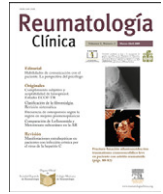


Reumatología Clínica

www.reumatologiaclinica.org



Revisión

Cincuentenario del descubrimiento de la estructura química de los anticuerpos

Dolores Ramos-Bello y Luis Llorente *

Departamento de Inmunología y Reumatología, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, México DF, México

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 4 de marzo de 2009

Aceptado el 5 de mayo de 2009

On-line el 4 de octubre de 2009

Palabras clave:

Anticuerpos

Historia

Inmunoquímica

RESUMEN

La identificación de la propiedad antitóxica del suero en 1890 por Emil von Behring y la introducción del término "Antikörper" por Paul Ehrlich en 1891 para referirse a uno de los mecanismos de defensa más relevantes del sistema inmunitario adaptativo, es decir, los mediadores de la respuesta inmunitaria humoral, marcan el inicio de la etapa de la inmunología moderna. La estructura en "Y" fue descrita hace cincuenta años por Gerald M. Edelman y Rodney R. Porter. Así, al cumplirse el cincuentenario de la descripción de la estructura química de los anticuerpos, consideramos oportuno no dejar pasar inadvertido el hecho a través de una breve remembranza y la revisión de dichos hallazgos.

© 2009 Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

Fiftieth anniversary of the description of the chemical structure of antibodies

ABSTRACT

The identification of the antitoxic property of serum in 1890 by Emil von Behring and the introduction of the term "Antikörper" by Paul Ehrlich in 1891 referring to one of the most relevant mechanisms of defense of the adaptive immune system, i.e., the humoral immune response mediators, mark the beginning of modern immunology. The "Y" structure was described 50 years ago by Gerald M. Edelman and Rodney R. Porter. Thus, on the fiftieth anniversary of the description of the chemical structure of antibodies, we consider it appropriate to celebrate this fact by sketching a brief outline and review of these epoch-making achievements.

© 2009 Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Keywords:

Antibodies

History

Immunochemistry

La ciencia ha creado su propia heráldica, un conjunto de insignias que han ejemplificado sus logros, sus campos, sus modas y sus rumbos. En la biología de nuestro tiempo, los dos emblemas más elegantes y de mayor estilo son la doble hélice del ADN y la Y de la molécula de inmunoglobulina. La Y es una de las moléculas mejor caracterizadas, y podríamos escribir un libro extenso acerca de ella. Pero ahora sólo nos concentraremos en los caminos y obstáculos que se tuvo que acometer para llegar a elucidar su estructura química, ahora hace cincuenta años.

Antecedentes

Podríamos situar el inicio de la historia de la inmunidad adquirida en el año 400 aC cuando Tucídides, en su libro *La Guerra del Peloponeso*, refiriéndose a la peste que azotó Atenas,

hacía notar que: "... los que habían sobrevivido a la enfermedad mostraron más compasión hacia los muertos y los enfermos, ya que la conocían bien y ahora se sentían seguros. Porque una segunda vez no la sufría nadie, al menos no como para morir de ella"¹.

Por los siguientes 2.300 años se consideró que a consecuencia de una enfermedad el cuerpo se volvía inmune, porque perdía un nutriente esencial para un determinado miasma, precisamente porque ese efluvio maligno lo habría consumido en su primera —y necesariamente no mortal— visita. Este concepto fue capaz de explicar satisfactoriamente el origen, la especificidad y la variable duración de la inmunidad en distintas enfermedades. Pero la inmunología, en ese lapso, aún no era ciencia.

En 1890 Emil Behring y Shibasaburo Kitasato descubrieron la seroterapia mediante el empleo del suero de conejos inmunizados contra tétanos y contra difteria (fig. 1), y con esto descubrieron que la inmunidad es la adquisición de algo —que se puede transferir—, y no la pérdida de algo que indiscutiblemente no se puede transferir a un organismo sano². Un año después, en la noche de navidad, se llevó a cabo la primera aplicación de la

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: luisllorentepeters57@gmail.com (L. Llorente).

