

Historien om



SAMMANFATTNING:

Upptäckten av immunoglobulinklass E, IgE, har haft stor betydelse för förståelsen av allergins mekanismer och för möjligheten att ställa diagnos. Under en stor del av 1960-talet arbetade S.G.O. Johansson och medarbetare med att karakterisera en ny M-komponent. Det var ett tålamodsprövande och tids-ödande arbete som vid ett par tillfällen såg ut att misslyckas. Samtidigt letade även Ishizaka och hans grupp i Denver, Colorado, USA, efter den serumfaktor som medierade klassisk allergi. De båda gruppernas resultat ledde fram till att den femte, och som det visade sig, sista, alfabetiska positionen bland immunoglobulinerna kunde fastställas.

S.G.O. Johansson

är professor vid avdelningen för klinisk immunologi och transfusionsmedicin, Karolinska Universitetssjukhuset och Institutionen för medicin, enheten för klinisk immunologi och allergi, Karolinska Institutet, Stockholm.

KONTAKTADRESS:

S.G.O. Johansson
Avdelningen för klinisk immunologi
och transfusionsmedicin
Karolinska Universitetssjukhuset L2:04
171 76 Stockholm
s.g.o.johansson@ki.se

S.G.O. JOHANSSON, *Karolinska Institutet, Stockholm*

Det första fallet av pollen-relaterad hösnuva rapporterades 1819 till «The Royal Medical and Chirurgical Society» i London av patienten själv, Dr John Bostock (1). Bostock beskrev inte bara hur han under pollensäsongen fick rinokonjunktivit symtom utan att han även under säsongstoppen fick symtom från de nedre luftvägarna, det vill säga både rinokonjunktivit och astma. Bostocks rapport ledde till en förståelse av allergenet som genererande av luftvägssymtom och man skaffade sig snart kunskap om kopplingen mellan pollenmängd i luften och grad av allergiska symtom.

Även om man förstod att höga mängder av allergen gav symtom hos predisponerade, tog det ytterligare 100 år innan man första gången började koppla allergenexponering till specifika sjukdomsmekanismer hos mottagaren. År 1919 publicerade Dr. Ramirez (2) ett intressant fall: en patient med aplastisk anemi som efter en blodtransfusion i samband med en tur i hästdroska i Central Park, New York, fick ett astmanfall. Läkare sökte upp blodgivaren och fann att denne led av allergisk astma vid kontakt med hästar. Ramirez slutsats, att en blodtransfusion kan överföra allergi, startade ett intensivt sökande efter denna faktor i blodet. Detta arbete visade sig emellertid inte vara så lätt eftersom dels aktiviteten, mätt i ett biologiskt system, var mycket labil och dels tydligen förekom i mycket låg koncentration i blodet.

Ett par år senare, 1921, visade Prausnitz och Kustner, i sin berömda PK-test, att man kunde överföra sensibilisering i form av positiv hudtest, från en person till en annan (3), medan begreppet atopi

introducerades för första gången av Coca and Cooke 1923 (4). De lanserade också beteckningen reaginer för den serumfaktor som ansågs vara kopplad till denna ärftliga disposition att utveckla allergier. Coca and Cooke rekommenderade att man inte kopplade dessa reagenter samman med begreppet «antikroppar» då reagenterna ansågs vara värmekänsliga, mer i linje med de värmekänsliga mediatorer, komplementfaktorer, som var involverade i Wassermanns reaktion. Man menade också att det inte fanns några hållpunkter för att reagenterna uppstod genom någon form av immunologisk stimulering (5).

Under de nästa 40 åren hände inte så mycket i försöken att närmare karakterisera reagenternas natur och ursprung. Den främsta anledningen var helt enkelt att man vid den tiden inte hade tillräckligt känsliga analysmetoder. Först under 1960-talet utvecklades de immunokemiska och immunologiska metoder som öppnade vägen för upptäckten av IgE.

