

UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE
CAMPINAS

BC/6077
IB/80738

MESTRADO

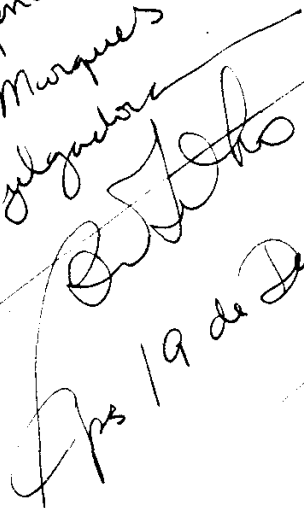
INSTITUTO DE BIOLOGIA

1984

80725

MARIA RISOLETA FREIRE MARQUES

Este exemplar corresponde à Redação
Final da tese defendida pela
Dra. Loiza M.R.F. Marques e aprovada
pela comissão julgadora


19 de Dezembro de 1984

VARIANTES NÃO ALÉLICAS DA REGIÃO C λ DE UMA
PROTEÍNA DE BENCE JONES (JJO) PERTENCENTE
AO SUBGRUPO VIIII.

Campinas - SP

1984

α

MARIA RISOLETA FREIRE MARQUES

VARIANTES NÃO ALÉLICAS DA REGIÃO C λ DE UMA PROTEÍNA
DE BENGE JONES (JJO) PERTENCENTE AO SUBGRUPO V λ III.

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre em Biologia.

Orientador: Prof. Dr. Benedito de Oliveira

Campinas - SP

1984.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

Classif. X
Autor M348w
V. Ex
Lombo BC/ 6077/IB
611

18/80738
34/6077

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Imunologia Química do Departamento de Bioquímica do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas.

Agradecemos à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio recebido (77/0834)(81/1349-4), fundamental para a realização deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) agradecemos o auxílio concedido (2222.0806/77).

INDICE

	<u>Página</u>
1. INTRODUÇÃO	1
2. MATERIAL E MÉTODOS	14
2.1. Tratamento preliminar da urina com proteinúria de Bence Jones	14
2.2. Dupla difusão em duas dimensões em gel de agar	14
2.3. Tipificação sorológica	15
2.4. Imunoeletroforese em gel de agar	15
2.5. Eletroforese e imunoeletroforese em gel de agarose rose	16
2.6. Eletroforese em gel de poliacrilamida	17
2.7. Fracionamento da urina JJ0	19
2.8. Oxidação perfôrmica	20
2.8.1. Oxidação da proteína nativa para deter- minação da composição global de aminoácidos	20
2.8.2. Oxidação da proteína para mapeamento pep- tídico	20
2.8.3. Oxidação perfôrmica em papel da proteí- na BJP (JJ0) e de peptídeos purificados	21

2.9. Hidrólise ácida da proteína JJ0 e de peptídeos obtidos de mapeamento e/ou purificação	21
2.10. Análise de aminoácidos	22
2.10.1. Analisador de aminoácidos	22
2.10.2. Solução padrão e constante de integração	23
2.10.3. Preparação das amostras	24
2.10.4. Cálculos	24
2.11. Determinação de resíduos de meia cistina e metionina	26
2.12. Redução e alquilação	27
2.13. Digestão trípica	27
2.14. Digestão péptico-trípica	27
2.15. Eletroforese de alta voltagem	28
2.16. Tipificação química	30
2.17. Mapa peptídico	30
2.18. Mapa diagonal	31
2.19. Metanólise	32
2.20. Análise do resíduo N-terminal	33
2.20.1. Dinitrofenilação	33
2.20.2. Dansilação	35

2.21. Degradação de Edman	36
2.22. Obtenção de soro de coelho anti-proteína do iso tipo	38
3. RESULTADOS	40
3.1. Análise imunoeletroforética da urina do pacien te JJ0	40
3.2. Tipificação sorológica da proteína BJP (JJ0)..	40
3.3. Purificação da proteína BJP (JJ0)	40
3.4. Composição de aminoácidos da proteína BJP(JJ))	43
3.5. Tipificação química da proteína BJP (JJ0)	48
3.6. Isolamento dos peptídeos básicos a partir de digesto triptico da proteína BJP (JJ0) oxidada	57
3.7. Isolamento dos peptídeos neutros da proteína BJP (JJ0) após oxidação e digestão triptica...	57
3.8. Peptídeos obtidos de mapa diagonal do digesto triptico da proteína BJP (JJ0) reduzida e al- quilada	62
3.9. Análise N-terminal da proteína BJP (JJ0)	68
3.10. Controle do soro de coelho anti-cadeia leve hu mana do isotipo λ , obtido a partir da protei na BJP (JJ0)	74

Página

4. DISCUSSÃO	81
5. RESUMO E CONCLUSÕES	93
6. SUMMARY	97
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	100

1. INTRODUÇÃO

As proteínas de Bence Jones são proteínas urinárias descritas pela primeira vez em 1847 (JONES, 1847) (JONES, 1848) e que se caracterizam pela sua peculiar termo-solubilidade: quando aquecidas em solução ligeiramente ácida precipitam a uma temperatura que varia de 45° a 60°C; são redissolvidas quando submetidas à ebulição, e, reprecipitam com subsequente resfriamento.

A excreção de proteínas de Bence Jones na urina é geralmente associada com neoplasias de células plasmáticas do tipo mieloma múltiplo (KYLE & BAYRD, 1976) (WALDENSTRÖM, 1973); esta correlação químico-clínica patológica conduziu à pesquisa rotineira de proteínas de Bence Jones para fins diagnósticos (WALDENSTRÖM, 1973).

A análise da estrutura antigênica das proteínas de Bence Jones estabeleceu dois tipos moleculares distintos: o tipo kappa (κ) e o tipo lambda (λ) (KORNGOLD & LIPARI, 1955) (MANNIK & KUNKEL, 1962).

A factibilidade de separação das subunidades de gama-globulinas em cadeias pesadas (H) e leves (L) (EDELMAN, 1959) (FLEISHMAN et al., 1962) permitiu demonstrar que as proteínas de Bence Jones são idênticas em estrutura e tipo antigênico às

cadeias leves do componente monoclonal do soro patológico de pacientes paraproteinêmicos e, são similares às cadeias leves de imunoglobulinas normais (EDELMAN & GALLY, 1962) (PUTNAM, 1962).

O isolamento e caracterização de cadeias leves de anticorpo na forma de proteínas de Bence Jones mostraram o alto grau de homogeneidade destas proteínas e, conduziram à determinação de sequências completas (PUTNAM et al., 1967) (MILSTEIN et al., 1968) (TITANI et al., 1969).

Decorrente de estudos de sequência de aminoácidos foi constatada a presença de 213 a 215 resíduos de aminoácidos nas proteínas BJ k e BJ λ , cujo alinhamento para obtenção de máxima homologia, revelou a presença de inserções e deleções ao longo da cadeia; este fato teria implicações de natureza genética, como o fenômeno da expansão e contração do genoma na escala evolutiva (HOOD et al., 1967) (MILSTEIN & PINK, 1970).

Estes estudos de homologia também puseram em evidência várias características a nível de estrutura primária. A presença de serina como resíduo C-terminal, bem como a presença de geralmente cinco cisteínas na molécula, são características estruturais importantes de cadeias leves do isotipo λ . Uma destas cisteínas ocupa posição vizinha à serina C-terminal e pode funcionar como um ponto de estabilização covalente do dímero Bence Jones (as proteínas de Bence Jones podem ocorrer como monômeros, dímeros e tetrâmeros (BERNIER & PUTNAM, 1963) (MILSTEIN, 1966) (CAGGIANO et al., 1969) ou, no caso de moléculas completas de anticorpo, esta cisteína participa da ponte

dissulfeto que faz a junção H-L. As quatro meias cistinas restantes, a saber: os resíduos 23 e 88, e aquelas das posições 134 e 194, estabilizam regiões moleculares muito compactas denominadas "*domínios*". Assim sendo, os dados experimentais puseram em evidência o arranjo das cadeias leves, ou seja, um arcabouço polipeptídico constituído de duas regiões distintas: um segmento N-terminal de sequência variável (região VL) e outro carboxi-terminal de sequência relativamente constante (região CL). As duas regiões (ou domínios), estabilizadas por pontes dissulfeto e constituídas de aproximadamente 100 resíduos de aminoácidos, estão ligadas por um polipeptídeo de 10 a 12 resíduos, denominado "*switch region*" (PUTNAM et al., 1967).

Como decorrência deste arranjo foi estabelecida a hipótese de que a cadeia leve seria codificada por dois segmentos descontínuos de DNA, um para a região variável e outro para a região constante (DREYER & BENNETT, 1965)(HOOD & EIN, 1968)(HOOD, 1972).

Longos e numerosos estudos derivados da aplicação da metodologia de DNA recombinante associada à análise de sequências polinucleotídicas produziram um acordo a favor da hipótese "*dois genes — uma cadeia polipeptídica*", e, contribuíram para a discussão de problemas "*únicos*" da Imunologia, tais como o fenômeno da exclusão alélica, o arranjo dos gens que codificam as cadeias polipeptídicas de imunoglobulinas e o problema crucial da origem da diversidade das moléculas de anticorpo (WEILER, 1965) (HOOD & TALMAGE, 1970) (WEIGERT et al., 1978).

Sequências desoxinucleotídicas determinadas em DNA clonado de células engajadas na produção de anticorpos revelaram que os fragmentos de DNA responsáveis pela expressão de uma cadeia, seja cadeia leve ou cadeia pesada, ao serem "*transcritos*" em RNA para posterior "*tradução*" em seqüências de aminoácidos, não são contínuos, mas interrompidos por segmentos de DNA "*silenciosos*". Foi sugerido que as regiões intragênicas que são expressas sejam denominadas "*exons*" e a "*matriz*" onde elas estão inseridas seja interpretada como um conjunto de segmentos "*intervenientes*" denominados "*introns*" (GILBERT, 1978).

A "*montagem*" de um gem de cadeia leve segue o padrão estabelecido para as cadeias kappa (SEIDMAN & LEDER, 1978) (LENHARD-SCHULLER et al., 1978) (SEIDMAN et al., 1979) (HIETER et al., 1980). Através de um processo de recombinação somática a nível do DNA, os genes V e C são aproximados (sem contudo apresentarem contigüidade) para a criação de um gem VC funcional na célula produtora de cadeia k. Este processo envolve ainda o segmento J, responsável pela codificação da porção C-terminal da região VL (resíduos 96 — 107) e, cuja ligação ao gem V (recombinação V/J) pode funcionar como fonte adicional de diversidade (SAKANO et al., 1979) (MAX et al., 1979).

No caso de cadeias lambda humanas foram descritos pelo menos seis genes codificadores de região constante arranjados em "*tandem*" e que estão contidos em um segmento de 50 kb (HIETER et al., 1981). Além disso, cada um dos seis genes descritos estaria aparentemente associado ao seu próprio segmento J (HIETER et al., 1981), como é o caso no sistema lambda do ca-

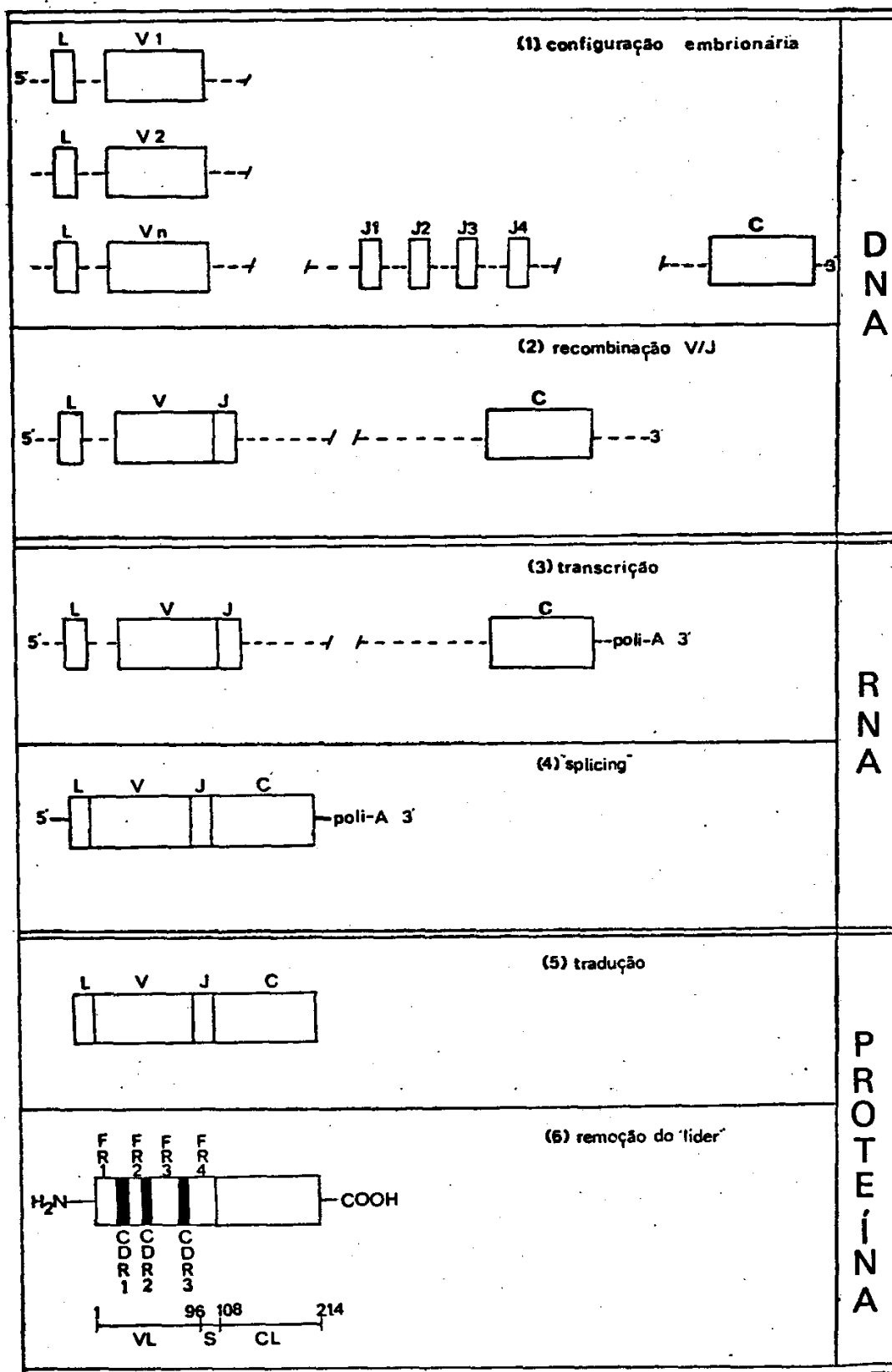
mundongo, onde são descritos quatro segmentos J, cada um associado a uma região C, de modo a se poder imaginar regiões J-C múltiplas (BLOMBERG et al., 1981). A aparente limitação de diversidade no sistema λ humano, consequência da ausência de recombinação V-J (em oposição ao sistema k, onde ocorrem cinco regiões J no camundongo, das quais quatro codificam seqüências de aminoácidos descritas (MAX et al., 1979) (SAKANO et al., 1979), e quatro no homem (HIETER et al., 1980) potencialmente disponíveis para a recombinação V-J e associadas a um único gem Ck), seria compensada pelo número de genes e arranjo complexo do locus C λ (HIETER et al., 1981). Um mecanismo de amplificação relativo ao locus C λ humano que poderia alterar o número de gens C λ de seis para nove foi recentemente descrito (TAUR et al., 1983).

A figura 1 mostra esquematicamente a montagem de um gem ativo de cadeia leve.

Os estudos que demonstraram que as regiões V e C são codificadas por gens diferentes e aqueles que mostraram a preservação de regiões C na escala evolutiva, cada uma ligada a diferentes regiões V, destacaram a importância da investigação destas regiões, seu papel biológico e a organização dos gens envolvidos na sua codificação para o arranjo de um gem ativo (CUNNINGHAM et al., 1971) (MILSTEIN & SVASTI, 1971) (CAPRA & KEHOE, 1975) (BEALE & FEINSTEIN, 1976) (GOTTLIEB, 1980).

A análise de coleções de seqüências interpretadas através de sistema de computação (WU & KABAT, 1970) (KABAT et al., 1979) mostrou a presença de três regiões de hipervariabilidade no do-

FIGURA 1 - Montagem de um gem ativo kappa humano segundo esquema modificado (WEIGERT et al., 1978) (LEDER, 1982) (TONEGAWA, 1983). Este processo ocorre durante a maturação do linfócito B comprometido com a síntese de um determinado isotipo (BRACK et al., 1978) (BERNARD et al., 1978) (SEIDMAN & LEDER, 1978) (LENHARD-SCHULLER et al., 1978) (HIETER et al., 1980). Estão representadas as etapas de recombinação somática a nível do DNA: a configuração embrionária em (1) e a recombinação V/J em (2). A transcrição e o processamento pós-transcricional que ocorrem a nível do RNA estão representados nas etapas transcrição (3) e "*splicing*" (4). A etapa tradução está representada em (5) e a remoção do líder na cadeia completa está representada em (6). Na região V estão representadas as regiões que determinam complementariedade em relação ao antígeno (CDR) e as regiões correspondentes ao arcabouço polipeptídico denominado "*framework*" (FR) (KABAT et al., 1979). No caso dos genes comprometidos com a biossíntese de uma cadeia λ humana existem evidências de pelo menos seis genes (podendo atingir um total de 9) arranjados em "*tandem*" e, responsáveis pela codificação da região C λ . Estes genes estão agrupados em um segmento de 50 kb, cada um deles aparentemente ligado ao seu respectivo segmento J (HIETER et al., 1981) (TAUB et al., 1983).



mínio V_L correspondentes aos resíduos 24 — 34, 50 — 56, e 89 — 97, denominadas CDR_1 , CDR_2 e CDR_3 , respectivamente. Foi previsto que estas regiões conteriam os resíduos envolvidos na determinação de complementariedade ao antígeno e seriam responsáveis pela configuração funcional do "pocket" da molécula de anticorpo (CAPRA & KEHOE, 1975) (KABAT et al., 1977). Estudos de "marcação por afinidade" propiciaram evidências experimentais consistentes com esta predição (GIVOL, 1974).

Foi verificado que estas regiões estariam sustentadas por um conjunto de resíduos que mostrou baixa variabilidade denominados FR_1 (resíduos 1 a 23), FR_2 (resíduos 35 a 49), FR_3 (resíduos 57 a 88) e FR_4 (resíduos 98 a 107) que aparentemente não participam da interação CDR-antígeno (KABAT et al., 1977) (KABAT et al., 1979).