Arrhenius no estaba del todo de acuerdo con el énfasis que ponía Ehrlich en el contorno molecular y, en cambio, postulaba que los antígenos y anticuerpos se combinaban mediante una forma de unión electrostática coloidal. Creía que la unión antígeno-anticuerpo compartía semejanzas con la interacción de ácidos débiles con bases. Este pionero fisicoquímico, cuyos experimentos fueron muy sonados en la época —a pesar de tener fundamentos erróneos—, introdujo en la inmunoquímica aspectos termodinámicos, las constantes de equilibrio, los coeficientes de viscosidad y otros parámetros cuantitativos, con lo que no sólo unieron, sino que literalmente fusionaron la química con la inmunología.

La primera evidencia experimental del modelo de grupos atómicos de Ehrlich fue llevada a cabo por Karl Landsteiner (premio Nobel de Fisiología o Medicina en 1930). Él midió meticulosamente la especificidad de las reacciones antígeno-anticuerpo a compuestos sintéticos con variaciones tan sutiles que disiparon toda duda sobre su exquisita especificidad y culminarían en un libro seminal aún vigente a pesar de los años⁸. Landsteiner descubrió las funciones de los haptenos y el efecto acarreador (*carrier effect*)⁹. Con sus experimentos logró dar a la idea de antigenicidad una contraparte material que era propia de la especificidad de los anticuerpos.

En esa época prevalecía la idea de que sólo las proteínas, y acaso también las glucoproteínas, eran las únicas estructuras químicas capaces de despertar la producción de anticuerpos, ya que esto jamás sucedía cuando se inmunizaban animales con azúcares. Sin embargo, en 1923, Michael Heidelberger y Oswald T. Avery, mientras estudiaban el polisacárido del neumococo, descubrieron lo contrario¹⁰. Inicialmente se consideraba que el polisacárido capsular del neumococo era reconocido como hapteno, capaz de unirse a un anticuerpo pero incapaz de inducir la producción de éste por sí solo. Posteriormente, con las dosis adecuadas y los huéspedes favorables, se demostró que los polisacáridos eran antígenicos y, más aún, inmunogénicos. Heidelberger, quien era químico orgánico de formación, utilizó el neumococo y otros hidratos de carbono complejos como herramientas para el microanálisis cuantitativo de la especificidad inmunológica que, como él decía: “liberaron de la tiranía de los títulos a la reacción antígeno-anticuerpo”¹¹.

Pero la inmunología, que por todo el primer cuarto del siglo XX había sido considerada una disciplina médica con claras aspiraciones terapéuticas, llegó a convertirse al final de la década de los años veinte en una mina de oro de investigación para los químicos. La química coloidal se encontraba en su cénit de popularidad, aunque ya se iniciaban las nociones sobre enlaces polares e hidrófilos. De importancia capital sobre esto último fue el modelo atómico de Niels Bohr, con su imagen de capas de electrones que introdujo la idea de electrón-valencia.

Ya en la siguiente década, en 1934, el médico inglés John R. Marrack propuso que las fuerzas hidrofílicas (enlaces o puentes de hidrógeno) eran la causa de la unión antígeno-anticuerpo. Más aún, describió que si los antígenos y algunos anticuerpos en particular pudieran tener una valencia mayor a la unidad, se lograría explicar satisfactoriamente varios enigmas inmunológicos como la floculación, la precipitación y la solubilidad de los complejos antígeno-anticuerpo en zonas de exceso de antígeno o de anticuerpo. Su hipótesis, basada en el modelo del átomo de Bohr, combatió la ya para entonces herida de muerte, pero aún prevalente, teoría coloidal y el consenso general de que los anticuerpos eran monovalentes¹².