En konstig M-komponent

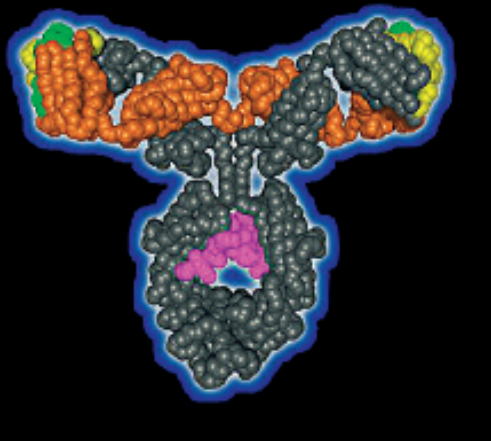
Hösten 1960 började jag arbeta som laboratorieassistent på Blodcentralen vid Akademiska sjukhuset i Uppsala för att finansiera familj och medicinska studier. Min chef, Claes Högman och hans kollega Johan Killander, engagerade mig snart i sin forskargrupp och jag och en annan medicine kandidat, Hans Bennich, vid Institutionen för Biokemi, fick i uppdrag att studera immunoglobulinernas biokemiska egenskaper och att utveckla immunologiska metoder att mäta dem. Hans och jag började arbeta med immunoglobulinprojektet omkring 1962, ett nära samarbete som skulle pågå i mer än 20 år.

Snart blev det tydligt att Hans, för att kunna isolera immunglobuliner, behövde sera med höga koncentrationer. Man visste att det vid en ganska ovanlig sjukdom, multipelt myelom, som angriper de immunglobulinproducerande plasmacellerna, kunde utsöndras ett homogent, monoklonalt immunglobulin, ofta med hög koncentration i serum. Vid elektrofores sågs ett smalt, vanligtvis kraftigt band, kallat en M-komponent. Med hjälp av immunoelektrofores började jag identifiera varje M-komponent som upptäcktes vid rutinundersökningar av serum med elektrofores.

M-komponenterna, antingen IgG, IgM eller IgA, renades och genom reduktion/alkylering och digestion med proteolytiska enzymer som papain och pepsin tog Hans fram flera fragment av varierande storlek och kolhydratinnehåll. Dessa var till exempel Fab (antigenbindande fragment), Fc (kristalliserbart fragment) eller L (lätta) och H (tungta) kedjor. För att kunna beskriva de immunologiska egenskaperna hos dessa fragment utvecklade jag immunanalyser med hjälp av antiserum från immuniserade kaniner.

Både min immunologiska verksamhet och Hans biokemiska arbete utvecklades bra och 1964 hade vi avsevärda tekniska kunskaper och hade samlat in stora mängder information om immunglobulinernas komplexa strukturer. Vi var mindre bra på att publicera oss, även om jag rapporterade om våra erfarenheter av kvantifiering av immunglobulin vid Läkarstämman 1963. Emellertid måste vissa nyheter om våra aktiviteter ha spritt sig via djungeltelegraf. I januari 1966 kom en ung forskare, Malcolm «Mac» Turner, från London för att arbeta med Hans.

IgE-molekylen. ILLUSTRATION: NOVARTIS



Mac blev en värdefull länk till den immunkemiska forskningen i Storbritannien.

I juni 1965 hittade jag ett serum med en M-komponent som jag inte kunde identifiera som IgG, IgM eller IgA (fig. 1). Detta var mycket spännande, speciellt med tanke på att det fanns uppgifter om att D.S. Rowe, under en vistelse på Johns Hopkins i Baltimore, hade hittat en M-komponent som uppfyllde alla kriterier för en ny immunglobulinklass. Enligt gällande nomenklatur följde man den alfabetiska ordningen och gav den namnet IgD.

En gelfiltrering av serumprovet, det vill säga separation av serumproteinerna efter molekylstorlek, indikerade att M-komponenten storleksmässigt liknade IgA, men jag kunde inte hitta den i någon fraktion. Våra antiserakunde uppenbarligen inte reagera med M-komponenten. Kunde det bero på att den tillhörde en av subclasserna till IgA, som immunologerna diskuterade mycket vid den här tiden? Kunde det vara ett IgA med dolda klassspecifika antigen-determinanter? Det kanske var ett IgD? Genom Mac Turner kontaktade vi David Rowe, som nu var tillbaka i Birmingham, Storbritannien, för att få anti-IgD. Eller kunde det, undrade vi, i likhet med David Rows M-komponent, vara en hittills okänd produkt av den okontrollerade tillväxten av plasmaceller hos en myelompatient?

