
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI
RENDICONTI

GIUSEPPE TOLONE, FILIPPO CICCIMARRA, GIUSEPPE
MARIO PONTIERI

**Isolamento dal siero di maiale di globuline con
attività del terzo componente del complemento e
caratterizzazione immunochimica di esse. Nota II**

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 42 (1967), n.1, p. 105–111.*
Accademia Nazionale dei Lincei

[<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1967_8_42_1_105_0>](http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1967_8_42_1_105_0)

L'utilizzo e la stampa di questo documento digitale è consentito liberamente per motivi di ricerca e studio. Non è consentito l'utilizzo dello stesso per motivi commerciali. Tutte le copie di questo documento devono riportare questo avvertimento.

*Articolo digitalizzato nel quadro del programma
bdim (Biblioteca Digitale Italiana di Matematica)
SIMAI & UMI*

<http://www.bdim.eu/>

Patologia. — *Isolamento dal siero di maiale di globuline con attività del terzo componente del complemento e caratterizzazione immunochimica di esse.* Nota II di GIUSEPPE TOLONE, FILIPPO CICCIMARRA e GIUSEPPE MARIO PONTIERI, presentata (*) dal Socio L. CALIFANO.

RIASSUNTO. — Vedi Nota I.

La presente « Nota II » fa seguito alla « Nota I », con lo stesso titolo, uscita nel precedente fascicolo di questi « Rendiconti » (vol. XLI, fasc. 6). La quale contiene il Riassunto completo.

Frazionamento su Sephadex G-100 della preparazione B₂.

Dopo prove preliminari di frazionamento a mezzo di elettroforesi su colonna di cellulosa con la quale non è riuscito il recupero negli eluati delle varie frazioni di attività emolitica, si è proceduto al frazionamento per colonna di Sephadex G-100.

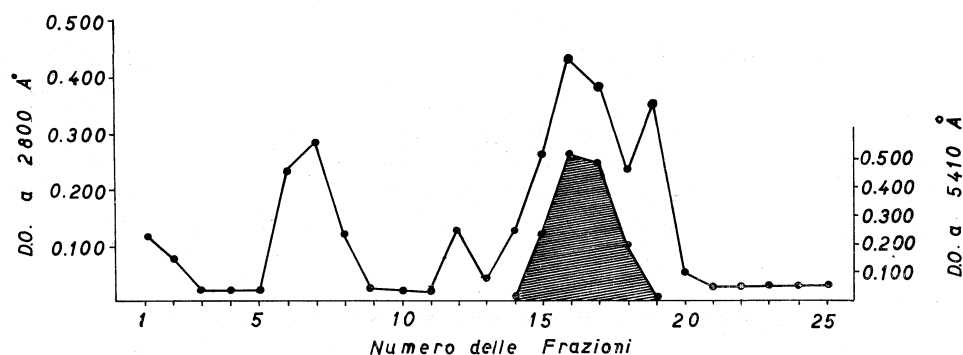


Fig. 3. — Separazione di frazioni su Sephadex G-100 da una preparazione B₂.

La fig. 3 dimostra i risultati ottenuti. Si ha risoluzione in cinque frazioni delle quali solo una è fornita di attività di C₃ che è stata messa in evidenza titolando l'attività emolitica delle singole frazioni su EAC_{1,4,2} in presenza di versene.

Sensibilità al calore della frazione contenente C₃ ottenuta per frazionamento su Sephadex G-100.

Al fine di meglio caratterizzare la proprietà della resistenza al calore del 3° componente complementare, isolato dalle altre proteine del siero, la frazione fornita della attività di tale componente è stata esposta alla temperatura di

(*) Nella seduta del 12 novembre 1966.

+56°C variando il tempo di esposizione. Nella fig. 4 è rappresentata la termolabilità del 3° componente presente nella frazione. L'attività scompare solo dopo esposizione a +56°C per 60'.

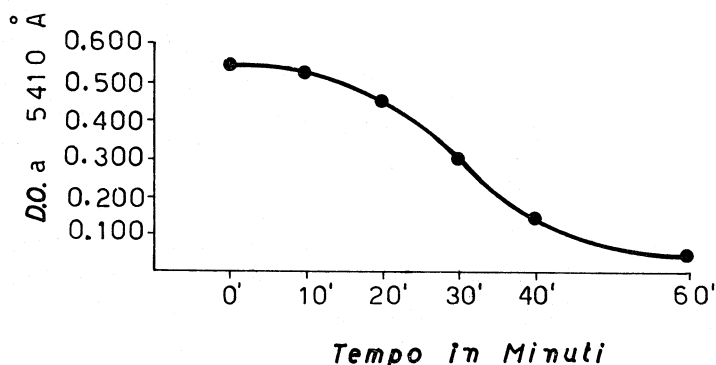


Fig. 4. - Azione della esposizione a 56°C per vario tempo sull'attività di C_3 nella frazione ottenuta per Sephadex G-100.

