

Struttura e funzione biologica delle immunoglobuline (*)

ZOLTAN OVARY

*Department of Pathology, New York University School of Medicine,
New York, N. Y., U.S.A.*

Il ruolo degli anticorpi nei trapianti è oggetto di controversia. Sebbene nessuno metta in dubbio l'importanza dei meccanismi immunologici nel rigetto dei trapianti, alcuni ricercatori ritengono che tale rigetto sia mediato da anticorpi, altri invece pensano ad altri fattori immunologici. Il ruolo degli anticorpi nella facilitazione immunologica dell'attecchimento dei tumori trapiantabili è un altro interessante fenomeno non ancora del tutto chiarito.

Una migliore comprensione della struttura degli anticorpi e delle immunoglobuline in generale è il primo requisito per chiarire questi fenomeni e rappresenta l'obbiettivo di molti scienziati. Negli ultimi anni è stato realizzato un enorme progresso in questo campo, dimostrato dal fatto che l'Organizzazione Mondiale della Sanità ha creato un Comitato per stabilire una nomenclatura delle immunoglobuline (CEPPELLINI *et al.*, 1964). Tale nomenclatura sarà qui seguita.

Un grande interesse nella struttura delle immunoglobuline venne suscitato dagli studi iniziali di PORTER (1959) sulla digestione delle gammaglobuline da parte di papaina cristallina. Gli studi di Porter aprirono un nuovo campo di ricerche. È stato dimostrato che le immunoglobuline sono costituite da diverse catene polipeptidiche (EDELMAN & POULIK, 1961; EDELMAN *et al.*, 1961), come l'insulina e l'emoglobina. Sono stati trovati due tipi di catene: catene L ed H (CEPPELLINI *et al.*, 1964). È stato possibile isolare queste catene polipeptidiche senza alterare le loro attività biologiche (FLEISCHMAN, PAIN & PORTER, 1962).

Sono state anche trovate differenze significative nella composizione in amminoacidi di anticorpi della stessa classe ma diretti contro antigeni differenti (anticorpi di specificità diverse) (KOSHLAND & ENGLBERGER, 1963; BASSETT *et al.*, 1965). Infine, sono state stabilite le sequenze di amminoacidi

(*) Conferenza tenuta il 6 luglio 1966 nell'Istituto Superiore di Sanità per i Seminari dei Laboratori di Microbiologia.

di diverse proteine di Bence-Jones (simili alle catene L) (HILSCHMANN & CRAIG, 1965; TITANI *et al.*, 1965). Gli studi sulla sequenza dell'altra catena (catena H) sono in corso: i risultati preliminari sono stati pubblicati recentemente (GIVOL & PORTER, 1965; PORTER & PRESS, 1965).

In questi ultimi anni sono state pubblicate alcune rassegne sulle immunoglobuline (COHEN & PORTER, 1964; FUDENBERG, 1965), che vanno consultate per maggiori dettagli e per la bibliografia. Questa rassegna descrive una struttura schematica della molecola anticorpale e comprende alcuni dati recenti non pubblicati nelle precedenti rassegne.

Attualmente si conoscono le seguenti classi di immunoglobuline umane (e di mammiferi):

1) IgM o γ M (in precedenza β 2M, γ 1M, macroglobulina e 19S γ). Peso molecolare circa 890.000 (MILLER & METZGER, 1965; LAMM & SMALL, 1966); costante di sedimentazione 19S; migrazione elettroforetica nella regione β . Questo anticorpo è apparentemente il primo ad essere sintetizzato durante l'immunizzazione primaria (BAUER & STAVITSKY, 1961; UHR, FINKELSTEIN & BAUMAN, 1962; SVEHAG & MANDEL, 1964), sebbene questo sia stato recentemente posto in discussione (FREEMAN & STAVITSKY, 1965; ROBBINS, ALTMEIER & SMITH, 1966). La valenza della IgM è stata determinata (ONOUÉ *et al.*, 1965). Se si assume un peso molecolare di 890.000 questo anticorpo è pentavalente, cioè si può combinare con cinque determinanti antigenici.

2) IgG o γ G (in precedenza γ , γ 2, 7S, 6,6S). Peso molecolare 140.000 (COHEN & PORTER, 1964); costante di sedimentazione 6,6S; migra nella regione γ . Questo anticorpo è bivalente, cioè ha due siti di combinazione.

In molte specie sono state identificate delle sottoclassi di questa immunoglobulina. Nell'uomo sono state trovate quattro sottoclassi (GREY & KUNKEL, 1964; TERRY & FAHEY, 1964). Nella cavia ci sono due classi di anticorpi e immunoglobuline IgG; la γ 1 a più elevata mobilità elettroforetica e la γ 2 a più bassa mobilità (BENACERRAF *et al.*, 1963; OVARY, BENACERRAF & BLOCH, 1963; BLOCH *et al.*, 1963; WHITE, JENKINS & WILKINSON, 1963). Nel topino la situazione è ancora più complessa; accanto alla γ 1 (MERRYMAN & BENACERRAF, 1963; FAHEY, WUNDERLICH & MISHILL, 1964a) esistono due anticorpi γ 2, precisamente γ 2a e γ 2b (FAHEY, WUNDERLICH & MISHILL, 1964b; OVARY, BARTH & FAHEY, 1965).

3) Nell'uomo è stata trovata recentemente una immunoglobulina ad alta mobilità elettroforetica (ROWE & FAHEY, 1965) con una costante di sedimentazione di 7S; viene indicata come IgD o γ D. Questa classe non è stata trovata in specie diverse da quella umana.

4) IgA o γ A (in precedenza β 2A o γ 1A). Questo anticorpo apparentemente polimerizza con grande facilità; quindi la costante di sedimentazione è variabile, generalmente tra 7S e 13S. Nel secreto della ghiandola parotidea

è stata trovata una immunoglobulina molto vicina alla IgA (TOMASI *et al.*, 1965). La IgA è stata trovata nel coniglio (ONOUÉ, YAGI & PRESSMAN, 1964) e nel topino (FAHEY, WUNDERLICH & MISHALL, 1964a) ma non ancora nella cavia.