Nytt hopp

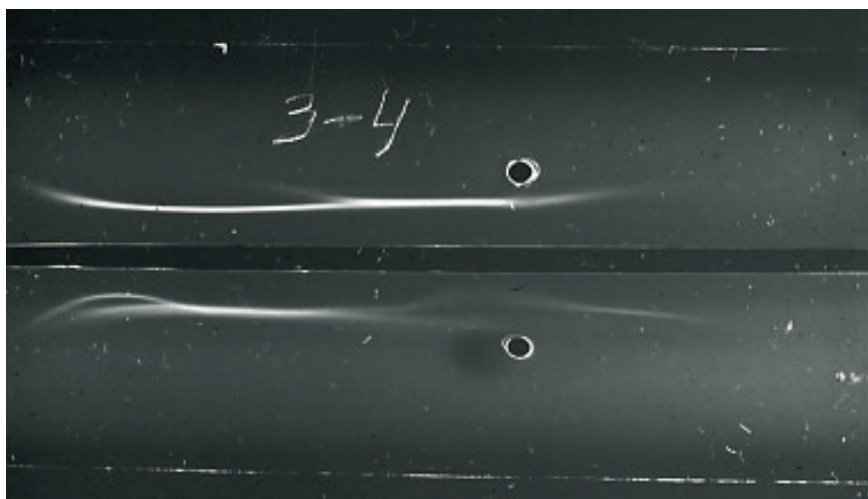
Till vår stora förvåning och förtjusning visade det sig att M-komponenten biokemiskt klart skiljde sig från övriga immunglobuliner, till exempel hade den en

molekylvikt på cirka 200 kDa, och vi kallade den IgX, i enlighet med den svenska vanan att använda «X» för att beteckna något okänt. En 3,5 S fraktion, som fås efter digestion med papain, troligen ett FcX-fragment, användes för att immunisera kaniner. Detta fragment borde bära alla isotyp-specifika antigen och med ett anti-IgX skulle vi kunna hitta en normal motsvarighet till M-komponenten IgX. Hans hade stor erfarenhet av digestion av IgG och vi kände väl till de typiska fysikalisk-kemiska egenskaperna hos 3,5 S Fc γ -fragment. IgX måste vara likartat, det var åtminstone vad vi trodde.

Anti-«FcX» gav ett mycket bra, kraftigt precipitat med M-komponenten IgX i geldiffusion och användes i ett flertal geldiffusions- och hemagglutinationstekniker för att testa serum från friska blodgivare och patientsera som skickats till mig för kvantifiering av IgG, IgM och IgA som en del av den kliniska utvärderingen. Men inte i något fall kunde vi se den minsta precipitinlinje. Då fick vi idén att produktionen av IgX kunde vara genetiskt begränsad. Jag frågade patienten om vi kunde få blodprov från hans familj. Han var mycket samarbetsvillig och tog med sig sina bröder och sin höggravida dotter. När deras sera testades fick vi en stark, vacker precipitinlinje med provet från dottern. Allt var kristallklart: IgX var faktiskt en ny immunglobulinklass och den var kopplad till graviditet.

Det var bara en liten förarglig sak: precipitatet var mycket starkt och tycktes smälta samman med den positiva kontrollen, vilken var den renade M-kompo-

FIGUR 1. Immunelektrofores av ett normalt serum (överst) och myelomserum ND (nederst) med en antiserumpool (mitten) med antikroppar mot IgG, IgA, IgM och lätta kedjor. Notera M-komponentens svaga linje, trots den höga proteinkoncentrationen. Den tunna linjen till vänster motsvarar fria lätta kedjor i myelomserum.



nenten IgX. Vi upprepade testet med ett nytt serumprov från dottern, och det var negativt. Tydligt var det i första fallet fråga om en olycklig kontamination med myelompatientens serum.

Där satt vi, inklämda i ett hörn, med ett immunglobulin med en unik struktur och unika antigena egenskaper, men utan någon normal motsvarighet (6). Vi fick börja om från början! Digestionen med papain upprepades, men denna gång användes alla stora huvudfraktioner, med molekylstorlekar från 3,5 S till 7 S, för immunisering. Leif Wide, biträdande professor på avdelningen för klinisk kemi, rådfrågades om möjligheten att anpassa hans mycket känsliga tekniker för HCG och andra hormoner, som vi redan använde för IgG och IgM, för att mäta IgX. Projektet tog nästan hela 1966. Under den tiden fick vi flera antiserer mot IgD, men inget som reagerade med M-komponenten IgX.

Vid Läkarstämman i november 1966 rapporterade jag om den unika M-komponenten IgX. Ingen blev särskilt begeistrad. En världsberömd, svensk klinisk kemist sa att udda M-komponenter var vanliga, han hade faktiskt flera i frysen, och dessa var inget att bli upphetsad av. Det är intressant att notera att han senare, med hjälp av ett anti-IgD från David Rowe, fann att flera av dessa var IgD-myelom.

