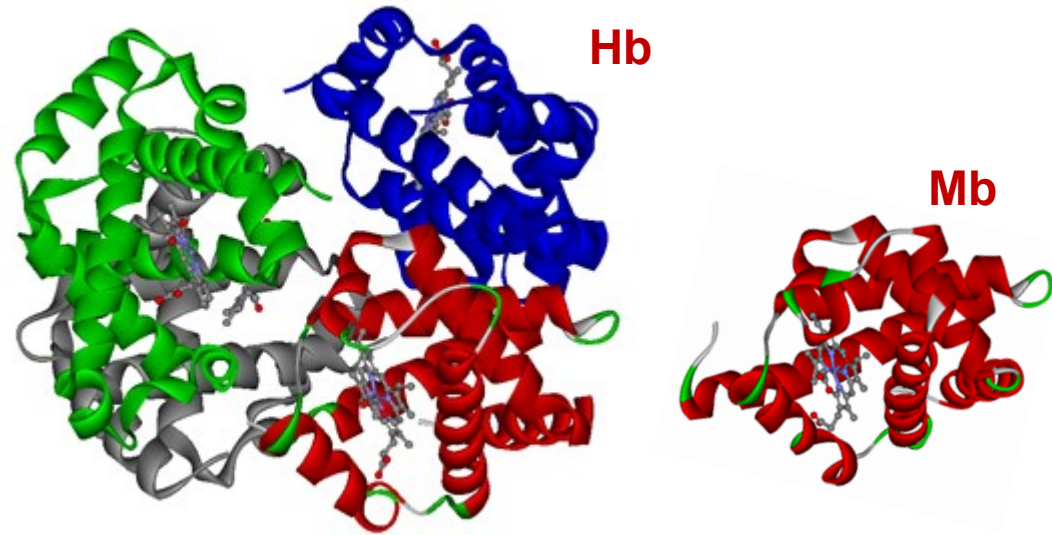
2023-24

INTERAZIONE FRA PROTEINA E LIGANDO: EMOGLOBINA e MIOGLOBINA



MIOGLOBINA ed EMOGLOBINA: proteine in azione

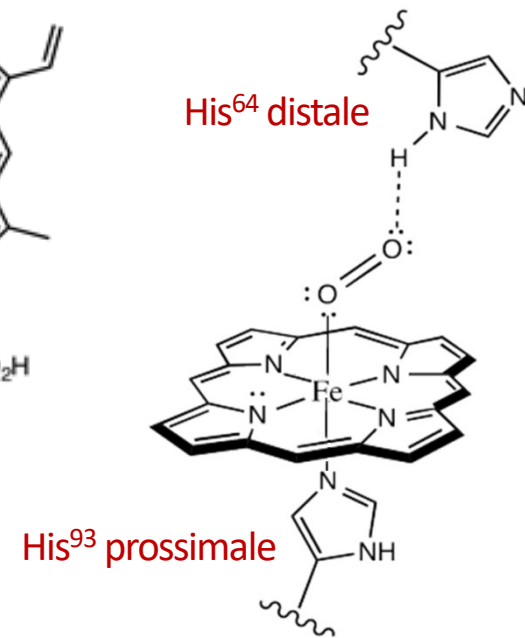
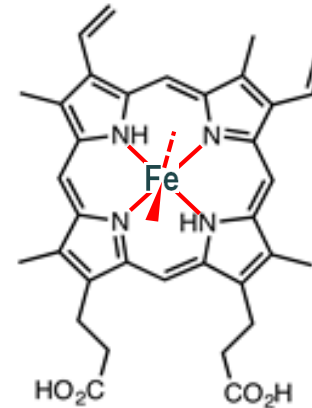
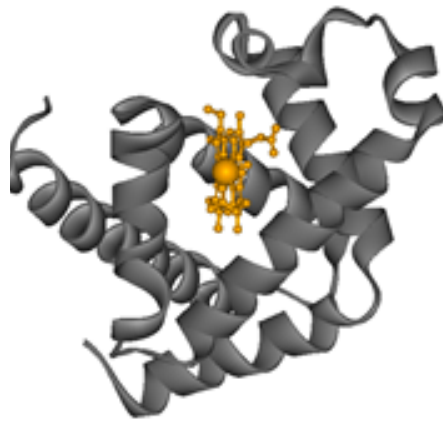
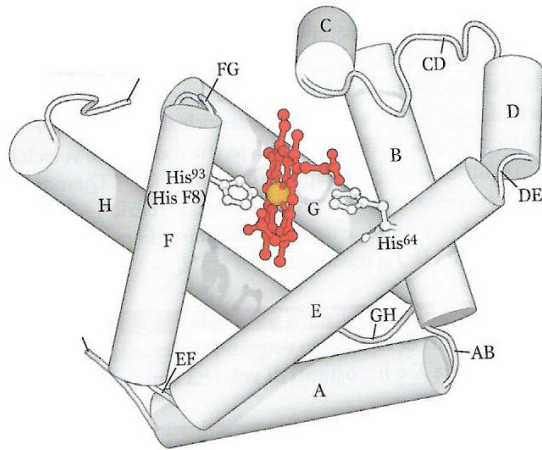
- ▶ La mioglobina (Mb) e l'emoglobina (Hb) sono fra le proteine meglio caratterizzate
 - a livello **strutturale e funzionale** (prime strutture cristallografiche, **fine anni '50**)
 - sono state cruciali nell'**evoluzione della vita aerobica**
 - servono per **legare e poi rilasciare l'ossigeno molecolare (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

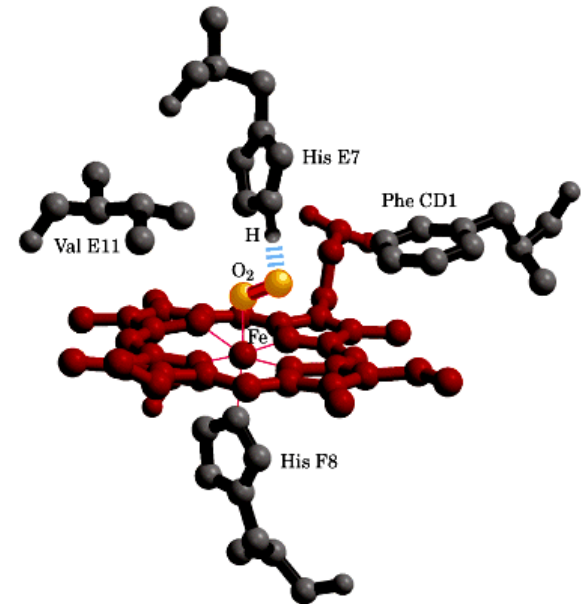
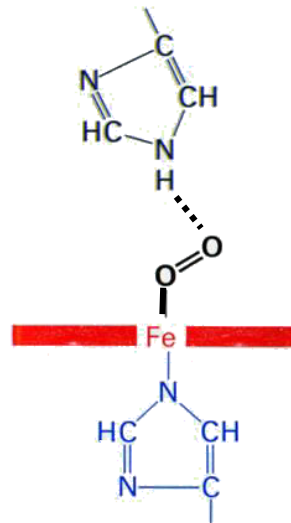
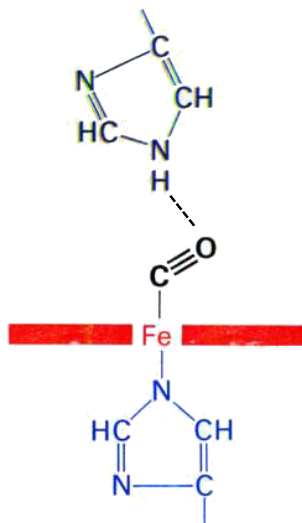
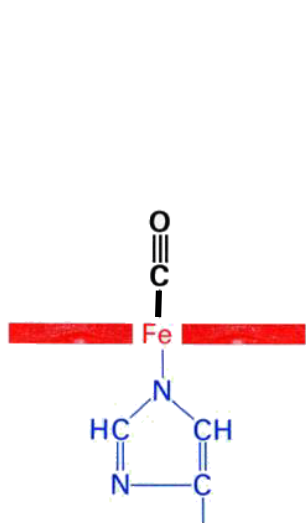
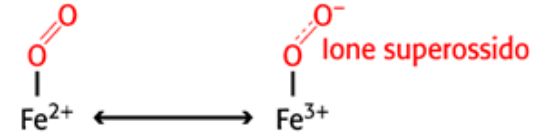


- lo ione **Fe²⁺** forma **6 legami di coordinazione**; 4 con l'eme e il 5° con His⁹³ (**prossimale**, elica F), ma è troppo distante per legare His⁶⁴ sull'altro lato (**distale**, elica E) e forma il 6° con O₂
- **O₂** non si lega in modo assiale, e forma un **legame-H con His⁶⁴**, che stabilizza il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



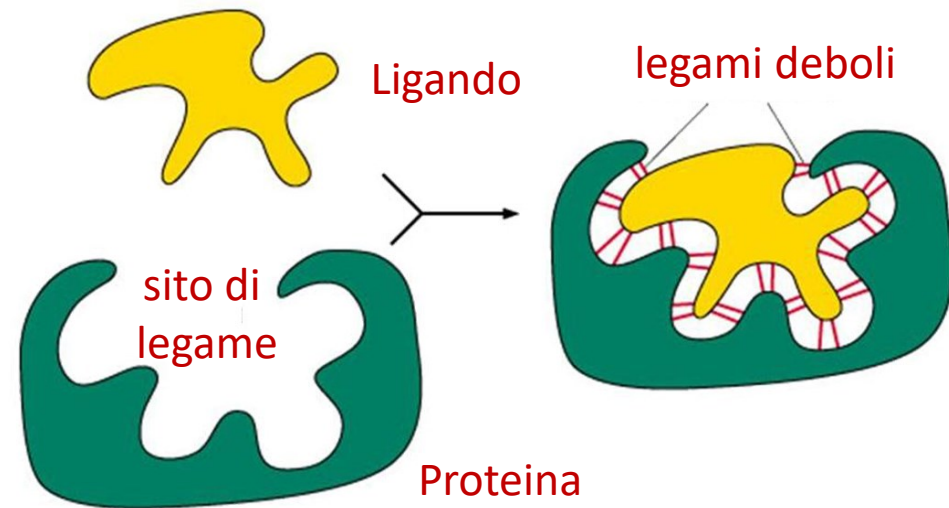
Mioglobina: esempio di legame reversibile con un ligando

- ▶ 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

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

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

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

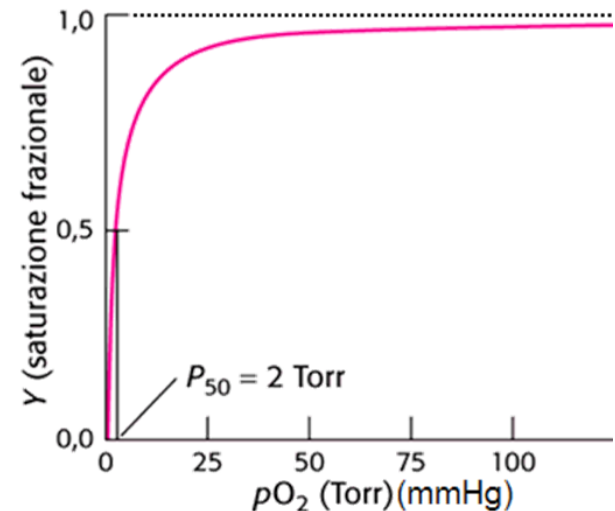
- combinando le due equazioni, si ricava:

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

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**

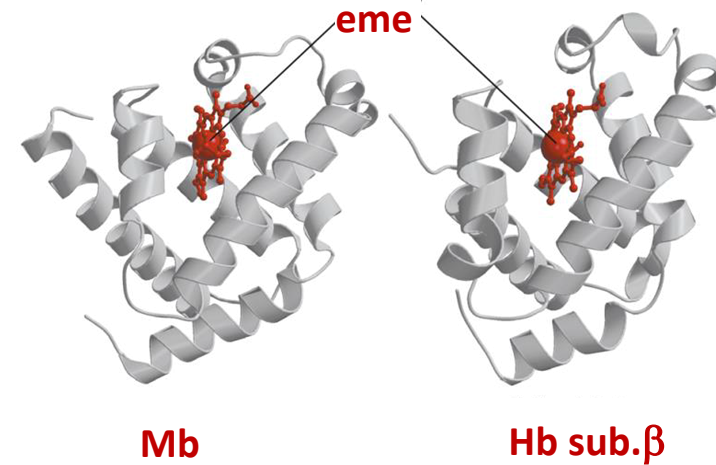
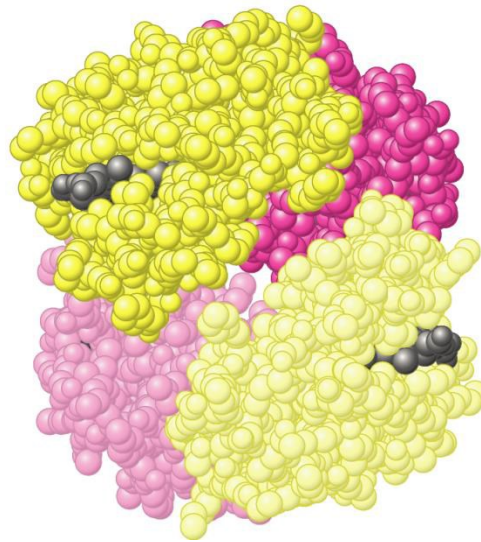
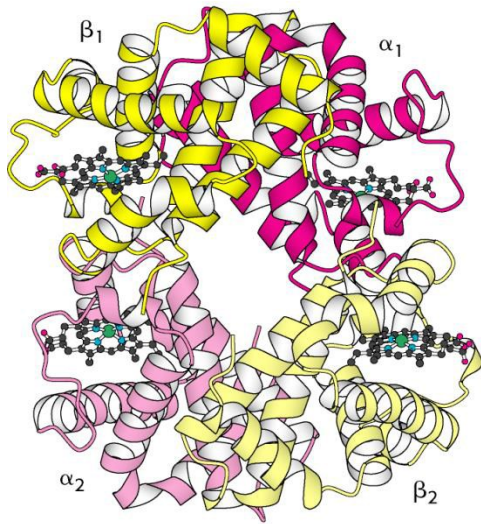