Produzione di anticorpi contro il 3° componente del complemento.

La fig. n. 5 riassume il risultato ottenuto nella prova seguente: a serie di tubi contenenti 0,9 ml di siero di maiale alla diluizione di 1 : 50 sono stati aggiunti rispettivamente 0,1 ml del siero immune in diluizione geometrica progressiva con ragione 2. Le miscele, dopo essere state rimescolate sono state incubate per 24 ore a +4°C e quindi centrifugate. Dei sopranatanti è stata determinata l'attività emolitica su eritrociti allo stato di $EAC_{1,4,2}$ in presenza di acido etilendiaminotetracetico (versene) al fine di determinare la eventuale inattivazione di C_3 , il componente che, in tali condizioni sperimentali, è responsabile della lisi eritrocitaria.

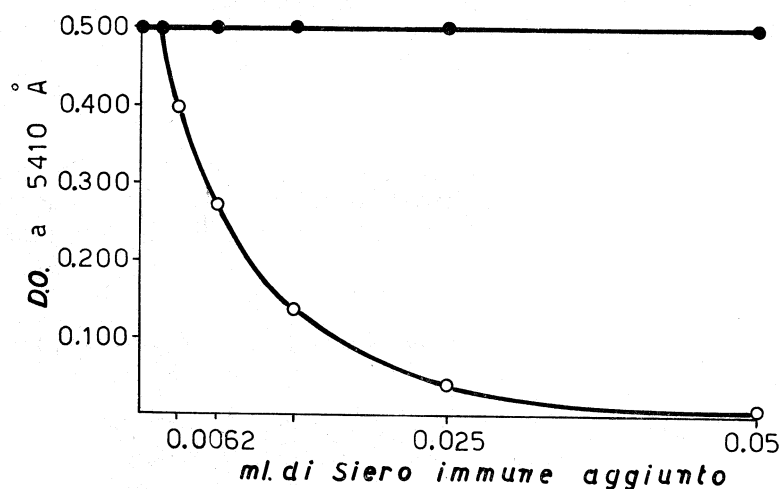


Fig. 5. - Titolazione dell'attività di C_3 di siero di maiale previamente incubato con siero di coniglio di controllo (●—●—●) e con siero di coniglio immunizzato (○—○—○).

Come la figura dimostra, con quantità di siero immune comprese tra 0,05 e 0,025 ml si ottiene totale inibizione del 3° componente complementare presente nella diluizione di siero di maiale adoperata. I sistemi emolitici erano costituiti da $0,2 \cdot 10^9$ cellule e 0,2 ml del sopranatante dei sistemi precipitanti sopra descritti. Per la tecnica di titolazione si rimanda ad altro lavoro (Pontieri e coll., 1962).

Da tale prova emerge il risultato che nel siero immune sono presenti anticorpi che reagiscono con il C_3 del siero di maiale.

La fig. 6 riassume i risultati ottenuti nella titolazione dell'attività di C_3 del siero di maiale dopo incubazione per 24 ore a $+4^\circ\text{C}$ con il siero immune

