

Dall'autobiografia di un neurofisiologo: ricerche sul tatto, solletico e dolore

YNGVE ZOTTERMAN

Siamo lieti di pubblicare il testo originale della conferenza tenuta dal professor Yngve Zotterman l'11 ottobre 1971 in Istituto.

Il professor Zotterman ha tenuto fino a pochi anni fa la cattedra di Fisiologia Veterinaria all'Università di Stoccolma ed è ora presidente della International Union of Physiological Sciences (IUPS). Egli è stato uno dei pionieri della ricerca elettrofisiologica, ed ha recentemente scritto, nella pace della sua casa di Capri, una autobiografia che porta lo stesso titolo della sua conferenza (Touch, Tickle, and Pain).

Leggendo il libro si ripercorre ogni passo delle ricerche con cui l'Autore ha approfondito i vari aspetti del problema. Problema scientifico che è diventato — lo si percepisce chiaramente — l'avventura di un uomo. E forse mai come in questo caso il titolo dell'opera si adatta altrettanto bene alla sua esperienza di scienziato e alle sue vicissitudini personali.

V. G. LONGO

Il dolore ha sempre occupato un posto speciale nella fisiologia sensoriale. Si è discusso se il dolore fosse una modalità specifica dei sensi, cioè se esso fosse recepito da ricettori distinti, e trasmesso da fibre nervose speciali. La vecchia teoria dell'intensità, che si rifà a Darwin — cioè che il dolore potrebbe essere trasmesso da tutti i nervi sensibili, quando l'intensità dello stimolo raggiunge un certo valore di soglia — ha avuto i suoi fedeli discepoli fino al 1940, ed è stata ripresa negli ultimi anni da un gruppo di specialisti anche con indagini *in vivo* (1968). È strano che ciò possa accadere ai nostri giorni, più di quarant'anni dopo le scoperte di Adrian⁽¹⁾, che introdusse i metodi elettronici nello studio della fisiologia del sistema nervoso, metodi che hanno reso possibile la registrazione della tra-

smissione degli impulsi nervosi in una singola fibra nel corso della stimolazione naturale dell'organo dei sensi. Negli anni 1925 e 1926 io lavoravo nel laboratorio del dott. Adrian a Cambridge, e dopo molti tentativi riuscimmo a registrare gli impulsi di una singola fibra nervosa proveniente da un ricettore muscolare di rana e da un ricettore sensitivo della pelle nel gatto. Dopo questi risultati c'erano buone ragioni per credere che il problema della trasmissione del dolore potesse avere una soluzione, almeno per ciò che concerne la natura ed in particolare la specificità delle fibre nervose dolorifere. Si trovò, per differenti motivi, che il problema fondamentale del dolore non era poi così facile da risolvere.

Al mio ritorno in Svezia, nel 1927, costruii un amplificatore, e dopo averlo collegato ad un elettrometro capillare, cominciai a registrare dai nervi dei cuscinetti delle zampe del gatto. Benchè fosse possibile registrare da questi nervi potenziali di azione ad alto voltaggio quando la pelle era stimolata meccanicamente, uno stimolo doloroso, provocato concentrando i raggi di una lampada sul cuscinetto, non provocava nessuna risposta sul nervo.

Nel 1926-27, a Londra, collaborai col famoso cardiologo Thomas Lewis in una ricerca riguardante la circolazione nei vasi cutanei; nel corso di questi esperimenti, eseguiti spesso su noi stessi, bloccavamo il flusso sanguigno del braccio anche per quaranta minuti. Osservai allora su di me come si instaurava gradualmente la paralisi motoria e la perdita delle differenti sensibilità della pelle: ciò che mi colpì in particolare erano le parestesie pungenti, che apparivano circa trenta secondi dopo che il sangue era ritornato al braccio (Fig. 1). Cominciai perciò ad esaminare il valore di soglia del tatto della pelle con il metodo classico del filo di Von Frey, mentre la manichetta gonfiata intorno al braccio bloccava progressivamente il flusso sanguigno. Dopo venti minuti di compressione la soglia sale a un valore dieci volte maggiore di quello di controllo. L'interessante era che i soggetti spontaneamente dichiararono che, dopo compressione, sentivano la pressione del filo come la puntura di un ago.

Nel 1901 due giovani svedesi, il medico Thunberg ⁽²⁾ e lo psicologo Alrutz ⁽³⁾, dell'Università di Uppsala, eseguirono un'indagine sulla « doppia sensazione di dolore ». Quando ci si punge con uno spillo un dito della mano o del piede (non sulla faccia), si sente immediatamente un dolore pungente, al quale segue, dopo circa un secondo, un « secondo dolore ». Thunberg studiò i tempi di reazione per entrambe le sensazioni dolorose che erano prodotte in parte da uno spillo e in parte da una lametta riscaldata che bruciava la pelle. L'interpretazione di Thunberg di questo fenomeno fu che la prima reazione alla puntura era dovuta ad una stimolazione diretta della fibra nervosa, mentre la sensazione ritardata di dolore era iniziata da un altro ricettore, con un tempo di latenza più lungo. Più tardi (nel 1905) egli avanzò l'ipotesi che, tra lo stimolo e la scarica del ricettore, avesse luogo un processo parti-

colare, opinione divisa da Von Frey (1922) (4). Nella Tab. 1 sono esposti i tempi di reazione ritrovati da Thunberg. Come si può vedere, esiste una notevole corrispondenza tra i valori della «seconda sensazione di dolore» di Thunberg e quelli ritrovati alla fine dell'esperimento di compressione al braccio (Fig. 1).

TABELLA 1

Tempi di reazione per il primo e secondo dolore nelle ricerche di Thunberg (2).

Lo stimolo veniva dato con lamelle di acciaio riscaldate a 60°C e con aghi applicati a varie pressioni

	Primo dolore	Secondo dolore
Lamella	0,4	1,3
Ago (pr. 1,7 g)	0,21	1,1
Ago (pr. 5 g)	0,18	1,14

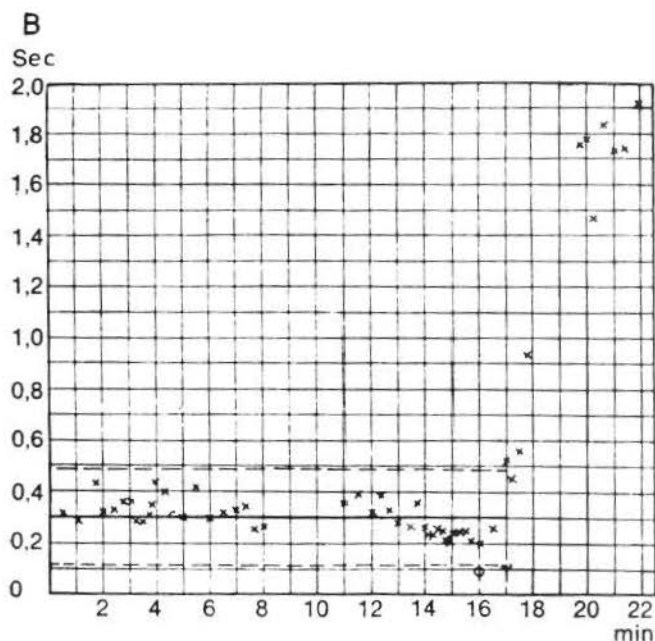
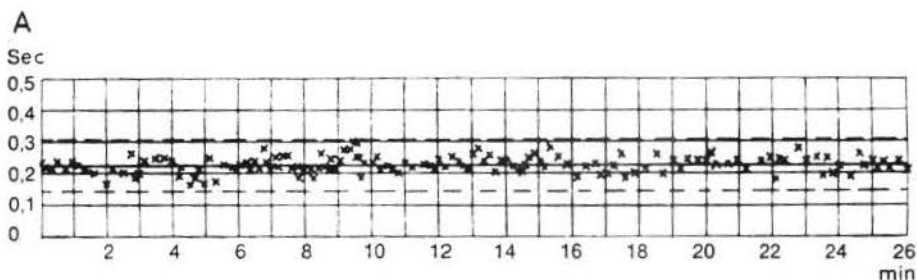


Fig. 1 A. — Tempi di reazione per la puntura di un ago sul dorso della mano. Controllo. Ordinate, tempo in secondi, ascisse, tempo in minuti.

B. — Tempi di reazione quando il flusso sanguigno è bloccato al tempo 0 con una manichetta pneumatica applicata al braccio (5).

La «seconda sensazione di dolore» fu descritta dai miei soggetti come tagliente, il che evidentemente denunciava che in questo caso un altro meccanismo nervoso poteva essere coinvolto. I miei calcoli sulla velocità di conduzione in questa fibra nervosa mostrano i valori di circa 0,5 metri al secondo per il «secondo dolore», una velocità di trasmissione che era in buon accordo con quella delle cosiddette fibre nervose di tipo C, che si trovano nelle radici spinali posteriori, fibre non mielinizzate che sono state descritte per la prima volta da Gasser ed Erlanger nel 1929 (6).