- ad un certo valore di pO_2 $Y \rightarrow \frac{1}{2}Y_{\max}$, ovvero il 50% dei siti di legame è occupato.
- questo valore di pO_2 è il P_{50} che per la mioglobina + ~ 2 Torr
- il pO_2 fisiologico (capillari) è ~20 Torr, quindi $Y \rightarrow 0.98$, è ~93% satura nel muscolo

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



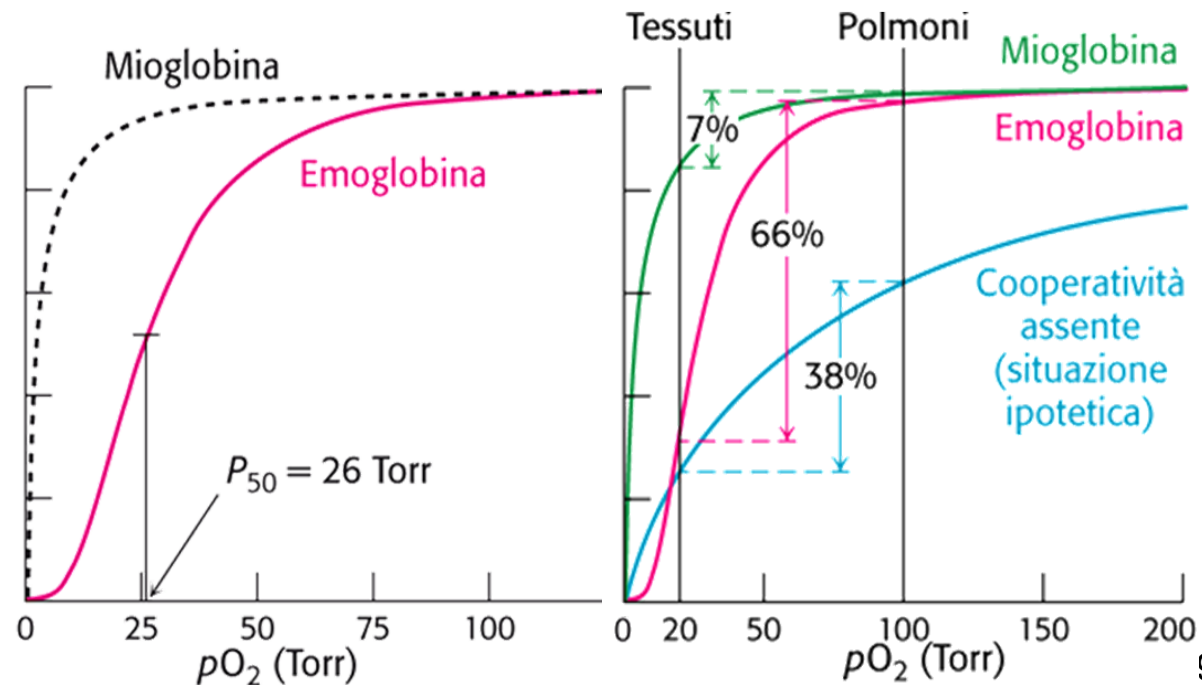
- le subunità sono connesse da multipli legami non-covalenti, che coinvolgono le diverse subunità con gruppi eme distanziati di ~30-40 Å
- hanno ~ il 25% di residui identici nelle loro sequenze e strutture 3D molto simili
- residui cruciali per il legame con O_2 e per la sua regolazione sono tutti conservati.

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

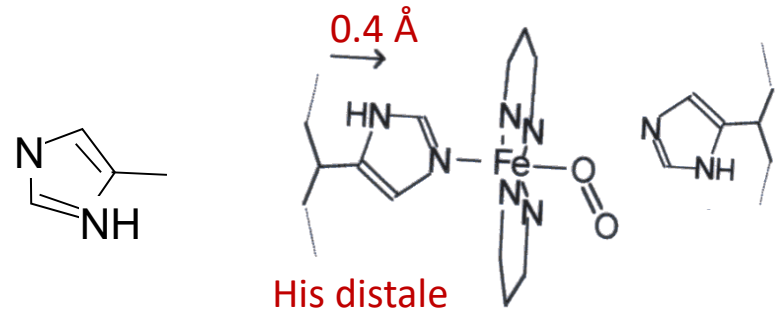
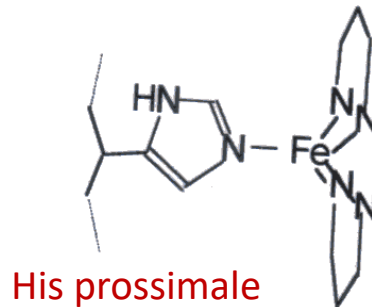
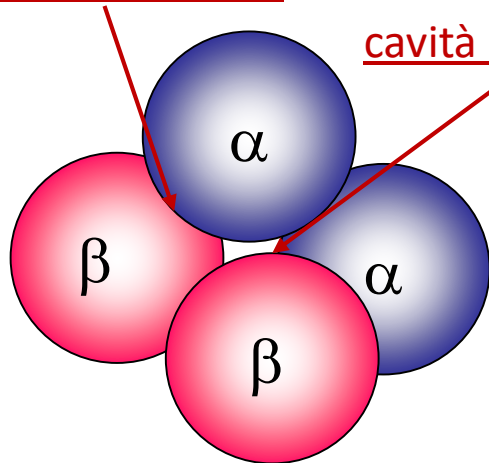
► Nell'Hb, due conformazioni alternative sono in equilibrio tra loro

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**

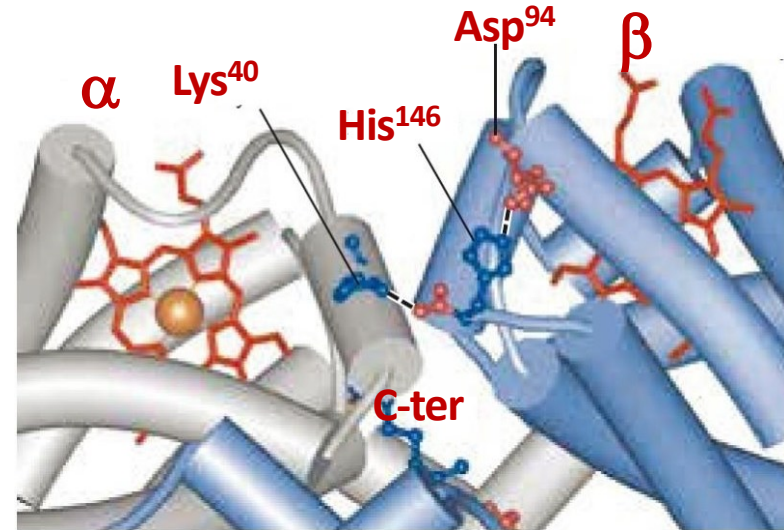
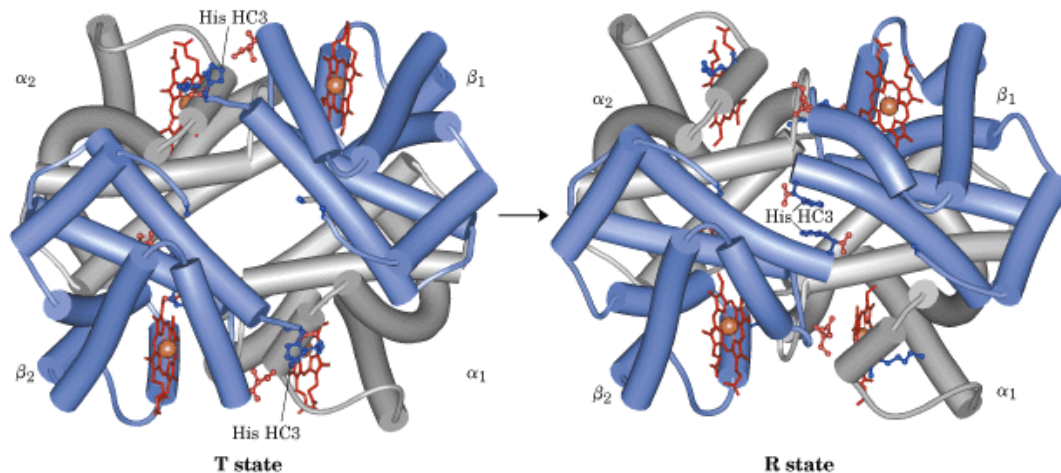
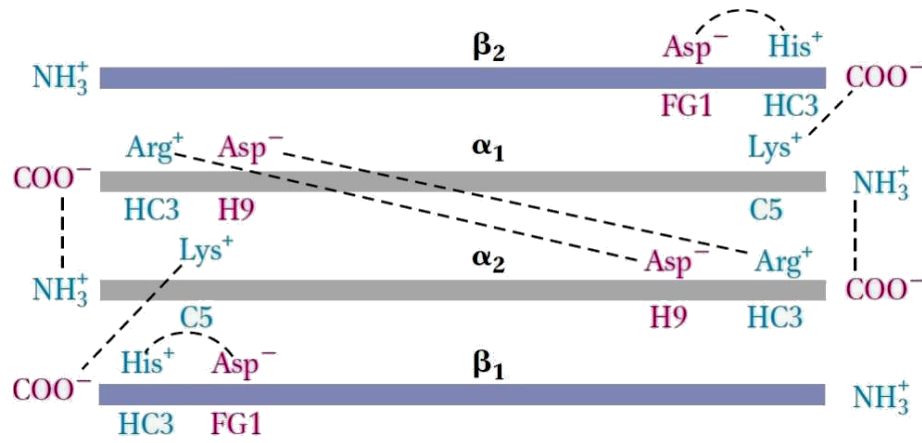


0.4 Å

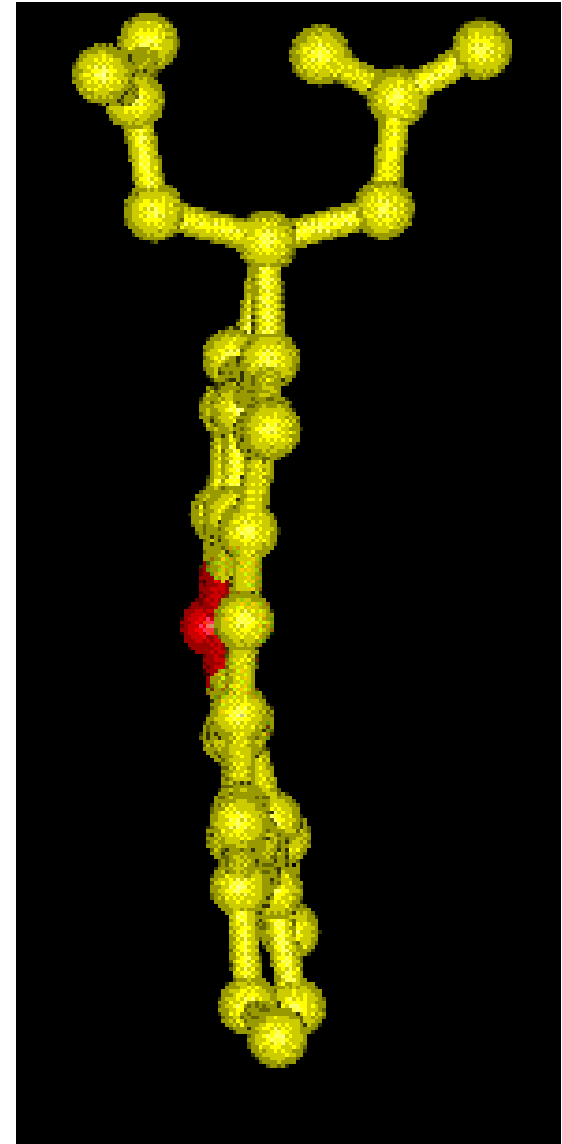
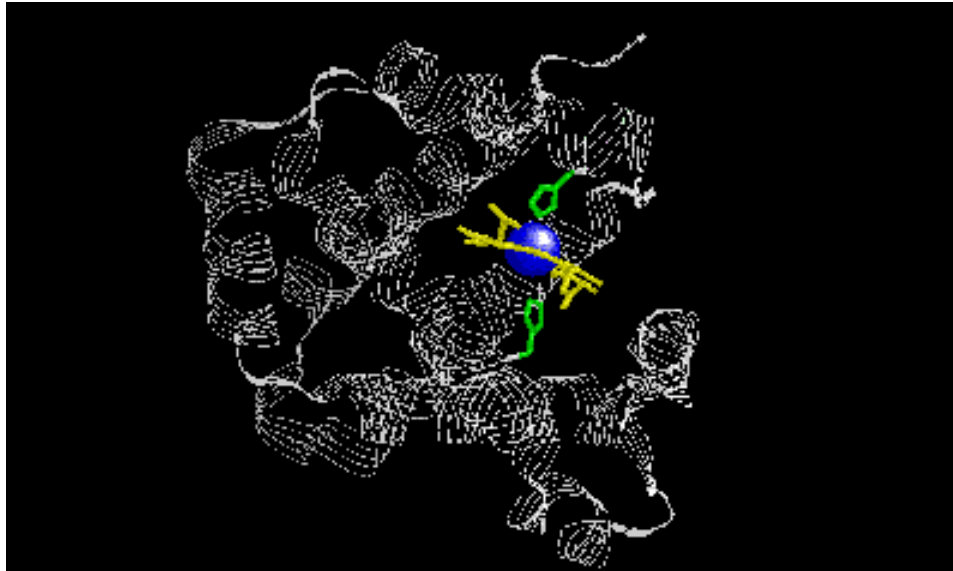
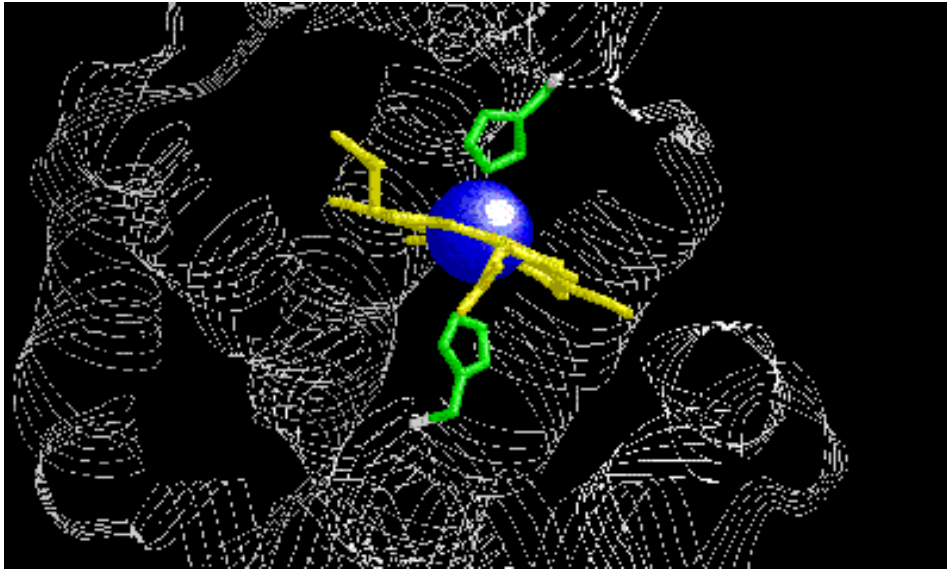
Effetto allosterico del legame dell'ossigeno nell'emoglobina