Los siguientes años fueron enteramente de avances tecnológicos que brindaron a la inmunoquímica cierta certidumbre sobre la naturaleza física del anticuerpo, y todo esto se dió en Escandinavia. En el lapso entre las dos guerras mundiales, Theodor Svedberg, en Suecia, estampó el sello de creatividad en la

tecnología química. Obtuvo el premio Nobel de Química en 1926 y se lo conoce principalmente por ser el inventor de la ultracentrífuga¹³. De hecho, los coeficientes de sedimentación se miden en unidades Svedberg (S) en su honor. Entre 1925 y 1932 Svedberg tuvo como alumno y posteriormente íntimo colaborador a Arne Tiselius, que a su vez obtuvo el premio Nobel de Química en 1948 por el descubrimiento de otro método analítico: la electroforesis. Un destino lleva a otro y así, un discípulo de Heidelberger, Elvin Kabat, realizó una estancia posdoctoral con Tiselius en Uppsala, Suecia. Esta relación tuvo como resultado el descubrimiento de extraordinarias y novedosas técnicas de separación física de anticuerpos de entre todas las proteínas del suero, como el isoelectroenfoque y la inmunoelectroforesis de dos dimensiones. Tiselius y Kabat sometieron a electroforesis el suero de conejos inmunizados con albúmina de huevo y demostraron que la actividad de anticuerpo se encontraba en el tercer pico del desplazamiento electroforético de las proteínas, también conocido como pico gamma, por lo que muy pronto se llamó gammaglobulinas a los anticuerpos¹⁴. Cuando se llegó a conocer que ciertas globulinas del pico gamma no eran anticuerpos, se introdujo el nombre inmunoglobulinas, con lo que se generó el término inmunoglobulina gamma (IgG). El análisis por ultracentrifugación estableció que las gammaglobulinas tenían un coeficiente de sedimentación de 7S, con un peso molecular de cerca de 150.000 Da. Sin embargo, no todos los anticuerpos son de esta categoría. A los que migraban más rápidamente al pico beta se los llamó primeramente β 2-macroglobulinas de γ M, ahora conocidas como inmunoglobulina macro (IgM). Éstas tienen un coeficiente de sedimentación de 19S y un peso molecular aproximado de 900.000 Da. También se encontraron cambios en el patrón electroforético del suero durante un periodo de inmunización. Así, con la primera exposición a un antígeno se iniciaba la formación de IgM, que disminuía después de unos días, al tiempo que la IgG aumentaba. Los siguientes contactos con el antígeno típicamente producían una misma respuesta IgM, pero inmediatamente después aparecía mayor cantidad de IgG, de ahí el término *booster shot*.

Un hallazgo de particular importancia en las investigaciones de Tiselius y Kabat fue que los anticuerpos no son uniformes en sus cargas eléctricas ni en sus coeficientes de sedimentación, lo que resultó ser el primer indicio de la heterogeneidad física de los anticuerpos.

En 1950 Tiselius recibió a quien llegaría a ser el padre de la inmunología clínica moderna, el Dr. Henry Kunkel, proveniente del Rockefeller Institute for Medical Research (hoy Rockefeller University), que llegó a Uppsala para realizar una breve estancia de investigación. En poco tiempo Kunkel asimiló toda la metodología del laboratorio de Tiselius y llegó a hacerla suya. A su regreso a Nueva York, tenía en mente cómo resolver el análisis de la estructura de los anticuerpos. Como ya se mencionó, su estudio resultaba sumamente complejo debido a su heterogeneidad, lo que hacía que el planteamiento de estudios analíticos con moléculas homogéneas fuera prácticamente imposible. En 1951 realizó un descubrimiento de enorme alcance. En ese tiempo se consideraba que los pacientes con mieloma múltiple secretaban productos derivados de las células malignas. En una serie de experimentos, de asombrosa simplicidad, demostró que la elevación de proteínas en el suero de pacientes con mieloma múltiple tiene relación con las gammaglobulinas normales¹⁵. Este hallazgo brindó a los inmunoquímicos la posibilidad de estudiar moléculas homogéneas para analizar y comparar e hizo posible, a la postre, la identificación de las clases de anticuerpos, las cadenas de inmunoglobulinas, sus genes y sus regiones constantes y variables.