Em função da sequência dos 22 aminoácidos N-terminais expressos em cadeias polipeptídicas se mostrou a presença de seis protótipos: $V\lambda 1$, $V\lambda 2$, $V\lambda 3$, $V\lambda 4$, $V\lambda 5$ e $V\lambda 6$. Três sub-tipos sorológicos (ST^+ , III^-), (ST^- , III^+) e (ST^- , III^-) foram reconhecidos. O grupo (ST^- , III^-) foi descrito em proteínas $V\lambda I$, e, o marcador (ST^- , III^+) está presente em proteínas $V\lambda III$ (TISCHENDORF et al., 1970; 1971; 1976). A especificidade designada VOR é compartilhada entre os subgrupos $V\lambda I$ e $V\lambda IV$, mas está ausente nos sub-tipos $V\lambda II$, $V\lambda III$ e $V\lambda IV$ (RIVAT-PERAN et al., 1980).

Através de técnicas de inibição de hemaglutinação e precipitação foram obtidos resultados que levam a indicar a natureza não alélica das sequências portadoras destes marcadores

sorológicos (TISCENDORF et al., 1971) (RIVAT et al., 1974).

As análises de sequências de aminoácidos mostraram que as especificidades sorológicas de sub-grupos estão relacionadas com segmentos de aminoácidos relativamente não variantes, e, que, a especificidade idiotípica deve estar correlacionada com áreas hipervariáveis, o que poderia indicar a proximidade destas porções da molécula de anticorpo do seu "*binding site*" (CAPRA & KEHOE, 1975).

A distribuição independente dos diferentes segmentos FR₁, FR₂, FR₃ e FR₄ e, CDR₁, CDR₂ e CDR₃ de região variável (KABAT et al., 1978) forneceu subsídios para a hipótese dos "*mini-genes*" (KABAT, 1980) que seriam segmentos de DNA responsáveis pela codificação independente dessas regiões.

Desta maneira, pode-se postular que sete mini-genes seriam os responsáveis pela codificação das quatro regiões FR₁, FR₂, FR₃, FR₄ e das três regiões CDR₁, CDR₂, CDR₃ (KABAT, 1980). O segmento J corresponderia à região FR₄ e engloba, segundo a numeração NEW (LANGER et al., 1968), os resíduos 100 a 111 (FRANGIONE et al., 1983). O segmento contém uma sequência peculiar Gly-Gly-Gly correspondente aos resíduos 102 a 104 segundo a numeração Mcg (FETT & DEUTSCH, 1974) ou, segundo a numeração NEW os resíduos de número 100 a 102 (RIVAT-PERAN, 1980). As similaridades e diferenças nos "*mini-genes*" responsáveis pela codificação dos sub-segmentos da região variável de cadeias L, poderia ser responsável pelas diferenças e semelhanças de comportamento antigênico dos marcadores genéticos detecta-

dos nessa região (RIVAT-PERAN, 1980).

A região C terminal dos domínios C_k e C_λ é muito importante por conter sequências de aminoácidos que tipificam quimicamente estes dois isotipos (FRANGIONE et al., 1969). Estes peptídeos, obtidos de digestão pēptico-trīptica (FRANGIONE et al., 1969) ou exclusivamente trīptica (PUTNAM & EASLEY, 1965) (MILSTEIN, 1967) contēm a cistina que estabiliza as proteínas urinárias de Bence Jones na forma de dīmero (BERNIER & PUTNAM, 1963) (MILSTEIN, 1966).

Poucas diferenças nucleotídicas que codificam a região C-terminal do domínio C_L são observadas, o que poderia ser interpretado como uma região preservada na evolução dos genes que codificam cadeias leves (HIETER et al., 1981).

Foi constatado através de análise de sequências de aminoácidos que a região constante ou domínio C_λ de cadeias leves humanas apresentam considerável heterogeneidade (PUTNAM & EASLEY, 1965) (MILSTEIN, 1967) (GIBSON et al., 1971). Foram detectadas substituições (de aminoácidos) características em posições bem definidas do domínio C_λ . Estas substituições, envolvendo uma ou mais posições nas cadeias leves de imunoglobulinas e das proteínas de Bence Jones lambda, foram denominadas variantes genéticas. O caráter não alélico destas variantes foi demonstrado (EIN, 1968) (FETT & DEUTSCH, 1976).

EIN & FAHEY (1967) demonstraram a existência de dois sub-tipos antigênicos de cadeia lambda humana, reconhecidos por soro de coelho anti-proteína de Bence Jones λ . Posteriormente este fato foi relacionado com a substituição de arginina

por lisina na posição 190 (Oz) (APPELA & EIN, 1967) e seu comportamento não alélico demonstrado (EIN, 1968).

Estudos desenvolvidos por MILSTEIN revelaram a substituição de alanina por valina na posição 143 e lisina por asparagina na posição 171 do domínio C λ da proteína Mz (MILSTEIN, 1967).

HESS & HILSCHMAN (1970) demonstraram a substituição de serina por glicina na posição 152 na proteína Kern.

FETT & DEUTSCH (1974, 1975 e 1976) ampliaram de modo significativo o conhecimento deste polimorfismo presente na região C λ a partir de análises de diferentes proteínas de Bence Jones e cadeias leves de paraproteínas séricas. Deste modo, descreveram as variantes: Mcg (substituição de alanina por asparagina na posição 112, serina por treonina na posição 114 e treonina por lisina na posição 163); Ev (substituição de asparagina por glutâmico na posição 151); Weir (substituição de lisina por glutâmico na posição 156) e Way (substituição de alanina por valina na posição 157).

O comportamento da variante Mcg como fator sorológico foi posteriormente descrito por SOLOMON (1977).

FETT & DEUTSCH (1976) sugeriram que estes dez locais de substituição de aminoácidos seriam responsáveis pelo polimorfismo observados nesta região da cadeia leve do isotipo lambda, caracterizado pela ocorrência de pelo menos oito tipos de arranjos distintos.

A figura 2 mostra em detalhes a organização estrutural de uma cadeia leve lambda.

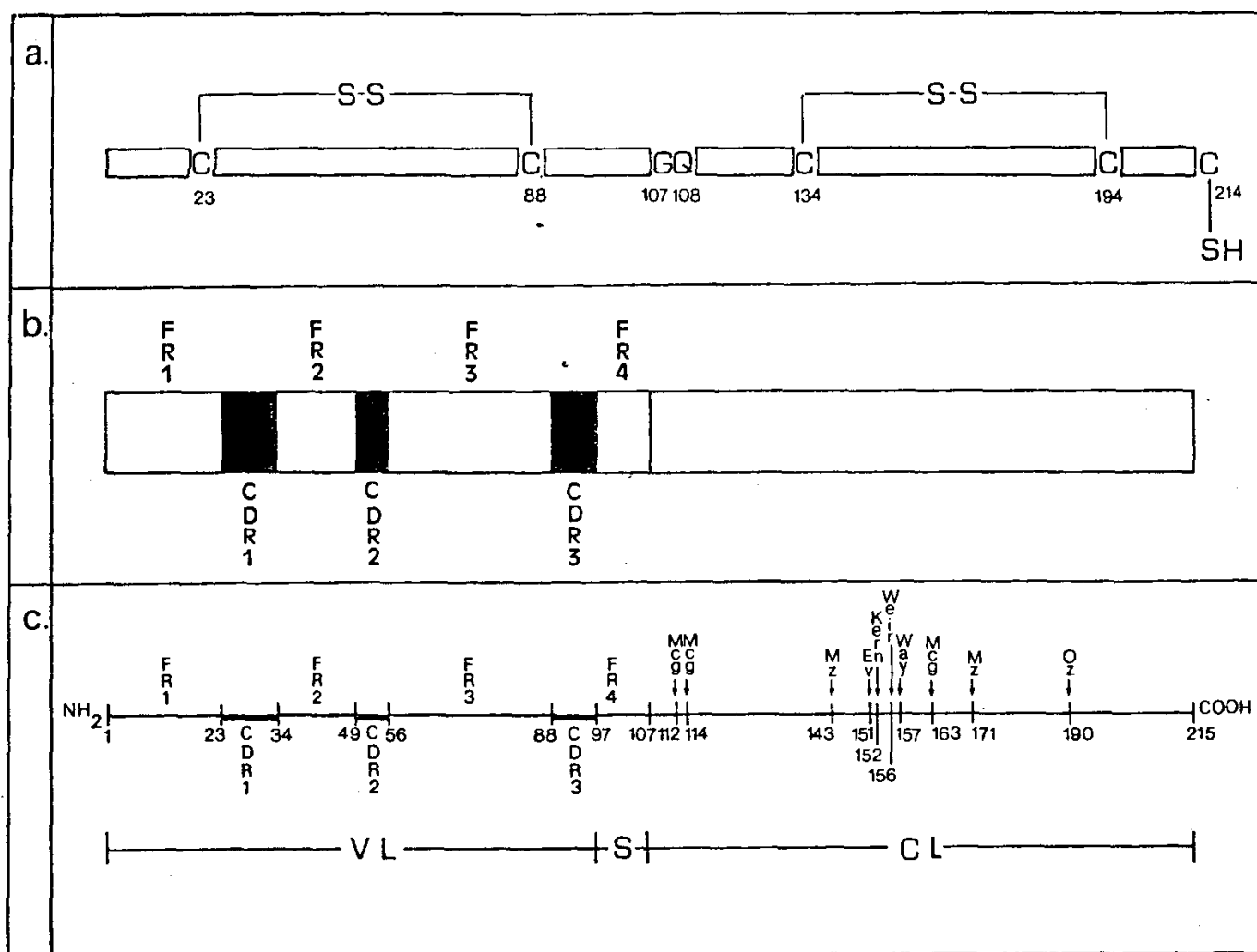


FIGURA 2 - Representação esquemática de uma proteína de Bence Jones na configuração de monômero. Em (a) estão indicadas as posições das cisteínas intracadeia (23-88 e 134-194), comprometidas com a estabilização dos domínios VL e CL e mais a meia cistina C-terminal (214) responsável pela ponte dissulfeto intercadeia que estabiliza covalentemente a forma dimerica. As cadeias polipeptídicas terminam por um resíduo de serina C-terminal (posição 215). Estão representados os resíduos glicina e glutamina nas posições 107 e 108 que estão frequentemente envolvidos na região denominada "switch" (KABAT et al., 1979). Em (b) são salientadas as regiões CDR₁, CDR₂ e CDR₃, que determinam complementariedade em relação ao antígeno no domínio VL; as regiões que correspondem ao "framework" de região variável estão assinaladas como FR₁, FR₂, FR₃ e FR₄. As posições que delimitam estes diferentes-segmentos estão assinaladas em (c). Na região CL estão representadas as variantes não alélicas de cadeia lambda descritas até a presente data (FETT & DEUTSCH, 1976).

No presente trabalho, a partir de uma proteína de Bence Jones típica, obtida de paciente paraproteinêmico (J.J.O.) e tipificada como pertencente ao tipo sorológico λ , foi isolado o peptídeo que corresponde à região C-terminal do domínio $CL\lambda$, cuja estrutura primária caracteriza quimicamente a proteína JJ0 como pertencente ao isotipo λ .

São apresentadas evidências de que a proteína JJ0 está presente na urina na configuração de duas unidades monoméricas estabilizadas entre si por uma ligação covalente do tipo disulfeto.

O domínio correspondente à região VL foi tipado como pertencente ao sub-grupo $V\lambda III$.

Foram isolados os peptídeos de região $CL\lambda$ portadores das variantes não alélicas Oz, Mz, Mcg e Way.

Os resultados obtidos permitem a caracterização desta proteína urinária como uma proteína de Bence Jones (JJ0), 190 Arg Oz(-), 171 Lys Mz(-), 112 Ala, 114 Ser, 163 Thr Mcg (-), 157 Ala Way (-), $V\lambda III$.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Tratamento preliminar da urina com proteinúria de Bence-Jones

Urina de paciente (J.J.O.) com gamopatia monoclonal tipo mieloma múltiplo* foi submetida ao teste clínico de Bence-Jones, segundo a técnica descrita (CANNON et al., 1974). Foi observado comportamento característico de urina patológica com proteinúria de Bence-Jones positiva. Esta urina foi dialisada repetidas vezes contra água desionizada e então, liofilizada (Virtis Freeze-Dryer, The Virtis Co., Gardiner, N.Y.). O material liofilizado foi acondicionado em frascos, rotulado e armazenado em Deep Freezer Revco (Revco Scientific and Industrial Products, West Columbia, S.C.) a -60°C .

2.2. Dupla difusão em duas dimensões em gel de ágar

A dupla difusão em duas dimensões em gel de ágar (Ouchterlony, 1958) foi realizada em ágar (Ion-Agar Oxoid nº 2, Oxoid Ltd, London) a 1% em tampão veronal 0.05M pH 8.6 (CHASE, 1968) sobre lâmina de microscópio de 25x75 mm.

O gel foi perfurado de acordo com o esquema desejado

* Agradecemos aos Drs. Luís S. Prigenzi e Celso P. da Costa do Departamento de Patologia Clínica da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, que gentilmente cederam o material.

O gel foi perfurado de acordo com o esquema desejado (Grafar Gel Punch Assembly, Grafar Corp., Detroit, Mich.) e o material aplicado. Após reação por 24 horas em câmara úmida, as lâminas foram lavadas em solução salina 0.15 M, secas à temperatura ambiente e coradas com "*amido black*" 0.1% (OLIVEIRA LIMA e DIAS da SILVA, 1970). O excesso de corante foi retirado em metanol-ácido-água (2:1:2 V/V).

2.3. Tipificação Sorológica

A tipificação sorológica da proteína de Bence Jones JJ0 foi realizada segundo a técnica descrita em 2.2.

Além da proteína BJP (JJ0) foram utilizadas duas outras proteínas, ambas já tipificadas: a) proteína BJP (Mau), tipificada como λ (MARANGONI et al., 1979, 1980); b) proteína BJP (Sim), tipificada como K (RODRIGUES PINTO et al.).*

Como revelador, utilizou-se soro de coelho anti-proteína humana (Mau) obtido segundo modificação do método descrito (OLIVEIRA et al., 1970).

2.4. Imunoeletroforese em gel de ágar

As imunoeletroforeses (GRABAR & WILLIAMS, 1955) foram realizadas em gel de ágar a 1% (preparado como descrito no item 2.2.). O ágar fundido (15 ml) foi colocado sobre duas lâminas

* R.M. RODRIGUES PINTO, S. MARANGONI & B. OLIVEIRA. Comunicação Pessoal.

de vidro de 25x75 mm dispostas em um suporte duplo de plástico (modificado de Gelman Immunoframes, Gelman Instrument Co., Ann Harbor, Mich.). Os poços e as canaletas foram impressos no agar gelificado utilizando-se um impressor metálico montado de acordo com o esquema imunoeletroforético desejado (Gelman Electrophoresis Punch Set, Gelman Instrument Co., Ann Harbor, Mich.).

A eletroforese foi realizada em tampão veronal (item 2.2), utilizando-se fonte estabilizadora Beckman Duostat (Beckman Instruments Inc., Spinco Division, Palo Alto, Cal.) e corrente de 15 mA/lâmina durante 90 minutos.

O agar das canaletas foi então retirado e os anti-soros aplicados.

Para revelação foram utilizados os seguintes anti-soros: a) soro de coelho anti-SHN (soro humano normal); b) soro de coelho anti-proteína de Bence Jones humana do isotipo λ Mau (MARANGONI et al., 1979, 1980). Ambos os anti-soros foram obtidos como descrito em 2.3.

Após aplicação dos anti-soros, as lâminas foram colocadas em câmara úmida por 24 horas. A lavagem foi feita em solução salina fisiológica. As lâminas foram secas à temperatura ambiente e coradas com "*amido black*" 0.1%. A solução de lavagem foi aquela descrita em 2.2.

2.5. Eletroforese e Imunoeletroforese em gel de agarose

Para as análises eletroforéticas e imunoeletroforéticas em camada delgada de agarose, utilizou-se agarose em supor

te flexível Pol E Film Diagnostics Division, Pfizer Inc. N.Y.C., N.Y. Foi aplicada voltagem de 11 V/cm durante 60 minutos, utilizando-se fonte e tampão descritos (2.4).

- Eletroforese - Após coloração em "*amido black*" 0.1%, a placa foi mantida por 20 minutos em estufa regulada para 37°C, sendo em seguida descorada em ácido acético 7%.

- Imunoeletroforese - Os anti-soros específicos aplicados nas canaletas foram: soro de coelho anti-SHN (soro humano normal) e soro de coelho anti-proteína λ humana (vide 2.3). A placa foi mantida em câmara úmida por 24 horas e lavada exaustivamente em solução salina 0.15M. O tratamento posterior foi idêntico ao descrito acima.

2.6. Eletroforese em gel de poliacrilamida

O método empregado na análise eletroforética em poliacrilamida foi modificado de SHAPIRO et al. (1967) e WEBER & OSBORN (1969). O aparelho utilizado foi montado após modificações do desenho de REID & BIELESKI (1968).

O gel de concentração, bem como o de separação foram obtidos a partir de uma solução 30% de acrilamida (Bio Rad. Labs., Richmond, Cal.) e 0.8% de N, N'-metileno-bis-acrilamida (Bio Rad. Labs., Richmond, Cal.). Esta solução foi preparada em água desionizada a 37°C sob agitação, filtrada em papel de filtro Whatman nº 1 e mantida a 4°C em frasco âmbar.

O gel de concentração contendo 5% de acrilamida em tampão tris-HCl 0.125 M pH 6.8, acrescido de dodecil sulfato de

sódio (SDS) (Bio Rad. Labs., Richmond, Cal.) a 0.1%, foi polimerizado pela adição de N, N, N', N'-tetrametiletilenediamina (TEMED) e persulfato de amônio a 0.05%.

O gel de separação contendo 10% de acrilamida foi preparado em tampão tris-HCl pH 8.8 na concentração final de 0.375 M com SDS a 1% e persulfato de amônio e TEMED a 0.025%.

O gel de separação foi colocado até a altura aproximada de 100 mm entre duas placas de vidro refratário de 160 x 145 mm, separadas por espaçadores de acrílico de 2 mm de espessura colocados entre as bordas laterais e inferiores das mesmas. As placas foram mergulhadas em água a 35°C por 1 hora. Após a polimerização, o gel de concentração foi colocado até a altura aproximada de 45 mm. Em seguida, a peça acrílica utilizada para a impressão dos poços foi inserida entre as placas.