5) Infine, nel 1966, Ishizaka (ISHIZAKA & ISHIZAKA, 1966) ha dimostrato che l'anticorpo reaginico umano responsabile delle allergie umane rappresenta una nuova classe di anticorpi, che migrano nella regione delle IgA; tale classe viene indicata come IgE o γ E.

In base alle proprietà biologiche, la IgE umana è stata messa in relazione con la γ 1 della cavia e del topino. Nel ratto (MOTA, 1964; BINAGHI & BENACERRAF, 1964) e nel coniglio (ZVAIFLER & BECKER, 1965) sono stati trovati anticorpi simili, ma in quantità talmente piccole che non è stato possibile studiarli dal punto di vista immunochimico.

Le diverse classi di immunoglobuline possono essere dirette contro lo stesso antigene o determinante antigenico; quindi gli anticorpi di classi diverse diretti contro lo stesso antigene devono avere qualcosa in comune sebbene differiscano per molti aspetti. Una delle differenze evidenti è il contenuto in carboidrati: IgG: 2%; IgA: 10%; IgM: 10%.

Come già detto, tutte le immunoglobuline risultano costituite da catene polipeptidiche e sono stati descritti due tipi di catene: L (in precedenza B) ed H (in precedenza A) (CEPPELLINI *et al.*, 1964; FLEISCHMAN, PAIN & PORTER, 1962). Le catene L ed H differiscono tra di loro per il peso molecolare, la composizione in amminoacidi e l'antigenicità. Le differenze più significative sono in corrispondenza delle catene H (vedi sotto).

Si devono distinguere due tipi di antigenicità, uno facilmente riconosciuto da una specie eterologa, l'altro molto meno differente e riconosciuto solo dalla specie omologa. Gli antigeni di questo secondo tipo sono stati chiamati allotipi (OUDIN, 1956; DRAY *et al.*, 1962) (isoantigeni) e nell'uomo « tipi Gm » (GRUBB, 1956).

Catene L.

Nell'uomo è stata dimostrata l'esistenza di due tipi di catene L: α e λ (COHEN & PORTER, 1964; FUDENBERG, 1965). Normalmente ambedue i tipi sono presenti nella popolazione di ciascuna immunoglobina. Tuttavia, ogni singola molecola è simmetrica ed è costituita da due catene α e due catene λ . I due tipi di catene L differiscono tra di loro per la composizione in amminoacidi e per i determinanti antigenici. Su queste catene sono stati anche trovati degli isoantigeni differenti; nell'uomo questi sono stati chiamati fattori Inv. Per informazioni più dettagliate sugli isoantigeni e allotipi umani e di coniglio si consultino le seguenti rassegne: COHEN & PORTER (1964), FUDENBERG (1965).

L'amminoacido C terminale è stato determinato in ambedue i tipi di catene (MILSTEIN, 1965). Nella catena α è una cisteina e nella catena λ è una serina, preceduta da una cisteina. Questa cisteina specifica ha un ruolo importante nella immunoglobulina in quanto fornisce il legame S-S tra le catene L ed H.

Nel coniglio è stato descritto un solo tipo di catena L; non si è ancora tentato di determinare se anche i conigli hanno due tipi di catene L.

In precedenza si era notato che nella cavia esistevano delle differenze tra le catene L di anticorpi della stessa specificità (EDELMAN, BENACERRAF & OVARY, 1963). Recentemente è stato dimostrato che anche nella cavia esistono i due tipi di catene L (NUSSENZWEIG & BENACERRAF, 1966).

C'è solo un'osservazione molto importante da fare sulle catene L: le stesse catene L sono presenti in tutte le classi di immunoglobuline. Tutte le immunoglobuline hanno, quindi, una certa similarità dovuta alle catene L. Ciascuna classe differisce, tuttavia, per le sue catene H o almeno per una porzione delle sue catene H (il frammento Fc) che verrà discussa in seguito.

Catene H.

Le catene H vengono chiamate (CEPPELLINI *et al.*, 1964):

catene γ per le IgG
 catene α per le IgA
 catene μ per le IgM
 catene δ per le IgD
 catene ϵ per le IgE.

Non si sa molto sulle catene H ad eccezione che per le catene γ . Nell'uomo sono state trovate quattro catene γ differenti. Esse determinano le sottoclassi già menzionate. Queste sottoclassi sono (GREY & KUNKEL, 1964; TERRY & FAHEY, 1964):

We o b
 Vi o c
 Ne o a
 Gc o d

Gli isoantigeni presenti sulle catene γ dell'uomo vengono chiamati fattori Gm. Per ulteriori dettagli sugli isoantigeni ed allotipi delle catene H dell'uomo e del coniglio, vedi: COHEN & PORTER (1964); FUDENBERG (1965).

Nella cavia sono state trovate due catene differenti: le catene γ_1 e γ_2 . Anche queste catene differiscono per l'antigenicità (THORBECKE, BENACERRAF & OVARY, 1963).

Nel topino le catene γ_2 vengono divise in due sottoclassi, γ_{2a} e γ_{2b} ; per ulteriori dettagli e specialmente per le differenze allotipiche, vedi: HER-

ZENBERG, WARNER & HERZENBERG (1965); WARNER, HERZENBERG & GOLDSTEIN (1966).

L'immunoglobulina più nota e più studiata è la IgG (vedi Fig. 1). Ogni molecola contiene due catene H e due catene L. Ogni molecola

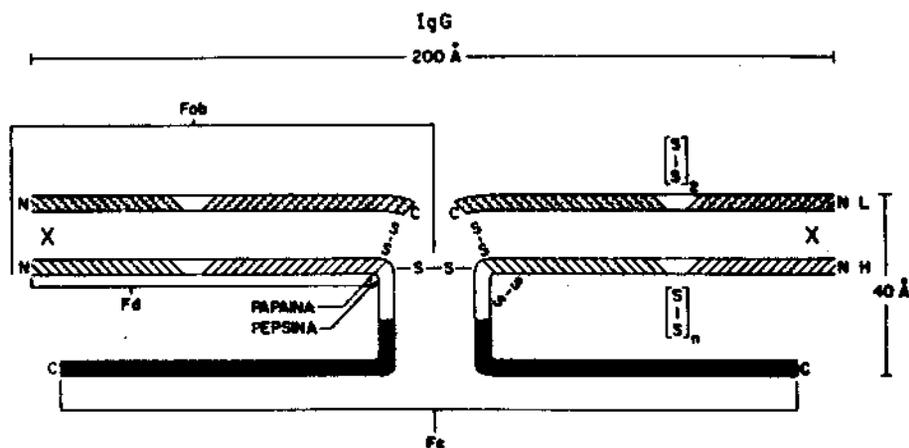


Fig. 1. — Immunoglobulina IgG.