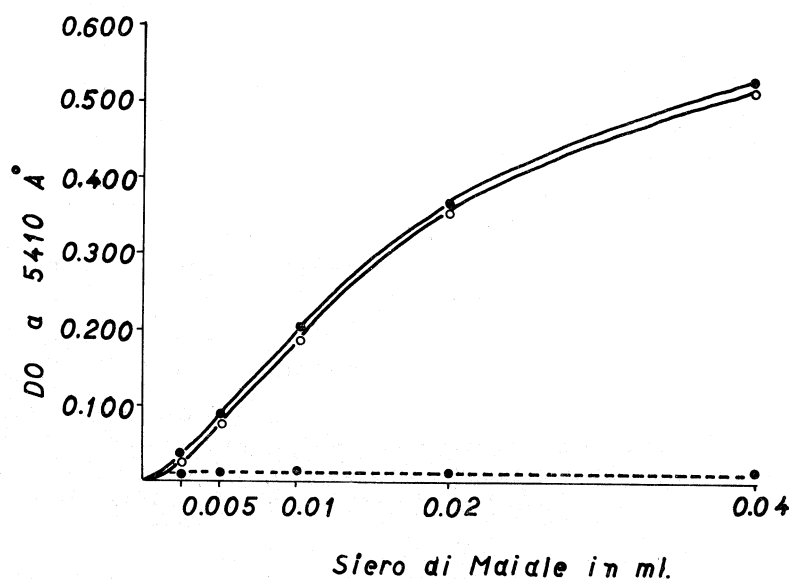


Fig. 6. — Titolazione dell'attività emolitica di siero di maiale come tale (●—●—●), preincubato con siero di coniglio non trattato (o—o—o) e con siero di coniglio immune (●---●---●).

e, come controllo, con siero di coniglio non trattato (1,8 ml di siero di maiale diluito 1 : 50 + 0,2 ml di siero di coniglio immune oppure 0,2 ml di soluzione tampone). Dopo centrifugazione e allontanamento del precipitato (quando presente) i sopranatanti sono stati saggiati per l'attività di C_3 , la quale risulta perduta nel siero di maiale tenuto a contatto col siero immune e immodificata in quello incubato col siero di coniglio di controllo.

Una prova simile è stata condotta adoperando come sorgente di C_3 la preparazione adoperata per la immunizzazione. In questo caso i due reagenti (preparazione e siero immune) sono stati riuniti in modo che a 0,2 ml di siero immune corrispondesse nella preparazione, una quantità di C_3 eguale a quella contenuta in 1,8 ml di siero di maiale alla diluizione di 1 : 50.

La fig. 7, che sommarizza i risultati, dimostra che anche in questo caso si è ottenuta inibizione di C_3 .

Nel sopranatante del sistema precipitante costituito dal siero di maiale + siero immune è stata eseguita anche la titolazione di C_1 , C_2 , e di C_4 . Anche di tali componenti è stata constatata la inibizione il qual fatto è da mettere in relazione con il noto fenomeno della fissazione di essi ai precipitati specifici.

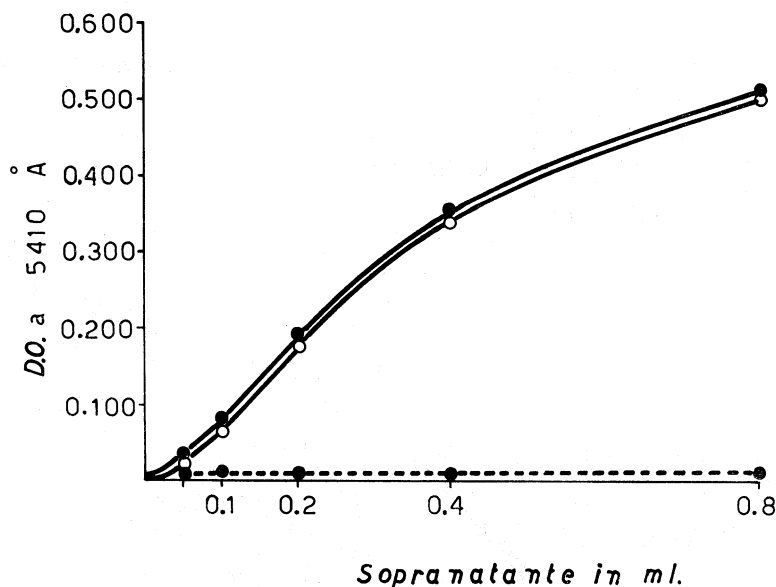


Fig. 7. - Titolazione dell'attività di C_3 nella preparazione ottenuta per trattamento con lisozima del precipitato formatosi per aggiunta di « Liquoid » al siero di maiale. Preparazione di controllo (●—●—●), incubata con siero di coniglio non trattato (○—○—○); incubata con siero di coniglio immune (●---●---●).

Sembra, difatti, di potere escludere nel siero immune la presenza di anticorpi diretti verso di essi per il fatto che la preparazione di C_3 , adoperata per l'immunizzazione, è costantemente risultata sfornita dell'attività degli altri componenti.

Prove di immunodiffusione e di immunoelettroforesi.

Prove di diffusione in gel d'agar e di immunoelettroforesi sono state, quindi, condotte al fine di determinare il grado di purificazione della frazione fornita di attività di C_3 , ottenuta a mezzo di filtrazione su Sephadex G-100 della preparazione usata per l'immunizzazione. Il siero immune è stato pertanto cimentato contro:

- a) siero di maiale;
- b) preparazione immunizzante;
- c) frazione ottenuta per Sephadex.