As amostras (aproximadamente 20-50 µg de proteína) foram dissolvidas em 100 µl de tampão tris-HCl pH 6.8 na concentração final de 0.0625 M, contendo SDS a 2%, 10% de glicerol e 0.001% de bromofenol.

A duplicata de cada uma das amostras foi adicionado diotiotreitol (DTT) (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.) na concentração final de 0.1 M. Como marcadores foram utilizados: citocromo c (PM 11700) (Sigma Co., St. Louis, Mo.; tipo VI), mioglobina (PM 17200) (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.; tipo II) e ovoalbumina (PM 43000) (Mann Research Lab., N.Y.C., N.Y.) *.

* Os valores de peso molecular foram tomados de WEBER & OSBORN (1969).

Antes da aplicação as amostras e os marcadores foram mergulhados em água em ebulição durante 2 minutos.

A eletroforese foi realizada em tampão tris HCl 0.025M, glicina 0.192 M e SDS 0.1% a 100 V durante aproximadamente 4 horas, até que o corante atingisse a extremidade inferior do gel de separação.

O gel foi retirado do suporte de vidro com o auxílio de uma espátula e corado em "*Comassie Blue*" 0.1% em ácido acético-metanol (1:8 V/V) a 37°C. O tempo médio de coloração foi de 10 horas. A lavagem foi realizada em ácido acético 7%.

2.7. Fracionamento da urina JJ0

A urina JJ0 foi purificada em DEAE-celulose (DE-52 Whatman), a partir de um gradiente de tampão fosfato 0.01-0.1M pH 8.2, em uma coluna de vidro de 330x22 mm.

Em uma separação característica, 500 mg de proteína liofilizada foram dissolvidos em 20 ml do tampão de equilíbrio da resina (tampão fosfato 0.01 M pH 8.2). O material foi clarificado por centrifugação a 5000 rpm durante 15 minutos em uma centrífuga refrigerada Sorval RC2-B (Sorval Co., Newtown, Conn.), e o sobrenadante aplicado à coluna. Em condições de fluxo de 20 ml/h foram coletados volumes de 3ml/tubo, utilizando-se um coletor de frações Gilson modelo VL (GME, Middleton, Wis.).

O eluato foi monitorado em um espectrofotômetro Beckman modelo 25 (Beckman Instruments Inc., Fullerton, Cal.), sendo os valores de absorbância determinados no comprimento de onda de

280 nm. Os "pools", delimitados com base no controle imuno-eletroforético, foram dialisados contra bicarbonato de amônia 0.01 M durante 24 horas em câmara fria a 4°C e liofilizados.

2.8. Oxidação perfôrmica

O procedimento para a realização da oxidação perfôrmica foi baseado nas especificações de HIRS et al. (1956). Como solução oxidante foi utilizada uma solução de ácido fôrmico 99% e H_2O_2 30%; 19:1 V/V contendo fenol 0.02%.

2.8.1. Oxidação da proteína nativa para determinação da composição global de aminoácidos

Dez gotas da solução oxidante foram adicionadas a cada alíquota de 1.0 mg da proteína JJ0 liofilizada. A reação ocorreu a temperatura ambiente por 1 hora. Acrescentou-se 1 ml de água desionizada ao material que foi em seguida, liofilizado.

2.8.2. Oxidação da proteína para mapeamento peptídico

Ao material dissolvido em 1 ml de ácido fôrmico 5% foram adicionados 3 ml da solução oxidante. Após 30 minutos à temperatura ambiente e adição de 0.1 ml de metanol, deixamos a reação prosseguir durante 4 horas a -6°C. Decorrido este pe-

Todo o material foi dissolvido em 3 ml de água desionizada e liofilizado.

2.8.3. Oxidação perfôrmica em papel da proteína BJP (JJ0) e de peptídeos purificados

A proteína BJP (JJ0) contida em tira de papel Whatman 3 MM recortada após eletroforese de alta voltagem em pH 6.5 (1ª dimensão de mapeamento diagonal) foi montada em suporte de vidro e colocada em um dessecador saturado com vapor de ácido perfôrmico. Ao fim de 4 horas, o papel foi retirado e colocado a 80°C em forno (Precision Scientific, GCA Corp., Chicago, Ill.) até a secagem total.

Os peptídeos contidos em papel Whatman 3 MM foram recortados e oxidados da mesma maneira antes de nova etapa de purificação.

2.9. Hidrólise ácida da proteína JJ0 e de peptídeos obtidos de mapeamento e/ou purificação

Aliquotas da proteína JJ0 foram hidrolisadas em HCl 6N contendo fenol (1mg/ml) em tubos fechados a vácuo a 106°C ($\pm$ 1.0) em forno com convecção forçada (Forma Scientific Inc., MTTA, O.). Os tempos de hidrólise foram de 24 horas para a proteína oxidada e de 24, 48 e 72 horas para a proteína nativa. As hidrólises foram feitas em duplicata.

Os peptídeos foram inicialmente eluídos de papel Whatman 3 MM ou com água desionizada (peptídeos radioativos) ou com ácido fórmico 5% (peptídeos ninhidrina positivos) e secos a vácuo. Ao material seco foi acrescentado HCl 6N com fenol (1 mg/ml) - (100 λ) e a hidrólise foi realizada por 24 horas nas mesmas condições descritas.

O material hidrolisado foi seco a vácuo na presença de H_2SO_4 .

2.10. Análise de aminoácidos

2.10.1. Analizador de Aminoácidos

As diferentes amostras foram analisadas num auto-analisador de aminoácidos construído após modificações do desenho original de ALONZO & HIRS (1968). O método de análise foi o de SPACKMAN et al. (1958). O sistema utilizado foi o de duas colunas: uma para a resolução dos aminoácidos ácidos e neutros (coluna AN) de 530x10 mm e outra para a resolução dos aminoácidos básicos (coluna B) de 130x10 mm. A resina na coluna AN foi do tipo Aminex A₆ e na coluna B, utilizou-se resina do tipo Aminex A₅ (Bio Rad. Labs., Richmond, Cal.).

A operação na coluna AN envolveu dois tampões: citrato de sódio 0.2 N pH 3.25 e citrato de sódio 0.2 N pH 4.25. Na coluna B foi utilizado tampão citrato de sódio 0.5 N pH 5.25.

A temperatura foi controlada por termoreguladores ajustados para 52.5°C (coluna B) e 52.5 e 60.0°C (coluna AN), aco-

plados a um circulador Haake tipo F (Brinkmann Instruments, Westbury, N.Y.).

O registro gráfico correspondente às leituras das três células do fotômetro (M.E.R. 1020 Mountain View, Cal.) é simultâneo: (1) 570 nm e caminho óptico de 12 mm; (2) 570 nm e caminho óptico de 6.6 mm e (3) 440 nm e caminho óptico de 12mm; e feito por pontos, por um registrador do tipo Eletronik 15 Strip Chart Multipoint Recorder (Noneywell Ltd, Ontario) em escala de 0 a 0.1 unidades de absorbância.

A reação com ninhidrina (Pierce Chemical Co., Rockford, Ill.) ocorreu a $97 \pm 1.0^{\circ}\text{C}$ em um banho (S.G.A. Scientific Inc., Bloomfield, N.J.) com temperatura regulada por reostato tipo 116 B (The Superior Electric Co., Conn.).

2.10.2. Solução Padrão e Constante de Integração

Alíquotas contendo valores médios de 20 nmoles para cada aminoácido, obtidas a partir de uma solução padrão de aminoácidos (Amino Acid Standard H, Pierce Chemical Co., Rockford, Ill.), acrescida de ácido cisteico, foram utilizadas como referência para tempo de eluição e leitura, produzindo um cromatograma cujos picos são prontamente calculados. Uma vez estabelecido o padrão de eluição dos diferentes aminoácidos, as leituras obtidas para cada um deles foram integradas em 570 nm (12 mm de caminho óptico), exceto para o aminoácido prolina, cuja leitura é integrada no canal de 440 nm (12 mm de caminho óptico). As integrações foram realizadas pelo método manual

(altura x valor da base a nível de altura média) e as constantes de integração obtidas da seguinte relação: $K = A/M$, onde: K = constante de integração do aminoácido; A = área determinada por integração manual; M = quantidade absoluta do aminoácido na solução padrão (nmoles). A figura 3 mostra uma análise automática de aminoácidos desta solução.

2.10.3. Preparação das amostras

As amostras hidrolisadas e secas foram dissolvidas em volumes iguais de tampão citrato de sódio 0.2 N pH 2.2 e polietileno glicol (PEG) 30%. O material foi homogeneizado em mixer (S 8220, Scientific Products, Evanston, Ill.) e centrifugado por cinco minutos (centrífuga modelo 204, FANEM Ltda, S.P.).

Antes da aplicação, norleucina (50 μ l de uma solução 0.4 mol/ml em HCl 0.1 N) foi acrescentada a todas as amostras para controle de eluição e cálculos de recuperação.

2.10.4. Cálculos

No caso de proteínas, os valores obtidos são expressos em número de moles de resíduo por mol de proteína, tomando-se como referência o peso molecular de 22600 (valor estimado para a proteína X descrita por MILSTEIN et al., 1968). O valor calculado para cada resíduo representa a média dos valores obtidos nos diferentes tempos de hidrólise, exceto para os aminoá-

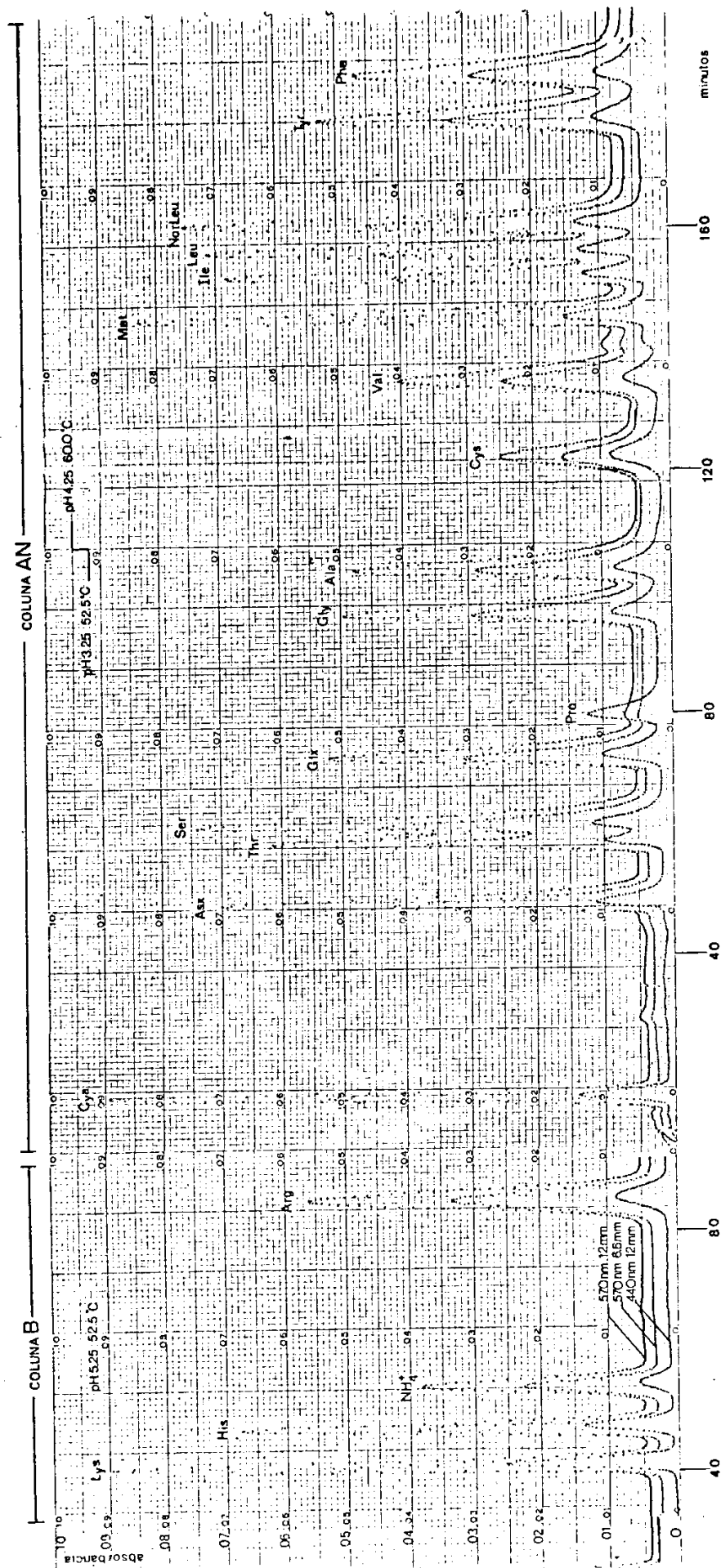


FIGURA 3 - Registro gráfico de uma análise automática de aminoácidos, obtido a partir de uma solução padrão de aminoácidos como descrito (2.10.1)(2.10.2). Estão indicadas as leituras correspondentes a cada uma das três células do fotômetro (570nm, caminho óptico 12mm; 570nm, caminho óptico 6.6mm e 440nm, caminho óptico 12mm), o tempo de eluição (minutos) para cada aminoácido e as condições (tempo e temperatura) para a coluna longa (AN) e coluna curta (B).

cidos cujos valores não são constantes com o tempo de hidrólise ácida.

Os valores de treonina e serina foram extrapolados para o tempo zero, uma vez que tendem a diminuir com o tempo de hidrólise. Os valores de valina, isoleucina e leucina foram aqueles de 72 horas, pois esses aminoácidos têm seus valores aumentados com o tempo de hidrólise (BAILEY, 1962).

No caso de peptídeos, os valores obtidos são expressos em número de moles de resíduo por mol de peptídeo, tomando-se como referência um número inteiro de um ou mais resíduos estáveis (recuperados quantitativamente nos diferentes tempos de hidrólise) e/ou a somatória dos resíduos teoricamente esperados para o peptídeo em questão.

2.11. Determinação de resíduos de meia cistina e metionina

Os resíduos de meia cistina foram determinados ou como ácido cisteico a partir das amostras da proteína nativa oxidada (MILSTEIN et al., 1968) ou como carboximetilcisteína sulfona (CMCysSO_2) a partir da oxidação dos digestos trípico ou péptico-trípico da proteína reduzida e alquilada (OLIVEIRA & LAMM, 1971).

Os resíduos de metionina foram determinados como metionina sulfona (MILSTEIN et al., 1968) nas amostras da proteína JJO oxidada.

2.12. Redução e Alquilação

À alíquotas de proteína BJP (JJ0) (10 mg) liofilizadas e dissolvidas em 1 ml de tampão 0.5 M tris, 6 M guanidina, 1mM EDTA pH 8.6 se adicionou 50 µl de solução recém-preparada de ditio-treitol (DTT) 65 mM. A reação se processou a 37°C durante 1 hora.

Em seguida, à amostra reduzida foi adicionado um volume de 100µl de uma solução de ácido iodoacético (2 - ¹⁴C) 0.16 M 0.75 mCi/nmol (New England Nuclear, Boston, Mass.). O material foi mantido a 37°C e ao fim de 90 minutos, dialisado contra o ácido fórmico 5% por 24 horas a temperatura ambiente (duas trocas).

2.13. Digestão Triptica

A proteína JJ0 oxidada e liofilizada foi digerida com tripsina tratada com TPCK: L(1-tosylamido-2-fenil) etilcloretilcetona (Worthington Biochemical Corp., Freehold, N.J.) relação E/S 1:50) em bicarbonato de amônia 1% pH 8.0 a 37°C durante 4 horas, sendo em seguida liofilizada.

As condições de digestão foram idênticas no caso de proteína reduzida e alquilada.

2.14. Digestão Pêptico-triítica

A proteína reduzida e alquilada foi digerida com pepsina (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.) (relação E/S 1:20) em ácido fórmico 5% a 37°C durante 16 horas. O digesto pêptico liofilizado foi dissolvido em bicarbonato de amônio 1% pH 8.0

e digerido com tripsina TPCK nas condições descritas no item 2.13. O material foi então, liofilizado.

2.15. Eletroforese de alta voltagem

As eletroforeses foram realizadas em papel Whatman 3MM (600x420 mm) a 60 V/cm, em tanques Savant LT-48 A (Savant Instruments Inc., Hicksville, N.Y.) refrigerados por circulação de metanol 5%. Foram empregados os seguintes tampões: a) tampão piridina pH 6.5 (piridina-ácido acético-água, 10:1:200 V/V), b) tampão piridina pH 3.5 (piridina-ácido acético-água, 1:10:440 V/V) e tampão fórmico-acético pH 2.1 (ácido fórmico - ácido acético - água, 1:4:45 V/V).

Para a caracterização dos peptídeos, foram aplicados os seguintes marcadores de referência: ácido aspártico, ácido glutâmico, lisina, ϵ -dinitrofenil-lisina (ϵ -DNP-L-Lys) e tinta vermelha para caligrafia (Pilot), de mobilidade semelhante à do ácido aspártico em pH 6.5. As mobilidades (m) dos peptídeos a pH 6.5 foram expressas como relativas à distância entre ϵ -DNP-L-Lys e ácido aspártico ($m = 1.0$), e a carga líquida (ϵ) foi determinada utilizando-se o "plot" de OFFORD (OFFORD, 1966) como indicado na figura 4.

Em eletroforese a pH 3.5, as mobilidades dos peptídeos foram expressas em relação ao dipeptídeo Gly-Ala (FRANGIONE et al., 1969a).