Gli aminoacidi N terminali sono indicati da N su tutte le catene; gli aminoacidi C terminali da C. Le catene L sono rappresentate da due sbarre leggermente ricurve in C; una di esse è segnata con L. Esse sono divise all'incirca in due metà indicate con una diversa ombreggiatura. La metà con l'amminoacido N terminale è il segmento variabile, la metà con l'amminoacido C terminale è il segmento invariabile. I legami S-S intracatenici sono segnati sopra una delle catene L tra parentesi (due legami S-S per catena L).

Le catene H sono indicate da due lettere U disposte orizzontalmente. Una di esse è segnata con H. Il frammento Fd è indicato su una delle catene H. Il frammento Fd è ombreggiato in maniera simile alle catene L, ma non è punteggiato per mettere in evidenza che questi frammenti corrispondono alle catene L, ma non sono identici ad esse per la composizione in aminoacidi. La porzione del frammento Fd con l'amminoacido N terminale è il frammento variabile della catena H. Il frammento Fc è quasi tutto ombreggiato in nero, mentre una piccola porzione è stata lasciata in bianco per indicare la possibilità di una porzione ancora sconosciuta del frammento Fc che potrebbe essere un frammento variabile. I legami S-S intracatenici sono indicati tra le braccia di una delle catene H tra parentesi (n per catena H; n = non determinato). Uno dei legami S-S intracatenici è indicato nell'angolo dove il frammento Fd si unisce al frammento Fc. I legami S-S intercatenici sono indicati per tutte le catene. Vengono anche indicati i punti della molecola in cui agiscono la papaina e la pepsina. Il frammento Fab e il frammento Fc sono indicati con grosse parentesi. Le dimensioni approssimate vengono date in unità Ångström. Ambedue i siti di combinazione sono segnati con X.

di anticorpo IgG ha due siti di combinazioni per il determinante antigenico per il quale essa è specifica. Essi sono localizzati, probabilmente, in prossimità dell'amminoacido N terminale di ambedue le catene. Nella figura schematica questi siti di combinazioni sono indicati da X.

Ambedue le catene probabilmente contribuiscono alla formazione del sito di combinazione. Non sono stati ancora trovati anticorpi eteroleganti. In altre parole, questi due siti di combinazione sono identici nella stessa molecola.

Le catene L possono essere divise all'incirca a metà (HILSCHMANN & CRAIG, 1965). Si è visto che per la catena α la metà con l'amminoacido C terminale presenta una notevole somiglianza in tutti gli individui; questa è la metà costante o invariabile. L'altra metà, invece, è molto variabile. Si pensa che il sito di combinazione abbracci una porzione di questo segmento variabile della catena L. Da studi preliminari sembra che i determinanti antigenici allotipici siano sulla metà invariabile delle catene L (HILSCHMANN & CRAIG, 1965). Nella Fig. 1 queste due porzioni della catena L sono ombreggiate diversamente.

Anche la catena H può essere divisa in due porzioni: una, con l'amminoacido N terminale, corrisponde alla catena L. Da prove preliminari (SINGER & DOOLITTLE, 1966; FRANZIONE & FRANKLIN, 1966) sembra che questa porzione della catena H (detta frammento Fd) risulti anch'essa costituita all'incirca da due metà: la metà con l'amminoacido N terminale è molto variabile (questa porzione contribuisce alla formazione del sito di combinazione), l'altra metà è la porzione invariabile. Le due porzioni corrispondono alla metà variabile ed invariabile delle catene L e nella figura sono ombreggiate in maniera simile alle catene L. (Per sottolineare che esse non sono identiche alle porzioni corrispondenti delle catene L, i frammenti di catena L sono punteggiati).

Quando la IgG viene digerita con papaina cristallina si ottengono tre frammenti: due frammenti Fab (in precedenza frammenti I e II di Porter) ed un frammento Fc (in precedenza frammento III di Porter) (vedi Fig. 1). I due frammenti Fab sono identici e ciascun frammento ha un sito di combinazione. Il frammento Fc, invece, non ha sito di combinazione. Il frammento Fc è costituito da una porzione della catena H (la porzione con l'amminoacido C terminale). La restante porzione della catena H viene chiamata frammento Fd: il frammento Fd assieme alla catena L costituisce il frammento Fab (vedi Fig. 1). (Per ulteriori dettagli vedi: COHEN & PORTER, 1964; FUDENBERG, 1965).

Quando la IgG viene digerita con pepsina, quasi tutto il frammento Fc viene scisso in piccoli peptidi dializzabili. Dal momento che la pepsina sembra scindere la molecola in un punto più vicino all'amminoacido C terminale rispetto al punto di attacco della papaina, una porzione molto piccola del frammento Fc rimane attaccata al resto della molecola di IgG. Questo residuo è un frammento anticorpale bivalente con due siti di combinazione e viene chiamato F (ab')₂.

Nelle catene H ed L esistono diversi legami S-S *intracatenici*. Per la catena L essi sono probabilmente in numero di due. Per le catene H il numero

di legami S-S *intracatenici* non è stato ancora determinato. (Nella Fig. 1 sono indicati in parentesi in corrispondenza di una catena H e di una catena L). Uno dei legami della catena è molto interessante perchè la papaina agisce proprio in corrispondenza di questo legame (CEBRA, 1966). (Esso è indicato nella Fig. 1 in corrispondenza dell'angolo della catena H).