A finales de la década, Kunkel realizó una aportación clásica a la reumatología al demostrar la presencia de complejos inmuni-

tarios en la artritis reumatoide. Demostró que el factor reumatoide es un autoanticuerpo del tipo IgM de 19°S dirigido contra una IgG de 7°S¹⁶. También descubrió la presencia de complejos inmunitarios de ADN y otros componentes celulares en el suero de pacientes con lupus eritematoso¹⁷. La gravedad de la enfermedad podía relacionarse con la presencia de complejos inmunitarios circulantes. Tanto el factor reumatoide como los complejos inmunitarios estaban relacionados, aparentemente, con la patogenia de la artritis y el lupus. Más aún, esto sirvió como ejemplo convincente de la existencia de autoanticuerpos en un tiempo en que la autorreactividad se encontraba lejos de ser establecida. Por último, cabe mencionar que la percepción de Kunkel de que las proteínas del mieloma (los productos monoclonales de células plasmáticas malignas) eran el equivalente de anticuerpos normales producidos por células plasmáticas normales demostró que la teoría de selección clonal de Frank Macfarlane Burnet de 1959 era correcta¹⁸.

La estructura química de los anticuerpos

Cuando Rodney R. Porter (1917-1986) se decidió por hacer cirugía molecular al anticuerpo, no sabía que estaba encendiendo el petardo que iniciaría una feria pirotécnica en la inmunología. Hoy por hoy, el renacimiento explosivo de ésta ciencia ya no muestra signos de que algún día vaya a menguar. Porter estudió en las Universidades de Liverpool y Cambridge. Entre 1949 y 1960 trabajó en el National Institute for Medical Research, en Mill Hill. Su último puesto fue como profesor de bioquímica en el Trinity College de Oxford. Para cuando inició su trabajo en Mill Hill, la bioquímica había florecido, sobre todo en metodología: compuestos conjugados con radioisótopos, cromatografía de dos dimensiones en papel y cromatografía líquida en columnas, tanto de intercambio iónico como de discriminación por peso molecular. Se sabía, además, que las enzimas proteolíticas disgregaban las proteínas al hidrolizar los enlaces peptídicos, siempre en un lugar preciso según la enzima que se empleara. Porter empleó gammaglobulina de conejo y decidió escoger la papaína (enzima que requiere que un agente reductor la active) para digerir la estructura, y así logró aislar, mediante cromatografía líquida de intercambio iónico con carboximetilcelulosa, dos fracciones (I y II) aparentemente similares y un fragmento (fracción III) completamente diferente¹⁹. Si bien su trabajo mostraba datos turbios y confusos, logró demostrar que dos de sus fragmentos (I y II) presentaban afinidad para unirse al antígeno. Los datos experimentales indicaban firmemente bivalencia (los primeros dos fragmentos capaces de unirse al antígeno sin formar precipitados, como predecían las estructuras monovalentes), por lo que Porter pensó en la posibilidad de que las fracciones I y II podrían localizarse a cada lado de la fracción III. Sin embargo, no consideró la posibilidad de dos cadenas diferentes unidas covalentemente, ya que todas las estructuras de las proteínas conocidas en ese tiempo están compuestas por una sola cadena polipeptídica. Hoy conocemos las fracciones I y II de Porter como "Fab" (del inglés *fragment antigen binding*). Puesto que el fragmento III podía ser cristalizado, se lo conoció como "Fc" o fragmento cristalino. Los cristales indicaban que los fragmentos Fc provenientes de anticuerpos de diferentes especificidades eran prácticamente homogéneos. Por el contrario, la incapacidad de las fracciones I y II de formar cristales correlacionaba la especificidad antigénica con la heterogeneidad estructural, o sea, diferencias en su secuencia de aminoácidos. Si Porter hubiera empleado pepsina sin un agente reductor, habría obtenido un gran fragmento y una gran variedad de pequeños péptidos. Lo encontrado en la gran fracción habría sido capaz de precipitar antígenos. Mediante la adición de un agente reductor, el fragmento se habría dividido en dos fracciones,

como ocurrió con la papaína. Los resultados difieren, puesto que los enlaces peptídicos susceptibles a la pepsina se encuentran más allá de los puentes disulfuro que unen al fragmento Fc, mientras que los de la papaína se encuentran por arriba de la unión disulfuro. Los fragmentos producidos por la pepsina se designan Fab', en tanto que los no reducidos que presentan un receptor de antígeno dual se conocen como F(ab')².