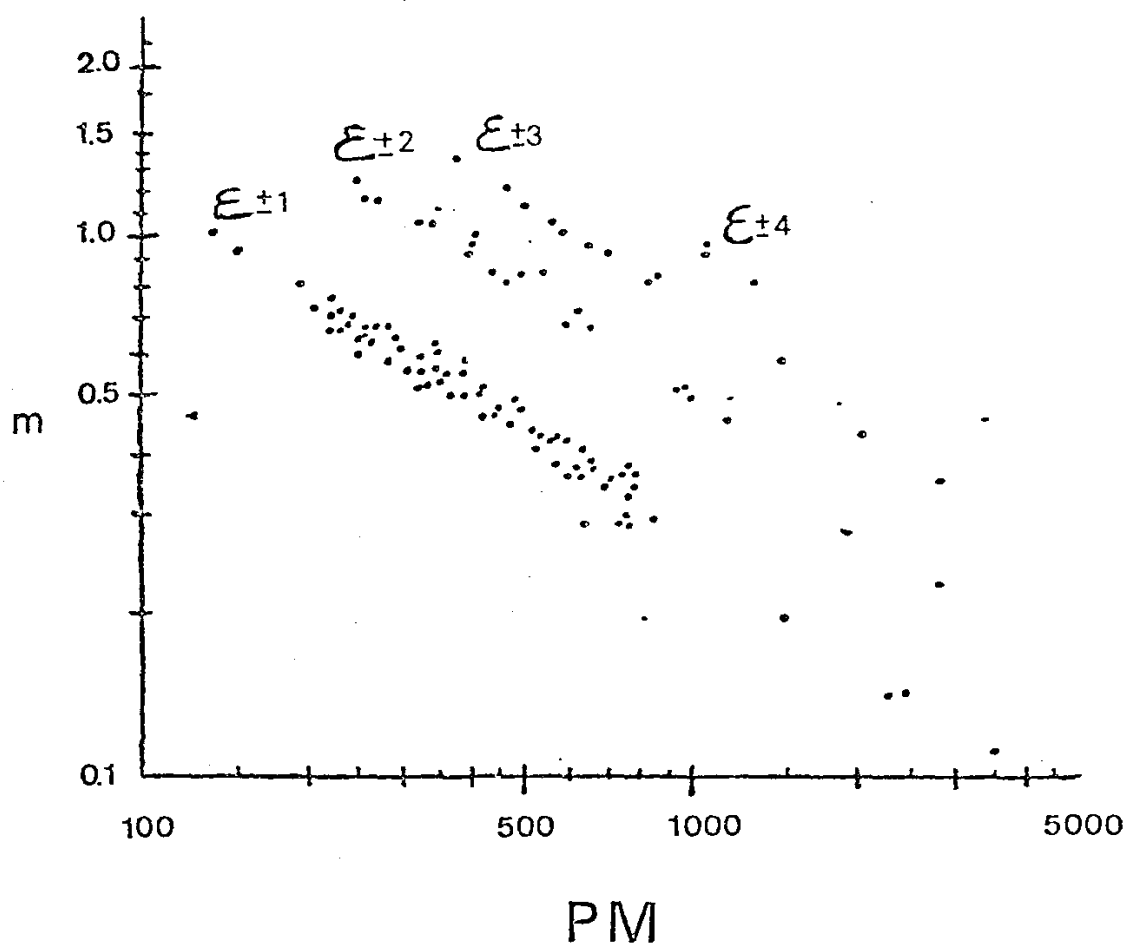


FIGURA 4 - Gráfico de OFFORD em escala ampliada: mobilidade eletroforética em pH 6.5 (m) (medida em centímetros, tornando-se ϵ -DNP-Lys como ponto de mobilidade zero) em função do peso molecular do peptídeo (PM) (calculado a partir da análise de aminoácidos). Valores de carga líquida (ϵ) válidos para peptídeos sem histidina ou ácido cistêico (OFFORD, 1966).

2.16. Tipificação química

O digesto peptico-tríptico da proteína reduzida e alquilada foi submetido a eletroforese em pH 6.5 como descrito anteriormente (2.15). Os peptídeos com carboximetilcisteína foram detectados por autoradiografia: o mapa eletroforético foi colocado em contato com uma chapa de raio X Sakura de 356x432 mm em câmara escura durante 16 horas. Após revelação da chapa, as áreas do mapa correspondentes às aquelas radioativas da chapa foram localizadas por sobreposição, recortadas e oxidadas em fase vapor (2.7). Essa banda foi em seguida costurada sobre outra folha de papel Whatman 3 MM e submetida a eletroforese a pH 3.5 a 60 V/cm durante 50 minutos. Glicina/Alanina foi incluído aos demais marcadores. A localização dos peptídeos marcados foi feita por nova autoradiografia. Os peptídeos contendo carboximetilcisteína sulfona foram eluídos com água desionizada, hidrolisados (2.8) e analisados (2.9).

2.17. Mapa peptídico

O digesto tríptico liofilizado foi aplicado em banda (10x70 mm) sobre papel Whatman 3 MM (600x420 mm) e submetido à eletroforese de alta voltagem em tanque Savant em tampão piridina pH 6.5 a 60 V/cm por 60 minutos (1ª dimensão). Os marcadores utilizados foram aqueles especificados (2.15).

O mapa foi seco a 80°C em forno (2.8.3.), e os marcadores localizados com ninhidrina 0.2% em acetona para controle.

Ao mapa foi costurada uma banda de papel Whatman 3 MM de 600x150 mm para a realização de cromatografia descendente em direção perpendicular à 1ª dimensão em câmara cromatográfica Precision Scientific (GCA Corp., Chicago, Ill.), utilizando-se BAWP (n-butanol-ácido acético-água-piridina; 13:3:12:10 V/V) como solvente. Aos demais marcadores foi adicionado valina. O tempo médio da 2ª dimensão foi de 10 horas, sendo a migração acompanhada pela posição de ϵ -DNP-L-Lys; até que este marcador atingisse a extremidade inferior do papel.

Depois de seco o mapa, a faixa central, correspondente à região dos neutros, foi recortada. O restante do mapa foi corada com solução de ninhidrina 0.02% em acetona, para revelar os peptídeos. Estes foram recortados e imediatamente lavados em acetona pura.

A faixa central recortada (região dos peptídeos neutros) foi costurada sobre nova folha de papel e submetida a uma nova eletroforese a pH 3.5 (3ª dimensão) a 60 V/cm durante 50 minutos, ortogonal à cromatografia. Os peptídeos foram localizados por coloração com ninhidrina, nas condições descritas acima.

2.18. Mapa Diagonal

Foi realizado após modificações do método descrito por BROWN & HARTLEY, 1966. O digesto triptico liofilizado da proteína reduzida e alquilada foi dissolvido em 0.1 ml de água desionizada e aplicado em uma banda de 70x10 mm sobre pa-

papel Whatman 3 MM e submetido a eletroforese de alta voltagem em tampão piridina pH 6.5 (1^a dimensão). Em seguida, uma faixa de 60 mm de largura foi cortada ao longo de uma margem e após oxidação, costurada em outra folha de papel e submetida a uma segunda eletroforese em pH 3.5 (2^a dimensão), em direção perpendicular à primeira dimensão. Os peptídeos contendo carboximetilcisteína sulfona (CMCysSO₂) foram detectados por autoradiografia (2.16).

Em seguida o mapa foi corado a 37°C ou com uma solução de ninhidrina 1% em acetona ou com uma solução de ninhidrina-cádmio, contendo acetato de cádmio 14% (6 g de acetato de cádmio em ácido acético 30%) em ninhidrina 1% em acetona (MICHAELSEN et al., 1977).

A faixa ninhidrina positiva da região de ϵ -DNP-L-Lys foi recortada (210x35mm), costurada sobre uma banda de papel Whatman 3 MM (600x210 mm) e submetida a cromatografia descendente ortogonal à eletroforese, nas condições descritas em 2.17.

2.19. Metanólise

As condições de metanólise foram aquelas modificadas de KAWASAKI & ITANO, 1972.

A 10 mg da proteína JJ0 liofilizada foram acrescentados 4 ml de HCl 1M em metanol. O tubo de ensaio foi mantido por 60 minutos a 40°C, sendo agitado a pequenos intervalos. Findo este período, a reação teve continuidade à temperatura ambiente por 18 horas. O material foi em seguida, liofilizado.

2.20. Análise do resíduo N-terminal

2.20.1. Dinitrofenilação

A análise N-terminal da proteína JJ0 purificada foi realizada através da reação com 1-fluor-2,4 dinitrobenzeno (FDNB) (Pierce Chemical Co., Rockford, Ill.), segundo o método original de SANGER (1945) revisto por BISERTE et al. (1959).

Alíquotas de 10 mg de proteína liofilizada foram dissolvidas em 1 ml de tampão bicarbonato de sódio 0.5 M pH 9.0 e, tratadas com solução alcoólica a 5% de FDNB num volume de duas vezes àquele da solução da proteína BJP (JJ0) tamponada. A reação se processou sob agitação, no escuro e a temperatura ambiente por 2 horas.

O meio foi acidulado (pH 2.0) com HCl 4.0 N e a DNP-proteína precipitada foi coletada por centrifugação.

O excesso de reagente foi removido por lavagem do material com água destilada, seguida de etanol e éter.

O material foi seco na presença de P_2O_5 e em seguida, hidrolisado em 1 ml de HCl 5.3 N a $110^{\circ}C$ por 16 horas em ampola selada à vácuo.

Após a hidrólise, a extração do DNP-aminoácido foi realizada com éter, utilizando-se um funil de separação, e o dinitrofenol (DNP-OH), contido na fase de éter, foi sublimado a $70^{\circ}C$ em um frasco de sublimação acoplado à uma bomba de vácuo, segundo modificação do esquema de MILLS (1952) e BISERTE et al. (1959).

A fase aquosa, resultante do processo de extração do DNP-aminoácido com éter, foi recolhida em um "beaker" e seca à vácuo na presença de P_2O_5 .

A identificação do resíduo N-terminal na forma de DNP-aminoácido, contido na fase de éter, foi feita por cromatografia bidimensional em papel Whatman nº 1 (460x570 mm), empregando-se o seguinte esquema: 1ª dimensão: cromatografia descendente em n-butanol- NH_4OH por 17 horas; e 2ª dimensão: cromatografia descendente em fosfato de sódio 1.5M pH 6.0 por 10 horas. As manchas obtidas foram comparadas a um cromatograma padrão contendo os vários DNP-aminoácidos resolvidos no mesmo sistema (KOCH & WEIDEL, 1956). Este dado foi complementado pelo exame do espectro de absorção da solução obtida após eluição da mancha suspeita em bicarbonato de sódio 1% pH 8.0 a 55°C durante 10 minutos, bem como pela análise do espectro de absorção de DNP-aminoácidos padrão (Mann Research Labs. Inc., N.Y.C., N.Y.), obtidos nas mesmas condições, utilizando-se um espectrofotômetro Beckman modelo Acta III (Beckman Instruments Inc., Spinco Division, Palo Alto, Cal.).

A análise da fase aquosa foi realizada através de eletroforese de alta voltagem em pH 3.5 a 3000 V em papel Whatman 3 MM (500x350 mm). Para efeito de comparação e identificação das manchas obtidas foram incluídos os seguintes DNP-aminoácidos padrão solúveis em água (BAILEY, 1962): DNP-arginina e DNP-lisina.

2.20.2. Dansilação

A determinação do resíduo N-terminal dos peptídeos foi realizada utilizando-se cloreto de dansil (cloro 1 dimetilaminoftaleno-5-sulfonil) (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.), nas condições descritas por GRAY (1967, 1972).

Aliquotas dos peptídeos (5 nmoles aproximadamente), obtidas a partir do material eluído de papel Whatman 3MM (2.9), foram transferidas para um tubo cônico de 75x7 mm e secas à vacuo sobre NaOH.

Ao material dissolvido em 10 μ l de bicarbonato de sódio 0.2M foram acrescentados 10 μ l de água de uma solução 2.5 mg/ml de cloreto de dansil em acetona. A reação de acoplamento ocorreu a 37°C durante 60 minutos. O material foi seco à vacuo na presença de P₂O₅.

A hidrólise do material dansilado foi realizada em HCl 6N a 105°C (2.9) durante 16 horas. O tempo de hidrólise foi reduzido para 7 horas no caso de serina ou prolina serem os aminoácidos teoricamente esperados na posição N-terminal.

O material hidrolisado foi seco, dissolvido em aproximadamente 5 μ l de piridina-água (1:1 V/V), aplicado sobre placa de camada delgada de gel de poliamida de 75x75 mm (Cheng, Chin Trading Co. Ltd., Taiwan) e submetido à cromatografia bidimensional segundo WOODS & WANG, 1967.

Foram empregados os seguintes solventes: 1ª dimensão: 1-ácido fórmico 1.5% (solvente I); 2ª dimensão: 2-benzeno-ácido acético (9:1 V/V) (solvente II) e 3-acetato de etila-ácido acético-metanol (20:1:1 V/V) (Solvente III).

A primeira dimensão foi uma cromatografia ascendente no solvente I por 15 minutos aproximadamente. Depois de seca, a placa foi mergulhada no solvente II e a segunda dimensão realizada a 90° da primeira durante 15 minutos.

O produto dansilado foi identificado por observação da placa à luz ultravioleta, comparando-se sua posição às dos diversos DNS-aminoácidos padrão (Pierce Chemical Co., Rockford, Ill.) utilizados como referência no verso da placa.

Após a análise, quando necessário, foi realizada nova cromatografia no solvente III (aproximadamente 20 minutos).

2.21. Degradação de Edman

A degradação de Edman foi realizada após adaptação da metodologia descrita (EDMAN, 1970). A identificação do resíduo N-terminal removido foi realizada pela determinação da composição de aminoácidos do peptídeo antes e após cada degradação (Edman subtrativo) ou por análise de aminoácidos do produto resultante da hidrólise da feniltioidantoína correspondente. Alternativamente foi realizada a degradação sequencial baseada no método de Dansil-Edman, como descrito por GRAY (1972).

O peptídeo (40-80 nmoles), em um tubo de ensaio de 130x9mm, foi dissolvido em 100 µl de água. Nesta etapa, quando feita a opção pelo método de Dansil-Edman, foi retirada uma alíquota do material (10 µl) para dansilação. Ao material restante foram acrescentados 100 µl de uma solução de fenilisotiocianato (PITC) (Pierce Chemical Co., Rockford, Ill.) 5% em pi-

ridina. O tubo foi agitado e incubado a 45°C durante 60 minutos, sob atmosfera de nitrogênio. Ao término da reação de acoplamento, o conteúdo do tubo foi seco a vácuo em dessecador na presença de P_2O_5 . Foram adicionados 150 μ l de ácido trifluoracético (TFA) (Pierce Chemical Co., Ill.). O material foi mantido a 45°C por 30 minutos, sendo posteriormente seco nas mesmas condições descritas acima. Após dissolução do material em 200 μ l de HCl 1M, foram realizadas três extrações sucessivas com 200 μ l de acetato de butila; o material foi agitado, centrifugado por 5 minutos e a fase n-butil-acetato transferida para um tubo limpo com o auxílio de uma pipeta Pasteur.

A fase aquosa e a fase do acetato de butila foram transferidas para um dessecador e secas em presença de NaOH.

O material contido na fase do acetato de butila foi convertido na feniltiodantoína correspondente ao ser dissolvido em 100 μ l de HCl 1M e mantido a 80°C por 10 minutos. A hidrólise foi realizada em 100 μ l de HCl 6M com mercaptoetanol (1:2000 V/V) a 130°C durante 24 horas, e o produto identificado por análise de aminoácidos.

O restante do peptídeo contido na fase aquosa foi submetido à análise de aminoácidos ou utilizado para ciclos posteriores, sendo previamente retirada uma alíquota para dansilação. Esta foi transferida para um tubo de dansilação e, após acerto do pH com NaOH para valores entre 8.0 e 9.0, o material foi seco em presença de NaOH em um dessecador. A dansilação foi realizada segundo procedimento descrito (2.20.2).

2.22. Obtenção de soro de coelho anti-proteína do isotipo λ :

Os coelhos foram inoculados com a proteína de Bence Jones JJ0 purificada, emulsificada em adjuvante de Freund completo (FREUND, 1965), na concentração de 10 mg de proteína/ml. Nas doses de reforço foi inoculado antígeno em salina fisiológica na concentração de 1 mg de proteína/ml.

O esquema de imunização utilizado foi modificado daquele descrito (OLIVEIRA et al., 1970). A primeira inoculação foi realizada com antígeno emulsificado em adjuvante de Freund completo (10 mg de proteína/animal), injetado via subcutânea nas quatro patas (coxins plantares, 2.5 mg/local).

Na segunda inoculação, realizada três semanas após a primeira, foi injetado antígeno em adjuvante de Freund completo via intramuscular em cada uma das quatro patas do animal (2.5 mg/local). Na terceira inoculação (quatro semanas após a primeira) foi administrado antígeno em salina fisiológica ("booster") (400 μ g proteína/animal). O material foi injetado via intradérmica em quatro pontos previamente depilados com o auxílio de uma gilete, localizados no dorso do animal. As injeções intradérmicas foram repetidas de 7/7 dias até a obtenção de reação local do tipo Arthus.

Foram executadas sangrias a partir de cortes do bordo externo de uma das orelhas. O sangue coletado foi mantido a 37°C em banho-maria por aproximadamente 30 minutos, sendo em seguida centrifugado em uma centrífuga refrigerada Sorval RC2-B (2.7) a 6000 rpm durante 20 minutos. Os soros foram coletados com o auxílio de uma pipeta Pasteur, distribuídos em ali-

quotas de 5 ml, adicionados de antisséptico. (Mertiolato a 1:10.000), rotulados e mantidos a -20°C , sob o abrigo da luz. Estes anti-soros foram inicialmente testados por "*ring test*" (teste interfacial para detecção de anticorpo ou antígeno). O controle por dupla difusão em duas dimensões e imunoeletroforese foi realizado como descrito anteriormente (2.2) (2.4). Nestes controles, além de proteína de mesmo isotipo (2.3) foram utilizadas proteínas de Bence Jones do tipo antigênico k:BJP (Sim)(2.3) e BJP (GOB) (OBATA et al. 1982)*.

* S. OBATA, S. MARANGONI & OLIVEIRA, B. Comunicação Pessoal.

3. RESULTADOS

3.1. Análise imunoeletroforética da urina do paciente JJ0

A urina do paciente paraproteinêmico JJ0, após diálise e liofilização, quando submetida a imunoeletroforese em gel de ágar, mostrou além da banda característica de proteína de Bence Jones, a presença de arcos de precipitação correspondentes às proteínas características das regiões α_1 , α_2 , β e albumina, detectadas por soro de coelho imunizado com soro humano normal (Fig. 5).

3.2. Tipificação sorológica da proteína BJP (JJ0)

O exame da urina do paciente JJ0 pela técnica de imuno difusão dupla em duas dimensões em gel de ágar mostrou um arco de precipitação com a proteína BJP λ (Mau), revelado pelo anti-soro de coelho anti-proteína Mau; da mesma forma foi detectado um arco de precipitação com a proteína BJP (JJ0). Este anti-soro foi incapaz de reagir com a proteína BJP (Sim) de isotipo kappa (Fig. 6).