Oltre a questi legami S-S *intracatenici* esistono dei legami S-S *intercadenici*. Ogni catena L è legata ad una delle catene H per mezzo della cisteina C terminale come già detto (MILSTEIN, 1965) (vedi Fig. 1). Un legame S-S è situato tra le due catene H (vedi Fig. 1). Questo legame è sempre all'interno del frammento F(ab')₂. Con la digestione papainica i risultati sono piuttosto diversi. In alcune delle molecole questo legame S-S è nel frammento Fc, mentre in altre la papaina ha agito più in basso (più vicino all'amminoacido C terminale della catena H) dando luogo ad un Fc senza questo legame (CEBRA, 1966).

Nelle catene umane γ una porzione della catena H (il frammento Fc) sembra costante nelle catene dello stesso tipo γ , l'altra porzione invece (il frammento Fd) almeno in parte è molto variabile nelle catene dello stesso tipo γ (FRANGIONE & FRANKLIN, 1965).

Nella cavia si sa che la differenza tra le γ 1 e le γ 2 interessa il frammento Fc (THORBECKE, BENACERRAF & OVARY, 1963) e recentemente è stato dimostrato che i frammenti Fd degli anticorpi γ 1 e γ 2 hanno determinanti antigenici identici (NUSSENZWEIG & BENACERRAF, 1966).

Se anche il frammento Fc potesse essere diviso in due porzioni, una variabile ed una invariabile (indicate nella Fig. 1 dalle aree nere e bianche), allora ogni IgG risulterebbe costituita da dodici porzioni. Tuttavia, non si hanno ancora le prove di una porzione variabile del frammento Fc (SINGER & DOOLITTLE, 1966). Potrebbe darsi che la IgG sia formata da più di quattro catene polipeptidiche (forse sei o anche di più). Se così fosse, dovrebbe esistere necessariamente un meccanismo genetico o un meccanismo di legatura tra le catene polipeptidiche, non ancora scoperto. Altri (SINGER & DOOLITTLE, 1966) propongono l'ipotesi di una reduplicazione e fusione genetica.

Osservata al microscopio elettronico sotto forma di complesso antigene-anticorpo, la molecola anticorpale di IgG di coniglio è a forma di sigaro, i due siti di combinazione sono ad ambedue le estremità e la molecola appare della lunghezza di 200 Å e della larghezza di 40 Å (KRATKY *et al.*, 1955; ALMEIDA, CINADER & HOWATSON, 1963). Una forma leggermente diversa ed una minore lunghezza sono state suggerite da altri i quali ritengono che nell'anticorpo libero i due siti di combinazione siano più vicini tra di loro come le due estremità libere di una V, mentre quando i due siti di combinazione si legano a due determinanti di due distinte molecole di antigene, la V si apre e si ottiene una retta. Questa retta misura allora circa 200 Å (FEINSTEIN & ROWE, 1965).

Gli anticorpi sono eterogenei, come è dimostrato dal fatto che anticorpi della stessa specificità si ritrovano nelle diverse classi di immunoglobuline. Perfino all'interno della classe gli anticorpi sono eterogenei. Essi presentano una mobilità elettroforetica diversa e si legano agli stessi determinanti antigenici in maniera non uniforme (METZGER, WOFSEY & SINGER, 1963). Le differenze tra le diverse catene H ed L all'interno della classe in anticorpi della stessa specificità sono note. Inoltre, anche se le molecole possiedono gli stessi tipi di H e di L, esistono delle differenze che possono essere meglio messe in evidenza con misurazioni di affinità (EISEN & SISKIND, 1964; HURLIMANN & OVARY, 1965; KABAT, 1966). Per ulteriori dettagli vedi: KABAT (1966). Questa eterogeneità degli anticorpi della stessa specificità all'interno della classe è un problema interessante in relazione al meccanismo di produzione degli anticorpi. Anche antigeni ben definiti (antigeni con un singolo determinante o una molecola ben definita) inducono la formazione di una popolazione di anticorpi eterogenei all'interno della stessa classe. Potrebbe darsi che ciascun clone di cellule produttrici di anticorpi per lo stesso antigene ben definito produca anticorpi della stessa specificità ma di affinità diversa e quindi la popolazione intera sia eterogenea.

La IgG, come già detto, è un anticorpo bivalente che precipita bene il suo antigene corrispondente se l'antigene è polivalente (ha più di due determinanti antigenici) (OVARY, 1963). Se la IgG viene sottoposta a trattamento con agenti riducenti (2 mercaptoetanolo o altri) conserva la capacità di precipitare l'antigene corrispondente; tuttavia la sua capacità di fissare il complemento o di sensibilizzare la cavia per l'anafilassi cutanea passiva (PCA) viene notevolmente ridotta (WIEDERMANN, OVARY & MIESCHER, 1964).

La IgG è una molecola fortemente simmetrica: sia le catene L che le catene H sono identiche tra di loro nella stessa molecola.

Se si sottopone a riduzione la IgM, questa si scinde in subunità 7S. Queste sono unità anticorpali monovalenti. Ciascuna metà è composta da due catene H e da due catene L (MILLER & METZGER, 1965; LAMM & SMALL, 1966). Esse si combinano ancora con l'antigene (JACOT-GUILLARMOD & ISLIKER, 1962; SCHROHENLOHER, KUNKEL & TOMASI, 1964; ROBBINS, KENNY & SUTER, 1965; ONOUE *et al.*, 1965), ma non sono più in grado di precipitarlo o di agglutarlo.

Funzioni biologiche degli anticorpi.

La proprietà più importante di un anticorpo è che esso reagisce e forma un complesso con il suo antigene corrispondente. Oltre a questa proprietà fondamentale, gli anticorpi hanno altre proprietà che sono molto importanti per le reazioni *in vivo*, precisamente: la loro capacità di accelerare l'eliminazione dell'antigene mediante opsonizzazione, facilitando così la fun-

zione del sistema reticolo-endoteliale; la capacità dei complessi immuni di fissare complemento; la lisi (da anticorpo e da complemento) di cellule viventi; ed infine la capacità di sensibilizzare i tessuti per le reazioni anafilattiche.