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

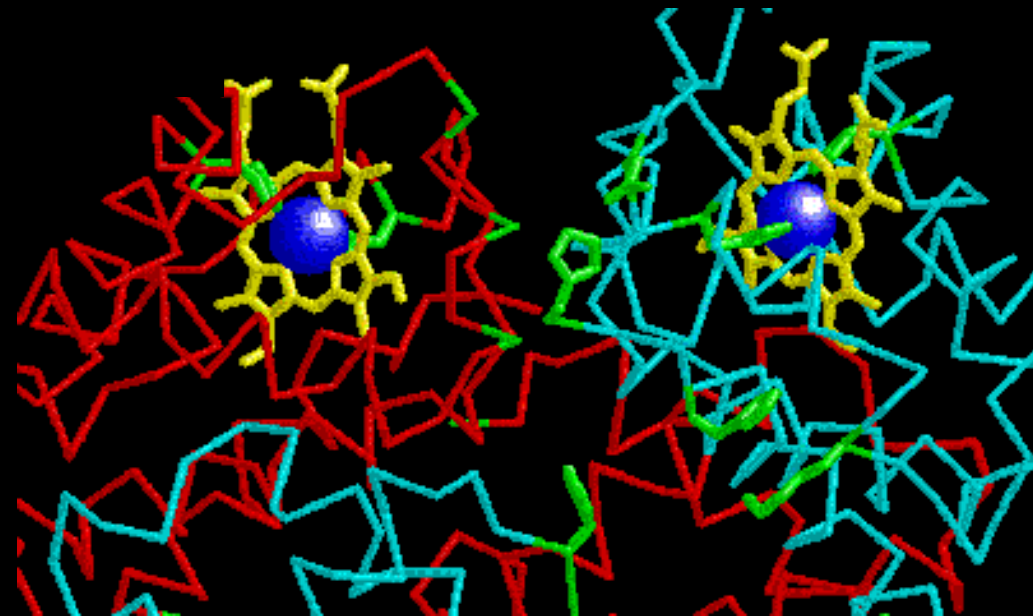
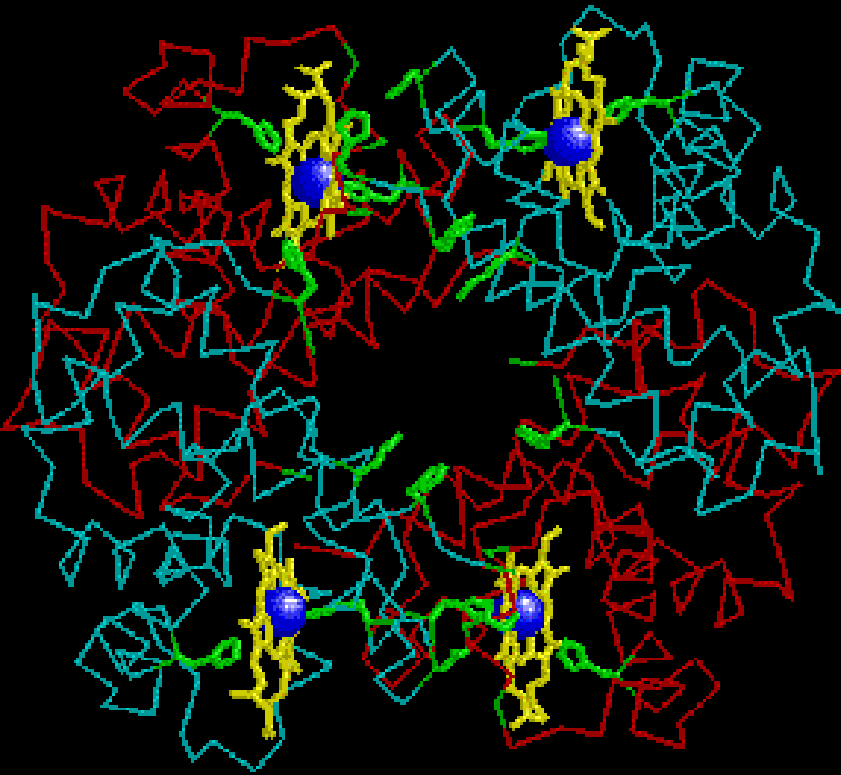
- per esempio (C-ter catene β)-COO⁻ con Lys⁴⁰(catene α); His¹⁴⁶ (β) con Asp⁹⁴(β)
- Il legame con O₂ ad una delle subunità innesca la variazione conformazionale che provoca la rottura dei ponti salini che favoriscono la transizione T $\rightarrow$ R



Effetto allosterico del legame dell'ossigeno nell'emoglobina



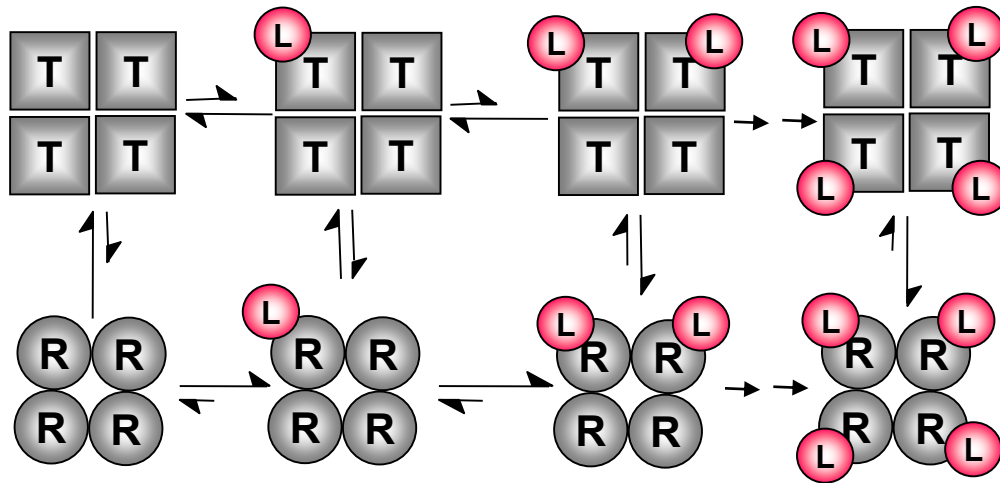
Effetto allosterico del legame dell'ossigeno nell'emoglobina



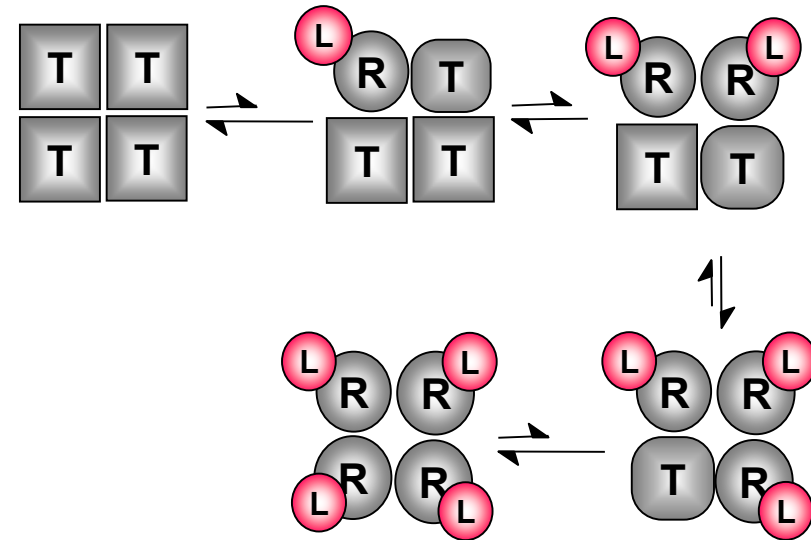
Modelli per l'effetto allosterico

► 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*

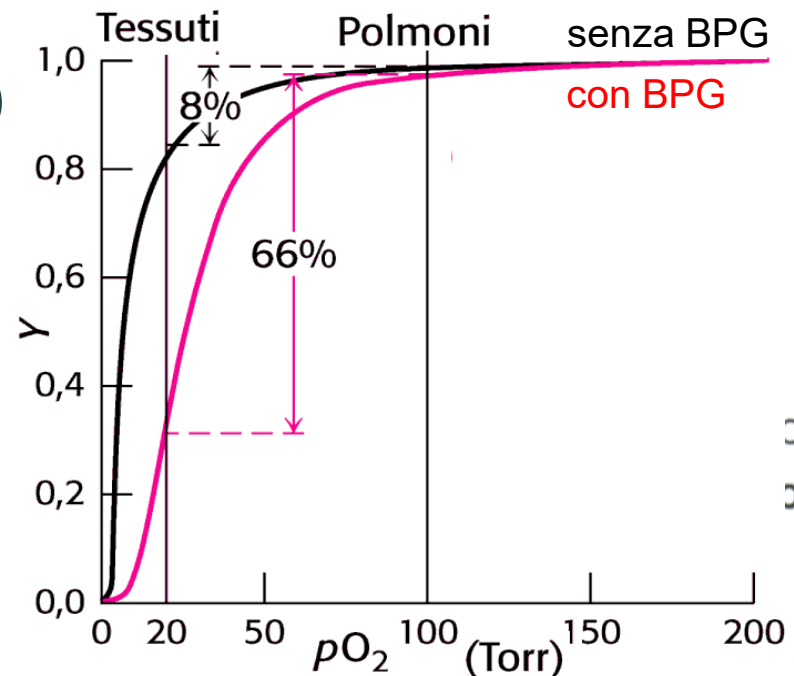
- Il legame di un ligando (substrato) al **sito attivo** di una proteina (enzima) aumenta l'affinità per i siti attivi in altre subunità (es. legame dell'O₂ nell'Hb)

▶ 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

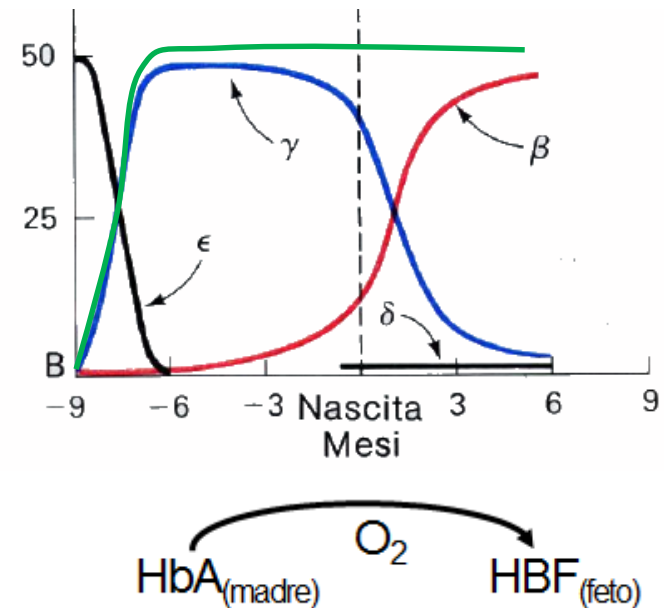
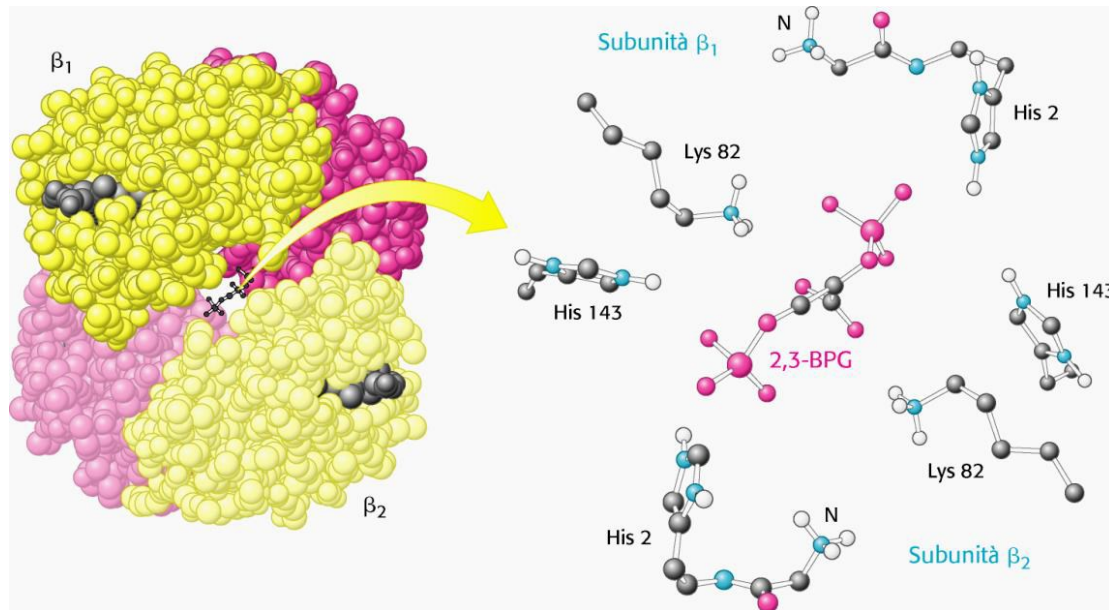
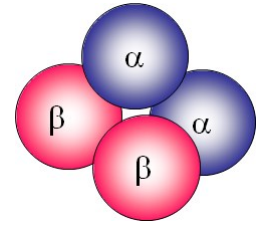
- Il **2,3-bisfosfoglicerato (2,3-BPG)** è presente nei globuli rossi a concentrazione pari a Hb (~2 mM)
- **stabilizza la forma T** dell'emoglobina
- **favorisce il rilascio di O₂** a livello tissutale
- senza regolatori < 10% di O₂ viene scaricato nei tessuti, con 2,3-BPG arriva al 66%
- [2,3-BPG] 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