3.3. Purificação da proteína BJP (JJ0)

A figura 7 mostra os resultados de purificação da pro-

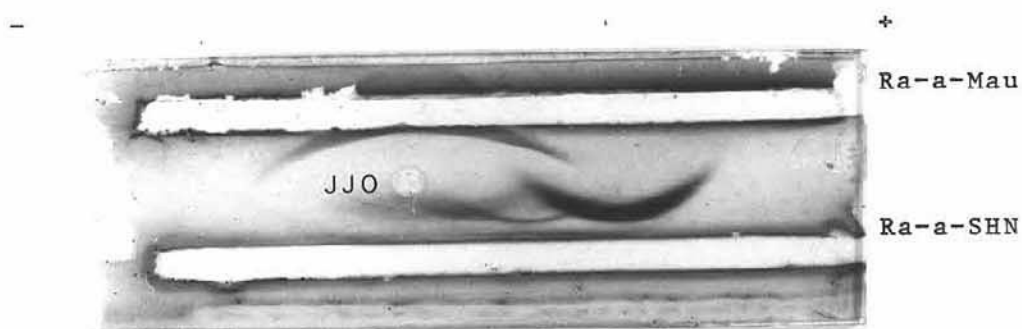


FIGURA 5 - Imunoeletroforese em gel de ágar a 1% da urina do paciente JJO após diálise e liofilização. Os contaminantes séricos presentes na urina do paciente JJO são revelados pelo soro de coelho anti-soro humano normal (Ra-a-SHN). Somente o arco de precipitação que corresponde à proteína de Bence Jones JJO é revelado pelo soro de coelho anti-BJP (Mau) λ (Ra-a-Mau).

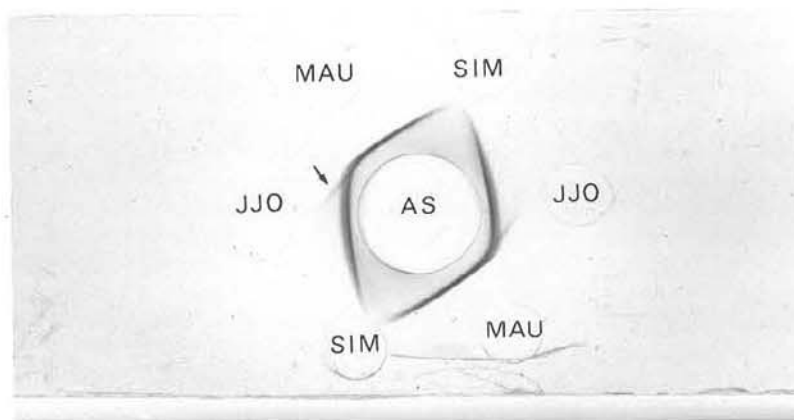


FIGURA 6 - Imunodifusão dupla em duas dimensões em gel de ágar segundo a técnica de Ouchterlony das proteínas BJP (JJ0) λ , BJP (Mau) λ e BJP (Sim) κ , reveladas por soro de coelho (AS) anti-proteína Mau. Não foi observado arco de precipitação entre o anti-soro e a proteína Sim do isotipo kappa. As proteínas BJP (JJ0) e BJP (Mau) mostram entre si relação de identidade antigênica. A presença de um "esporão" entre as proteínas JJ0 e Mau é indicada pela seta.

teína BJP (JJ0) em DEAE-celulose. Foram identificados dois picos de densidade ótica denominados arbitrariamente BJ1 e BJ2. A fração correspondente à proteína urinária JJ0 purificada (BJ1) aparece como uma única banda em eletroforese em camada fina de agarose como indicado na figura 8. O controle imunoeletroforético da fração BJ1 pode ser observado na figura 9; esta fração, denominada JJ02 nesta figura, não mostrou os arcos de precipitação correspondentes às proteínas contaminantes presentes nas amostras de proteína urinária dialisada e liofilizada (JJ01). Como mostra a técnica de PAGE/SDS (Fig. 10) a proteína de Bence Jones JJ0 purificada se apresenta como uma única banda de peso molecular aparente de 50 K; após redução com ditioneitol, esta proteína aparece como uma banda homogênea que migra ao lado de cadeias leves (25 K) da imunoglobulina IgG 1 JJ0 e de outras paraproteínas reduzidas.

3.4. Composição global de aminoácidos da proteína BJP (JJ0)

Os registros gráficos das análises de aminoácidos da proteína JJ0 purificada oxidada e não oxidada no tempo de hidrólise de 24 horas são mostrados nas figuras 11 e 12.

A tabela I apresenta os valores em moles de resíduo/mol de proteína, encontrados para cada resíduo de aminoácido presente na proteína BJP (JJ0).

O número de meias cistinas determinado como ácido cisteico (Cya) foi igual a cinco. O resíduo metionina foi detec-

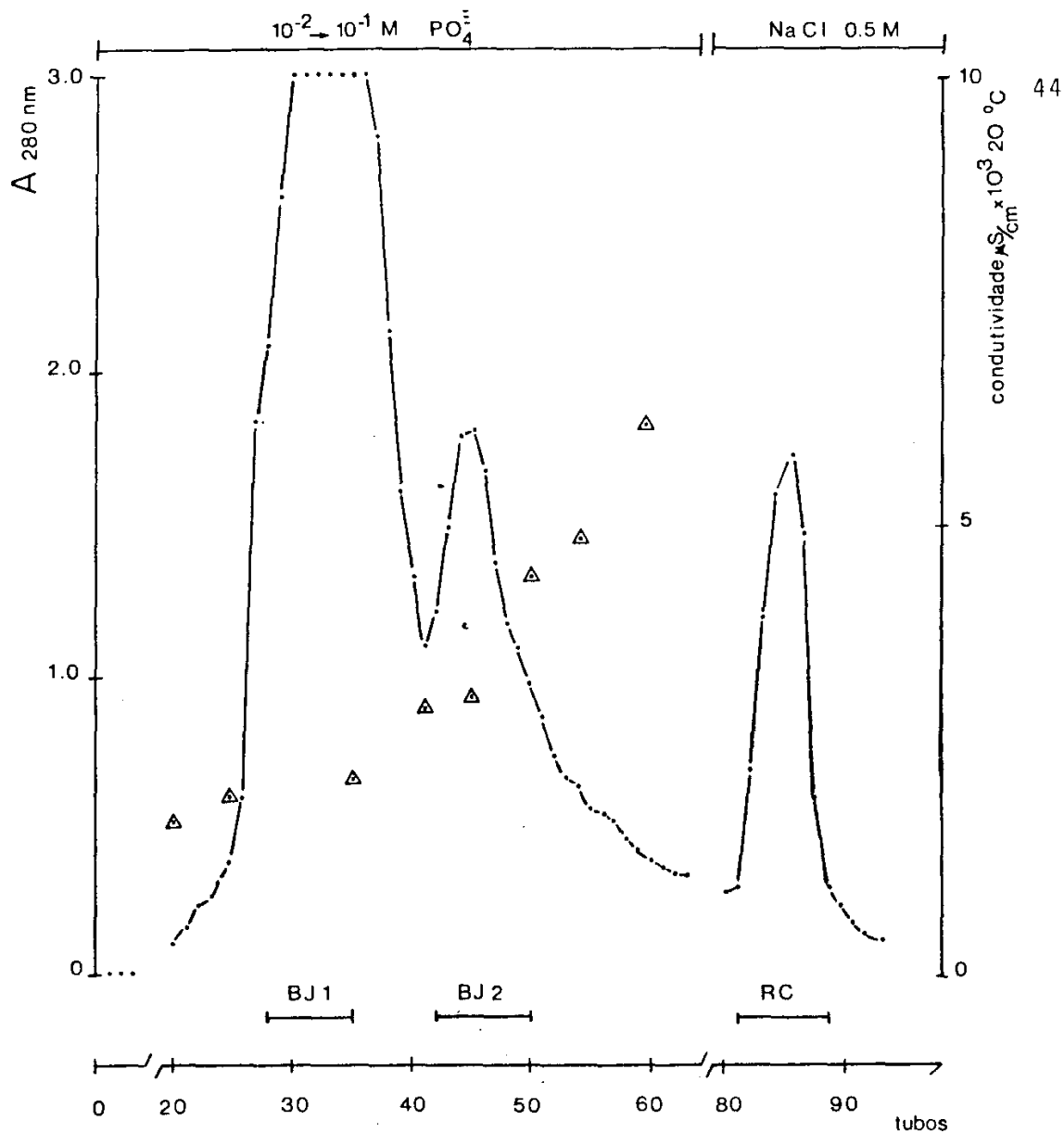


FIGURA 7 - Cromatografia de troca aniônica em DEAE-celulose da urina do paciente JJO dializada e liofilizada, resuspensa em tampão fosfato 10^{-2} M pH 8.2. As frações indicadas como BJ1 e BJ2 foram obtidas de gradiente de molaridade nos limites de 10^{-2} a 10^{-1} M pH 8.2. Em uma segunda etapa foi obtida a fração RC com NaCl 0.5 M. A condutividade (Δ) foi medida a cada cinco tubos e, a leitura da absorbância foi efetuada a 280 nm.

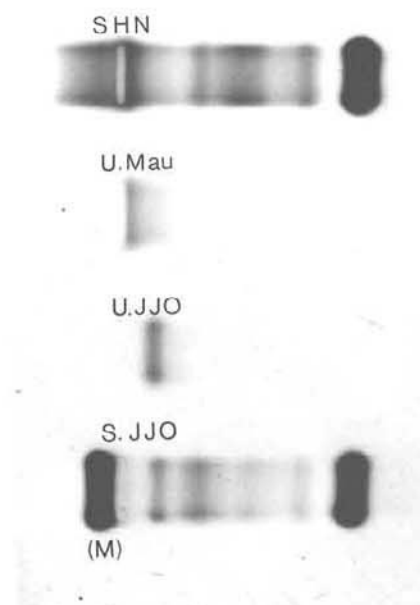


FIGURA 8 - Eletroforese em camada delgada de agarose da proteína urinária JJO (U.JJO) purificada. Como controles paralelos foram utilizados soro humano normal (SHN), proteína de Bence Jones Mau (U.Mau) e soro mielomatoso JJO (S.JJO). No soro mielomatoso JJO está presente a banda M de mobilidade eletroforética restrita localizada na região de gamaglobulina lenta. Pode ser observado o grau de homogeneidade das bandas monoclonais características das proteínas de Bence Jones JJO e Mau. No soro humano normal nota-se a região polidispersa de gamaglobulina, o que indica heterogeneidade molecular.

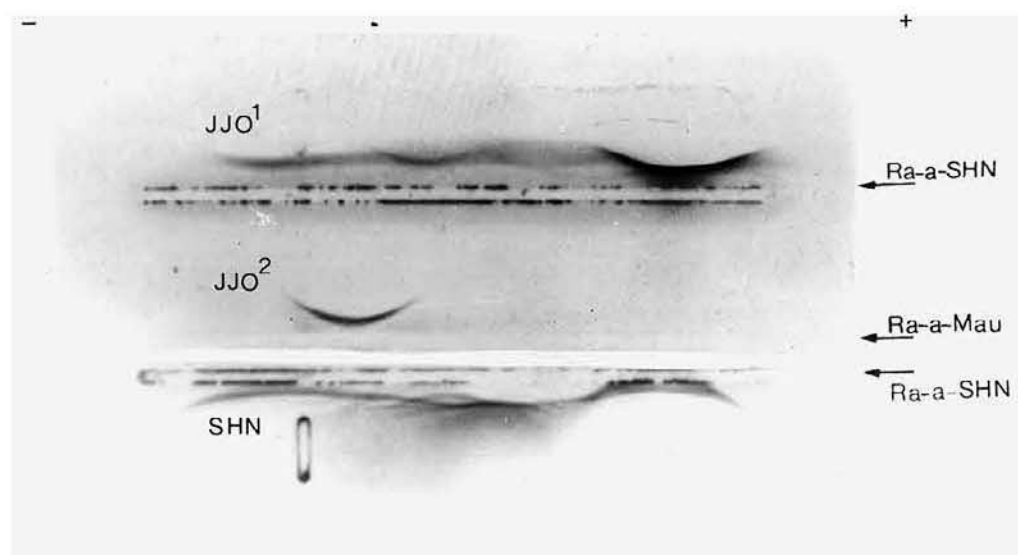


FIGURA 9 - Controle imunoeletroforético do fracionamento em DEAE-celulose da proteína BJP (JJ0). O soro de coelho anti-soro humano normal (Ra-a-SHN) revela contaminantes séricos presentes na urina JJ0 dialisada e liofilizada (JJ01). Após cromatografia, esta proteína (JJ02) se apresenta livre de contaminação "vis-a-vis" o soro Ra-a-SHN. O soro de coelho anti-proteína lambda Mau (Ra-a-Mau) revela a proteína de Bence Jones após purificação (JJ02). Como controle se utilizou soro humano normal (SHN).

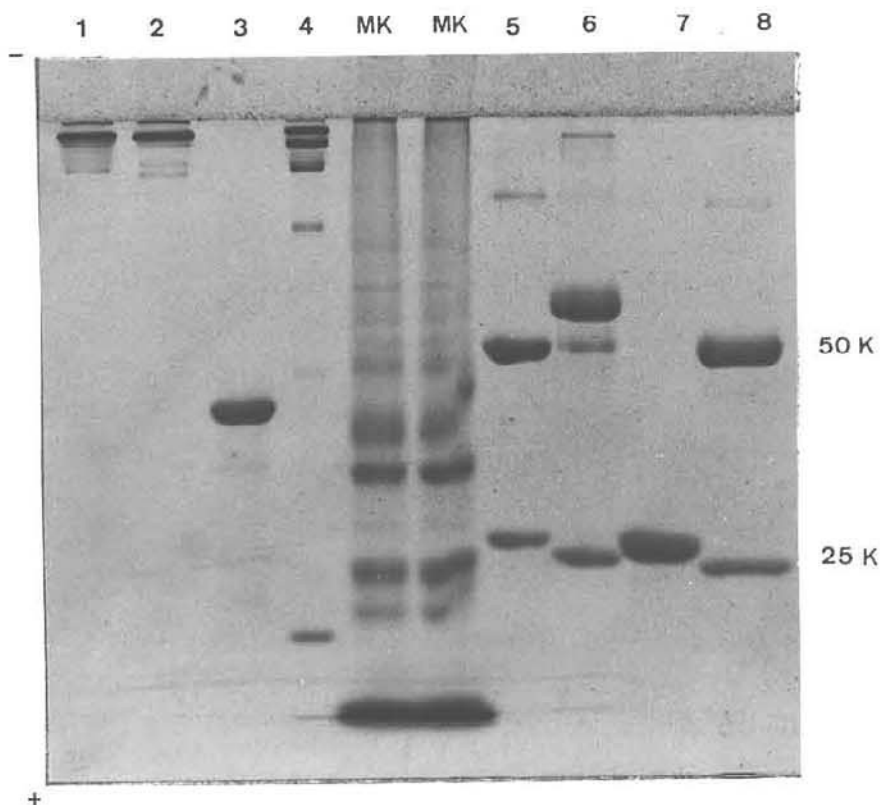


FIGURA 10 - Eletroforese em gel de poliacrilamida a 10% com SDS da proteína de Bence Jones (JJ0) antes e depois de redução com DTT 0.1 M. As proteínas não reduzidas foram aplicadas: em (1) a paraproteína M do soro do paciente JJ0, em (2) uma proteína M (FKW) do isotipo IgG3, com cadeias leves K, em (3) a proteína de Bence Jones JJ0 após purificação, em (4) a paraproteína COB do isotipo IgG1 portadora de cadeias leves kappa. Os marcadores estão indicados como MK. Estas mesmas proteínas após redução com DTT foram aplicadas em (5), (6), (7) e (8) na mesma ordem. As cadeias pesadas (H) que correspondem a 50 K e as cadeias leves (L) que correspondem a 25 K são evidenciadas após redução com DTT. A cadeia pesada da proteína FKW do tipo antigênico IgG3 tem peso molecular maior que 50 K e se destaca das outras bandas H. Após redução a proteína de Bence Jones JJ0, agora na forma de monômero, migra como uma única banda correspondente àquelas das cadeias leves.

tado na forma reduzida e na forma de metionina oxidada; os cálculos realizados foram compatíveis com a presença de um único resíduo de metionina por mole de proteína BJP (JJ0).

A composição global de aminoácidos determinada para a proteína JJ0 é comparada com a de outras cadeias leves de mesmo isotipo (MILSTEIN et al., 1968; MARANGONI, et al., 1979) e outra de isotipo kappa (TITANI et al., 1969).

O número total de resíduos estimado para a proteína JJ0 foi 206 (não incluindo triptofano).

3.5. Tipificação química da proteína BJP (JJ0)

A figura 13 indica a banda radioativa A de mobilidade 0.81 em relação a ácido aspártico, obtida de autoradiografia de eletroforese em alta voltagem do digesto peptico-tríptico da proteína BJP (JJ0) após redução e alquilação radioativa. Na tabela II pode-se observar a composição de aminoácidos do peptídeo JJ0 P1 contido na banda radioativa A, após oxidação, nova eletroforese em pH 3.5 (Fig. 14) e análise de aminoácidos (Fig. 15).

No mapa peptídico da proteína de Bence Jones JJ0 oxidada e submetida à digestão tríptica (Fig. 16) está representada a mancha ninhidrina positiva (JJ0 T1) de mobilidade eletroforética 0.63 em pH 6.5 (1a. dimensão) que na segunda dimensão em BAWP apresenta coeficiente de partição (Rf) de 0.42.