Come regola generale la IgM è un anticorpo molto più efficiente della IgG nella agglutinazione (fino a 1000 di più) (GREENBURY, MOORE & NUNN, 1963), nella neutralizzazione del fago, nella fissazione del complemento e specialmente nell'emolisi (ROBBINS, KENNY & SUTER, 1965; TALMAGE, FRETER & TALIAFERRO, 1956), sebbene esistano delle eccezioni (OVARY, 1966; SHARP, 1966; LINSKOTT, 1966). Così con alcune cellule tumorali di topo di tipo ascitico, questi anticorpi fissano complemento ma non sono litici (BORSOS & RAPP, 1966). Tuttavia, potrebbe darsi che quando gli anticorpi IgM fissano complemento ma non lisano gli eritrociti e le cellule tumorali, il fattore importante sia la situazione sterica del determinante antigenico sulla parete cellulare. Va anche notato che alcuni anticorpi IgM non fissano complemento (ad esempio, gli anticorpi antipolisaccaridici di cavallo lo fissano molto poco) (OSLER *et al.*, 1957). La grande efficacia degli anticorpi IgM nell'emolisi è dovuta al fatto che una sola molecola è sufficiente per la lisi, mentre con la IgG sono necessarie due molecole vicine (BORSOS & RAPP, 1965). In questo caso una semplice considerazione statistica spiega la maggiore efficacia della IgM rispetto alla IgG.

Sembra che la IgM non sensibilizzi alcuna specie per le reazioni anafilattiche.

Sul comportamento biologico della IgA e della IgD si sa poco. È stato dimostrato che la IgA non sensibilizza la specie omologa o eterologa per l'anafilassi (OVARY, BARTH & FAHEY, 1965) e che generalmente non fissa complemento (BORSOS, 1966).

La IgG è stata meglio studiata. È stato dimostrato che le funzioni biologiche, cioè la capacità di fissare il complemento (TARANTA & FRANKLIN, 1961; AMIRALIAN & LEIKHIM, 1961; OVARY & TARANTA, 1963), la capacità di attraversare la placenta (BRAMBELL *et al.*, 1960) e la capacità di sensibilizzare per l'anafilassi (OVARY & KARUSH, 1961; OVARY, 1964) sono legate al frammento Fc. Il frammento Fab o F(ab')₂ di coniglio ottenuto dalla IgG non fissa il complemento come l'anticorpo originario (OVARY & TARANTA, 1963), nè produce lisi degli eritrociti (OVARY & TARANTA, 1963) e non sensibilizza la cavia per l'anafilassi (OVARY & KARUSH, 1961; OVARY, 1964). È stato dimostrato che la cavia e il topino vengono sensibilizzati per l'anafilassi e per l'anafilassi cutanea passiva (PCA) dagli anticorpi omologhi γ_1 e da alcuni anticorpi eterologhi γ_2 (OVARY, BENACERRAF & BLOCH, 1963; OVARY, 1964).

Come regola generale, gli anticorpi γ_2 fissano il complemento e possono sensibilizzare le specie eterologhe per l'anafilassi del tipo PCA, mentre gli

anticorpi $\gamma 1$ non fissano il complemento e sensibilizzano solo la specie omologa per l'anafilassi sistemica e per la PCA (OVARY, BLOCH & BENACERRAF, 1964). (Esistono però delle eccezioni: vedi BLOCH *et al.*, 1963). Le immunoglobuline umane IgE, gli anticorpi di ratto anafilattici o degranulanti delle mast-cellule e gli anticorpi di coniglio che sensibilizzano il coniglio per la reazione di PCA sono, quindi, gli anticorpi che in queste specie corrispondono agli anticorpi $\gamma 1$ del topino e della cavia.

Se si ascrive un ruolo agli anticorpi nel rigetto del trapianto (STETSON & DEMOPOULOS, 1958; STETSON & JENSEN, 1960; CHUTNA, 1961; KRETSCHMER & PEREZ-TAMAYO, 1961; 1962; STETSON, 1963) è probabile che questo ruolo venga assunto dal complemento che fissa anticorpi IgM e IgG (PORTER, 1959).

Nella facilitazione immunologica (KALISS & KANDUTSCH, 1956; KALISS, 1958; 1962), la IgM sembra essere meno efficace (MÖLLER, 1966). Qui la IgG sembra essere l'anticorpo importante, sebbene il ruolo della IgA non sia stato ancora ben studiato. Non è stato ancora possibile studiare la facilitazione immunologica dei tumori di topo con anticorpi isolati di topo $\gamma 1$ e $\gamma 2$. Probabilmente, l'anticorpo $\gamma 1$, che non fissa il complemento e che quindi non distrugge la cellula, è l'anticorpo che protegge la cellula tumorale ricoprendola e prevenendo così la lisi e la distruzione da parte dell'anticorpo $\gamma 2$. Questo sarebbe quindi l'anticorpo facilitante: tuttavia, potrebbe anche darsi che qualche altro fattore sierico intervenga con l'anticorpo, forse perfino con l'anticorpo $\gamma 2$. Per capire il ruolo eventuale dell'anticorpo fissante il complemento $\gamma 2$ nella facilitazione, è necessario esaminare accuratamente i passi successivi di reazione dei diversi componenti del complemento nella fissazione del complemento e nella lisi immune. È stato recentemente dimostrato (ROMMEL, 1966) che uno dei fattori del classico terzo componente del complemento, precisamente C'8 (COMPLEMENT WORKSHOP, 1966) può essere inattivato da pH troppo bassi o troppo elevati. Questo C'8 inattivato, tuttavia, viene ancora legato dal complesso immune (eritrociti di pecora con il loro anticorpo) che ha già legato tutti i precedenti componenti del complemento. Quando questo complesso con il C'8 inattivato viene fatto reagire con l'ultimo componente, cioè C'9, non si ha lisi degli eritrociti. Si è pensato che questo C'8 inattivato possa agire come un inibitore. Se un'azione simile si verificasse *in vivo* con le cellule tumorali, allora anche gli anticorpi fissanti il complemento $\gamma 2$ di topo potrebbero avere un ruolo nel fenomeno della facilitazione.

Un'altra osservazione è a favore del ruolo di qualche fattore inibitore. È stato visto (MÖLLER, 1963) che, se si inoculano degli eritrociti di topo in recipienti isto-incompatibili, non tutti gli eritrociti vengono distrutti. Una certa frazione, non indifferente, sfugge alla lisi immune e diviene, per di più, resistente ad una ulteriore azione del complemento e degli anticorpi di topo

diretti contro questi eritrociti. Potrebbe darsi che un piccolo inibitore simile al C'8 inattivato abbia prevenuto la lisi.