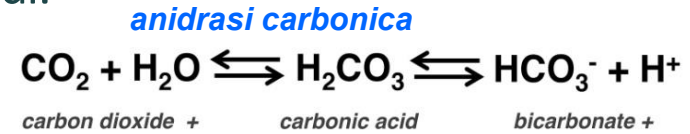
► Anche H⁺ e CO₂ sono effettori allosterici che regolano l'affinità per l'O₂

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

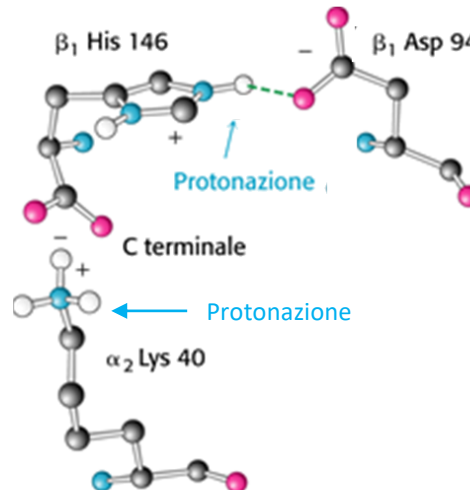
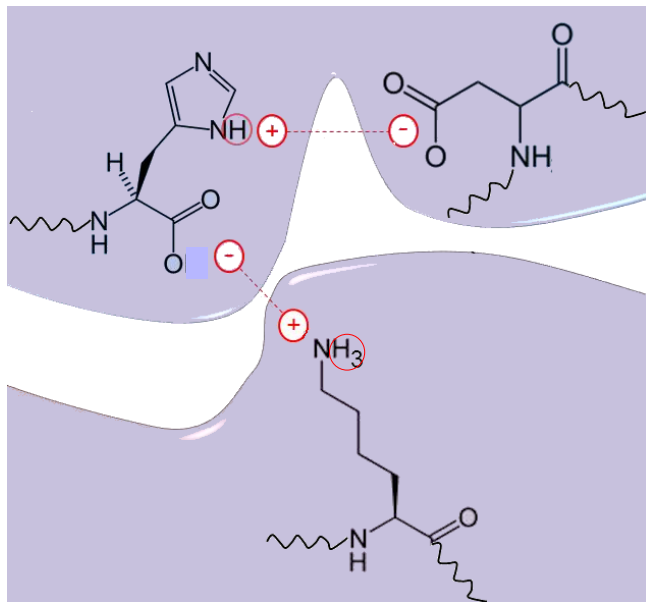
1) **riduce il pH nei tessuti (Effetto Bohr):**

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

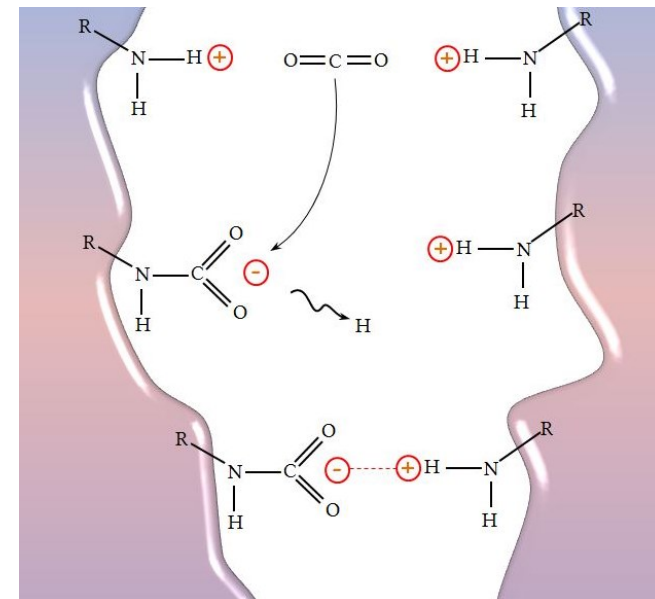
delle catene α e β nella cavità interstiziale.



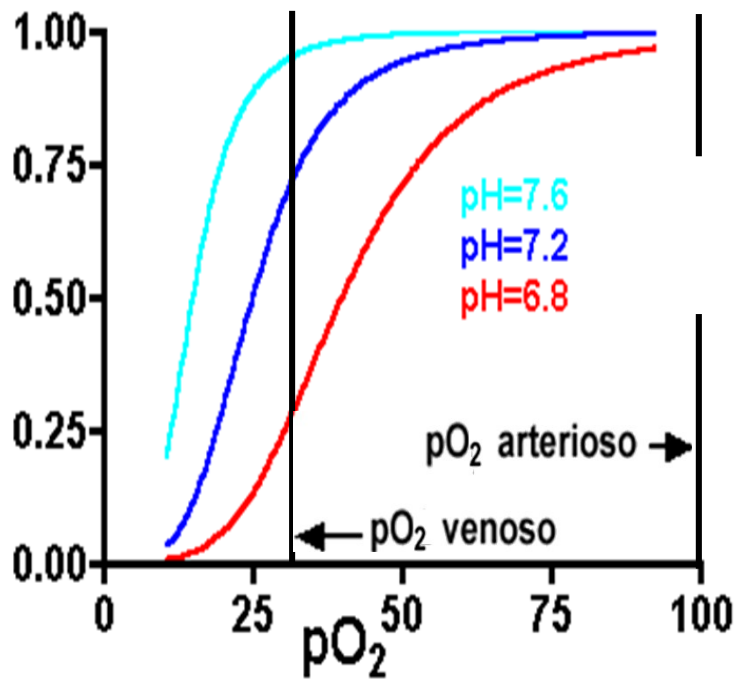
- si formano ponti salini aggiuntivi, che favoriscono la forma T, causando il rilascio di O₂
- Hb rilascia maggiori quantità di ossigeno dove ce ne è più bisogno, a livello dei tessuti a rapido metabolismo che producono H⁺ e CO₂.
- Parte del CO₂ metabolico viene trasportato di ai polmoni dall'Hb



+

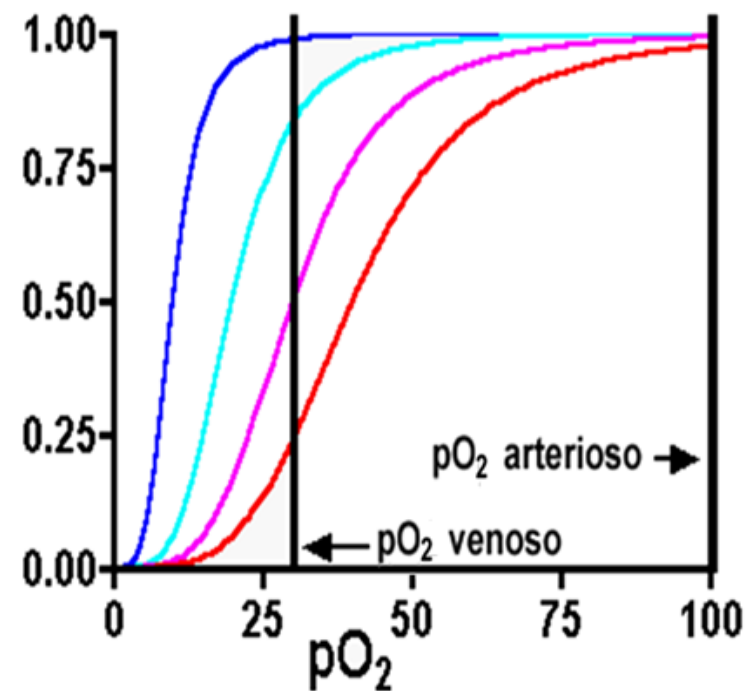


Effetto combinato del controllo allosterico



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

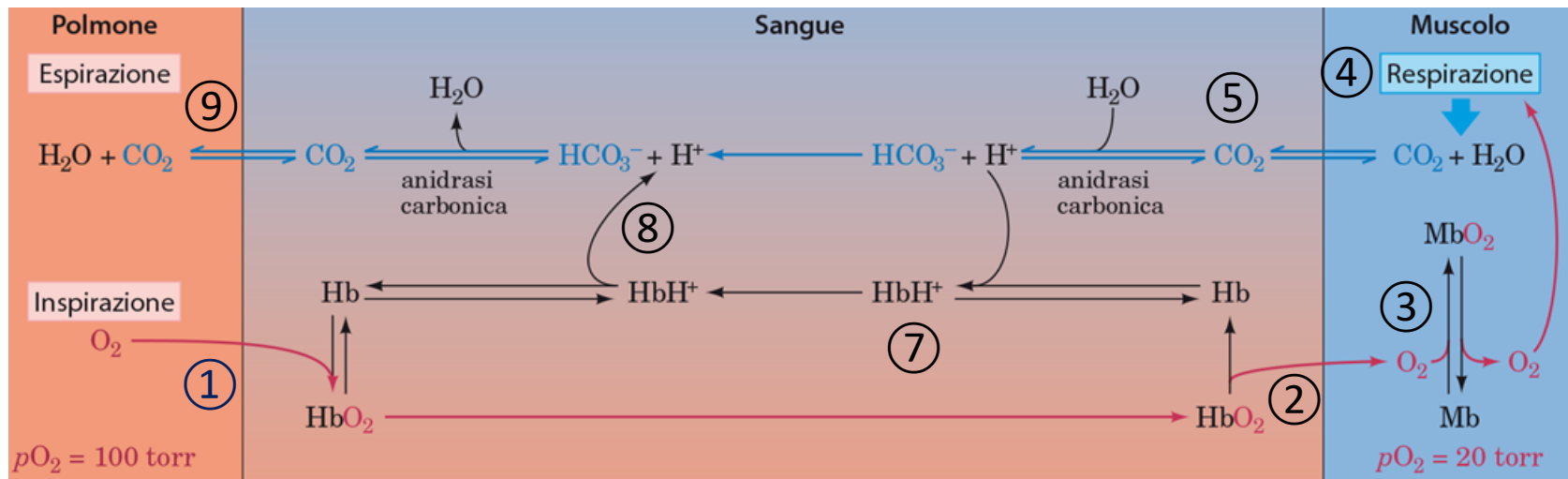
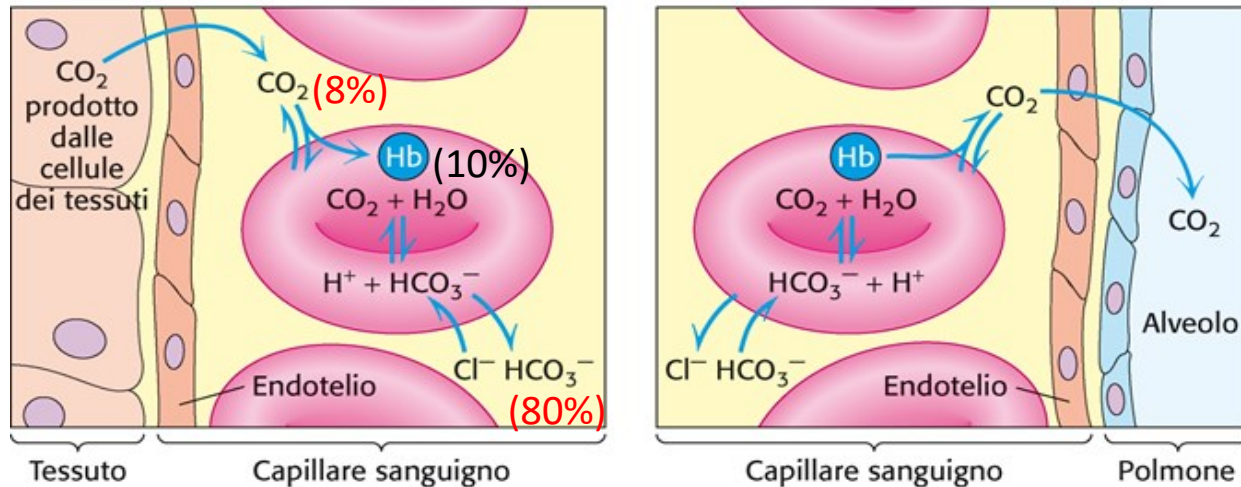
- **esercizio intenso:** riduzione del pO_2 a < 20 mm Hg $\rightarrow$ $< 20\%$ saturazione
- **effetto di CO₂:** $\sim 8\%$ va in soluzione nel siero, 80% convertito in acido carbonico ($pH \downarrow$)
 $\sim 10\%$ si lega all'Hb (come carbammato, trasportato ai polmoni)
- **effetto di CO:** anche se solo una molecola di CO lega ad uno dei quattro siti 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