O registro gráfico da análise de aminoácidos desta man

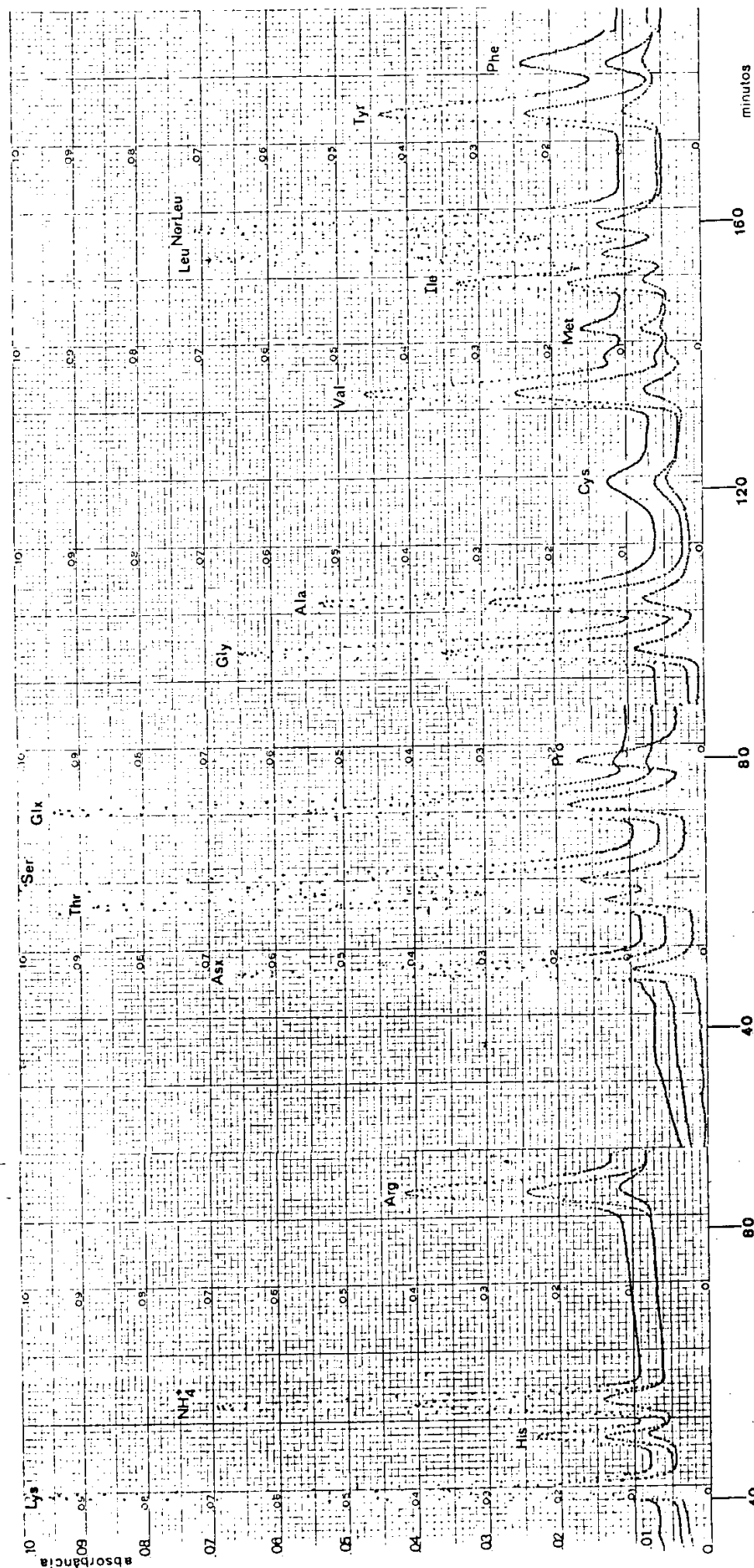


FIGURA 11 - Registro gráfico da análise de aminoácidos da proteína de Bence Jones JJO após hidrólise de 24 horas. Os picos fora de escala foram integrados no caminho ótico de 6.6 mm e os resultados convertidos para os valores correspondentes aos de 12 mm.

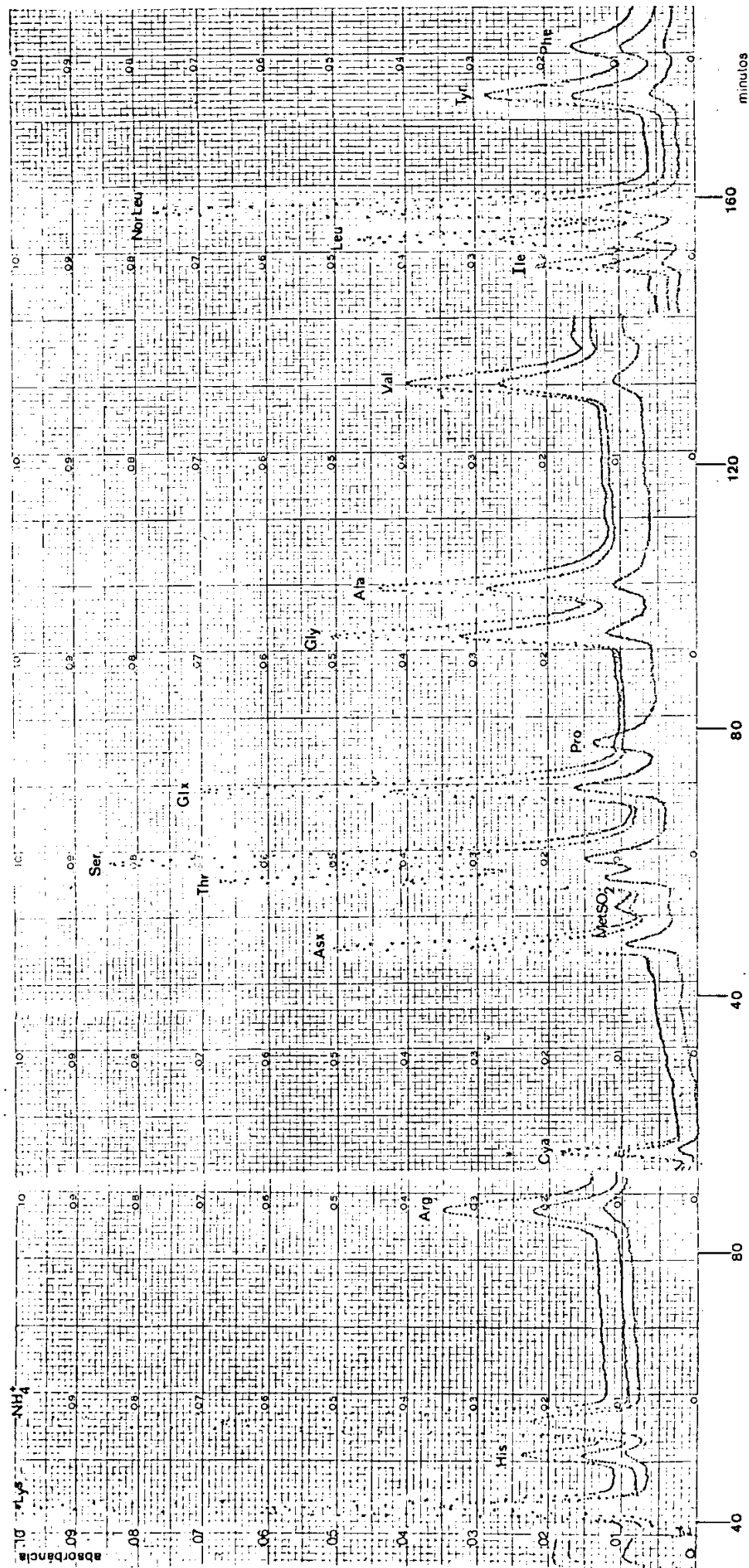


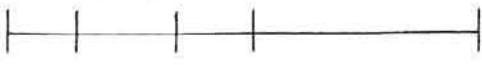
FIGURA 12 - Registro gráfico da análise de aminoácidos da proteína de Bence Jones JJO após oxidação e hidrólise (24 horas). Notar os produtos de oxidação: ácido cisteico (Cya) aos 16.5 minutos e metionina sulfona (Met SO₂) aos 53.5 minutos.

TABELA I - COMPOSIÇÃO GLOBAL DE AMINOÁCIDOS DA PROTEÍNA BJP
(JJ0) COMPARADA COM OUTRAS PROTEÍNAS DE BENICE JONES.

Resíduo	Média (b) (moles resíduo/mol de proteína)(a)	Valor mais próximo	λ_{Mau} (h)	λ_x (i)	K Ag (j)
Lys	11.3	11	11	10	13
His	2.1	2	3	2	3
Arg	6.3	6	4	5	6
Cya (c)	4.6	5	5	6	5
Asx	13.5	14	13	16	21
Met(SO ₂) (d)	1.4	1	-	2	-
Thr (e)	21.9	22	19	20	20
Ser (e)	25.7	26	35	31	27
Glx	22.2	22	20	23	26
Pro	17.1	17	16	15	11
Gly	16.1	16	17	14	13
Ala	14.6	15	17	16	12
Val (f)	16.4	16	16	17	13
Ile (f)	4.6	5	7	5	9
Leu (f)	12.8	13	12	12	15
Tyr	11.1	11	10	9	9
Phe	4.4	4	4	4	9
Met	-	-	-	-	1
Trp	-	-	-	4	2
Σ 206 (g)			209 (g)	211	215

Composição Global de aminoácidos da proteína de Benice Jones JJ0: (a) Cálculos realizados em relação ao PM de 22600, estimado do número total de resíduos da proteína λ_x (MILSTEIN et al., 1968); (b) Valores de hidrólises em duplicata nos tempos de 24, 48 e 72 horas para a proteína nativa e de 24 horas para a proteína oxidada; (c) Meia-cistina determinada como ácido cistêmico (Cya) (MILSTEIN et al., 1968); (d) Metionina determinada como metionina sulfona (Met SO₂) (MILSTEIN et al., 1968); (e) Valores extrapolados para tempo zero de hidrólise (BAILEY, 1962); (f) Valores de 72 horas de hidrólise (BAILEY, 1962); (g) Valor total normalizado (não incluindo Trp); (h) MARANGONI et al., 1979; (i) MILSTEIN et al., 1968; (j) TITANI et al., 1969.

M O B I L I D A D E



1.0 0.8 0.7 0.5 0

A



+



↑↑
M A
R s
p

↑
G
l
u

↑ ↑
O ε
r D
i N
g P
e L
m Y
S

FIGURA 13 - Autoradiografia de eletroforese em pH 6.5 do digesto p  ptico-tríptico da proteína de Bence Jones JJO submetida à redução parcial com DTT e alquilada com ácido iodoac tico ^{14}C . Nas margens desta figura estão indicadas as mobilidades eletroforéticas das diferentes bandas radioativas e a posição dos marcadores de referência em relação à origem: Asp, MR (marcador vermelho de tinta Pilot com mobilidade semelhante   ácido aspártico) e ϵ -DNP-Lys (mobilidade zero). A banda A, na margem superior da figura tem mobilidade eletroforética de 0.81 em relação   ácido aspártico, tomado como valor 1.0.

TABELA II - COMPOSIÇÃO DE AMINOÁCIDOS E MOBILIDADES ELETROFORÉTICAS DO PEPTÍDEO JJO P1.

Resíduo	moles de resíduo/mol de peptídeo
CMCysSO ₂	+
Asp *	
Thr	0.99 (1)
Ser	0.95 (1)
Glu	1.27 (1)
Pro	1.39 (1)
Gly *	
Ala *	
Leu *	
Mobilidade (m) pH 6.5	0.81
Mobilidade (m) pH 3.5	0.84

Resultado da análise de aminoácidos da banda radioativa A obtida a partir da proteína BJP (JJO) reduzida e alquilada, submetida a eletroforese em pH 6.5, seguida de eletroforese em pH 3.5 na segunda dimensão. Entre parênteses o valor integral mais próximo. CMCysSO₂ é detectada qualitativamente (+). O símbolo * indica detecção em nível de contaminação.

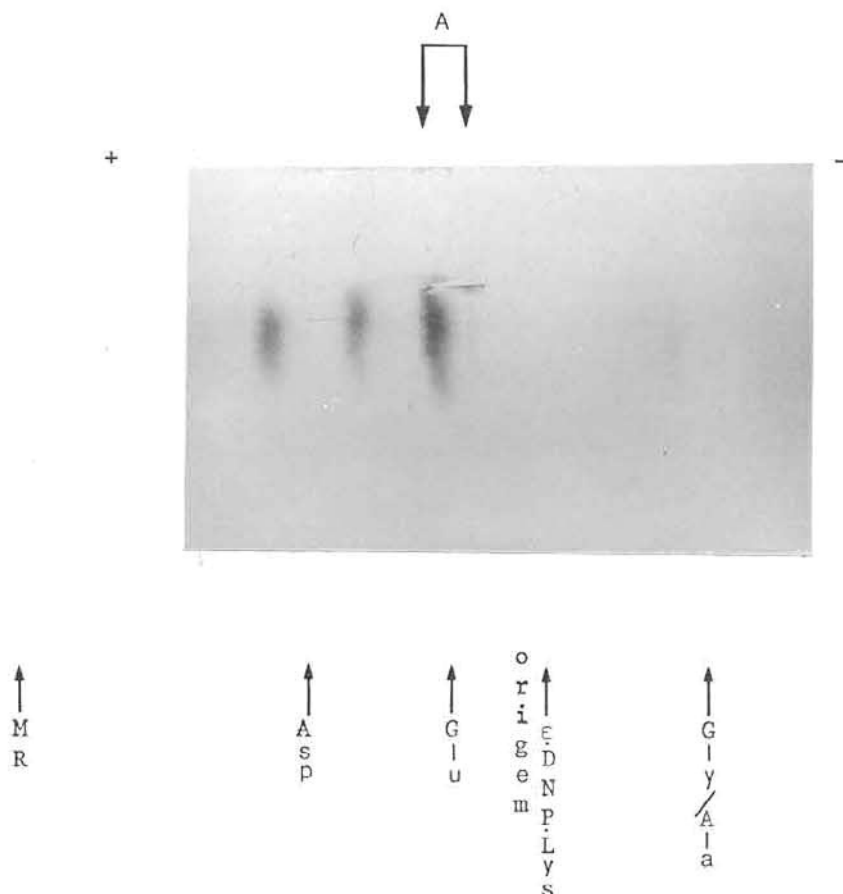


FIGURA 14 - Autoradiografia de eletroforese de alta voltagem em pH 3.5 da banda radioativa A oxidada com ácido perfôrmico. Nesta figura é mostrada a região dos peptídeos radioativos anódicos e o campo catódico. Como marcadores de mobilidade eletroforética foram utilizados: Asp, Glu, ϵ -DNP-Lys (mobilidade zero) e Gly-Ala, além do marcador vermelho (MR). Na margem superior está indicada a banda A de mobilidade 0.84 em relação ao dipeptídeo Gly-Ala tomado como valor 1.0.

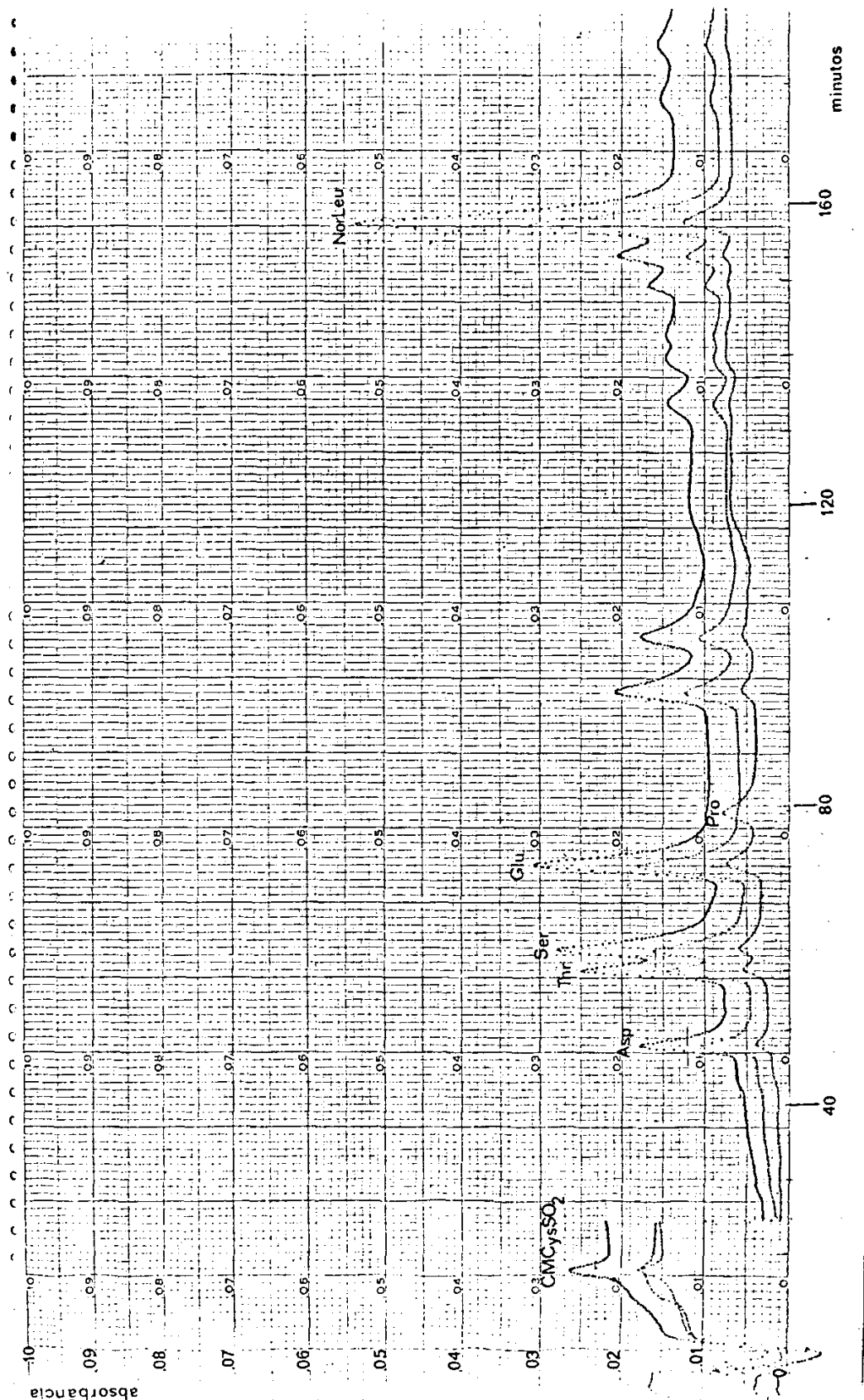


FIGURA 15 - Registro gráfico da análise de aminoácidos do material eluído da banda radioativa A purificada em pH 3.5, obtida de eletroforese (pH 6.5) do digesto peptídico da proteína JJ0 reduzida e alquilada. Foram indicados os resíduos que destacam a composição do peptídeo. Os picos de menor intensidade correspondem a resíduos detectados em nível de contaminação. Não - foi incluído o setor básico da análise de aminoácidos, uma vez que não foram detectados resíduos deste tipo.