Reazioni simili possono verificarsi *in vivo* con cellule tumorali e anticorpi fissanti il complemento γ_2 di topo. Queste cellule tumorali resisterebbero allora alla lisi ed alla distruzione; quindi il tumore crescerebbe meglio in presenza di anticorpi γ_2 che in assenza.

La soluzione di questo problema si avrà soltanto quando anticorpi di topo anti-tumore e anti-parete cellulare potranno essere frazionati in γ_1 e in γ_2 e queste frazioni purificate potranno essere impiegate per lo studio del rigetto e della facilitazione dei trapianti.

BIBLIOGRAFIA

- ALMEIDA, J., B. CINADER & A. HOWATSON, 1963. The structure of antigen-antibody complexes. A study by electron microscopy. *J. Exptl. Med.*, **118**, 327-340.
- AMIRALIAN, K. & E. J. LEIKHIM, 1961. Interaction of fragment III of rabbit gamma globulin and guinea pig complement. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **108**, 454-460.
- BASSETT, E. W., S. W. TANENBAUM, K. PRYZWANSKY, K. BEISER & E. A. KABAT, 1965. Studies on human antibodies III. Amino acid composition of four antibodies from one individual. *J. Exptl. Med.*, **122**, 251-261.
- BAUER, D. C. & A. N. STAVITSKY, 1961. On the different molecular forms of antibody synthesized by rabbits during the early response to a single injection of protein and cellular antigens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, **41**, 1667-1680.
- BENACERRAF, B., Z. OVARY, K. J. BLOCK & E. C. FRANKLIN, 1963. Properties of guinea pig 7S antibodies I. Electrophoretic separation of two types of guinea pig 7S antibodies. *J. Exptl. Med.*, **117**, 937-949.
- BINAGHI, R. A. & B. BENACERRAF, 1964. The production of anaphylactic antibody in the rat. *J. Immunol.*, **92**, 920-926.
- BLOCH, K. J., F. M. KOURILSKY, Z. OVARY & B. BENACERRAF, 1963. Properties of guinea pig 7S antibodies III. Identification of antibodies involved in complement fixation and hemolysis. *J. Exptl. Med.*, **117**, 965-981.
- BORSOS, T., 1966. Personal communication.
- BORSOS, T. & H. J. RAPP, 1965. Complement fixation on cell surfaces by 19S and 7S antibodies. *Science*, **153**, 505-506.
- BORSOS, T. & H. J. RAPP, 1966. Personal communication.
- BRAMBELL, F. R. R., W. A. HEMMINGS, C. L. OAKLEY & R. R. PORTER, 1960. Changes in ¹³¹I-labelled immune bovine γ -globulin during transmission to the circulation after oral administration to the young rat. *Proc. Roy. Soc. London, Ser. B*, **153**, 477-489.
- CEBRA, J., 1966. Personal communication.
- CEPPELLINI, R. *et al.*, 1964. Nomenclature for human immunoglobulins. *World Health Organ. Bull.*, **30**, 447-450.
- CHUTNA, J., 1961. White-graft reaction and passive transfer of immunity in inbred strains of mice. *Transplant. Bull.*, **28**, 23-26.
- COHEN, S. & R. R. PORTER, 1964. Structure and biological activity of immunoglobulins. *Advan. Immunol.*, **4**, 287-349. F. R. Dixon, Jr. & J. H. Humphrey, Eds., Academic Press, New York.

- COMPLEMENT WORKSHOP, 1966. La Jolla, California.
- DRAY, S., S. DUBISKI, A. KELUS, E. S. LENNON & J. OUDIN, 1962. A notation for allotypy. *Nature*, **195**, 785-786.
- EDELMAN, G. M., B. BENACERRAF & Z. OVARY, 1963. Structure and specificity of guinea pig 7S antibodies. *J. Exptl. Med.*, **118**, 229-244.
- EDELMAN, G. M., B. BENACERRAF, Z. OVARY & M. D. POULIK, 1961. Structural differences among antibodies of different specificities. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, **47**, 1751-1758.
- EDELMAN, G. M. & M. D. POULIK, 1961. Studies on structural units of the γ -globulins. *J. Exptl. Med.*, **113**, 861-884.
- EISEN, H. N. & G. W. SISKIND, 1964. Variations in affinities of antibodies during the immune response. *Biochemistry*, **3**, 996-1008.
- FAHEY, J. L., J. WUNDERLICH & R. MISHELL, 1964a. The immunoglobulins of mice I. Four major classes of immunoglobulins: 7S γ_2 , 7S γ_1 , γ_1A (β_2A)₁ and 18S γ_1M -Globulins. *J. Exptl. Med.*, **120**, 223-242.
- FAHEY, J. L., J. WUNDERLICH & R. MISHELL, 1964b. The immunoglobulins of mice II. Two subclasses of mouse 7S γ_2 -globulins: γ_{2a} and γ_{2b} -globulins. *J. Exptl. Med.*, **120**, 243-251.
- FEINSTEIN, A. & A. J. ROWE, 1965. Molecular mechanism of formation of an antigen-antibody complex. *Nature*, **205**, 147-149.
- FLEISCHMAN, J. B., R. H. PAIN & R. R. PORTER, 1962. Reduction of γ -globulins. *Arch. Biochem. Biophys.*, Suppl. **1**, 174-180.
- FRANGIONE, B. & E. C. FRANKLIN, 1965. Structural studies of human immunoglobulins. Differences in the Fd fragments of the heavy chains of G myeloma proteins. *J. Exptl. Med.*, **122**, 1-9.
- FRANGIONE, B. & E. C. FRANKLIN, 1966. Personal communication.
- FREEMAN, M. J. & A. B. STAVITSKY, 1965. Radioimmuno-electrophoretic study of rabbit anti-protein antibodies during the primary response. *J. Immunol.*, **95**, 981-990.
- FUDENBERG, H. H., 1965. The immune globins. *Ann. Rev. Microbiol.*, **19**, 301-338. C. F. Clifton, S. Raffel & M. P. Starr, Eds., Annual Reviews, Inc., Palo Alto, California.
- GIVOL, D. & R. R. PORTER, 1965. The C-terminal peptide of the heavy chain of the rabbit immunoglobulin IgG. *Biochem. J.*, **97**, 32c-34c.
- GREENBURY, C. L., D. H. MOORE & L. A. C. NUNN, 1963. Reaction of 7S and 19S components of immune rabbit antisera with human group A and AB red cells. *Immunology*, **6**, 421-433.
- GREY, H. M. & H. G. KUNKEL, 1964. H chain subgroups of myeloma proteins and normal 7S γ -globulin. *J. Exptl. Med.*, **120**, 253-266.
- GRUBB, R., 1956. Agglutination of erythrocytes coated with «incomplete» anti-RH by certain rheumatoid arthritic sera and some other sera. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.*, **39**, 195-197.
- HERZENBERG, L. A., N. L. WARNER & L. A. HERZENBERG, 1965. Immunoglobulin isoantigens (allotypes) in the mouse I. Genetics and cross-reactions of the 7S γ_{2A} -isoantigens controlled by alleles at the IG-1 locus. *J. Exptl. Med.*, **121**, 415-438.
- HILSCHMANN, N. & L. C. CRAIG, 1965. Amino acid sequence studies with Bence-Jones proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, **53**, 1403-1409.
- HURLIMANN, J. & Z. OVARY, 1965. Relationship between affinity of anti-dinitrophenyl antibodies and their biologic activities. *J. Immunol.*, **95**, 765-770.
- ISHIZAKA, K. & T. ISHIZAKA, 1966. Physico-chemical properties of reaginic antibody III. Further studies on the reaginic antibody in γA globulin preparations. Submitted to *J. Allergy*.
- JACOT-GUILLARMOUD, H. & H. ISLIKER, 1962. Scission et réassociation des isoagglutinines traitées par des agents reducteurs des ponts disulfures. Préparation d'anticorps mixtes. *Vox Sanguinis*, **7**, 675-695.