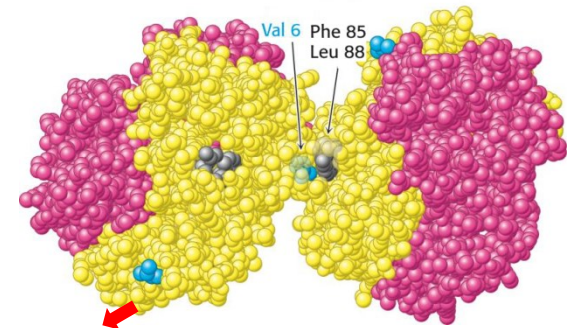
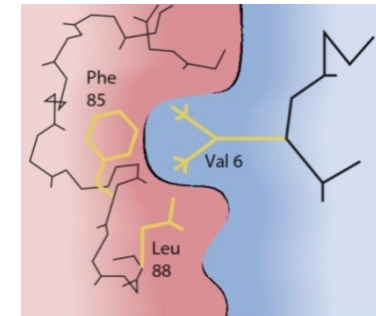
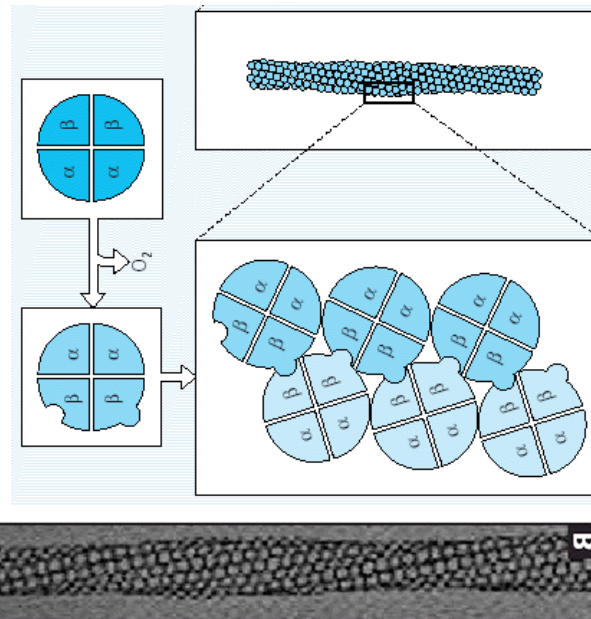
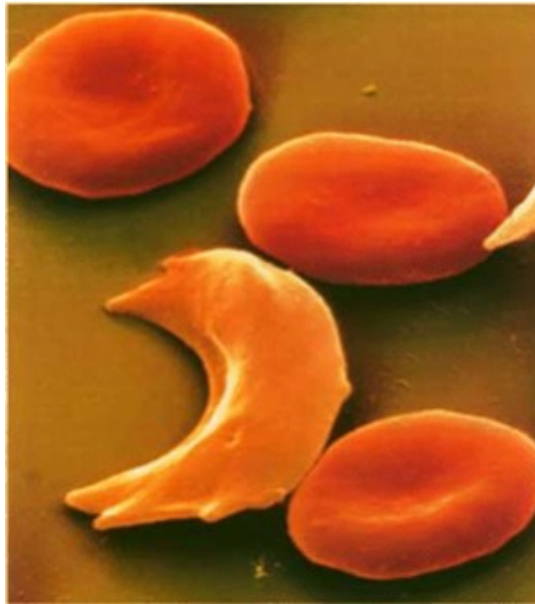
► L'anemia falciforme è la prima malattia genetica molecolare ad essere stata identificata

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

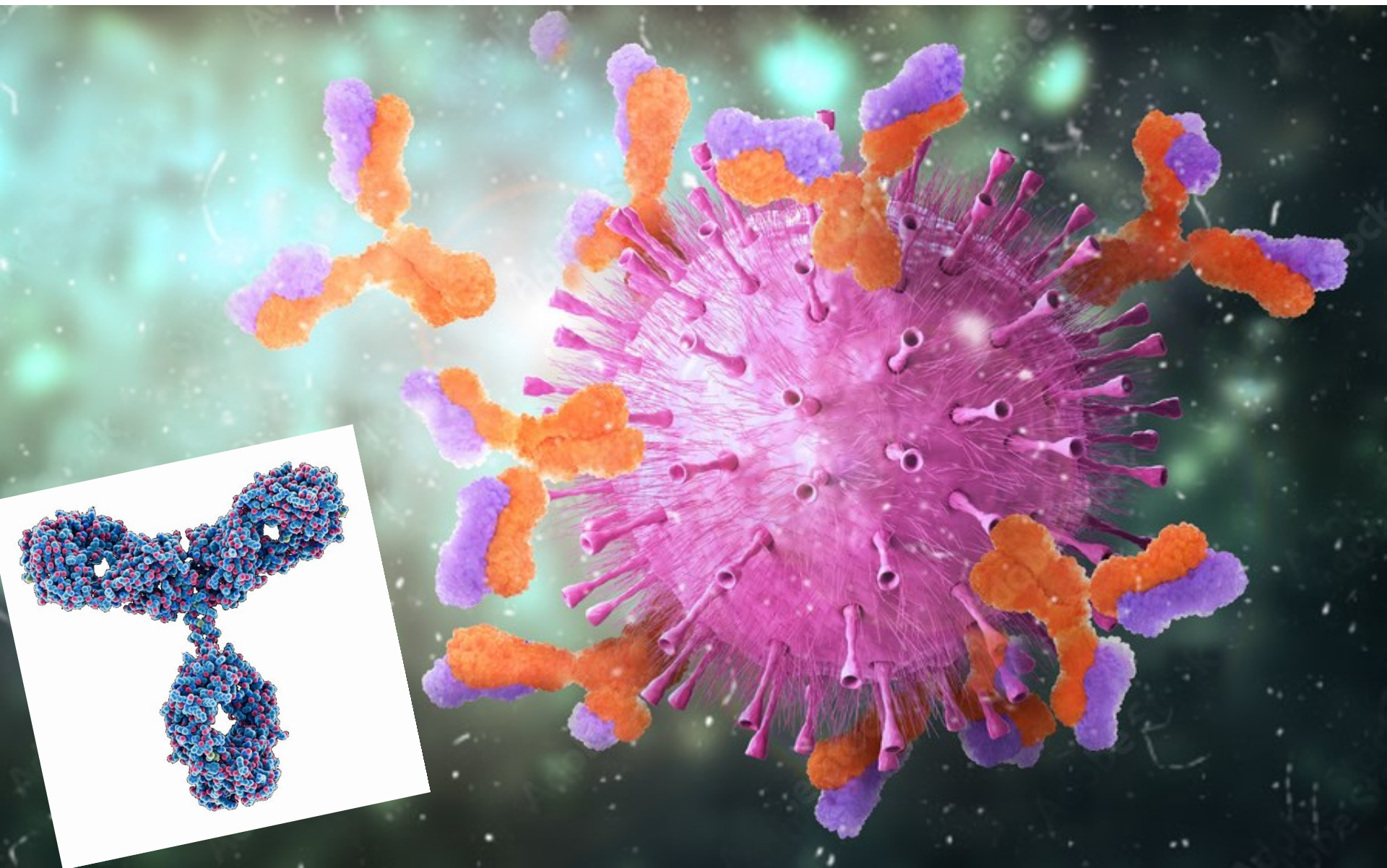
Catena β mutata nell'adulto (HbS)

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



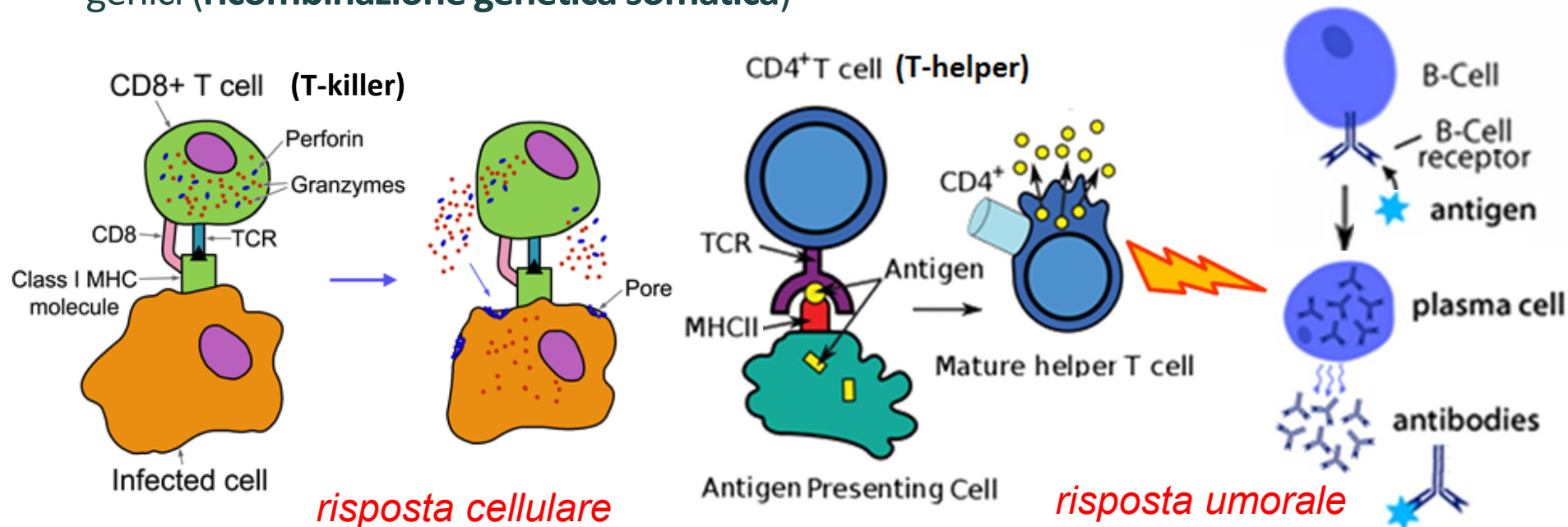
- Val⁶ è in superficie della subunità β in *deossi*HbS e interagisce con una tasca idrofobica di una subunità β in un'altra HbS, iniziando un processo anomalo di multimerizzazione (struttura 4^a aperta)
- si formano fibre insolubili di HbS non-funzionale, che alterano la morfologia degli eritrociti
-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

INTERAZIONE FRA PROTEINA E LIGANDO: LE IMMUNOGLOBULINE



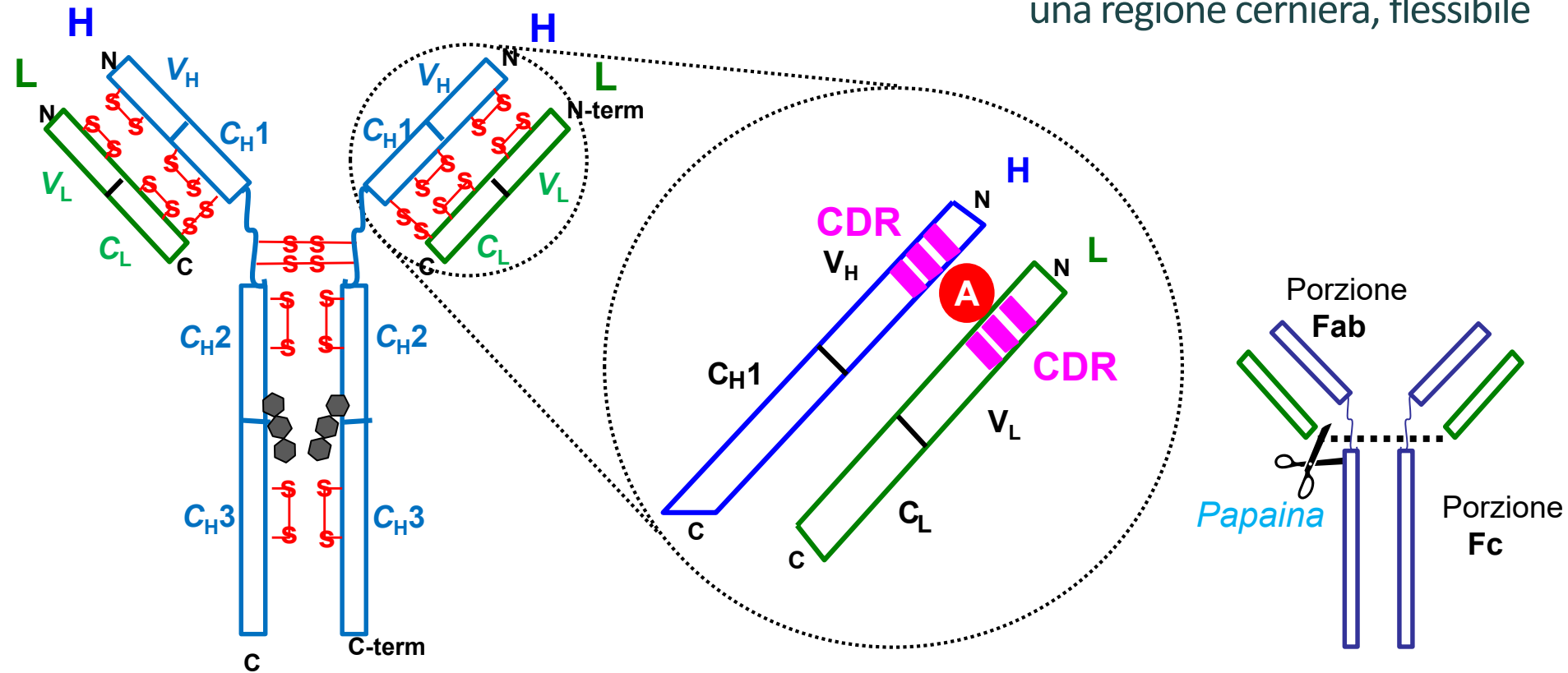
IMMUNOGLOBULINE

- 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 (con la 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

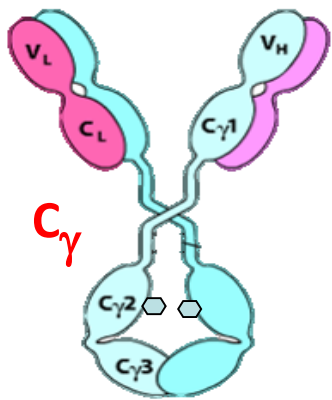


H = heavy chain (*catena pesante*) **L** = light chain (*catena leggera*) **C** = conserved **V** = variable

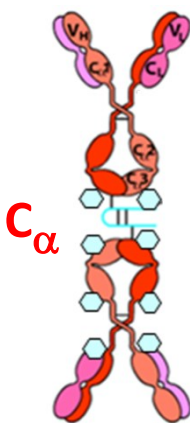
s-s ponti disolfuro **●●●** oligosaccaride **A** antigene **CDR** Complementarity Determining Region (Regione ipervariabile)

IMMUNOGLOBULINE: funzioni di F_{ab} e F_c

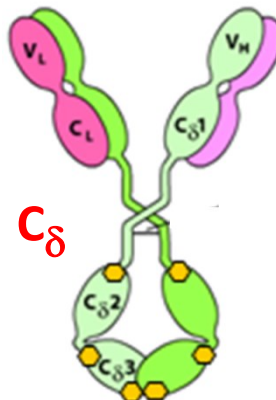
- ▶ La parte F_{ab} delle immunoglobuline riconosce l'antigene
 - il **sito di legame** è formato dalle **sequenze CDR** che legano l'epitopo nell'Ag
- ▶ La parte F_c media le funzioni effettrici a valle
 - interagisce con **recettori su cellule immunitarie** o con le **proteine del complemento**
- ▶ 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



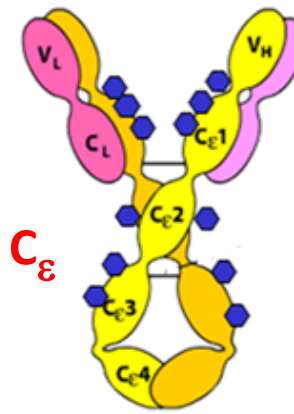
IgG (monomeriche)
siero (~ 80%)