Comunque, non fui il primo a suggerire che la sensazione ritardata di dolore (la «seconda sensazione ritardata di dolore» di Thunberg) è trasmessa da fibre nervose diverse da quelle che trasmettono la prima sensazione di dolore. Lo psicologo Alrutz, che lavorò con Thunberg a Uppsala, fu il primo che si espresse così nella sua tesi di laurea nel 1901 (3). Basandosi sui differenti caratteri delle due sensazioni di dolore egli postulò fibre nervose separate per i due fenomeni. In quel tempo non si aveva ancora idea che le fibre nervose avessero differenti velocità di conduzione.

Le conclusioni che io trassi nella mia tesi (5) furono che le fibre di tipo C giocano un ruolo importante nella conduzione del dolore; queste conclusioni furono rafforzate quando Clark, Hughes e Gasser (7) dimostrarono che uno stimolo elettrico del nervo safeno del gatto influenzava sia il respiro che la pressione sanguigna, anche dopo che tutte le fibre nervose di tipo A erano bloccate, mentre le sottili fibre nervose di tipo C erano ancora indenni. I riflessi erano persino più forti quando le fibre nervose di classe A erano bloccate. Alcuni anni più tardi, Lewis e Pochin (8) misurarono i tempi di reazione nel corso di anestesie differenziali sulle braccia di pazienti affetti da tabe dorsale, i quali, come è noto, hanno reazioni ritardate agli stimoli dolorosi, arrivando alle mie stesse conclusioni. Già da queste indagini risultava in modo abbastanza evidente che il dolore era trasmesso non solo da fibre nervose a conduzione rapida, ma anche da quelle molto sottili, non coperte da mielina, e a conduzione lenta. Anche gli studi anatomici di Ranson e Billingsley (9) avevano suggerito che la trasmissione del dolore sembrava essere una proprietà delle fibre nervose sottili. Dovevo adesso cercare una prova diretta di questa mia ipotesi registrando l'attività elettrica di tali fibre nervose.

Dopo un'approfondita analisi teorica sulle migliori condizioni sperimentali necessarie alla registrazione dell'attività delle fibre nervose di tipo C, e grazie anche ai miglioramenti della tecnica, che aveva messo a mia disposizione un oscillografo a raggi catodici, riuscii nel 1935 a registrare l'attività non solo delle fibre nervose A-Delta, ma anche delle fibre C presenti in fibre isolate del nervo linguale (Fig. 2). Per la prima volta, usando questa preparazione, i singoli potenziali delle fibre C si levano al disopra del «noise level» causato dalla valvola e dalla resistenza del circuito di entrata dell'amplificatore.

Si sapeva da Blair ed Erlanger ⁽¹⁰⁾ che il potenziale d'azione registrato da un nervo variava con la sua velocità di conduzione. Supponendo che il potenziale di membrana, come il potenziale di azione, fosse indipendente dallo spessore della fibra nervosa, il relativo potenziale d'azione che si registrava da un tronco nervoso doveva variare col diametro delle fibre nervose. Dividendo un nervo in finissimi fasci, doveva essere possibile aumentare l'ampiezza del potenziale. Con questo procedimento si aumenta la

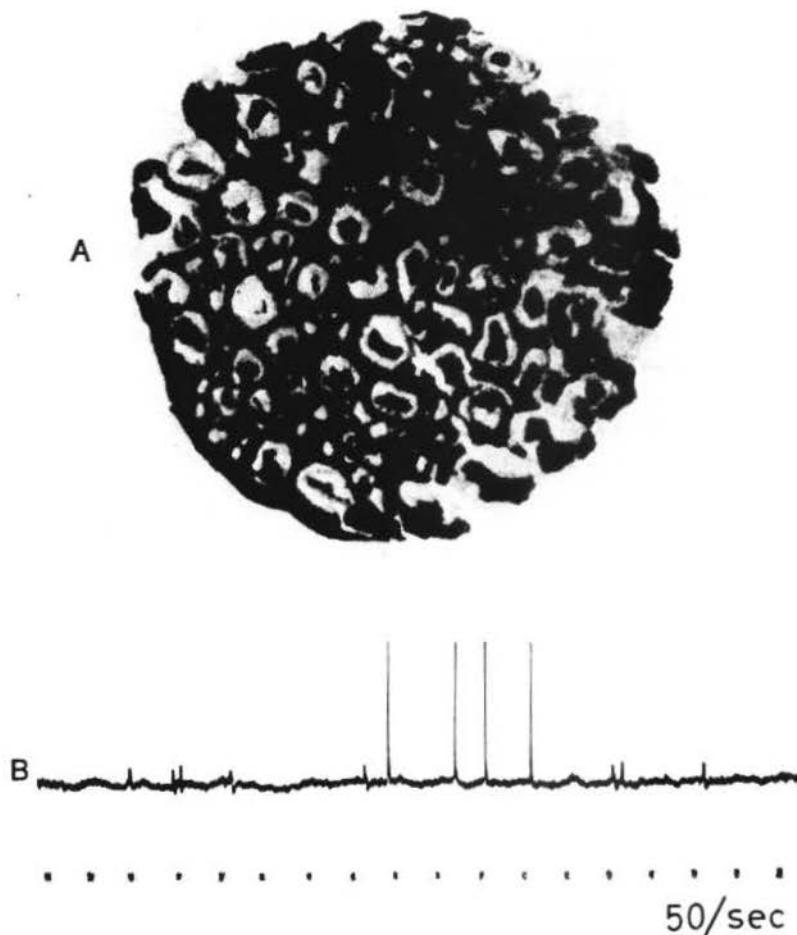


Fig. 2 A. — Microfotografia di un sottile ramo del nervo linguale. Il diametro massimo delle fibre è 10 nm.

B. — Registrazione di spikes di differenti fibre nervose. Tatto e pressione provocano impulsi ad alto voltaggio nelle fibre di tipo A; il raffreddamento moderato della lingua determina impulsi di piccolo voltaggio nelle fibre di tipo A-Delta ⁽¹¹⁾.

resistenza della preparazione e anche il «noise level», ma il potenziale aumenta linearmente con la resistenza, mentre il «noise» solamente con la radice quadrata di questa. Ciò significa che io trovai un margine che rendeva possibile registrare gli impulsi anche delle sottilissime fibre nervose C. Una dettagliata analisi di varie fibre isolate dal nervo linguale (Fig. 3) dimostrò

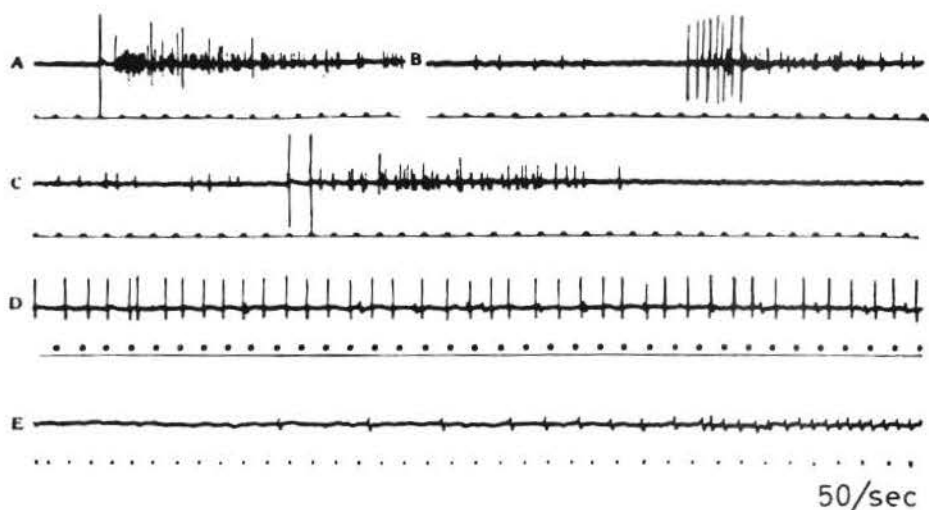


Fig. 3. — Spikes afferenti da singole, differenti fibre di un ramo sottile del nervo linguale in risposta a differenti stimoli applicati alla lingua del gatto.