- KABAT, E. A., 1966. Structure and heterogeneity of antibodies. Submitted to *Acta Haematol.*
- KALISS, N., 1958. Immunological enhancement of tumor homografts in mice. A review. *Cancer Res.*, **18**, 992-1003.
- KALISS, N., 1962. The elements of immunologic enhancement : a consideration of mechanisms. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **101**, 64-79.
- KALISS, N. & A. A. KANDUTSCH, 1956. Acceptance of tumor homografts by mice injected with antiserum I. Activity of serum fractions. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **91**, 118-121.
- KOSHLAND, M. E. & F. M. ENGBERGER, 1963. Differences in the amino acid composition of two purified antibodies from the same rabbit. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, **50**, 61-68.
- KRATKY, O., G. POROD, A. SEKORA & B. PALETTA, 1955. Determination of the shape of γ -globulin. *J. Polymer Sci.*, **16**, 163-175.
- KRETSCHMER, R. R. & R. PEREZ-TAMAYO, 1961. The role of humoral antibodies of isoimmune serum to conditioned hosts. *J. Exptl. Med.*, **114**, 509-519.
- KRETSCHMER, R. R. & R. PEREZ-TAMAYO, 1962. The role of humoral antibodies in rejection of skin homografts in rabbits II. Passive transfer of transplantation immunity by sensitized lymph node cells within diffusion chambers. *J. Exptl. Med.*, **116**, 879-896.
- LAMM, M. E. & P. A. SMALL, 1966. Polypeptide chain structure of rabbit immunoglobulins II. γ M-Immunoglobulin. *Biochemistry*, **5**, 267-276.
- LINSCOTT, W. D., 1966. Personal communication.
- MERRYMAN, C. & B. BENACERRAF, 1963. Studies on the structure of mouse antibodies. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **114**, 372-376.
- METZGER, H., L. WOFSY & S. J. SINGER, 1963. A specific antibody hapten reaction with novel spectral properties. *Arch. Biochem. Biophys.*, **103**, 206-215.
- MILLER, F. & H. METZGER, 1965. Characterization of a human macroglobulin I. The molecular weight of its subunit. *J. Biol. Chem.*, **240**, 3325-3333.
- MILSTEIN, C., 1965. Interchain disulphide bridge in Bence-Jones proteins and in γ -Globulin β chains. *Nature*, **205**, 1171-1173.
- MÖLLER, G., 1963. Survival of mouse erythrocytes in histoincompatible recipients. *Nature*, **199**, 573-575.
- MÖLLER, G., 1966. Personal communication.
- MOTA, I., 1964. The mechanism of anaphylaxis I. Production and biological properties of « Mast cell sensitizing » antibody. *Immunology*, **7**, 681-699.
- NUSSENZWEIG, V. & B. BENACERRAF, 1966. Presence of identical antigenic determinants in the F_1 fragments of γ_1 and γ_2 guinea pig immunoglobulins. *J. Immunol.*, in press.
- NUSSENZWEIG, V. & B. BENACERRAF, 1966. Personal communication.
- ONOUÉ, K., Y. YAGI, A. L. GROSSBERG & D. PRESSMAN, 1965. Number of binding sites of rabbit macroglobulin antibody and its subunits. *Immunochemistry*, **2**, 401-415.
- ONOUÉ, K., Y. YAGI & D. PRESSMAN, 1964. Multiplicity of antibody proteins in rabbit anti-p-azobenzene-arsenate sera. *J. Immunol.*, **92**, 173-184.
- OSLER, A. G., M. M. HAWRISIAK, Z. OVARY, M. SIQUEIRA & O. G. BIER, 1957. Studies on the mechanism of hypersensitivity phenomena II. The participation of complement in passive cutaneous anaphylaxis of the albino rat. *J. Exptl. Med.*, **106**, 811-834.
- UDIN, J., 1956. The allotype of certain blood protein antigens. *Compt. Rend.* **242**, 2606-2608.
- OVARY, Z., 1963. *In vitro* and *in vivo* interactions of anti-hapten antibodies with monovalent and bivalent haptens (antibodies against the 2,4-dinitrophenyl group with N-2,4-dinitrophenyl-epsilon-L-lysine and N-di,2,4-dinitrophenyl-alpha-epsilon-L-lysine). *Conceptual Advances in Immunology and Oncology*, 206-219, Hoeber Medical Division, Harper & Row, New York, N. Y.
- OVARY, Z., 1964. Passive cutaneous anaphylaxis. *C.I.O.M.S. Imm. Methods Symposium*, 259-284, J. F. Aekroyd, Ed., Blackwell Scientific Publications, Oxford.