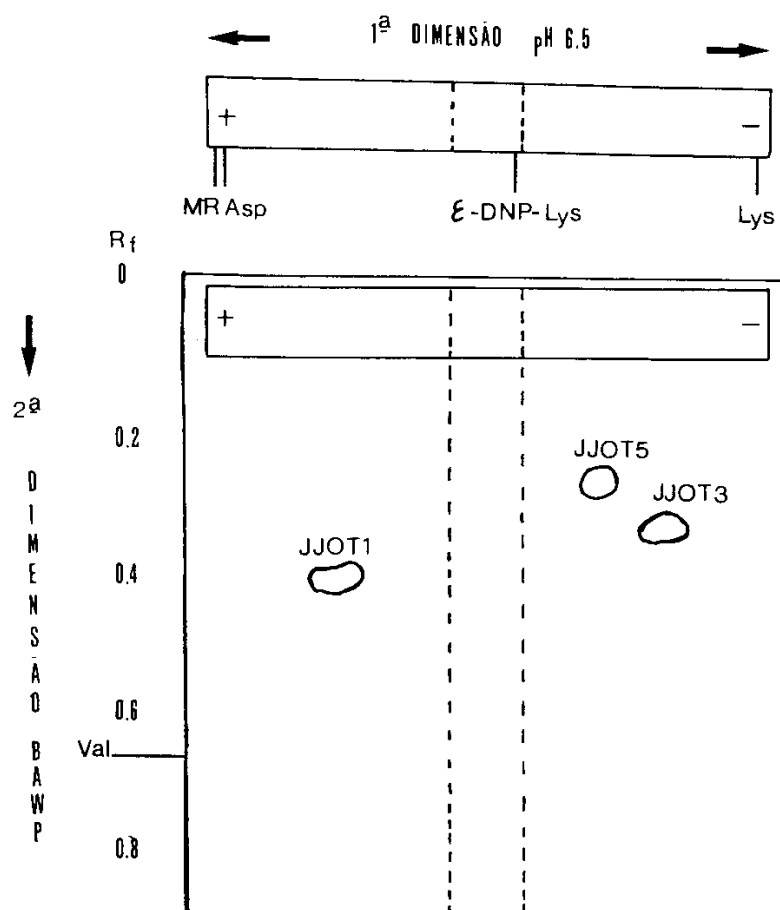


FIGURA 16 - Posição relativa dos peptídeos obtidos da proteína de Bence Jones JJO após oxidação, digestão trípica e mapeamento peptídico (eletroforese em pH 6.5 na primeira *dimensão* e posterior cromatografia em BAWP em direção perpendicular à primeira), revelados com ninhidrina. São indicados os valores de Rf e a posição dos marcadores eletroforéticos. A faixa central delimitada não foi revelada.

cha, após eluição e hidrólise ácida, é indicado na figura 17; os resultados desta análise estão apresentados na tabela III. Treonina e valina foram detectados como resíduos na posição N-terminal após análise do peptídeo pela técnica de Dansil-Edman.

3.6. Isolamento dos peptídeos básicos a partir de digesto triptico da proteína BJP (JJ0) oxidada

Do mapeamento triptico representado na figura 16 as manchas JJ0T3 e JJ0T5 após eluição, hidrólise ácida, e análise de aminoácidos produziram os registros gráficos apresentados nas figuras 18 e 19, respectivamente. Os valores deduzidos destes cromatogramas estão localizados na tabela III.

Utilizando-se a técnica de dansilação como descrito em metodologia (2.20.2.) foi determinado serina como resíduo N-terminal do peptídeo JJ0T3. A aplicação do método de OFFORD(1966) permitiu a determinação do estado de amidação de Glx e Asx presentes no peptídeo JJ0T5, a partir do valor de mobilidade a pH 6.5 e do peso molecular (calculado a partir da análise de aminoácidos).

3.7. Isolamento dos peptídeos neutros da proteína BJP (JJ0) após oxidação e digestão triptica

Após uma terceira dimensão representada por eletroforese de alta voltagem em pH 3.5 da banda dos neutros obtida como

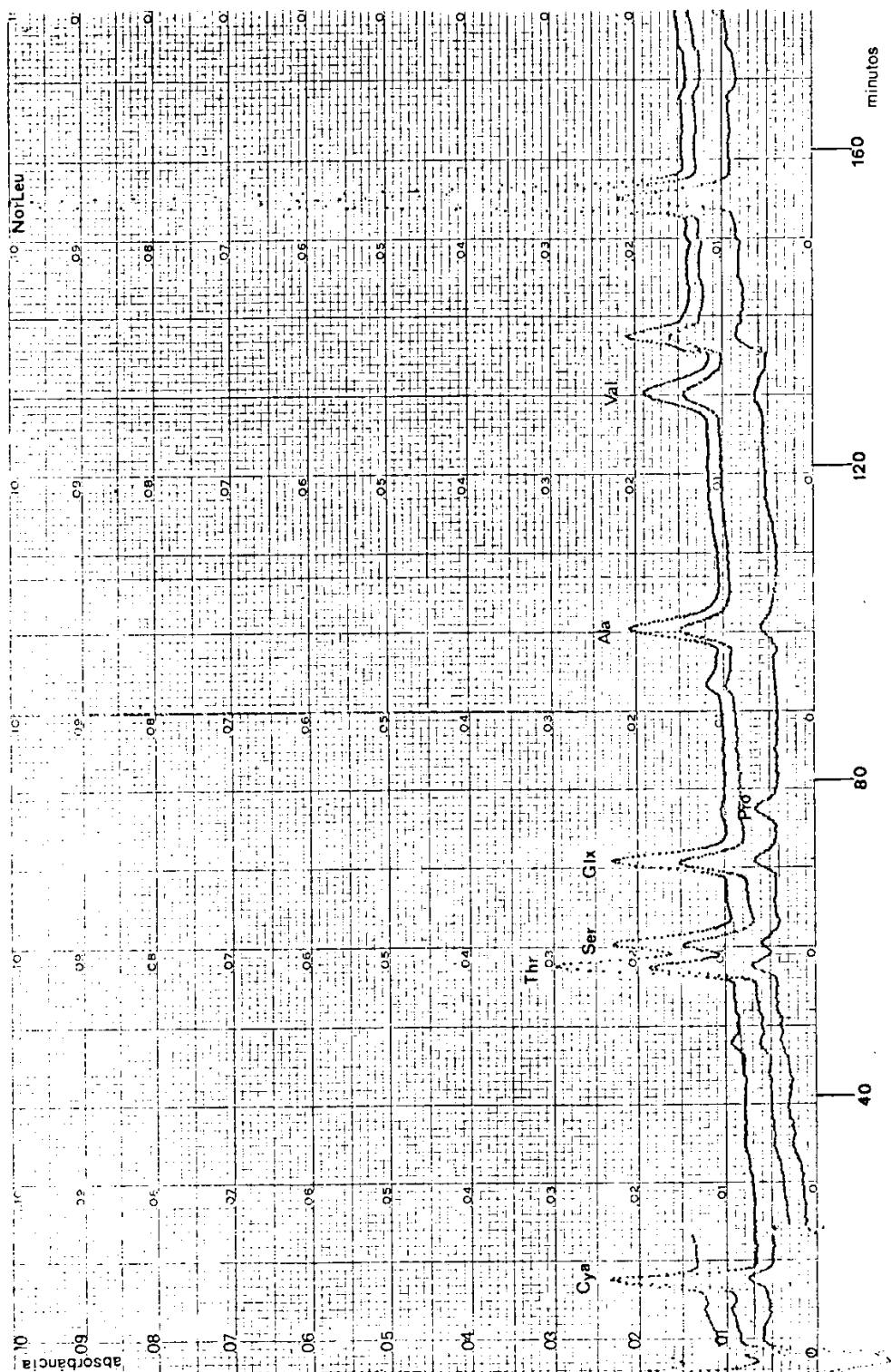


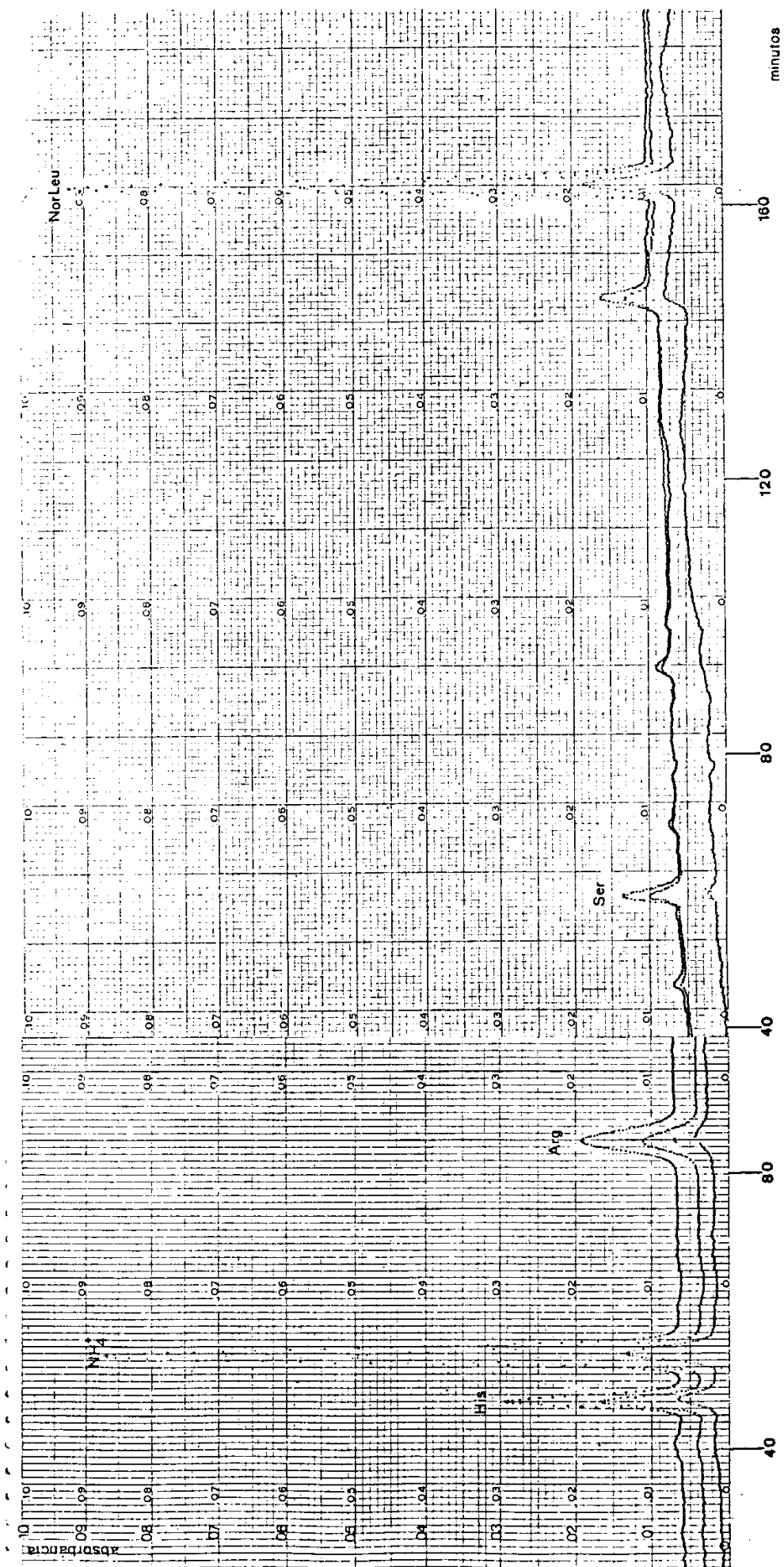
FIGURA 17 - Registro gráfico de análise de aminoácidos do material eluído da mancha ninhidrina positiva JJ0T1, obtida de mapeamento peptídico do digesto triptico da proteína BJP (JJ0) oxidada.

TABELA III - COMPOSIÇÃO DE AMINOÁCIDOS, MOBILIDADE ELETROFORÉTICA, VALOR DE R_f E RESÍDUO N-TERMINAL DOS PEPTÍDEOS JJOT1, JJOT3 e JJOT5.

Resíduo	JJOT1 moles de resíduo/mol de peptídeo	JJOT3	JJOT5
Lys			1.40 (1)
His		0.90 (1)	
Arg		1.0	
Cya	0.86 (1)		
Asx			1.80 (2)
Thr ^a	1.68 (2) ^c		
Ser ^a	1.15 (1)	0.56 (1) ^c	0.90 (1)
Glx	1.14 (1)		0.80 (1) ^c
Pro	1.06 (1)		
Ala	0.99 (1)		
Val ^b	0.96 (1)		
Mobilidade (m) pH 6.5	0.63	-0.54	-0.33
Valor de R _f	0.42	0.35	0.26
Resíduo N-terminal	Thr	Ser	-

Resultados obtidos das análises de aminoácidos dos peptídeos - JJOT1, JJOT3 e JJOT5, obtidos após mapeamento peptídico do digesto triptico da proteína BJP (JJ0) oxidada: (a) valores não corrigidos para tempo zero de hidrólise; (b) valores não corrigidos para tempo de 72 horas de hidrólise; (c) na posição N-terminal, o resíduo tem seu valor diminuído devido a reação parcial com o revelador diluído, utilizado na detecção dos peptídeos.

Entre parênteses, o valor integral mais próximo.



RECORDED BY CHAUSSON OPTIC CONTROL CORPORATION BUFFALO, NEW YORK

FIGURA 18 - Registro gráfico da análise de aminoácidos do material eluído da mancha ninhidrina positiva JJOT3, obtida de mapeamento do digesto trípico da proteína BJP (JJ0) oxidada.

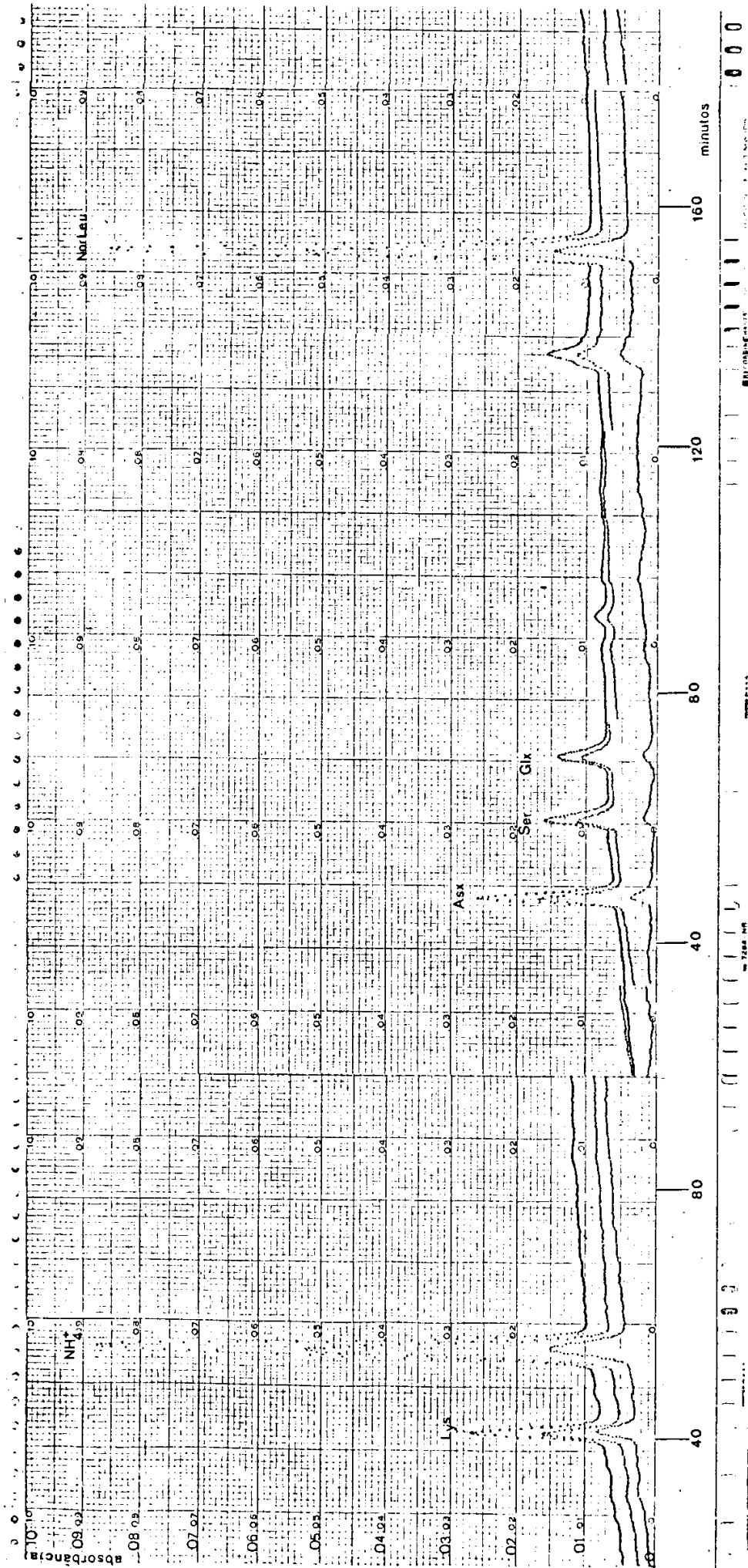


FIGURA 19 - Registro gráfico da análise de aminoácidos do material eluído da mancha ninhidrina positiva JJOT5, obtida de mapeamento peptídico do digesto trípico da proteína BJP (JJ0) oxidada.

descrito anteriormente, foram detectadas duas manchas ninhidrina positivas que se convencionou denominar JJOT9 e JJOTv1, como esquematizado na figura 20. Os registros gráficos das análises de aminoácidos do material contido nessas bandas estão indicados nas figuras 21 e 22, respectivamente. Alanina foi detectado como o resíduo N-terminal do peptídeo JJOT9 por dansilação. A composição de aminoácidos, mobilidade eletroforética e valor de R_f dos peptídeos JJOT9 e JJOTv1 são apresentados na tabela IV.

3.8. Peptídeos obtidos de mapa diagonal do digesto triptico da proteína BJP (JJ0) reduzida e alquilada

Após padronização dos parâmetros experimentais foi obtido o "*pattern*" característico representado na figura 23. Quatro peptídeos se destacam: JJOT1, JJOT2, JJOT3 e JJOT5. As manchas JJOT1 e JJOT2 mostraram intensa radioatividade e as demais foram reveladas com ninhidrina-cádmio.

JJOT1 é um peptídeo anódico que migra em pH 6.5 com mobilidade de 0.71 em relação a ácido aspártico; JJOT3 e JJOT5 são peptídeos catódicos com mobilidade de -0,56 e -0,31 respectivamente, em relação ao mesmo marcador. Os peptídeos T1 e T3 apresentaram os seguintes resíduos na posição N-terminal: treonina e serina, respectivamente.