- A. — Goccia d'acqua a 14°C.
- B. — Leggero getto d'aria senza visibile deformazione della mucosa seguito da uno più forte che provoca un'evidente deformazione.
- C. — Goccia d'acqua ad 80°C.
- D. — Effetto dell'aumento della pressione di una punta.
- E. — Getto d'acqua calda (60°C) che determina risposta di una singola fibra amielinica (classe C) (11).

che toccando, raffreddando e bruciando la superficie della lingua si potevano evocare potenziali d'azione in diverse fibre nervose. La pressione provocò potenziali nelle grandi fibre nervose A, il raffreddamento o riscaldamento moderato della lingua provocarono potenziali in due tipi di fibre nervose Delta, mentre stimoli calorifici con una componente dolorosa (acqua calda > 45°C) provocò la comparsa di potenziali d'azione nelle fibre C. Questi ultimi potenziali erano i primi registrati dalle singole fibre nervose di tipo C. Solo vent'anni dopo il prof. Iggo in Scozia (12,13) ha registrato gli stessi fenomeni elettrici da analoghe fibre di tipo C. Dopo queste esperienze io ero giunto alla conclusione che il dolore è trasmesso tanto dalle fibre nervose fini coperte di mielina (classe A-Delta), quanto da fibre amieliniche a velocità di conduzione molto più lenta.

Il dott. Sjöqvist in quel tempo lavorava presso il neurochirurgo Olivecrona e si interessava della terapia chirurgica della nevralgia al trigemino. Io gli suggerii di eseguire una ricerca sul decorso delle vie trigeminali, per controllare se le fibre nervose di piccolo diametro si separavano dalle altre a livello della radice, oppure dopo l'entrata nel midollo allungato. Gli studi istologici di Sjöqvist (14) dimostrarono che la seconda ipotesi era giusta: nel tratto intrabulbare del trigemino le fibre di maggior diametro continuavano a salire, mentre le fibre più sottili deviavano verso il basso. In assenza di Olivecrona, Sjöqvist operò tre pazienti con nevralgia al trigemino. Egli incise il tratto bulbospinale all'altezza dell'oliva caudale. Il risultato fu quello previsto: analgesia completa in tutta la parte omolaterale della faccia, con residua sensibilità al tatto ed alla pressione. Questo metodo di operazione, la tractotomia di Sjöqvist, diventò famoso. Sfortunatamente questo esimio neurochirurgo e carissimo amico morì prematuramente all'età di cinquantadue anni.

Qualche anno dopo misi a punto la registrazione dei potenziali di azione da sottili fasci di fibre afferenti del nervo safeno del gatto (Fig. 4). Questo esperimento rafforzò la mia convinzione che le fibre A-Delta e C erano specificamente responsabili della trasmissione di tutti gli stimoli di natura nociva. Perdi più io scoprii che un leggero stimolo della pelle (che può essere paragonato a un vellichio o al solletico) provocava delle risposte non solo in fibre mielinizzate, ma anche in fibre di tipo C; queste ultime avrebbero dunque le loro terminazioni negli strati più superficiali dell'epidermide. Da queste ricerche risultò molto chiaramente che le sensazioni che noi comu-

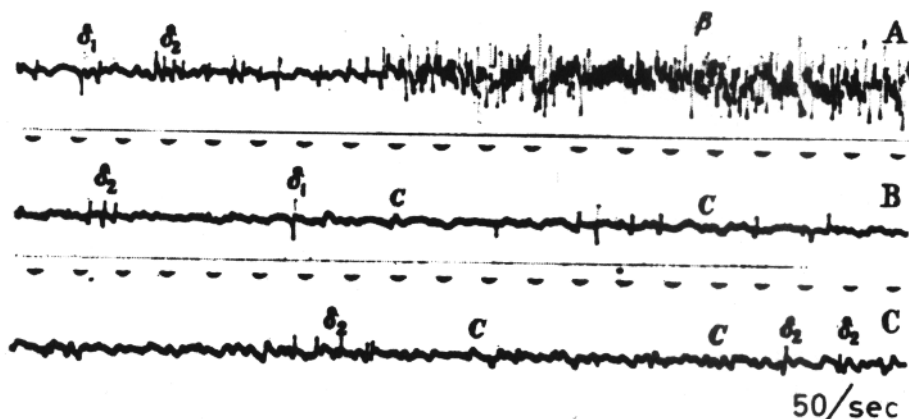


Fig. 4. — Spikes registrate da un sottile ramo del nervo safeno di gatto.

- A. — Azione di un titillamento della pelle, eseguito con una penna d'oca; si osservi la scarica di spikes durante la stimolazione.
 - B. — 10 secondi dopo la stimolazione: scarica residua delle fibre A-Delta e C.
 - C. — Il calore radiante provoca impulsi solo nelle fibre A-Delta e C.
- (I tracciati vanno letti da destra a sinistra) (15,16).

nemente chiamiamo «tatto» non derivano da un solo tipo di ricettori. Ciò ha una completa rispondenza anche nell'esperienza soggettiva: infatti, lo stesso stimolo produce differenti sensazioni se applicato in differenti parti della pelle e cambiamenti *quantitativi* dello stimolo inducono cambiamenti *qualitativi* nelle sensazioni (^{15,16}). Era adesso completamente chiaro che le fibre

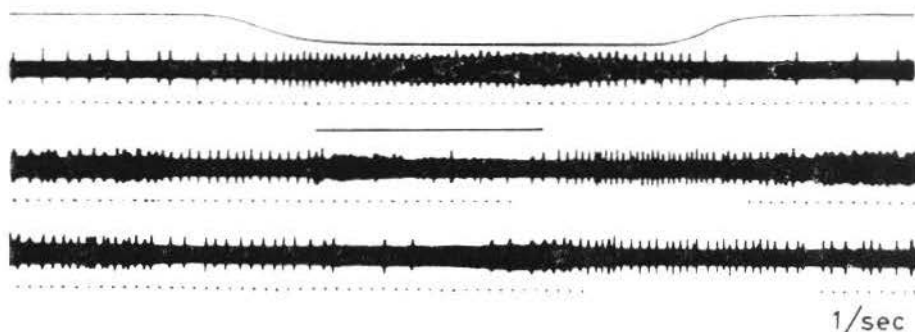


Fig. 5. — Registrazione di un sottilissimo ramo del nervo infraorbitale del cane. In alto, attività di una fibra proveniente da un recettore sensibile al freddo quando la temperatura della pelle è abbassata da 30 a 25°C. In mezzo, attività spontanea di fibre inibite da una leggera pressione di un dito caldo. In basso, il dito caldo si trova qualche mm sopra la pelle; questo è sufficiente per inibire l'attività del ricettore. Tempo in secondi (¹⁷).

del gruppo A-Delta erano messe in azione non solo da stimoli dolorosi ma anche da quelli tattili e calorifici (Fig. 5 e 6) e che le fibre di tipo C sono

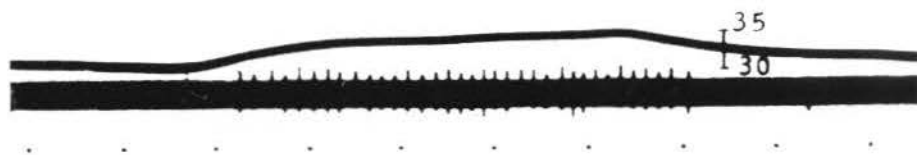


Fig. 6. — Ri-posta di una fibra del nervo safeno di cane al calore proveniente da un ricettore sensibile al caldo. Velocità di conduzione: 0,4 m/sec. Tempo in secondi (¹⁸).

responsabili della sensazione di solletico e di dolore. Il ruolo delle fibre A-Delta fu affrontato molti anni dopo da Maruhashi, Mizuguchi e Tasaki (¹⁹), i quali confermarono che il dolore è trasmesso da fibre A-Delta e C. Queste ultime costituiscono dall'80 al 90% delle fibre cutanee afferenti, fatto che mette bene in evidenza il loro ruolo primario nella trasmissione delle sensazioni cutanee.

Già nel 1901 Alrutz (⁴), a Uppsala, suppose che il solletico ed il prurito fossero trasmessi da fibre speciali. Se si passa in modo estremamente leggero un crine sopra la pelle, si proverà una sensazione di solletico e il

desiderio di grattarsi. Dopo essersi grattati, con l'unghia per esempio la stessa stimolazione non provocherà più solletico. Solo dopo circa venti minuti i ricettori specifici riacquisteranno la loro sensibilità e potranno ritrasmettere la stessa sensazione. È da tenere presente inoltre che io dimostrai nel 1939^(15,16) che la stessa cordotomia, come la tractotomia di Sjöqvist, dà una completa analgesia ed abolisce anche la sensazione di solletico. Su questo argomento ho avuto con Adrian un interessante scambio di opinioni; ed una volta egli mi scrisse che la mia ipotesi, che postulava l'esistenza di fibre specifiche deputate a trasmettere il solletico ed il prurito, era accettabile; ma egli aggiunse una domanda: «Qual'è la funzione di questi ricettori»? Al che io risposi: «Se lei entra in una scuderia o in una stalla potrà notare che il leggero contatto delle mosche o di altri insetti sul manto dei cavalli provoca dei movimenti riflessi di difesa. Questo tipo di sensibilità della pelle si è sviluppato nell'uomo e nell'animale ed è servito nel corso dei millenni per difendersi dagli insetti».