Rodney Porter compartió el premio Nobel de Fisiología o Medicina en 1970 con Gerald M. Edelman (1929), quien empleó una estrategia similar pero con diferente táctica para resolver el problema de la estructura de los anticuerpos. El primer trabajo publicado sobre este tema también apareció en 1959²⁰. Sin embargo, uno más desarrollado y definitivo apareció en 1961²¹. Éste, a diferencia del de Porter, es extraordinariamente elegante y su lectura resulta una delicia, sobre todo por la metodología bioquímica empleada. Edelman se graduó de médico cirujano en la Universidad de Pennsylvania y su entrenamiento clínico lo realizó, en el Massachusetts General Hospital. Obtuvo su doctorado en el Rockefeller Institute en 1960 bajo la tutela de Henry Kunkel. En su publicación de 1961 fue asistido por el checoslovaco Miroslav Dave Poulik, quien había emigrado a Canadá, donde obtuvo su grado de médico en 1960 en la Universidad de Toronto. Edelman y Poulik suponían que el anticuerpo estaba compuesto por más de una sola proteína. Si su sospecha fuera cierta, las cadenas deberían estar unidas por puentes disulfuro como ocurre en el aminoácido cisteína. Porter de hecho empleó la cisteína, por su propia naturaleza un agente reductor débil, para activar la papaína. Edelman y Poulik escogieron un reactivo sulfhidrilo más potente, el mercaptoetanol, que rompería los enlaces disulfuro si los había, y agregaron urea como un solvente de disociación de las posibles fracciones resultantes. El problema de la heterogeneidad de los anticuerpos lo tenían resuelto *a priori* gracias a los clarividentes hallazgos de su tutor Henry Kunkel: emplearon proteínas monoclonales de pacientes con mieloma múltiple. De hecho, al año siguiente Edelman y su estudiante Joseph A. Gally demostraron que las proteínas urinarias de Bence-Jones eran en realidad las cadenas de bajo peso molecular de las proteínas del mieloma²², con lo que resolvieron un misterio que se había iniciado en 1845 con su descubrimiento por el químico y médico inglés Henry Bence-Jones (fig. 1)²³. Pero regresemos al clásico trabajo de Edelman y Poulik. Mediante el empleo de ultracentrifugación, cromatografía líquida y electroforesis, demostraron que en cada anticuerpo hay de 3 a 5 proteínas. En trabajos ulteriores en los siguientes años, Porter, Edelman y Alfred Nisonoff, entre otros²⁴⁻²⁶, establecieron la estructura básica de la IgG (fig. 2). Nisonoff, al tratar la molécula de IgG de conejos con pepsina, observó la generación de un solo fragmento bivalente (Fab')₂ y péptidos pequeños, esto es, un fragmento con capacidad de unirse a dos determinantes antigénicos, hallazgos que en conjunto vendrían a confirmar las ideas propuestas 25 años antes por John R. Marrack¹², cuando señaló que los anticuerpos deberían de tener al menos dos sitios de unión al antígeno. El modelo aceptado actualmente de esta molécula consiste en cuatro cadenas: dos ligeras (L, del inglés *light*) y dos pesadas (H, del inglés *heavy*). Se propuso una configuración en forma de Y que luego se confirmó por microscopio electrónico y estudios de difracción de rayos X. Al poco tiempo se describieron dos tipos antigénicos de cadenas ligeras denominados κ y λ. Se observó que la macroglobulina IgM estaba constituida por cinco estructuras semejantes a la IgG, con una configuración en forma de estrella donde sus respectivos fragmentos Fc estaban unidos por una pequeña cadena polipeptídica denominada cadena J. Como indicaban los datos de Edelman y Poulik, algunos enlaces disulfuro no estaban directamente involucrados en uniones intercatenarias, sino que más bien servían para plegar la proteína lineal y así formar una sólida estructura terciaria en la que cada dominio globular ejercía su propia función.