Come dimostrano le figg. 8 e 9 nel siero di maiale si mettono in evidenza almeno sette antigeni, nella preparazione adoperata per l'immunizzazione almeno quattro, nella frazione purificata solo due.

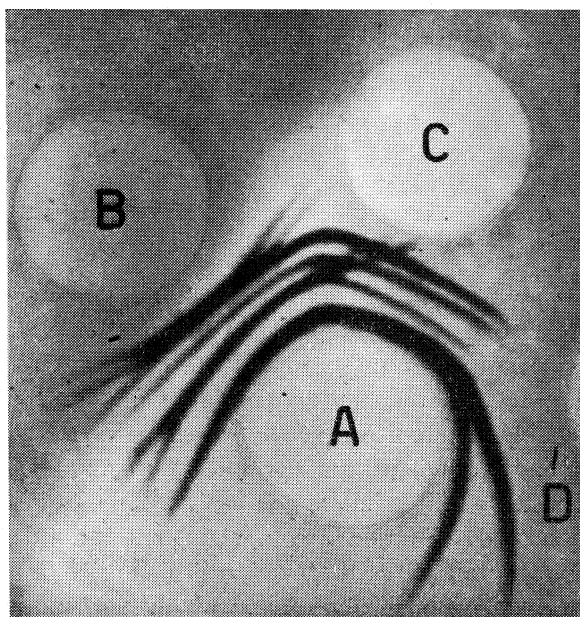


Fig. 8. - Prova di immunodiffusione in agar.

A) siero di coniglio immunizzato con la preparazione bruta fornita di attività di C'_3 indicata schematicamente B_2 ; B) siero di maiale; C) preparazione adoperata per l'immunizzazione; D) frazione ottenuta dalla precedente per filtrazione attraverso Sephadex G-100 e fornita di attività di C'_3 .

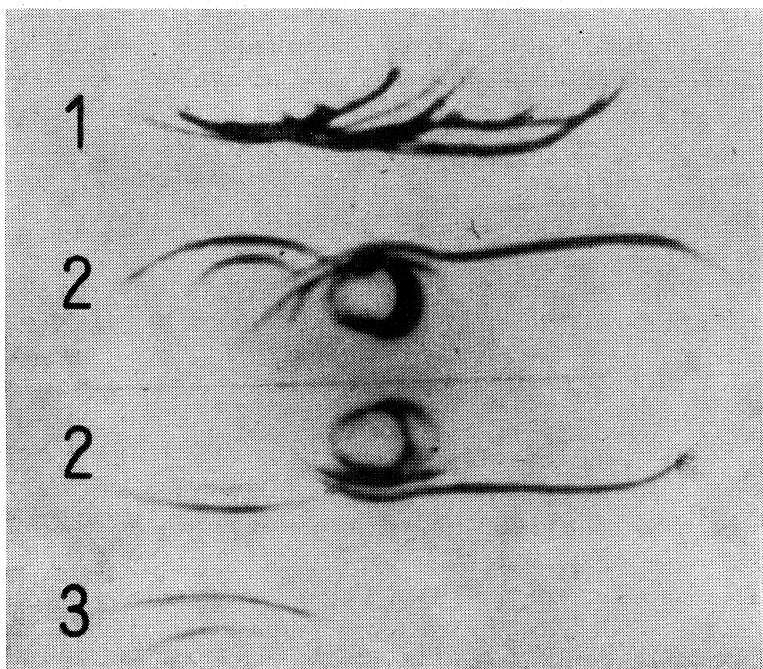


Fig. 9. - Immunolettroforesi.

Nelle fessure: siero di coniglio immunizzato con la preparazione bruta fornita di attività di C'_3 , indicata schematicamente B_2 . *Nei pozzi:* 1) siero di maiale; 2) preparazione adoperata per l'immunizzazione; 3) frazione ottenuta dalla precedente per filtrazione attraverso Sephadex G-100 e fornita di attività di C'_3 .

Il fatto che nella preparazione immunizzante si svelino meno antigeni che nel siero di maiale è verosimilmente dovuto al fatto che alcuni di questi, pur non essendo presenti in quantità tale da formare precipitato apprezzabile nel gel di agar, sono in quantità tale da aver avuto effetto immunizzante nel corso delle inoculazioni alle quali i conigli sono stati sottoposti.

DISCUSSIONE.