Äntligen framgång

Vi hade nu arbetat med M-komponenten IgX i 18 månader och vi hade fortfarande inte hittat någon motsvarighet i normalt



Från vänster Leif Wide, Hans Bennich och S.G.O. Johansson. Bilden tagen vid lanseringen av RAST 1974.

serum. En månad senare, i januari 1967, förändrades allting. Serum från blodgivare reagerade i den radioimmuntestet som användes, baserad på antiserum mot 7S-fragmentet av IgX. Plötsligt hade vi alla de bevis vi behövde för att definiera en ny immunglobulinklass: en unik biokemisk struktur med unika antigener som finns hos befolkningen i allmänhet. Enligt den tidens konvention fick den ett provisoriskt namn med initialerna från den patient den härstammade från, IgND. För några år sedan hörde jag en talare på en internationell kongress berätta för publiken att «ND» var förkortningen för «Not Detected» (Ej upptäckt)!

Bland de allra första sera från blodgivare som testades för IgND, för att representera en referensgrupp, fanns ett anmärkningsvärt avvikande värde med

en IgND-nivå som var cirka 30 gånger högre än gruppens medelvärde. I alla studier jag utfört på serumnivåer av IgG, IgM och IgA, hade jag aldrig någonsin, varken i normala eller patologiska sera, sett ett sådant extremvärde. Det visade sig att blodgivaren, en ung flicka, haft vissa andningsproblem några veckor tidigare, när hon tillbringat juledigheten hos sina föräldrar. De hade en hund. Jag bad en vän på allergimottagningen, docent Erik Fagerberg, att undersöka henne och han bekräftade astma orsakad av allergi mot hund.

I min frysa hade jag sera från flera astmapatienter. Jag hade kvantifierat IgG-nivåer i sera jag fått från en läkare som behandlade astma med gammaglobulininjektioner. Jag kvantifierade IgND i ett 40-tal av dessa sera och bad honom, utan att han kände till mina resultat, att klassificera patienterna som allergiska eller icke allergiska. IgND i serum var förhöjt hos drygt 60% av patienterna med allergisk astma men bara hos 5% av de med icke-allergisk astma (7).

IgND var uppenbarligen relaterat till allergi och det gjorde oss en aning bekymrade. Enligt den allmänna uppfattningen var det klart att den serumaktivitet som kunde mediera en allergisk reaktion, det vill säga reaginerna, var kopplad till IgA (8). Ishizaka och hans grupp hade ju tagit fram det slutliga beviset genom att visa att isolerade H-kedjor av IgA kunde blockera passiv sensibilisering, det så kallade PK-testet, och därmed hade den struktur som var unik för en reaginmolekyl (9). Men, några tvivlade på dessa data.

IgE's «födelsedagskalas» i Lausanne, februari 1968. Från vänster W.D. Terry, D.S. Rowe, D.R. Stanworth, K. Ishizaka och Hans Bennich. FOTO: S.G.O. JOHANSSON



Till exempel fanns det allergiker som hade en genetisk defekt som gjorde att de inte kunde producera IgA.

Eftersom IgND tycktes vara kopplad till allergi, utvecklade vi, tillsammans med Leif Wide, en radioimmunanalys för IgND-antikroppar mot vanliga allergener. Vi utnyttjade oss av antiglobulinprincipen, som används dagligen på blodcentralen för att spåra antikroppar mot Rh i serum hos gravida kvinnor. Proteinerna i kommersiella allergenextrakt kopplades kovalent till CNBr-aktiverade cellulosa-partiklar. Testet, som kallades RAST (Radio Allergo Sorbent Test), gav resultat som korrelerade väl med den kliniska allergi-diagnosen (10). Detta arbete var mitt första möte med vad som ansågs vara standardiserade allergenextrakt och det var ganska chockerande – de varierade 100–10 000 gånger i allergiennehåll, mätt som IgND-bindande kapacitet.