- OVARY, Z. Unpublished observations.
- OVARY, Z., W. F. BARTH & J. L. FAHEY, 1965. The immunoglobulins of mice III. Skin sensitizing activity of mouse immunoglobulins. *J. Immunol.*, **94**, 410-415.
- OVARY, Z., B. BENACERRAF & K. J. BLOCH, 1963. Properties of guinea pig 7S antibodies II. Identification of antibodies involved in passive cutaneous and systemic anaphylaxis. *J. Exptl. Med.*, **117**, 951-964.
- OVARY, Z., K. J. BLOCH & B. BENACERRAF, 1964. Identification of rabbit, monkey and dog antibodies with PCA activity for guinea pigs. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **116**, 840-845.
- OVARY, Z. & F. KARUSH, 1961. Studies on the immunologic mechanism of anaphylaxis II. Sensitizing and combining capacity *in vivo* of fractions separated from papain digests of antihapten antibody. *J. Immunol.*, **88**, 146-150.
- OVARY, Z. & A. TARANTA, 1963. Passive cutaneous anaphylaxis with antibody fragments. *Science*, **140**, 193-195.
- PORTER, R. R., 1959. The hydrolysis of rabbit γ -globulin and antibodies with crystalline papain. *Biochem. J.*, **73**, 119-126.
- PORTER, R. R. & E. M. PRESS, 1965. N-Terminal peptide of the heavy chain of immunoglobulin IgG. *Biochem. J.*, **97**, 32p-33p.
- ROBBINS, J. B., W. A. ALTMEIER & R. T. SMITH, 1966. Personal communication.
- ROBBINS, J. B., K. KENNY & E. SUTER, 1965. The isolation and biological activities of rabbit γ M- and γ G- anti-salmonella typhimurium antibodies. *J. Exptl. Med.*, **122**, 385-402.
- ROMMEL, F. A., 1966. Personal communication.
- ROWE, D. S. & J. L. FAHEY, 1965. A new class of human immunoglobulins II. Normal serum IgD. *J. Exptl. Med.*, **121**, 185-199.
- SCHROHENLOHER, R. E., H. G. KUNKEL & T. B. TOMASI, 1964. Activity of dissociated and reassociated 19S anti-4-globulins. *J. Exptl. Med.*, **120**, 1215-1229.
- SHARP, G., 1966. Personal communication.
- SINGER, J. S. & R. F. DOOLITTLE, 1966. Personal communication.
- STETSON, C. A., 1963. The role of humoral antibody in the homograft reaction. *Advan. Immunol.*, 97-130, F. R. Dixon, Jr. & J. H. Humphrey, Eds., Academic Press, New York.
- STETSON, C. A. & R. DEMOPOULOS, 1958. Reactions of skin homografts with specific immune sera. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **73**, 687-692.
- STETSON, C. A. & E. JENSEN, 1960. Humoral aspects of the immune response to homografts. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **87**, 249-257.
- SVEHAG, S. E. & B. MANDEL, 1964. The formation and properties of poliovirus-neutralizing antibody. I. 19S and 7S antibody formation: differences in kinetics and antigen dose requirement for induction. *J. Exptl. Med.*, **119**, 1-19.
- TALMAGE, D. W., G. G. FRETER & W. H. TALIAFERRO, 1956. Two antibodies of related specificity but different hemolytic efficiency separated by centrifugation. *J. Infect. Diseases*, **98**, 300-305.
- TARANTA, A. & E. C. FRANKLIN, 1961. Complement fixation by antibody fragments. *Science*, **134**, 1981-1982.
- TERRY, W. D. & J. L. FAHEY, 1964. Subclasses of human γ_2 -globulin based on differences in the heavy polypeptide chains. *Science*, **146**, 400-401.
- THORBECKE, G. J., B. BENACERRAF & Z. OVARY, 1963. Antigenic relationship between two types of 7S guinea pig γ -globulins. *J. Immunol.*, **91**, 670-676.
- TITANI, K., E. WHITELY, Jr., L. AVOGADRO & F. W. PUTNAM, 1965. Immunoglobulin structure: partial amino acid sequence of a Bence-Jones protein. *Science*, **149**, 1090-1092.
- TOMASI, T. B., Jr., E. M. TAN, A. SOLOMON & R. A. PRENDERGAST, 1965. Characteristics of an immune system common to certain external secretions. *J. Exptl. Med.*, **121**, 101-124.

- UHR, J. W., M. S. FINKELSTEIN & J. B. BAUMANN, 1962. Antibody formation III. The primary and secondary antibody response to bacteriophage phi X 174 in guinea pigs. *J. Exptl. Med.*, **115**, 655-670.
- WARNER, N. L., L. A. HERZENBERG & G. GOLDSTEIN, 1966. Immunoglobulin isoantigens (Allotypes) in the mouse II. Allotypic analysis of three γG_2 -myeloma proteins from (NZB X BALB/c) F₁ hybrids and of normal γG_2 -globulins. *J. Exptl. Med.*, **123**, 707-721.
- WHITE, R. G., G. C. JENKINS & P. C. WILKINSON, 1963. The production of skin-sensitizing antibody in the guinea pig. *Intern. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, **22**, 156-165.
- WIEDERMANN, G., Z. OVARY & P. A. MIESCHER, 1964. Influence of mercaptoethanol treatment on skin sensitizing and complement binding ability of 7S anti-dinitrophenol-bovine gamma globulin antibody. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **116**, 448-452.
- ZVAIFLER, N. & E. L. BECKER, 1965. Rabbit passive cutaneous anaphylaxis. *Fed. Proc.*, **24**, 250, abstract 677.