Penso che una delle ragioni che ha ostacolato l'accettazione della mia teoria di una conduzione specifica delle varie sensazioni sia stata la mancata dimostrazione, su base anatomica, di strutture differenti dei terminali sensitivi. Vorrei citare a questo proposito che Iggo nel 1959^(12,13) ha confermato le mie osservazioni trovando un gran numero di fibre di tipo C che reagivano specificatamente ad alta e bassa temperatura ($> 45^{\circ}\text{C}$ e $< 8^{\circ}\text{C}$), e a stimoli meccanici forti, pizzicamenti o stimoli con oggetti pungenti e taglienti. Più recentemente, Burgess e Perl⁽²⁰⁾, a Salt Lake City, hanno introdotto un nuovo metodo per lo studio delle afferenze sensoriali. Essi hanno inserito microelettrodi nelle cellule dei gangli posteriori ed hanno confermato che un gran numero di fibre di tipo C sono fibre specifiche, che rispondono sia a stimoli dolorosi, sia al calore, al freddo forte, al pizzicamento della pelle, ecc.; alcune fibre di tipo C sono selettivamente sensitive, un gruppo al calore ($> 45^{\circ}\text{C}$), e un altro gruppo a stimoli meccanici nocivi. Inoltre essi trovarono un gran numero di fibre cutanee che reagivano solo a tocchi molto leggeri e ripetuti, come quando un insetto passeggia sulla pelle.

Le conclusioni che io vorrei trarre da questo mio breve *excursus* di fisiologia sensoriale sono le seguenti. Il dolore è trasmesso da fibre nervose specifiche, molto sottili, mieliniche ed amieliniche, i cui ricettori rispondono a stimoli di alta soglia, trasmettendo le informazioni al cervello in tratti nervosi separati. Queste fibre dolorifere decorrono nei nervi insieme ad altre fibre nervose di diametro simile, e non si possono separare al microscopio. Quasi tutti gli stimoli dolorosi producono anche impulsi nelle fibre di soglia inferiore. Queste fibre, che rispondono alla temperatura, al tatto, al solletico e così via, non danno origine a dolore in condizioni normali, ma possono indirettamente contribuire al dolore se traumi o processi patologici distruggono l'isolamento tra le fibre di un tronco o di un tratto nervoso. In queste con-

dizioni lo stimolo può trasferirsi da una fibra a soglia bassa (per esempio, una fibra di tatto) ad una fibra dolorifera a soglia alta. Sinapsi artificiali possono instaurarsi tra differenti fibre afferenti: ciò produce una iperalgesia della regione innervata.

Io qui ho solo sfiorato ciò che riguarda la lotta contro il dolore, il metodo neurochirurgico. Le ricerche farmacologiche trovano quotidianamente nuove sostanze antidolorifiche le quali — come i preparati salicilici — hanno effetto periferico sulle fibre terminali dolorifere, o — come la morfina o i barbiturici — hanno effetto centrale. Ancora non sappiamo qual'è il neurotrasmettitore nelle vie dolorifiche (nei gangli spinali, per esempio). Una indagine diretta a riconoscere il neurotrasmettitore a livello della sinapsi gangliare o di quella talamica dovrebbe portare ad una ricerca, più razionale che empirica, di nuove ed efficaci sostanze antidolorifiche.

BIBLIOGRAFIA

- (1) ADRIAN, E. D. *Proc. Roy. Soc. B.*, **106**, 596 (1931).
- (2) THUNBERG, T. *Skand. Arch. Physiol.*, **12**, 434 (1901).
- (3) ALRUTZ, S. *Undersökningar över smärtsinnet*, Uppsala Univ. Årsbok 91 (1901).
- (4) VON FREY, M. *Z. Biol.*, **76**, 1 (1922).
- (5) ZOTTERMAN, Y. *Acta Med. Scand.*, **80**, 185 (1933).
- (6) GASSER, H. S. & J. ERLANGER, *Am. J. Physiol.*, **88**, 581 (1929).
- (7) CLARK, D., J. HUGHES & H. S. GASSER. *Am. J. Physiol.*, **114**, 69 (1935).
- (8) LEWIS, T. & E. E. POCHIN. *Clin. Sci.*, **3**, 67 (1933).
- (9) RANSON, S. W. & P. R. BILLINGSLEY. *Am. J. Physiol.*, **40**, 571 (1916).
- (10) BLAIR, E. A. & J. ERLANGER. *Am. J. Physiol.*, **106**, 524 (1933).
- (11) ZOTTERMAN, Y. *Skand. Arch. Physiol.*, **75**, 105 (1936).
- (12) IGGO, A. *J. Physiol.*, **142**, 110 (1959).
- (13) FJÄLLBRANT, N. & A. IGGO. *J. Physiol.*, **145**, 28 P (1959).
- (14) SJÖQVIST, Ö. *Acta Psychiat. Neurol. Suppl.* XVII, 139 pp. (1938).
- (15) ZOTTERMAN, Y. *J. Physiol.*, **95**, 1 (1939).
- (16) ZOTTERMAN, Y. *Acta Psychiat. Neurol.*, **14**, 91 (1939).
- (17) IRIUCHIJIMA, J. & Y. ZOTTERMAN, *Acta Physiol. Scand.*, **51**, 283 (1961).
- (18) IRIUCHIJIMA, J. & Y. ZOTTERMAN, *Acta Physiol. Scand.*, **49**, 267 (1960).
- (19) MARUHASHI, J., K. MIZUGUCHI & I. TASAKI, *J. Physiol.*, **117**, 129 (1952).
- (20) BURGESS, P. R. & E. R. PERL. *Proc. Intern. Union. Physiol. Sc.* **VII**, 42 (1968).

Chimica e genetica delle catene leggere di immunoglobuline G di coniglio (*)

ALBERTO CHERSI (**)

Istituto di Chimica Organica ed Analitica, Università di Milano

Introduzione

In questi ultimi anni sono stati compiuti notevoli progressi sulla genetica e sulla chimica delle immunoglobuline, grazie a studi sistematici condotti in diversi laboratori. Vorrei qui riassumere alcuni di quei dati che hanno permesso di dare le prime risposte al problema della struttura delle catene leggere delle IgG di coniglio, e di definire alcune delle relazioni fra le differenze strutturali ed antigeniche fra i vari allotipi

Gli allotipi

Sembra ormai confermato che nel coniglio le specificità allotipiche, cioè le differenze strutturali ed antigeniche controllate geneticamente, sono associate a numerosi luoghi genetici. Le specificità allotipiche a1, a2, a3 sono presenti nella frazione Fd, cioè N-terminale, delle catene pesanti, e sono controllate da alleli mendeliani nel luogo chiamato a^(1,2). Questi determinanti antigenici sono presenti in tutte le classi di immunoglobuline, cioè su catene pesanti μ , γ , α , ε , δ , e riflettono probabilmente differenze geneticamente controllate in amminoacidi in particolari zone relativamente costanti della regione V_H.

Altri determinanti antigenici sono invece rappresentati solo sulle catene di tipo γ , cioè nelle IgG: questi sono i determinanti A8, A10; A11, A12; A14,

(*) Seminario tenuto il 24 febbraio 1972 nell'Istituto Superiore di Sanità. Parte dei dati presentati sono stati ottenuti dall'A. nei Laboratori del Dott. Ettore Appella e della Dott.ssa Rose Mage dei National Institutes of Health, Bethesda, Md., U.S.A.

(**) Indirizzo attuale: Istituto Regina Elena, Roma.

A15: queste forme alleliche corrispondono a leggere variazioni nella struttura primaria della parte costante, ed esattamente ad una differenza nel carboidrato, unito alla regione Fc, per gli allotipi A8 e A10 (3); ad un interscambio metionina-treonina, nella regione « Hinge », per gli allotipi A11 e A12 (4); ad un interscambio alanina-treonina, nella regione Fc, per gli allotipi A14 e A15 (5).

Le specificità allotipiche b4, b5, b6, b9 sono localizzate invece sulle catene leggere, e sono controllate da alleli mendeliani nel luogo chiamato b (6,7). Questi determinanti antigenici corrispondono a sostituzioni multiple in amminoacidi, che sono localizzate nella metà costante delle catene leggere: le notevoli differenze strutturali che si riscontrano in peptidi corrispondenti della parte C-terminale di catene leggere b4, b5, b6 e b9 sono infatti da correlarsi ad allotipia al luogo b.

Le catene b-positive mostrano una forte omologia con le catene di tipo k dell'uomo e del topino: vi è poi evidenza chimica ed immunologica che esistono in piccola quantità, sia in conigli omozigoti che eterozigoti, anche catene leggere omologhe alle catene λ umane (8,9). Esse non portano determinanti antigenici controllati dal luogo b, e sono state chiamate b-negative (6,10). Tali catene sono poi risultate avere due distinti allotipi, c7 e c21, controllati da un terzo luogo c, una regione genetica non collegata al luogo b (11).