Betydelsefull upptäckt

Studien av IgND-nivåer vid astma, RAST-rapporten och resultaten av dos-/responsblockering av PK-testet med renat IgND, utförda av dr. Denis R. Stanworth i Birmingham (11) publicerades samtliga i Lancet hösten 1967. Men redan i mars 1967 hade vi kontaktat Ishizaka-gruppen, informerat dem om IgND, och erbjudit dem att jämföra reagenser. I senare artiklar hade de rapporterat att de hade ett antiserum mot någonting de kallade γ E. Man uppgav att det kunde blockera den faktor som orsakade erytem av ragweed-pollen, och, vilket var intressantare,

Tillgången till kunskaper om IgE och reagens för att mäta IgE och IgE-antikroppar stimulerade till omfattande klinisk forskning, särskilt inom pediatriken. Från vänster Tony Foucard, S.G.O. Johansson, Torsten Berg, Hans Bennich och Claes Högman.

reaginaktiviteten mot ragweed allergen E i PK-testning. Ishizaka-gruppen blev entusiastisk och skickade oss några anti-gE sera och vi skickade anti-IgND och lite renat IgND. Det här var början på flera års forskningssamarbete och personlig vänskap.

Tillsammans kontaktade vi Världshälsoorganisationens (WHO) internationella referenscenter för immunglobuliner. Båda grupperna skickade tillgängliga antisera och Hans och jag skickade också renat IgND. På grund av de mycket låga koncentrationerna i serum gick det tyvärr inte att få fram rent γ E. I februari 1968 var Hans, Kimi Ishizaka och jag, tillsammans med några medarbetare och experter, en vecka på WHO:s center i Lausanne. Slutsatsen av workshopen var att de unika biokemiska och antigena egenskaper hos IgND, tillsammans med de unika antigena egenskaperna hos gE, dokumenterade ett nytt immunglobulin. Den allra första rapporten skrevs (12). Den tillkännagav att det fanns en ny immunglobulinklass, IgE, som tog den femte, och som det visade sig, sista, alfabetiska positionen.

Upptäckten av IgE har haft en mycket positiv effekt på förståelsen av de kliniska och mekanistiska aspekterna av allergi. De nationella och internationella samarbeten som ledde till att IgE's centrala roll i den allergiska inflammationen erkändes formellt överensstämmer väl med den bästa forskningstraditionen. Redan 1969 uppmärksammades upptäckten genom att Hans och jag fick Jahres pris för unga forskare. Upptäckten

har också uppskattats av allergiföreningar världen över och jag känner mig hedrad att ett 20-tal nationella allergiförbund, bland annat norska, svenska, danska och finska, haft vänligheten att utse mig till hedersmedlem.

Referenser

1. Bostock J. Case of a periodical affection of the eyes and chest. *Med Chir Trans* 1819;10:161.
2. Ramirez MA. Horse asthma following blood transfusion: Report on a case. *JAMA* 1919; 73:984.
3. Prausnitz C, Küstner H. Studien über die Überempfindlichkeit. *Zentralbl Bakteriol I Abt Orig* 1921; 86:160.
4. Coca AF, Cooke RA. On the classification of the phenomenon of hypersensitiveness. *J Immunol* 1923; 8:163–82.
5. Pepys J. «Atopy»: a study in definition. (Editorial) *Allergy* 1994;49:397–9.
6. Johansson SGO, Bennich HH. Immunological studies of an atypical (myeloma) immunoglobulin. *Immunology* 1967; 13:381–94.
7. Johansson SGO. Raised levels of a new immunoglobulin class (IgND) in asthma. *Lancet* 1967;2:951–7.
8. Vaerman JP, Epstein W, Fudenberg H, Ishizaka K. Direct demonstration of reagin activity in purified γ 1A-globulin. *Nature* 1964;203: 1046.
9. Ishizaka K, Ishizaka T, Hathorn EM. Blocking of Prausnitz-Küstner sensitization with reagin by „A chain“ of human γ 1A-globulin. *Immunochemistry* 1964;1:197–207.
10. Wide L, Bennich H, Johansson SGO. Diagnosis of allergy by an in-vitro test for allergen antibodies. *Lancet* 1967; 2:1105–7.
11. Stanworth DR, Humphrey JH, Bennich H, Johansson SGO. Specific inhibition of the Prausnitz-Küstner reaction by an atypical human myeloma protein. *Lancet* 1967; 2:330–2.
12. Bennich HH, Ishizaka K, Johansson SGO, Rowe DS, Stanworth DR, Terry WD. Immunoglobulin E, a new class of human immunoglobulin. *Bull World Health Organ* 1968;38:151–2.

Instrument för bestämning av mängden IgE i blod,

Pharmacia Diagnostics, Uppsala. FOTO: ANDRÉ MASLENNIKOV/PRESSENS BILD