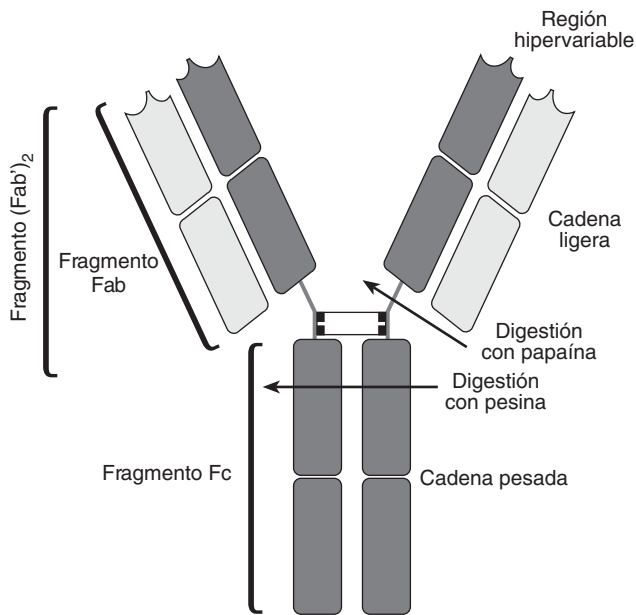


Figura 2. Estructura de la unidad monomérica de las inmunoglobulinas. La digestión enzimática con papaína produce dos fragmentos que se unen al antígeno (Fab) y un fragmento que cristaliza (Fc). El tratamiento con pepsina produce un fragmento (Fab')₂ y péptidos pequeños (péptidos de pepsina).

En 1965 David S. Rowe y John L. Fahey descubrieron una nueva clase de anticuerpos, la IgD, que se encuentra primariamente restringida a la inmunorregulación en la superficie de las células beta²⁷. Todas las clases de anticuerpos son funcionalmente distintas y la últimas dos que se aislaron eran extraordinariamente especializadas. El añejo acertijo inmunológico de la inmunidad local contra microorganismos patógenos se resolvió cuando Thomas B. Tomasi y sus colaboradores determinaron que la IgA (que en un principio se había encontrado en el suero) podía incorporar un componente proteínico y ser secretada a varios fluidos en la zona donde llegan a confluir el huésped y su medio ambiente, es decir, tracto digestivo y vías respiratorias. La IgA se encuentra en forma de unidades monoméricas de 7°S, como dímero de 11°S y en su forma secretora de 18°S²⁸. Por último, la IgE, descrita en 1966, es una inmunoglobulina con actividad reagínica y la encargada de iniciar la cascada inflamatoria derivada de la desgranulación de las células cebadas^{29,30}.

Epílogo

Después de esta visión panorámica sobre la historia de cómo se llegó a establecer la estructura química de los anticuerpos, se podría concluir que la pesquisa inmunológica virtualmente se completó. Empero, quedaban aún muchos datos por aclarar, pero los principios estaban establecidos y, lo que es más, confirmados. La inmunología continuó teniendo un papel preponderante en los diseños de vacunas y métodos diagnósticos.

A cincuenta años de distancia, podemos aseverar que los anticuerpos son unas estructuras extraordinarias, mucho más complicadas, diversas e interesantes de lo que se imaginaba en 1959. Los trabajos pioneros de Porter y Edelman y Poulik

brindaron información acerca de la estructura elemental de estas moléculas. Su estructura fina, los mecanismos de su variabilidad y de la especificidad de sus receptores, la relación de las secuencias de aminoácidos con su función y otros problemas relacionados ocuparon a los investigadores por el resto del siglo. Como la cabeza de la hidra, el sistema inmunitario responde con dos preguntas por cada una que se le hace.