Uno schema sulla distribuzione delle diverse specificità allotipiche è riportato nella Tab. 1.

TABELLA 1

Regioni delle immunoglobuline di coniglio controllate da geni distinti

CATENE PESANTI		CATENE LEGGERE	
a) Variabile:	a1 a2 a3 ...	a) Variabile:	?
b) Costante:	A 8 } A10 } A11 } A12 } A14 } A15 } ...	b) Costante	
		tipo k:	b4 b5 b6 b9
		tipo λ	c7 ? c21 ?

Preparazione di catene leggere

Le IgG vengono generalmente ottenute dal siero di conigli omozigoti per frazionamento con solfato di sodio (¹²), o per trattamento con Rivanol (¹³), seguiti da cromatografia su DEAE-Cellulosa. Il loro grado di purezza può poi essere facilmente controllato per elettroforesi su gel di poliacrilammide (¹⁴).

La separazione delle catene pesanti dalle leggere può essere effettuata per riduzione e carbossimetilazione, seguite da gelfiltrazione su Sephadex in acido formico o propionico (^{15,16}), o mediante parziale solfitolisi, seguita da gelfiltrazione su Sephadex G 100 in urea-acido formico (^{17,18}). Questo metodo è generalmente preferibile per la sua semplicità.

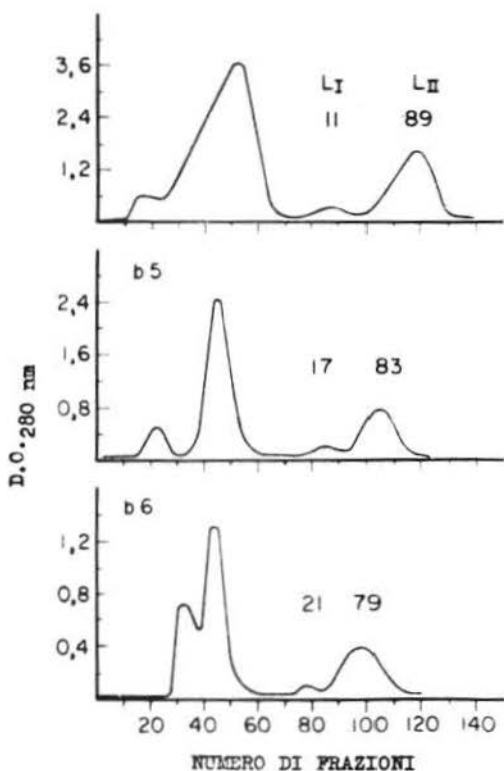


Fig. 1. — Separazione per gelfiltrazione fra catene pesanti e leggere di IgG di conigli b4 b5 b6 dopo solfitolisi parziale. Si sono utilizzate colonne di Sephadex G 100 equilibrate con urea 6 M, acido formico 0,05 M. Il picco principale contiene catene pesanti, gli ultimi due catene leggere (¹⁹).

Nella Fig. 1 vengono riportate alcune separazioni fra catene pesanti e leggere ottenute per solfitolisi e gelfiltrazione, dalle IgG di conigli b4, b5 e b6: si nota che si ottengono, per le catene leggere, due picchi, L_I e L_{II}, i cui K_d sono all'incirca 0,36 e 0,48 rispettivamente (¹⁹). Il primo picco di catene leggere contiene tutte le catene λ , cioè le b-negative, assieme a piccole quantità di catene κ di tipo particolare, le κ_A ; il secondo picco contiene tutte le altre catene di tipo κ , chiamate κ_B (¹⁹).

La separazione fra le catene leggere non è dovuta ad una differenza di peso molecolare, in quanto esse hanno pressapoco lo stesso numero di amminoacidi, ma al fatto che la catene λ , come pure le k_A , contengono due ponti S-S, mentre le k_B contengono tre ponti S-S, il che distingue il coniglio da tutti gli altri animali. Siccome con la solfitolisi parziale non si rompono che i ponti S-S intercatene, mentre quelli intracatene rimangono intatti, la conformazione delle catene resta poco alterata. Ed è una differenza di conformazione fra molecole a due e a tre ponti disolfuro interni che permette la loro separazione per gelfiltrazione.

Le catene k_B , che negli allotipi b4, b5, b6 rappresentano circa l'80-90 per cento di tutte le catene leggere, vengono generalmente ottenute a tal grado di purezza nelle frazioni L_{II} da rendere possibile la loro utilizzazione diretta per gli studi strutturali. Anche le catene λ , che però rappresentano solo il 5-10 per cento delle catene leggere negli allotipi citati, possono essere recuperate da conigli normali, generalmente b5b5 omozigoti, e precisamente dal picco L_I . Le catene k_A presenti in questa frazione possono essere facilmente allontanate dalle b-negative per azione di un opportuno antisiero anti-b5, ottenuto puro per passaggio di un antisiero su una colonna di immunoassorbente Sepharose- L_{II} , e successiva eluizione con tampone glicina-HCl (18).

Il modo migliore per ottenere catene di tipo λ è quello di ricorrere alla soppressione dell'espressione fenotipica del coniglio al luogo b. È noto che un coniglio eterozigote b4b5, nato da madre omozigote b4 immunizzata ripetutamente con b5, esprime questo allotipo in modo molto limitato, e compensa questa sua incapacità a produrre catene b5 producendo una maggior quantità di catene b4 (20). Al contrario, la soppressione dell'espressione fenotipica al luogo b di conigli omozigoti b5b5 con anti-b5 induce l'animale a sintetizzare catene leggere b-negative, ferma restando la quantità di IgG totali (7) (Fig. 2 e 3).

Per ottenere le catene λ , il siero dell'animale soppresso viene raccolto generalmente entro la 25^{ma} settimana di vita, in quanto dopo tale periodo il coniglio comincia a riaversi dalla soppressione, e a sintetizzare lentamente anche catene leggere di tipo k. La soppressione avviene con relativa facilità su conigli b5 (21), e specialmente b9 (22).

Se non si vuole ricorrere alla soppressione, catene di tipo λ possono essere anche ottenute in discreta quantità da conigli b9 normali: questa famiglia genetica, la cui specificità è controllata al luogo b da un allele relativamente poco frequente (23), produce una quantità di catene leggere λ notevolmente superiore a quella degli altri allotipi (24). Approfittando di una maggiore acidità delle IgG con catene leggere b9, si può ottenere un opportuno frazionamento delle immunoglobuline in tre gruppi per cromatografia su DEAE-Cellulosa. Dalla prima frazione si ottiene, per solfitolisi e gelfiltrazione, un

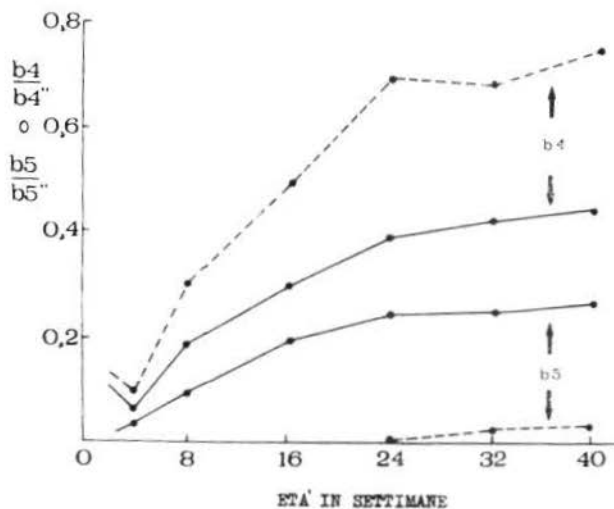


Fig. 2. — Quantità relative di catene leggere b4 e b5 prodotte nel primo anno di vita da conigli eterozigoti b4b5 nati da madri omozigoti b4 normali (—) o trattate con b5 (---). b4'' e b5'' sono le quantità di questi allotipi presenti in conigli omozigoti presi come riferimento.