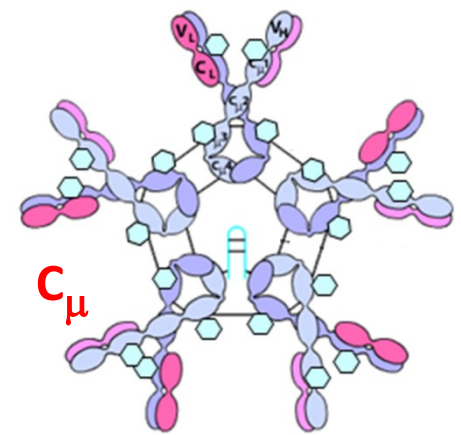
IgA (1-3-meriche)
secrez. esterne (~10%)



IgD (monomer.)
(?) ~0.1%



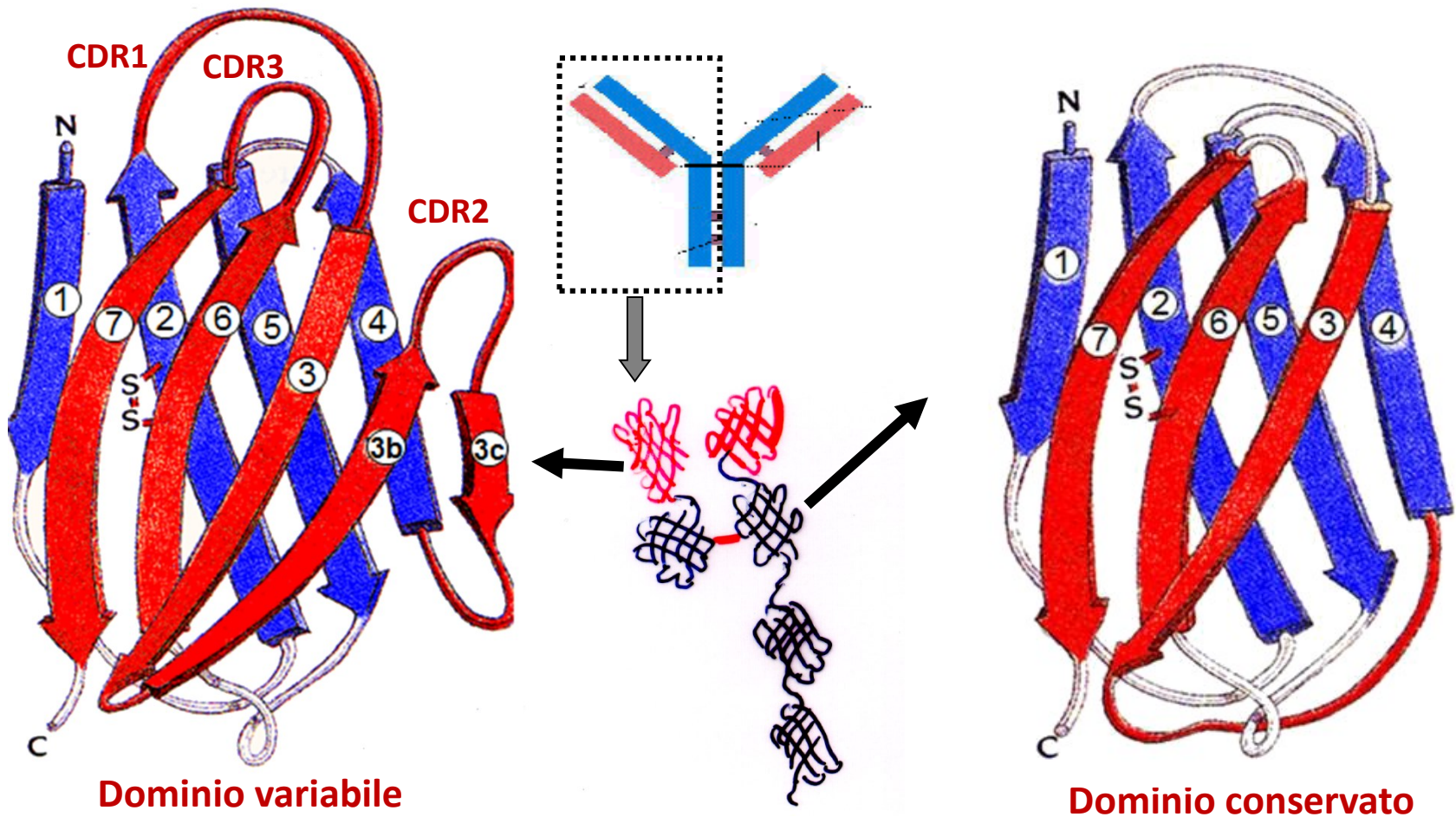
IgE (monomer.)
parassiti ~0.01%



IgM (pentameriche)
precoci ~10%

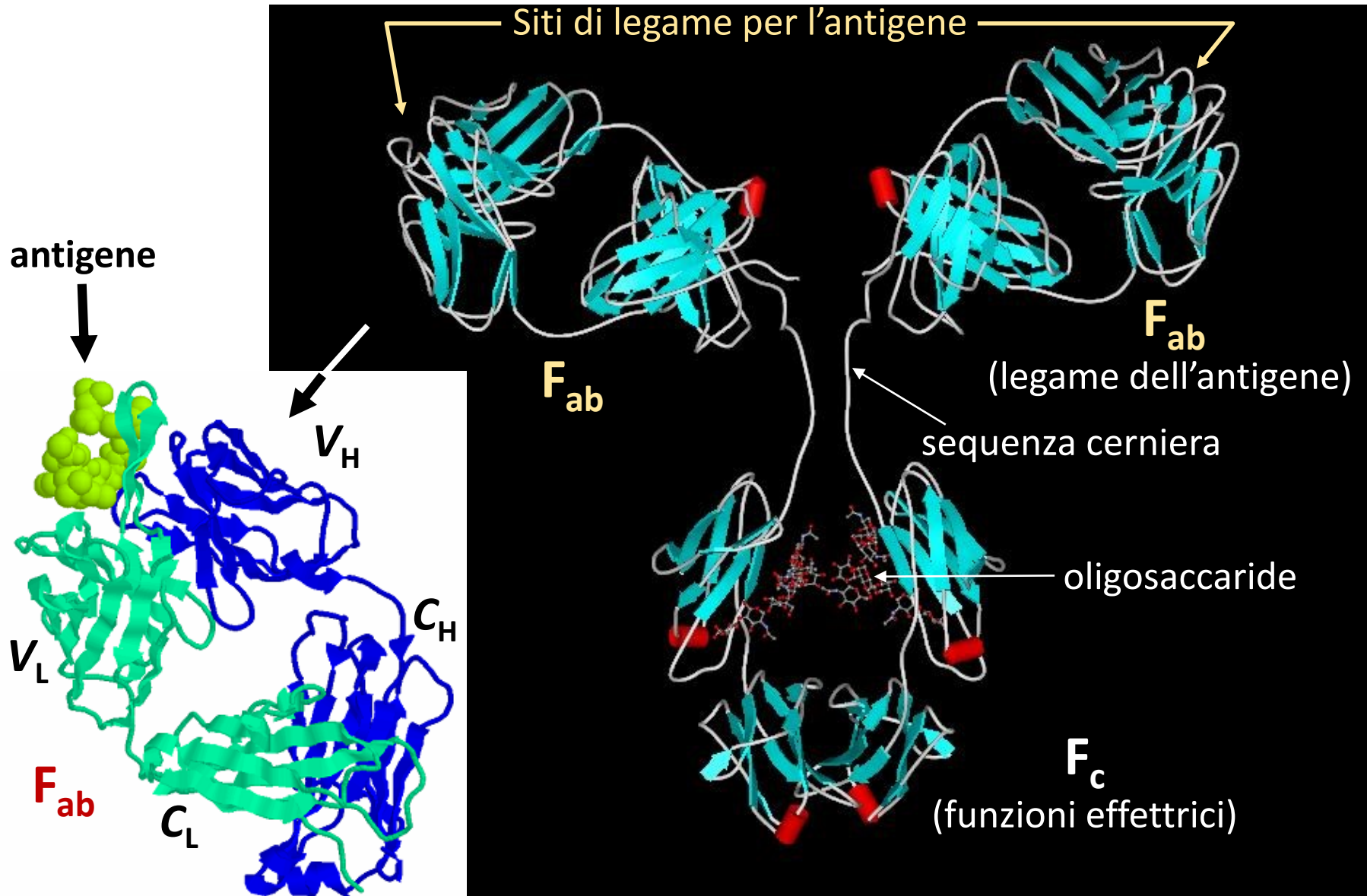
IMMUNOGLOBULINE: struttura 2^a

- 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

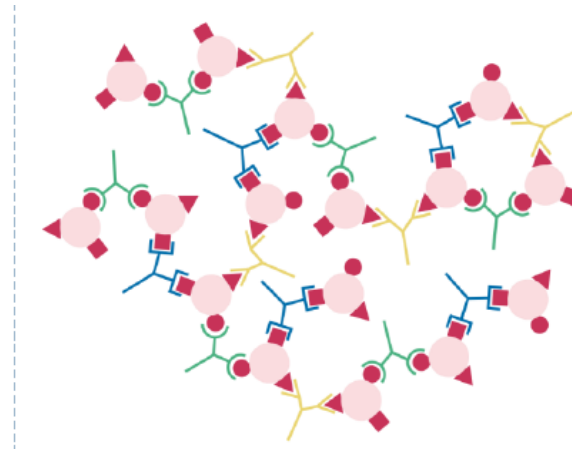
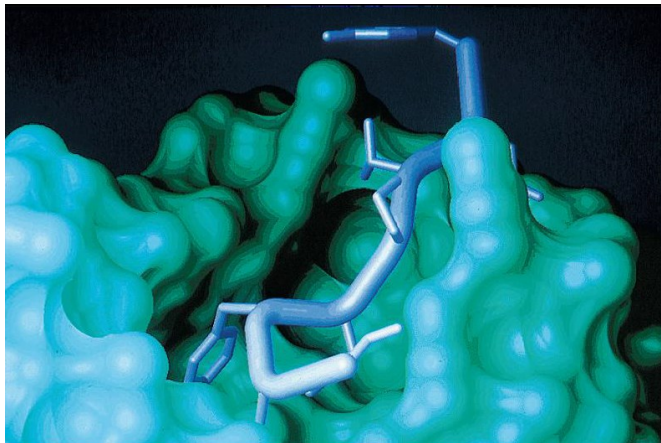
- Il sito di legame per l'antigene è formato dai domini V_L e V_H
- le Ig hanno una struttura 4^a?



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.

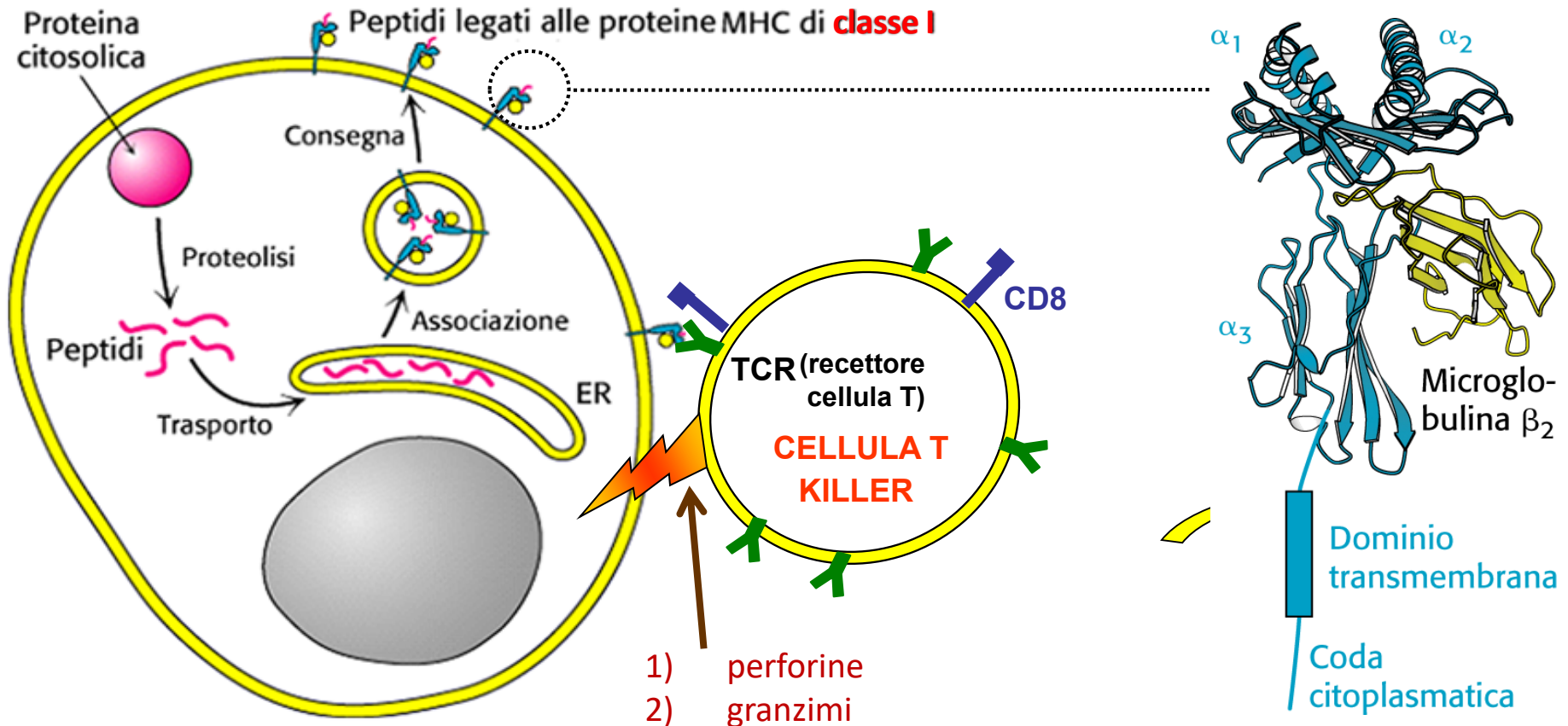


► Il sistema immunitario adattativo è dotato di memoria

- dopo la risoluzione dell'infezione i linfociti attivati diminuiscono in numero, ma **non ai livelli iniziali**
- questo rende molto **più rapida la risposta ad una seconda infezione** da parte dello stesso agente