Il metodo sviluppato nel corso della presente indagine permette di ottenere rapidamente separazione del terzo componente complementare dal siero di maiale al quale sia stato aggiunto « Liquoid » in concentrazione di 600 $\mu\text{g/ml}$. Si formano precipitati insolubili nei quali sono anche conglobate le globuline fornite di attività di C_3 le quali passano in soluzione se i precipitati vengono risospesi in un mezzo contenente una proteina basica quale il lisozima.

Il meccanismo di tale liberazione non è dissimile da quello messo in luce in precedenti ricerche da (Pontieri e coll., 1962) nel corso delle quali è stata osservata restaurazione ad opera di proteine basiche del 3° reagente complementare preparato con siero di cavia inattivato con « Liquoid ».

La preparazione bruta fornita di attività di C_3 (schematicamente indicata come B_2) è suscettibile di ulteriore purificazione in seguito a filtrazione attraverso colonna di Sephadex G-100. La preparazione bruta inocolata in conigli insieme ad adiuvante di Freund determina produzione di anticorpi che inibiscono l'attività del terzo componente complementare posseduta dalla preparazione così come inattivato è il terzo componente del siero di maiale. In quest'ultimo in seguito alla incubazione con siero immune si ottiene anche diminuzione dell'attività del 1°, 2° e 4° componente di C' , fenomeno questo che va riguardato come la conseguenza della fissazione di tali componenti ai complessi immuni. Difatti, non essendo nella preparazione adoperata per l'immunizzazione contenuti i componenti suddetti, non appare possibile interpretazione diversa.

Il terzo componente di C' del siero di maiale, isolato col metodo suddetto, determina lisi di emazie allo stato di $EAC'_{1,4,2}$ e anche lisi di EA in presenza dei reagenti preparati con siero rispettivamente inattivato con « Liquoid » (R_3-L) o con formalina (R_3-F). La restaurazione dell'attività emolitica del terzo reagente R_3-L potrebbe essere anche la conseguenza di una restaurazione aspecifica dovuta alla presenza di lisozima nella preparazione (Pontieri e coll., 1962), onde particolarmente convincenti appaiono i risultati ottenuti nelle prove di titolazione di C_3 eseguite sia su $EAC'_{1,4,2}$ in presenza di versene che su EA in presenza di R_3-F .

Nella preparazione bruta sono contenute un numero considerevole di proteine come è svelato dalle prove di immunodiffusione e immunoelettroforesi, mentre nella frazione purificata il numero dei costituenti antigenici svelabili con tale metodo è ridotto a due. Nella prova di immunodiffusione (fig. 8) si osserva che la banda di precipitazione prossima al pozzetto del siero immune si risolve in due bande quando la reazione ha luogo con la preparazione purifi-

cata anziché con quella bruta o col siero *in toto*. Tale comportamento è indice del fatto che la unica linea risulta tale, negli altri casi, per la sovrapposizione delle linee di precipitazione indicanti la presenza di due costituenti antigenici, la risoluzione dei quali riesce possibile quando ne diminuisce la concentrazione.

Al momento, si può solo prospettare la possibilità che i due antigeni contenuti nella preparazione purificata siano da identificare con due dei fattori del complesso C₃ che Pontieri e Plescia (1965) e Ciccimarra e coll. (1964) hanno dimostrato essere titolabili rispettivamente con i due reagenti. L'ulteriore sviluppo della ricerca potrà o meno dare conferma di tale evenienza.

BIBLIOGRAFIA.

- [1] CAVALLO G., PONTIERI G. e IMPERATO S., « *Experientia* », 19, 36 (1963).
- [2] CICCIMARRA F., ZAPPACOSTA S. e SCHIANO S., « *Giorn. Microbiol.* », 12, 199 (1964).
- [3] HIRSCHFELD J., « *Science Tools* », 7, 18 (1960).
- [4] KABAT E. A. and MAYER M. M., *Experimental Immunochemistry*, Thomas Publ. Springfield Ill., U.S.A., (1961).
- [5] LEVINE L., MAYER M. M. and RAPP H. J., « *J. Immunol.* », 73, 435 (1954).
- [6] MAYER M. M., CROFT C. C. and GRAY M. M., « *J. Exptl. Med.* », 88, 427 (1948).
- [7] PONTIERI G., IMPERATO S. e CAVALLO G., « *Giorn. Microbiol.* », 10, 93 (1962).
- [8] PONTIERI G. M. and PLESCIA O. J., « *Experientia* », 21, 81 (1965).
- [9] RAPP H. J., SIMS M. R. and BORSOS T., « *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* », 100, 730 (1959).