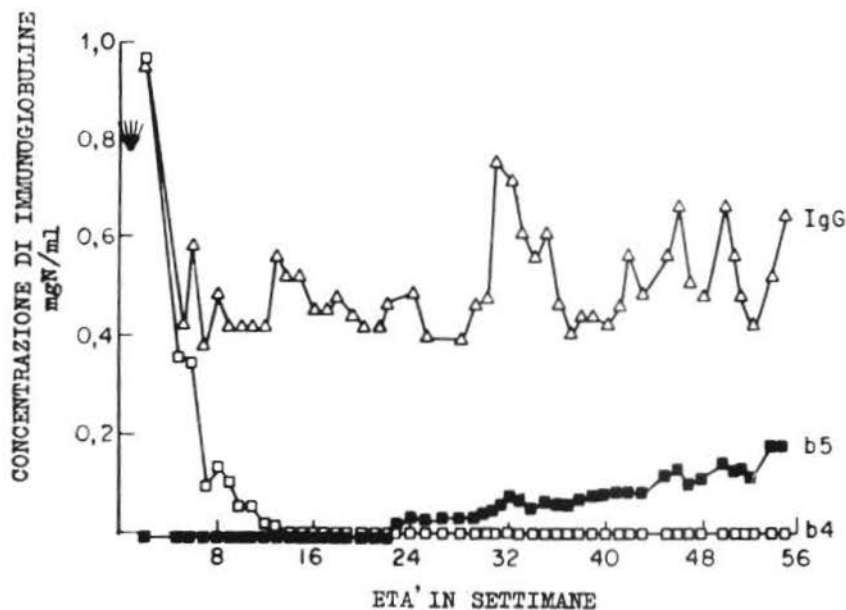


Fig. 3. — Concentrazione di IgG totali e di catene leggere b4 e b5 nel siero di un coniglio omozigote b5b5 nato da madre b4b5, soppressa con anti-b5, e a sua volta ripetutamente immunizzato con anti-b5 nella prima settimana di vita (21).

picco L_I con catene leggere di tipo λ , dalla seconda frazione catene λ e k_A (picco L_I) e k_B (picco L_{II}), e dalla terza frazione solo catene k_B (²⁵). Un esempio di tali separazioni per l'allotipo b9 è riportato in Fig. 4.

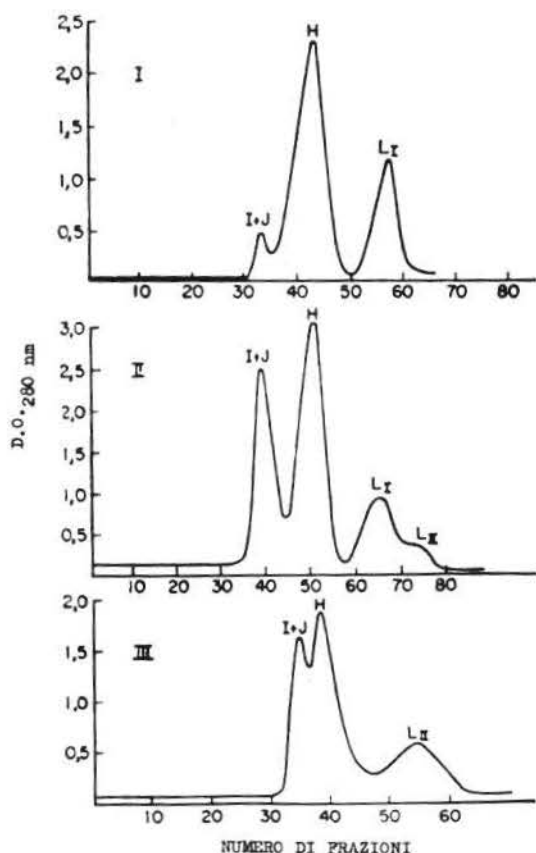


Fig. 4. — Separazione per gel-filtrazione di catene pesanti e leggere di IgG di conigli b9. Le IgG sono state precedentemente suddivise in tre frazioni I, II, III per cromatografia su DEAE-Cellulosa. Il picco L_I della frazione I è composto quasi esclusivamente da catene λ .

Sequenze di catene k

È noto che il coniglio non è soggetto a forme tumorali spontanee od indotte, e che non si è riscontrata in esso la produzione di immunoglobuline patologiche omogenee o delle corrispondenti Bence Jones urinarie: questo ha portato, come conseguenza, ad un progredire relativamente lento degli studi strutturali, in quanto per le sequenze si sono dovute utilizzare miscele di immunoglobuline a diversa specificità idiotipica.

Sensibili progressi sono stati comunque compiuti in questi ultimi anni nello studio della sequenza dell'allotipo b4, che è il più comune. Un certo numero di peptidi triptici sono stati isolati da catene leggere b4 ridotte ed amminoetilate (²⁶), mentre peptidi chimotriptici e peptici sono stati ottenuti

da catene ridotte e carbossimetilate (27, 28) utilizzando le note tecniche di cromatografia su colonna di Sephadex, Dowex 50 × 2, e DEAE-Sephadex, abbinata ad elettroforesi preparativa su carta a 3000 Volt e diversi pH. Frammenti a peso molecolare elevato sono stati poi isolati dopo digestione triptica di catene leggere guanidinate o trifluoroacetilate. Nella Tab. 2 vengono riportate le sequenze di peptidi triptici e peptici corrispondenti alle zone dei ponti disolfuro.

TABELLA 2

Sequenze di peptidi triptici e peptici delle regioni dei ponti S—S, isolati da catene leggere amminoetilate o carbossimetilate dell'allotipo b4

T1-1	(Ala Val Ala Ala Pro Thr Val Val Ile Phe Pro Pro Pro Asp Glu Asp - -Leu Thr Gly Gly Thr Ala Thr) Ile Val Cys
T3-2	Gly Asn Cys
T3-4	Gln Tyr Thr Cys Lys
P1-1	Thr Ser Thr Glu Tyr Asn Ser His Lys Gln Tyr Thr Cys Lys (Gly Thr) Val
P1-2	Ser Lys Thr Pro Glu Asp Ser Ala Asp Cys Thr Tyr
P1-3	Glu Cys ^{Ala} Asp Ala Ala Thr _{Asp}
P2-1	Tyr Tyr Cys Gln ^{Gln} Gly Ser _{Gly} Ala Tyr
P2-3a	Ile Val Cys
P2-3b	Ile ^{Asn} Ser Cys _{Ser}
P4-2	Asp Arg Gly Asn Cys

I peptidi P1-2, P1-3, P2-1 e P2-3b appartengono alla regione variabile.

Pochi dati esistono invece per gli altri allotipi, all'infuori delle sequenze del peptide C-terminale (29), riportate in Tab. 3, e dei primi 15-20 residui della parte N-terminale variabile, determinati questi ultimi mediante il Sequen-

TABELLA 3

Confronto delle sequenze C-terminali di catene leggere b4, b5, b6

coniglio b4	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Asn	Cys
b5		Phe	Ser	Arg	Lys	Asn	Cys
b6			Ser	Arg	Lys	Ser	Cys
uomo, k	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys
topino, k	Ser	Phe	Asn	Arg	Asn	Glu	Cys

nator^(30,31). La grande eterogeneità che si riscontra praticamente in ogni posizione delle catene può essere dovuta, oltre che alle diverse specificità idiotipiche dei vari anticorpi componenti la miscela, anche alla presenza di catene con lunghezze leggermente diverse, e cioè con delezioni di uno o più amminoacidi alla posizione N-terminale (Tab. 4). Nel caso del coniglio b9, ad esempio, la presenza nel «pool» delle catene leggere di due catene a sequenza anche simile, una delle quali mancante però del primo amminoacido (Ala), porterebbe, con il metodo della sequenza diretta, a determinare eterogeneità solamente apparenti. La sequenza di anticorpi omogenei diretti contro antigeni diversi ha confermato la possibilità dell'esistenza di catene con delezioni all'N-terminale⁽³²⁾.

Sequenze di catene λ

Notevoli dati sono stati ottenuti anche sulla struttura delle catene leggere di tipo λ , cioè b-negative. Di esse si conoscono, oltre ai peptidi N- e C-terminali, anche le sequenze dei quattro peptidi delle regioni dei due ponti disolfuro.

A questo scopo catene leggere b-negative, ottenute da conigli soppressi b5b5, e contenenti all'incirca uguali quantità delle due forme allotipiche c7 e c21, sono state ridotte ed amminoetilate con ¹⁴C-etilimina. Dopo idrolisi triptica, i peptidi sono stati separati su Sephadex G 25 superfine, e le frazioni contenenti radioattività purificate o per cromatografia su DEAE-Sephadex in tamponi volatili (peptidi grandi), o per cromatografia su Dowex 50 \times 2 in piridina-acido acetico seguita da elettroforesi su carta (peptidi medi o piccoli). Di tutti i peptidi radioattivi, corrispondenti alle regioni dei due ponti disolfuro e del C-terminale, sono state determinate, con i metodi tradizionali, le sequenze complete⁽³³⁾ che sono riportate in Tab. 5. Si nota che l'omologia con i peptidi corrispondenti delle catene λ umane e del topino è relativamente elevata.

Mediante digestione con subtilopeptidase si è poi isolato, per cromatografia su Dowex ed elettroforesi su carta, un peptide ninidrin-negativo, la cui sequenza è risultata:



e che per omologia con le corrispondenti catene λ umane, risulta essere il peptide N-terminale⁽⁸⁾.