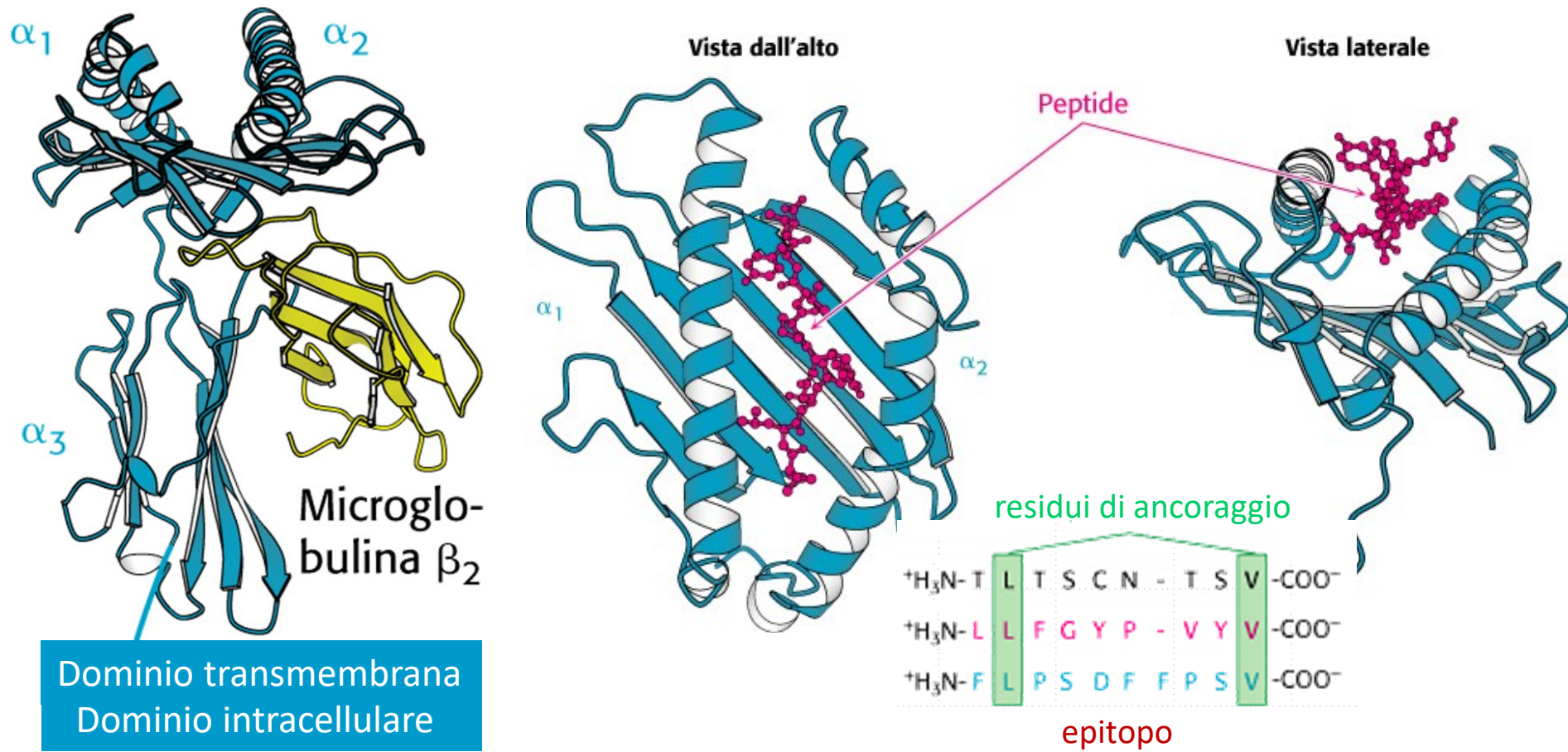
MAJOR HISTOCOMPATIBILITY COMPLEX: presentazione dell'antigene

- ▶ 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.



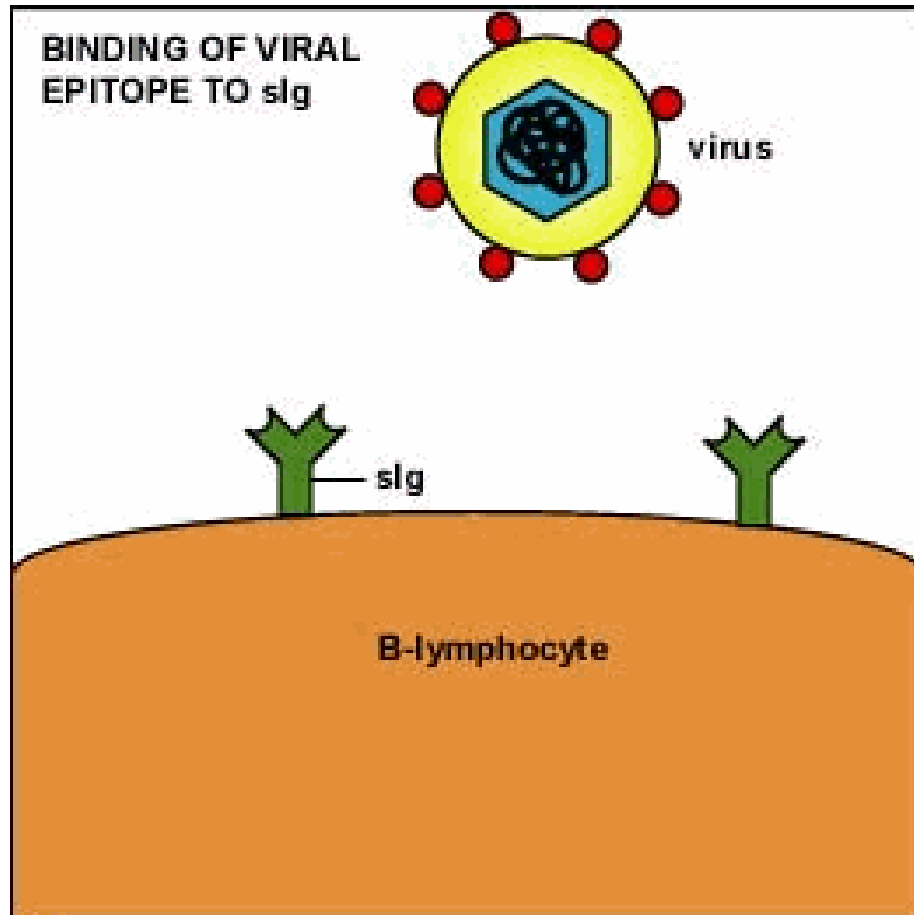
Major Histocompatibility Complex: struttura

- ▶ 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)

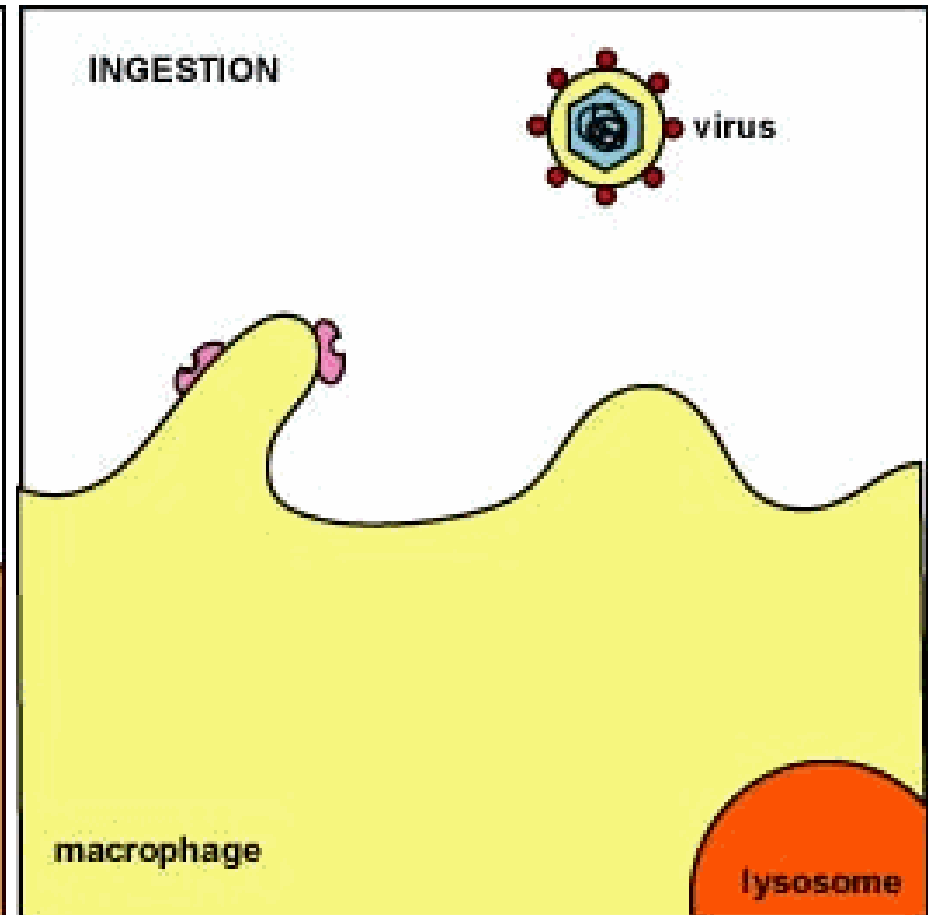


MHCII e le Antigen Presenting Cells (APC)

Linfociti B



Fagociti: macrofagi / cellule dendritiche



Gli anticorpi sono utilissimi strumenti sperimentali

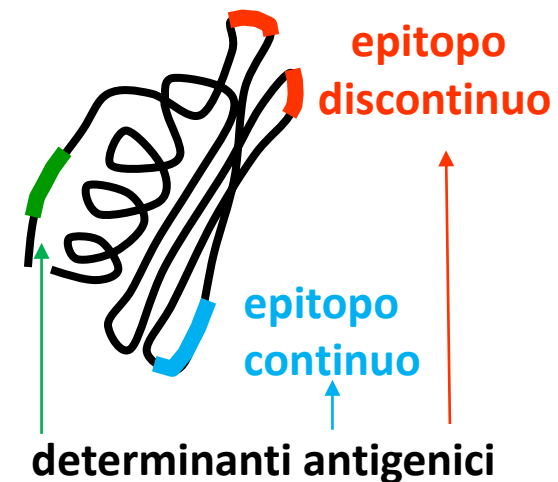
- Le Ig riconoscono determinanti antigenici (DA) in molecole bersaglio con elevata precisione
 - possono **identificare**, **isolare** o **eliminare** la molecola bersaglio (o la cellula che la esprime)
 - è però necessario disporre dell'**Ig specifica** – è possibile ottenerla identificando il DA
 - 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

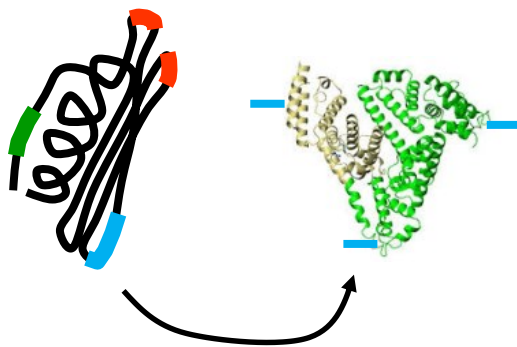
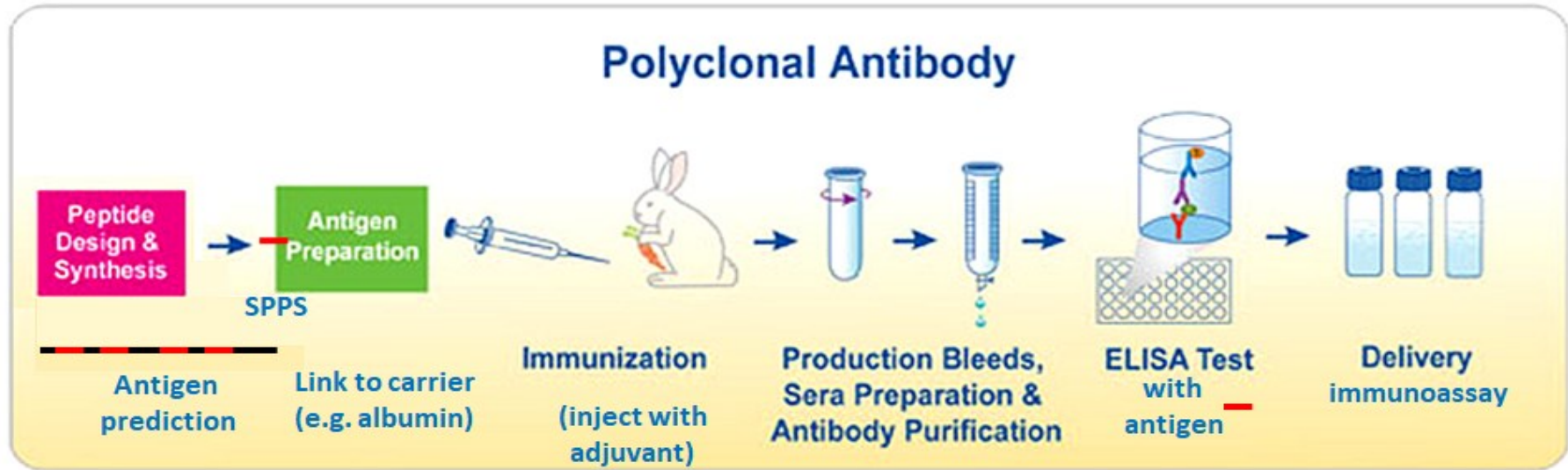
polare



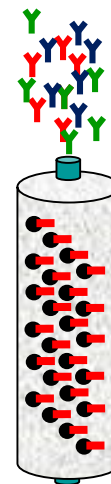
Produzione di anticorpi policlonali

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

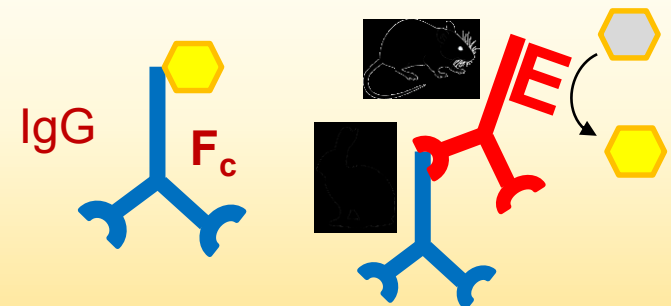
- alcune diverse linee di linfociti B riconoscono diverse parti dell'antigene
- sono comunque molto utili a scopo diagnostico