Bibliografía

- Silverstein AM, Bialasiewicz AA. A history of theories of acquired immunity. *Cell Immunol.* 1980;51:151-67.
- Silverstein AM. A history of theories of antibody formation. *Cell Immunol.* 1985;91:263-83.
- Silverstein AM. Cellular versus humoral immunity: Determinants and consequences of an epic 19th century battle. *Cell Immunol.* 1979;48:208-21.
- Ehrlich P. Experimentelle Untersuchungen ubre Immunitat. II. Ueber Abrin. *Dtsch Med Wochenschr.* 1891;17:1218.
- Ehrlich P. Die Wertbemessung des Diophterieheilserums und deren theoretische Grundlagen. *Klinisches Jahrbuch.* 1897;6:299-326.
- Ehrlich P. On immunity with special reference to cell life. *Proc Roy Soc (London).* 1900;66:424-48.
- Arrhenius S. *Immunochemistry. The application of the principles of physical chemistry to the study of the biological antibodies.* New York: MacMillan; 1907.
- Landsteiner K. *The Specificity of Serological Reactions,* 1936. Baltimore: 1936.
- Landsteiner K. Ueber die Antigeneigenschaften von methyliertem Eiweiss. VII. Mitteilung über Antigene. *Zeitschrift für Immunitätsforschung.* 1917;26:122-33.
- Heidelberger M, Avery OT. The soluble specific substance of pneumococcus. *J Exp Med.* 1923;38:73-9.
- Heidelberger M. Reminiscences. *Immunol Rev.* 1985;83:5-22.
- Marrack JR. *The chemistry of antigens and antibodies. Special Report Series No. 194.* London: Medical Research Council; 1934.
- Svedberg T, Rinde H. The ultra-centrifuge, a new instrument for the determination of size and distribution of size of particle in amicroscopic colloids. *J Amer Chem Soc.* 1924;46:2677-93.
- Tiselius A, Kabat EA. An electrophoretic study of immune sera and purified antibody preparations. *J Exp Med.* 1939;69:119-31.
- Kunkel HG, Salter RJ, Good RA. Relation between certain myeloma proteins and normal gamma globulin. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1951;76:190-3.
- Kunkel HG, Franklin EC, Muller-Eberhard HJ. Studies of the isolation and characterization of the "rheumatoid factor". *J Exp Med.* 1959;38:424-34.
- Deicher HRG, Holman HR, Kunkel HG. The precipitin reaction between DNA and a serum factor in systemic lupus erythematosus. *J Exp Med.* 1959; 109:97-114.
- Burnet FM. *The clonal selection theory of acquired immunity.* Cambridge: Vanderbilt University Press and Cambridge University Press; 1959.
- Porter RR. The hydrolysis of rabbit γ -globulin and antibodies with crystalline papain. *Biochem.* 1959;73:119-26.
- Edelman GM. Dissociation of γ -globulin. *J Am Chem Soc.* 1959;81:3155.
- Edelman GM, Poulik MD. Studies on structural units of the γ -globulins. *J Exp Med.* 1961;113:861-84.
- Edelman GM, Gally JA. The nature of Bence-Jones proteins. Chemical similarities to polypeptide chains of myeloma globulins and normal gamma-globulins. *J Exp Med.* 1962;116:207-27.
- Bence-Jones H. On a new substance occurring in the urine of a patient with Mollities ossium. *Philosoph Trans Royal Soc Lond.* 1848;138:55.
- Porter RR. The structure of antibodies. *Scientific American.* 1967;180:713-6.
- Edelman GM. Antibody structure and molecular immunology. *Science.* 1973;180:830-40.
- Nisonoff A, Wissler FC, Lipman LN, Woernley DL. Separation of univalent fragments from the bivalent rabbit antibody molecule by reduction of disulfide bonds. *Arch Biochem Biophys.* 1960;89:230-44.
- Rowe DS, Fahey JL. A new class of human immunoglobulins. II. Normal serum IgD. *J Exp Med.* 1965;121:171-84.
- Tomasi TB, Tan EM, Solomon A, Prendergast RA. Characteristics of an immune system common to certain external secretions. *J Exp Med.* 1965; 121:101-24.
- Ishizaka K, Ishizaka T, Hornbrook MM. Physico-chemical properties of human reaginic antibody. IV. Presence of a unique immunoglobulin as a carrier of reaginic activity. *J Immunol.* 1966;97:75-85.
- Ishizaka K, Ishizaka T, Hornbrook MM. Physicochemical properties of reaginic antibody. V. Correlation of reaginic activity with gamma-E-globulin antibody. *J Immunol.* 1966;97:840-53.