Dalla Tab. 5 si può notare che i peptidi della parte costante sono stati ottenuti con una sequenza unica, cioè senza varianti allotipiche. Ciò starebbe ad indicare che i marcatori allotipici c7 e c21 non sono localizzati nella regione del ponte disolfuro della parte costante. Una delle possibilità è che questi determinanti antigenici, al contrario di quanto

TABELLA 4

Regioni ammino terminali di catene leggere dei vari allotipi

In caratteri maiuscoli vengono indicati gli amminoacidi presenti in quantità preponderante

	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
b4	ALA	VAL	VAL	THR	THR	THR	GLX	PRO	PRO	GLY	VAL	VAL			
		Asp	Asp	Pro	Met	Met	Glx	PRO	Val	Pro	Ala	Leu				
			Ile	Val	Glx	Glx	VAL	VAL	Gly	Ala	Pro	Pro				
b5	ALA	VAL	VAL	LEU	THR	GLX	THR	PRO	ALA	SER	VAL	SER	ALA	ALA	VAL
		Asp	Glx	Met	Met	Met	Thr	Glx	Thr	Pro	Val	Ser	Val	Val	Val	Ala
			Asp	Val	Glx	Glx	Val	Ala	Ala	Ser	Pro	Pro	Thr	Thr	Pro	Pro
b6	ALA	ASP	THR	VAL	MET	THR	GLX	THR	PRO	ALA	SER	VAL	ALA	ALA	VAL
		Val	Val	Val	Leu	Thr	Glx	Thr		Val	Val	Ala	Leu	Leu	Val	Gly
b9	ALA	VAL	VAL	MET	THR	GLX	THR	PRO	SER	SER	VAL	ALA	ALA	ALA	VAL
		Val		Met	Thr		Thr	Pro		Val	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ala
		Asp		Leu						Pro		Ser				Ser
b9: a)	Ala	Val	Val	Met	Thr	Glx	Thr	Pro	Ser	...						
b)	Val	Val	Met	Thr	Glx	Thr	Pro	Ser	...							

TABELLA 5

Sequenze dei peptidi contenenti cisteina di catene leggere λ
di coniglio⁽³³⁾ e topino⁽³⁴⁾

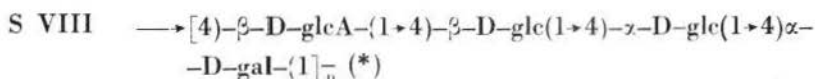
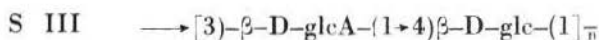
	20	21	22		23	24	25	26	27	28					
Coniglio	Leu	Thr	Cys												
Topino	Leu	Thr	Cys												
	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78
Coniglio	Phe	Ser	Gly	Ser	Thr	Asp	Gly	Tyr	Thr	Ala	Ser	Leu	Thr	Ile	Thr
Topino	Phe	Ser	Gly	Ser	Leu	Ile	Gly	Asn	Lys	Ala	Ala	Leu	Thr	Ile	Thr
	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90			
Coniglio	Gly	Ala	Glx	(Gly)	Val	Asp	Glx	Ala	Asx)	Tyr	Tyr	Cys			
Topino	Gly	Ala	Glu	Thr	Glu	Asp	Glu	Ala	Ile	Tyr	Phe	Cys			
	132	133	134	135	136										
Coniglio	Ala	Thr	Leu	Val	Cys										
Topino	Ala	Thr	Leu	Val	Cys										
	189	190	191	192	193	194	195								
Coniglio	Ser	Tyr	Gln	Val	Ser	Thr	Cys								
Topino	Ser	His	Ser	Tyr	Ser	Ser	Cys								
	207	208	209	210	211	212	213	214							
Coniglio	Ser	Leu	Ala	Pro	Ala	Glu	Cys	Ser							
Topino	Ser	Leu	Ser	Arg	Ala	Asp	Cys	Ser							

succede per quelli controllati dal luogo b, riflettano sostituzioni singole in amminoacidi, o che corrispondano a sostituzioni localizzate nella parte variabile. La discussione su questo terzo luogo genetico è comunque ancora aperta: non si può escludere che esista un terzo allele al luogo c, come pure che le forme c7 e c21 non siano forme allotipiche, ma forme isotipiche, analoghe cioè alle forme Oz e Kern delle catene λ umane (11).

Gli anticorpi omogenei

Il problema della sequenza completa delle immunoglobuline di coniglio sarebbe rimasto probabilmente ancora per anni senza soluzione, data la difficoltà di eseguire sequenze su proteine eterogenee, se recentemente non si fosse riusciti ad ottenere da alcuni conigli, per immunizzazione con particolari antigeni, degli anticorpi che presentano una marcata omogeneità. Tali sono, ad esempio, gli anticorpi contro vaccini di streptococco (35, 36), pneumococco (37), p-amminobenzoato copulato a γ -globulina (38), e qualche altro.

Quando si utilizzano come antigeni i vaccini batterici, la risposta immunologica è diretta contro i polisaccaridi della parete cellulare del batterio: la marcata omogeneità delle immunoglobuline prodotte può essere spiegata in questo caso dal fatto che questi anticorpi sono diretti contro polimeri omogenei di una piccola unità ripetuta, che nel caso dei pneumococchi è ad esempio:



La risposta con limitata eterogeneità viene data solo da una piccola percentuale degli animali trattati: i conigli che hanno dato una risposta più omogenea per immunizzazione con lo stesso antigene si possono individuare dalla distribuzione delle proteine sieriche per elettroforesi su acetato di cellulosa (Fig. 5).

Questi anticorpi ad eterogeneità ristretta vengono isolati mediante un immunoassorbente specifico, che viene preparato generalmente per copulazione dell'antigene ad una proteina, e successiva reazione di questo coniugato con Sepharose modificato o con bromoacetilcellulosa (39). La purificazione dell'anticorpo può essere condotta per via cromatografica:

(*) Abbreviazioni: D-glcA = acido D-glucuronico; D-glc = D-glucosio; D-gal = D-galattosio.

esso viene selettivamente assorbito dall'immunoassorbente a pH alcalino, ed eluito poi a pH acido. La sua purezza viene quindi controllata per elettroforesi su acetato di cellulosa o su gel di poliacrilammide. Spesso può presentare più bande, che corrispondono ad immunoglobuline con strut-

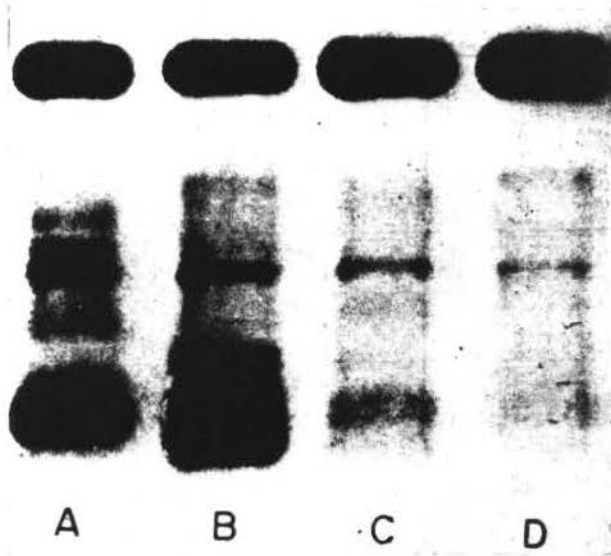


Fig. 5. — Elettroforesi su acetato di cellulosa del siero di alcuni conigli immunizzati con polisaccaride S VIII. A: siero mostrandone una regione di γ -globuline molto ristretta. B: siero mostrandone una regione di γ -globuline parzialmente ristretta. C: siero senza particolare evidenza di una regione ristretta di γ -globuline. D: siero normale.

tura leggermente diversa, e che possono essere separate ricorrendo all'uso di immunoassorbenti eterologi⁽³⁰⁾.

Dei sette od otto anticorpi omogenei isolati in sufficiente quantità, sono state determinate, con l'uso del Sequenator, le sequenze della parte N-terminale^(32, 40, 41): esse sono riportate nella Tab. 6.

È da notare che in tutte le diverse forme idiotipiche dell'allotipo b4 e b5 esaminate, alcune posizioni sono occupate sempre dal medesimo residuo (posizioni 3, 5, 6, 7, 15, 16, 18, 19, 20, 21), mentre alcune altre mostrano una grande variabilità. Due catene di anticorpi diretti contro antigeni differenti, (anti-Strep 2711 e anti-S VIII 325) sono uguali, all'infuori di una alanina in posizione 0. Una catena, (anti-Strep 26-90) ha una delezione all'N-terminale di due amminoacidi.