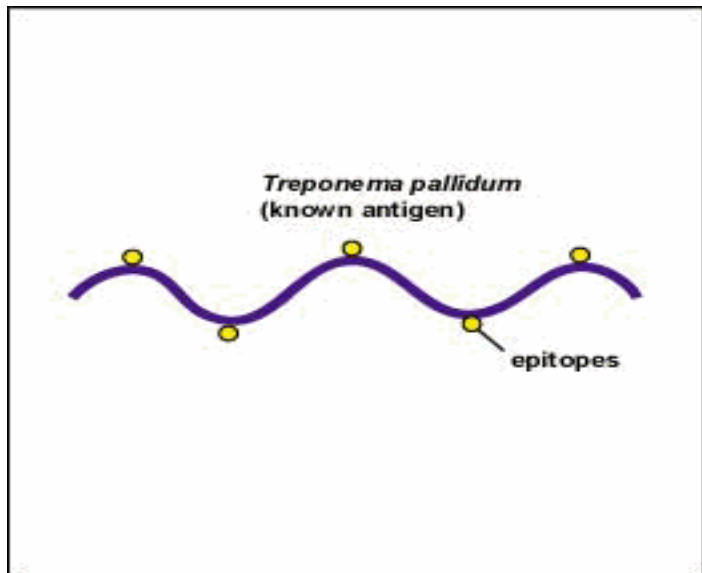
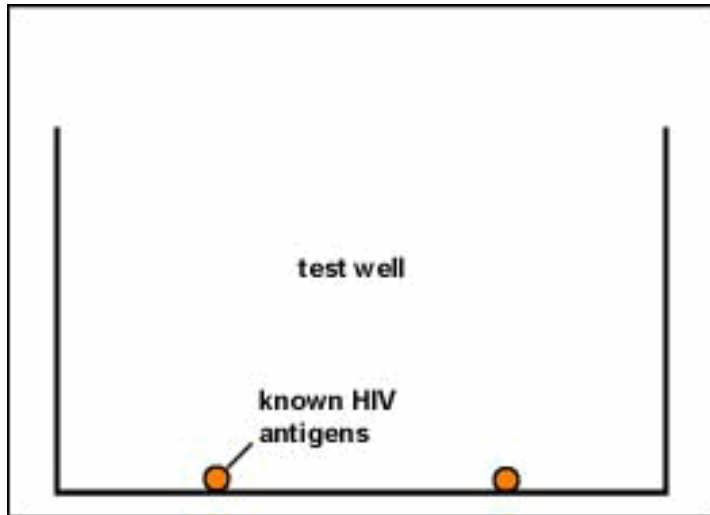
Affinity
Chromatography
With
Immobilized
antigen



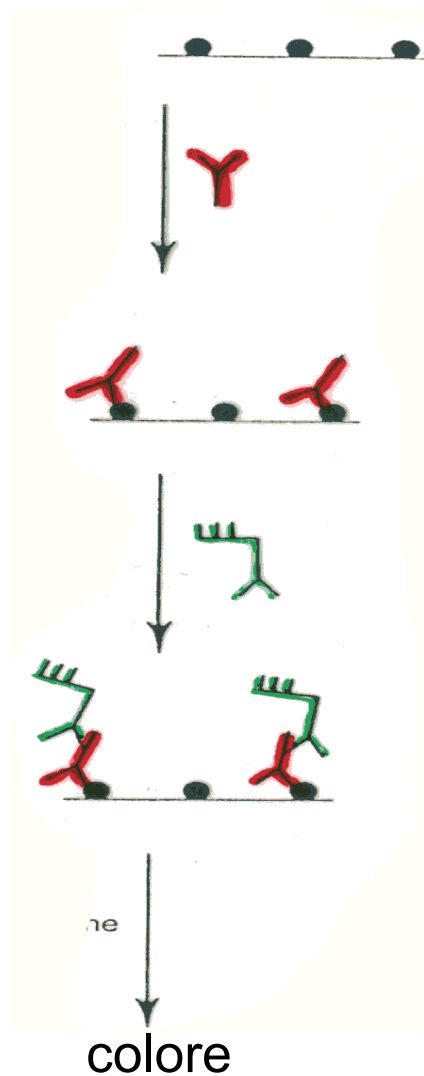
Evidenziare l'anticorpo



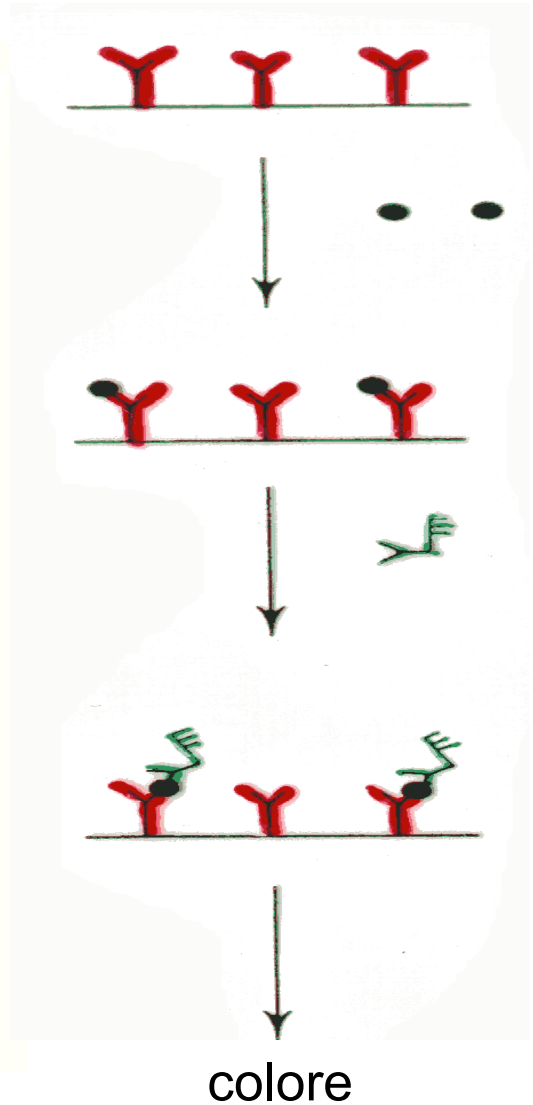
ELISA: Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay



ELISA indiretto



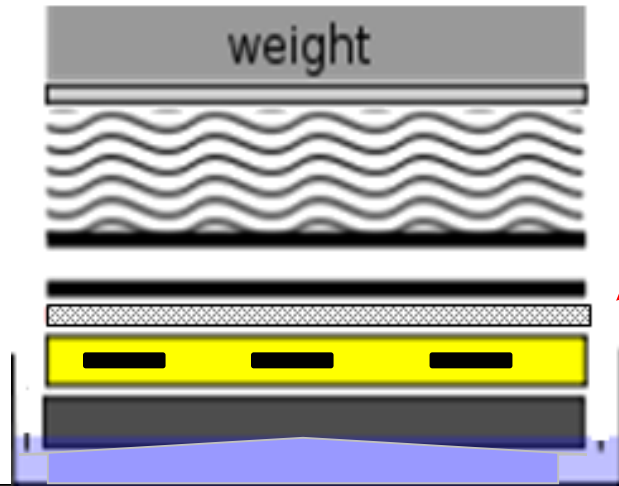
e a sandwich



Western Blot

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

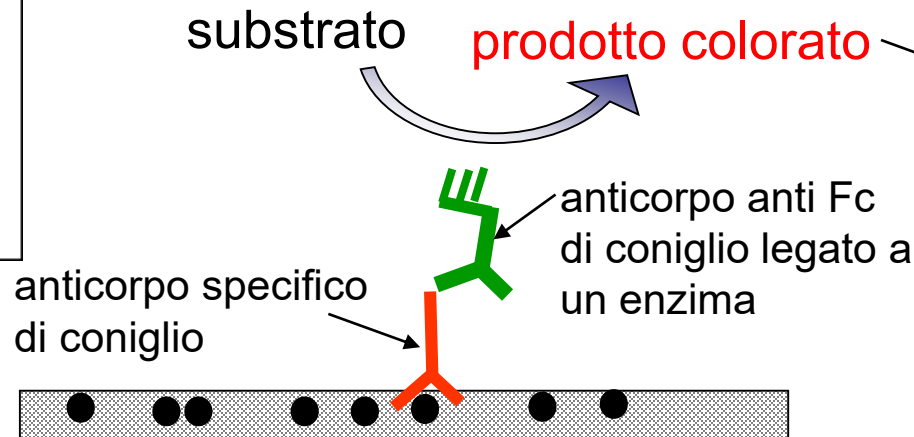
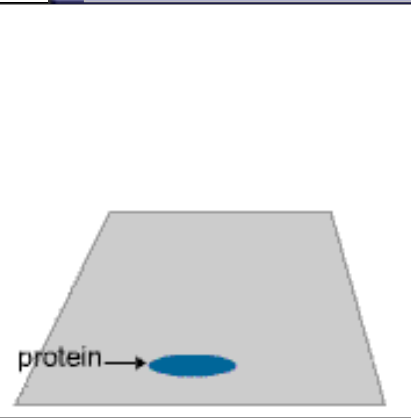
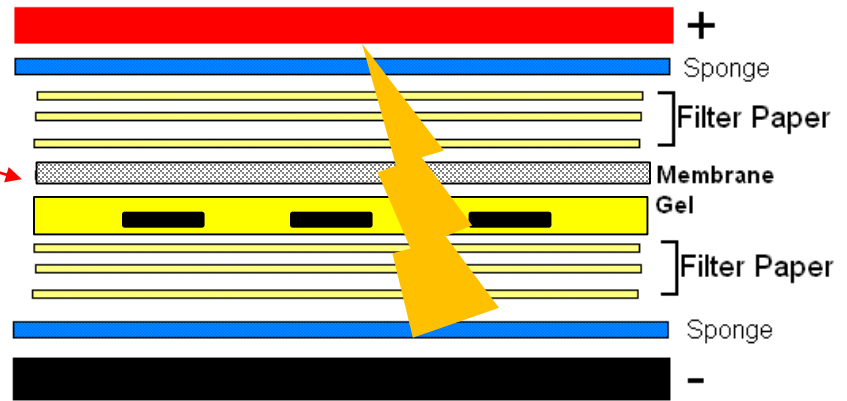
Blot a capillarità



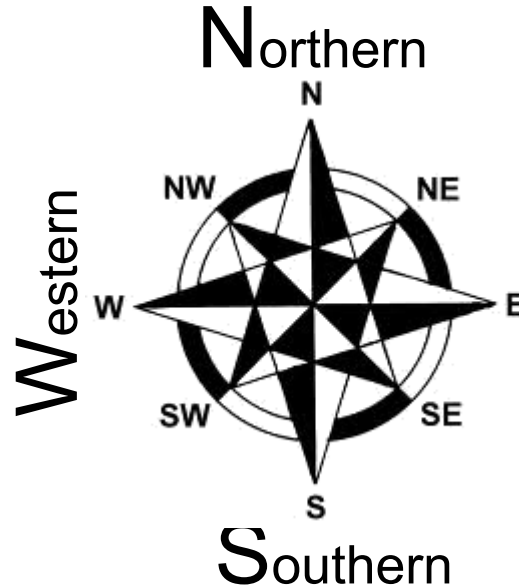
membrana di nitrocellulosa

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).

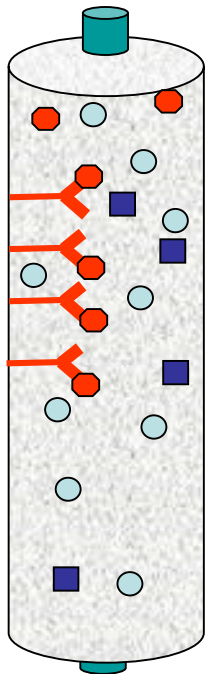
Gli anticorpi come strumenti sperimentali

Epitopo + Ig $\rightarrow$ elevata affinità e selettività

interazione

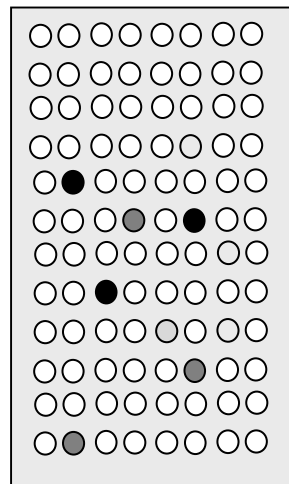
separazione

colonne di affinità



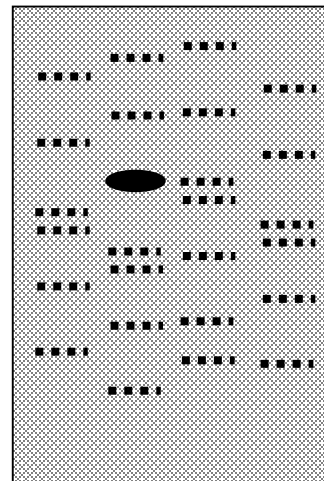
identificazione
diagnostica

saggi ELISA

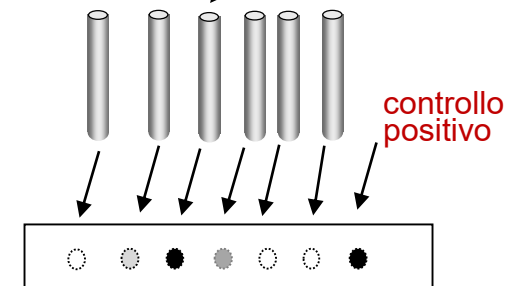
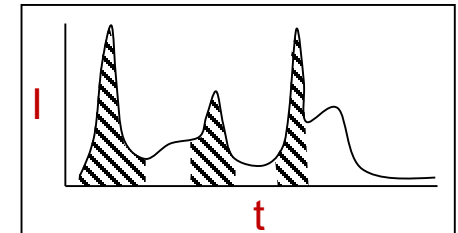


Identificazione dell'antigene
sperimentale

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)