Dalla catena leggera di uno di questi anticorpi omogenei, ottenuto per immunizzazione di un coniglio omozigote al b4 con p-amminobenzoato diazotizzato e copulato a γ -globulina⁽³⁸⁾, sono stati isolati recentemente

TABELLA 6

Regioni ammino terminali di catene leggere di anticorpi con eterogeneità ristretta

	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
b4:																	
Anti-Strep 27-11	Ala	Asp	Val	Val	Met	Thr	Glx	Thr	Pro	Ala	Ser	Val	(Ser)	Glu	Pro	Val	Gly
Anti-S III 268-FZ	—	—	Ile	—	—	—	—	—	—	—	—	—	Glx	—	Val	—	—
Anti-S VIII 325	Val	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	Thr	—	Ala	Ala	—	—
Anti-benzoato 2717	Val	Glx	—	Leu	—	—	—	—	Ser	Pro	—	—	—	Ala	Ala	—	—
Anti-S VIII 268-FZ	Ile	—	—	—	—	—	—	—	Ser	—	()	—	—	Val	—	—	—
b5:																	
Anti-arsonato 134-DD 8	Ala	—	—	Leu	—	—	—	—	Ala	Ser	Pro	—	—	Ala	—	—	—

i peptidi corrispondenti alle regioni dei 3 ponti S-S intracatene (28). La catena leggera è stata ridotta ed amminoetilata con ^{14}C -acido iodoacetico, e sottoposta a digestione peptica. I peptidi sono stati dapprima separati su Sephadex G 25 superfine, poi le due frazioni radioattive ottenute sono state frazionate per elettroforesi preparativa su carta a pH 6,4 e 3000 Volt (Fig. 6). I peptidi radioattivi, contenenti le carbosimetilcisteine, sono stati eluiti: di essi sono state fatte le sequenze riportate in Tab. 7.



Fig. 6. — Elettroforesi analitica su carta a 3000 Volt e pH 6,4 delle due frazioni radioattive ottenute per digestione peptica della catena leggera di un anticorpo omogeneo (anti-p-benzoato 2717), dopo riduzione e carbosimetilazione con ^{14}C acido iodoacetico. Sono indicate con un numero le posizioni dei peptidi radioattivi.

Una quantità leggermente maggiore di catena leggera è stata invece ridotta ed amminoetilata, e sottoposta a digestione triptica: 14 dei 19 peptidi teorici sono stati poi isolati con rese soddisfacenti, e di essi si stanno eseguendo le sequenze (42).

TABELLA 7

Sequenze di peptidi peptici isolati dalla catena leggera ridotta e carbossimetilata
con ¹⁴C-acido iodoacetico del coniglio 2717

P1-1	Thr	(Ser	Thr	Glx	Tyr	Asx	Ser	His	Lys	Gln	Tyr	Thr	Cys	Lys	(Gly	Thr)	Val
P1-2	Ser	(Lys	Ile	Ser	Glx	Asx	Ser	Asx)	Asp	Cys	Thr	Tyr	Thr				
P1-3a	Gln	Cys	Asx	Asx	Ala	Ala	Thr										
P1-3b	(Gln	Cys	Asx	Asx)													
P2-1	Tyr	Tyr	Cys	(Gly	Gly	Ala)	Asx	Tyr									
P2-2	Asp	Cys	Thr	Tyr	Leu												
P2-3a	Ile	Val	Cys														
P2-3b	Ile	Ser	Cys														

I peptidi P1-3b e P2-2 sono frammenti dei peptidi P1-3a e P1-2.

Nessun altro dato si conosce sino ad ora sulla struttura primaria degli altri anticorpi omogenei recentemente isolati, aventi differente specificità idiotipica ed allotipica. Il confronto fra le loro strutture chimiche dovrebbe permettere di individuare i determinanti antigenici dei vari allotipi, e localizzare le zone responsabili della complementarietà con l'antigene.

BIBLIOGRAFIA

- (1) TODD, C. W. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **11**, 170 (1963).
- (2) FEINSTEIN, A. *Nature*, **199**, 1197 (1963).
- (3) HAMERS, R., & C. HAMERS-CASTERMAN. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **32**, 128 (1967).
- (4) PRAHL, J. W., W. J. MANDY & C. W. TODD. *Biochemistry*, **8**, 4935 (1969).
- (5) APPELLA, E., A. CHERSI, R. MAGE & S. DUBISKI. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **68**, 1341 (1971).
- (6) OUDIN, J. *J. Cellular Physiol.*, **67**, 77 (1966).
- (7) DUBISKI, S. *Nature*, **214**, 1365 (1967).
- (8) APPELLA, E. R. MAGE, S. DUBISKI & R. A. REISFELD. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **60**, 975 (1968).
- (9) RUDE, E., & D. GIVOL. *Biochem. J.*, **107**, 449 (1968).
- (10) DRAY, S., G. O. YOUNG & L. GERALD. *J. Immunol.*, **91**, 403 (1963).
- (11) GILMAN-SACHS, A., R. MAGE, G. O. YOUNG, C. ALEXANDER & S. DRAY. *J. Immunol.*, **103**, 1159 (1969).
- (12) KEKWICK, R. A. *Biochem. J.*, **34**, 1248 (1940).
- (13) HOREJSI, T. & R. SMETANA. *Chem. Listy*, **48**, 758 (1964).
- (14) REISFELD, R. A. & P. A. SMALL. *Science*, **152**, 1253 (1966).
- (15) FLEISCHMAN, J. B., R. H. PAIN & R. R. POSTER. *Arch. Biochem. Biophys.*, **99**, 174 (1962).
- (16) REISFELD, R. A., A. NISONOFF & S. DRAY. *Immunochemistry*, **2**, 155 (1965).
- (17) FRANEK, F. & R. S. NEZLIN. *Folia Microbiol.*, **8**, 128 (1963).
- (18) REJNEK, J., R. MAGE & R. A. REISFELD. *J. Immunol.*, **102**, 638 (1969).
- (19) REJNEK, J., E. APPELLA, R. MAGE & R. A. REISFELD. *Biochemistry*, **8**, 2712 (1969).
- (20) MAGE, R., & S. DRAY. *J. Immunol.*, **95**, 525 (1965).
- (21) MAGE, R., G. YOUNG, J. REJNEK, R. A. REISFELD, S. DUBISKI & E. APPELLA. *Protides of the Biological Fluids* Vol 17, Pergamon Press, 1970 p. 215.
- (22) CHERSI, A., & R. MAGE. Risultati non pubblicati.
- (23) DUBISKI, S., & P. MULLER. *Nature*, **214**, 696 (1967).
- (24) CARBONARA, A. O., R. TOSI, G. MANCINI & A. LUZZATI. *Progr. Immunobiol. Standard*, Vol. 4^o, S. Karger, Basel (1969).
- (25) CHERSI, A., R. MAGE, J. REJNEK & R. A. REISFELD. *J. Immunol.*, **104**, 1205 (1970).
- (26) APPELLA, E., A. CHERSI, J. REJNEK & R. A. REISFELD. *Symp. on Developmental Aspects of Antibody Formation and Structure*, Vol. I, Academic Press, N. Y., 1970 p. 327.
- (27) APPELLA, E. & A. CHERSI. Risultati non pubblicati.

- (28) APPELLA, E., A. CHERSI, O. A. ROHOLT & D. PRESSMAN. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **68**, 2569 (1971).
- (29) APPELLA, E. J. REJNEK & R. A. REISFELD. *J. Mol. Biol.*, **41**, 473 (1969).
- (30) JATON, J., M. D. WATERFIELD, M. N. MARGOLIES & E. HABER. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **66**, 959 (1970).
- (31) CHERSI, A., R. MAGE & E. APPELLA. *Federation Proc.*, **30**, 1307 (1971).
- (32) APPELLA, E., A. CHERSI & R. MAGE. Risultati non pubblicati.
- (33) APPELLA, E., A. CHERSI, J. REJNEK, R. A. REISFELD & R. MAGE. *Biochemistry*, in corso di stampa.
- (34) APPELLA, E. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **68**, 590 (1971).
- (35) OSTERLAND, C. K., E. J. MILLER, W. W. KARAKAWA & R. M. KRAUSE. *J. Expl. Med.*, **123**, 599 (1966).
- (36) MILLER, E. J., C. K. OSTERLAND, G. M. DAVIE, & R. M. KRAUSE. *J. Immunol.*, **98**, 710 (1967).
- (37) PINCUS, J. H., J. C. JATON, K. J. BLOCK & E. HABER. *J. Immunol.*, **104**, 1143 (1970).
- (38) ROHOLT, O. A., B. K. SEON & D. PRESSMAN. *Immunochemistry*, **7**, 329 (1970).
- (39) ROBBINS, J. B., J. HAINOVICH & M. SELA. *Immunochemistry*, **4**, 11 (1967).
- (40) HOOD, L., K. EICHMANN, H. LACKLAND, R. M. KRAUSE & J. J. OHMS. *Nature*, **228**, 1040 (1970).
- (41) WATERFIELD, M. D., J. C. JATON, M. N. MARGOLIES & E. HABER. *Federation Proc.*, **29**, 438 (1970).
- (42) APPELLA, E., A. CHERSI, O. A. ROHOLT & D. PRESSMAN. *Federation Proc.*, in corso di stampa.