JJOT2 se comporta como um peptídeo anódico, com mobilidade 0.27 em relação a ácido aspártico e é radioativo. Este

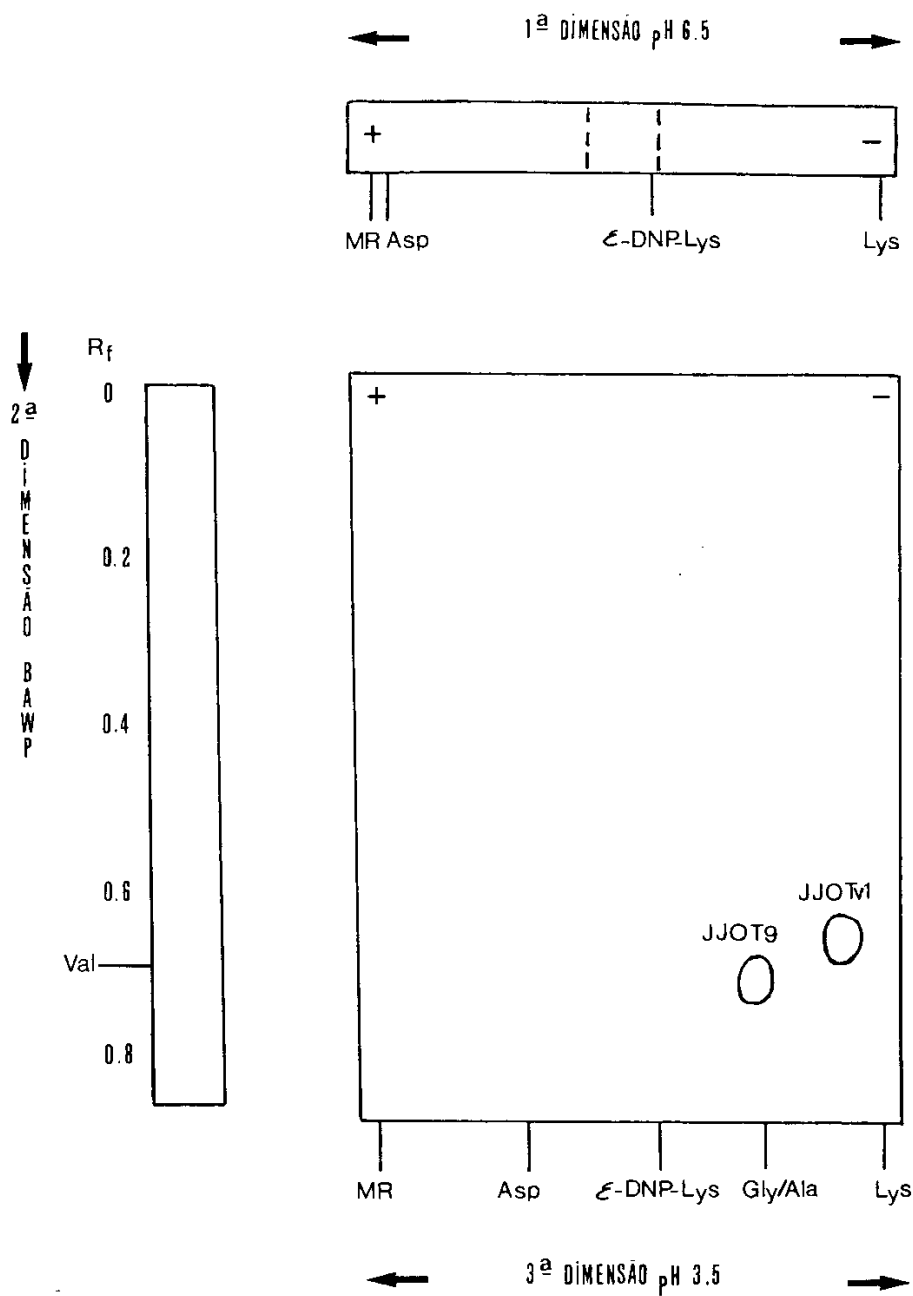


FIGURA 20 - Peptídeos obtidos a partir da região de peptídeos neutros de mapeamento peptídico (eletroforese de alta voltagem em pH 6.5 e cromatografia descendente em BAWP), submetida à eletroforese de alta voltagem em pH 3.5 (3a. dimensão) como indicado. Os peptídeos assinalados foram observados após embebição do mapa com ninhidrina 0.02% em acetona 1%.

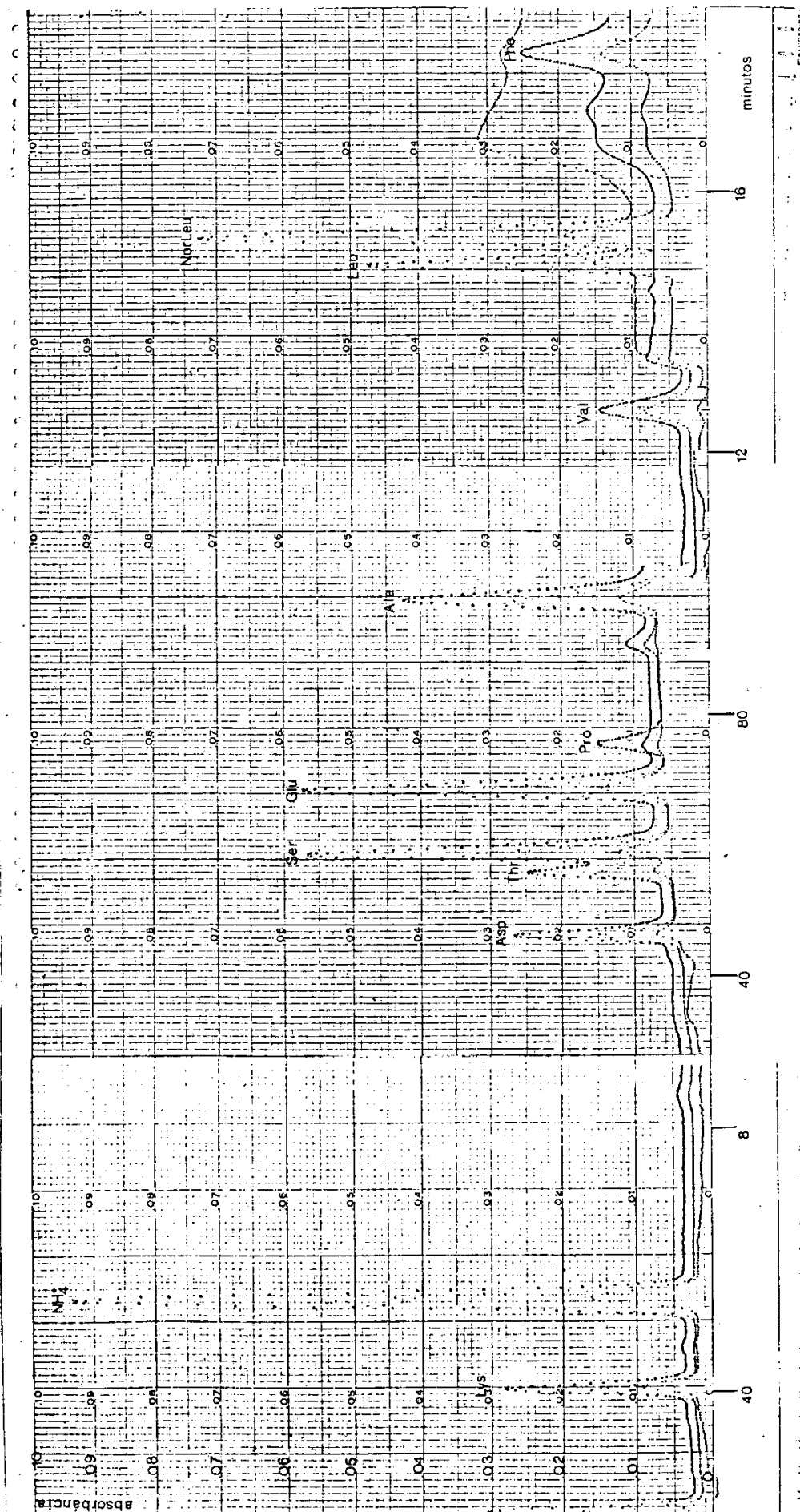


FIGURA 21 - Registro gráfico da análise de aminoácidos do material eluído de JJOT9, obtido após terceira di-
 mensão (eletroforese em pH 3.5) da banda dos neutros originada de mapeamento peptídico da proteína BJP (JJ0)
 oxidada e digerida com tripsina.

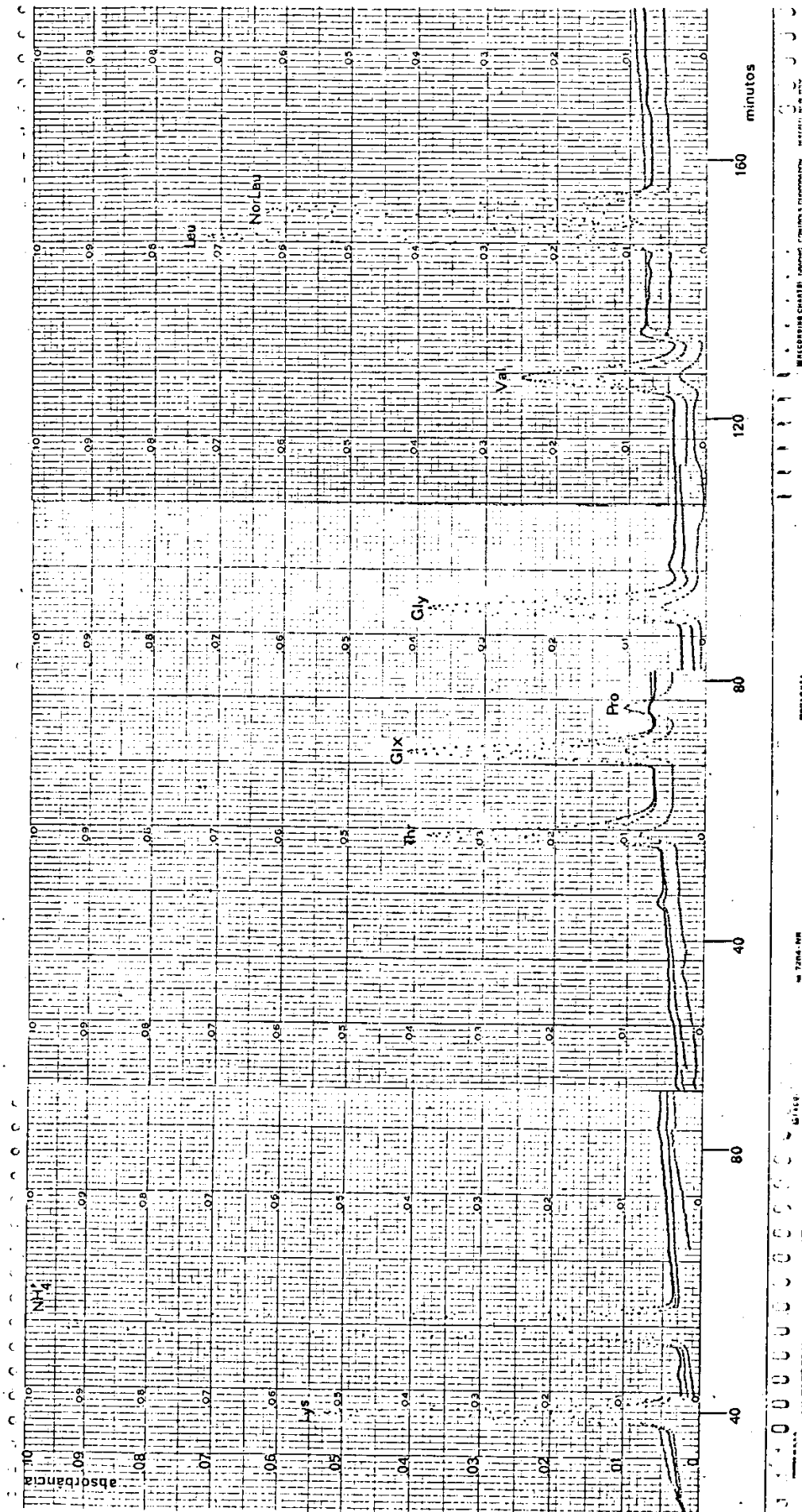


FIGURA 22 - Registro gráfico da análise de aminoácidos do material eluído de JJOTv1, obtido após terceira dimensão (eletroforese em pH 3.5) da banda dos neutros originada de mapeamento peptídico da proteína BJP (JJ0) oxidada e digerida com tripsina.

TABELA IV - COMPOSIÇÃO DE AMINOÁCIDOS, MOBILIDADE ELETROFORÉTICA, VALOR DE R_f E RESÍDUO N-TERMINAL DOS PEPTÍDEOS JJOT9 e JJOTv1.

Resíduo	JJOT9 moles de resíduo/mol de peptídeo	JJOTv1 moles de resíduo/mol de peptídeo
Lys	0.96 (1)	0.85 (1)
Asx	1.09 (1)	
Thr ^a	1.08 (1)	0.91 (1)
Ser ^a	2.71 (3)	
Glx	3.08 (3)	1.02 (1)
Pro	3.07 (3)	0.97 (1)
Gly		1.0
Ala	2.60 (3) ^c	
Leu	2.19 (2)	1.63 (2)
Val ^b	1.07 (1)	0.96 (1)
Phe	1.18 (1)	
Mobilidade (m) pH 3.5	-1.07	-1.78
Valor de R _f	0.74	0.71
Resíduo N-terminal	Ala	-

Resultados das análises de aminoácidos dos peptídeos JJOT9 e JJOTv1 após terceira dimensão (eletroforese de alta voltagem em pH 3.5) da banda dos peptídeos neutros obtida de mapeamento peptídico da proteína BJP (JJ0) oxidada e digerida com tripsina: (a) valores não corrigidos para tempo zero de hidrólise; (b) valores não corrigidos para tempo de 72 horas de hidrólise; (c) na posição N-terminal, o resíduo tem seu valor diminuído devido a reação parcial com revelador diluído, utilizado na detecção dos peptídeos.

Entre parênteses, o valor integral mais próximo.

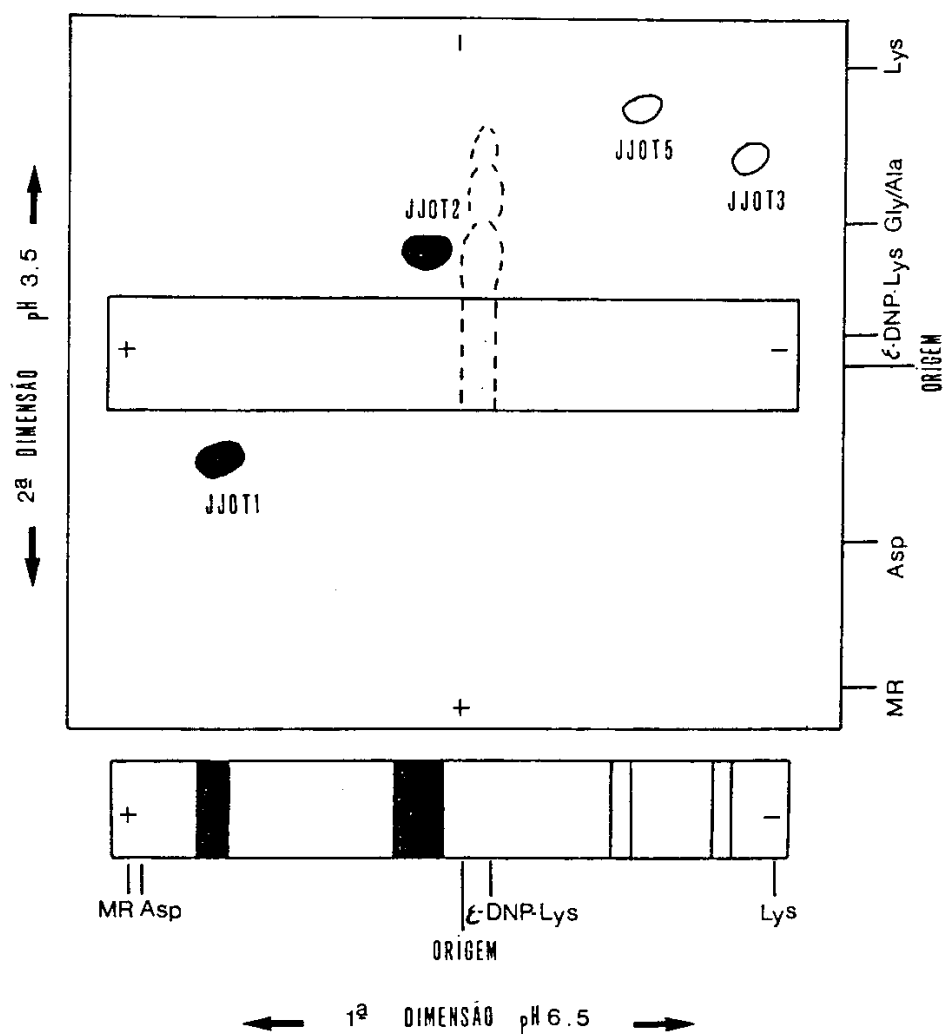


FIGURA 23 - Mapa diagonal do digesto trípico da proteína BJP (JJO) reduzida e alquilada, obtido após eletroforese em pH 6.5 (1a. dimensão), seguida de oxidação e eletroforese em pH 3.5 (2a. dimensão). Os peptídeos que mostraram radioatividade mais intensa (■) e aqueles ninhidrina positivos (□) estão indicados. Os marcadores eletroforéticos estão assinalados através de setas.

peptídeo foi purificado através de nova corrida eletroforética em pH 2.1 e submetido a análise de aminoácidos (fig. 24); sua composição em aminoácidos é apresentada na tabela V. Serina e tirosina foram detectados como resíduos na posição N-terminal após análise do peptídeo JJOT₂ pela técnica de Dansil-Edman.

De cromatografia da região dos peptídeos neutros deste mapa diagonal foram obtidos os peptídeos JJOT6 e JJOTv2. Os registros gráficos das análises de aminoácidos do material contido nas manchas ninhidrina positivas JJOT6 e JJOTv2 estão mostradas nas figuras 25 e 26, respectivamente. Os resultados da composição de aminoácidos e valores de R_f correspondentes a estes peptídeos estão contidos na tabela VI. JJOT6 apresentou alanina como resíduo N-terminal, detectado pela técnica de dansilação. Leucina foi detectada na posição N-terminal no peptídeo JJOTv2.

3.9. Análise N-terminal da proteína BJP (JJ0)

No esquema correspondente à cromatografia bidimensional da fase de éter, obtida da dinitrofenilação da proteína JJ0 submetida inicialmente à metanólise (Figura 27), as diversas manchas detectadas estão assinaladas. Foram identificados os seguintes resíduos dinitrofenilados: Di-DNP-tirosina (ou Di-DNP-lisina que migra em posição muito próxima), DNP-glicina, DNP-alanina, DNP-serina, DNP-treonina, DNP-glutâmico, DNP aspártico, e os dois produtos secundários da reação de dinitrofenilação: dinitrofenol (DNP-OH) e dinitroanilina (DNP-NH₂).

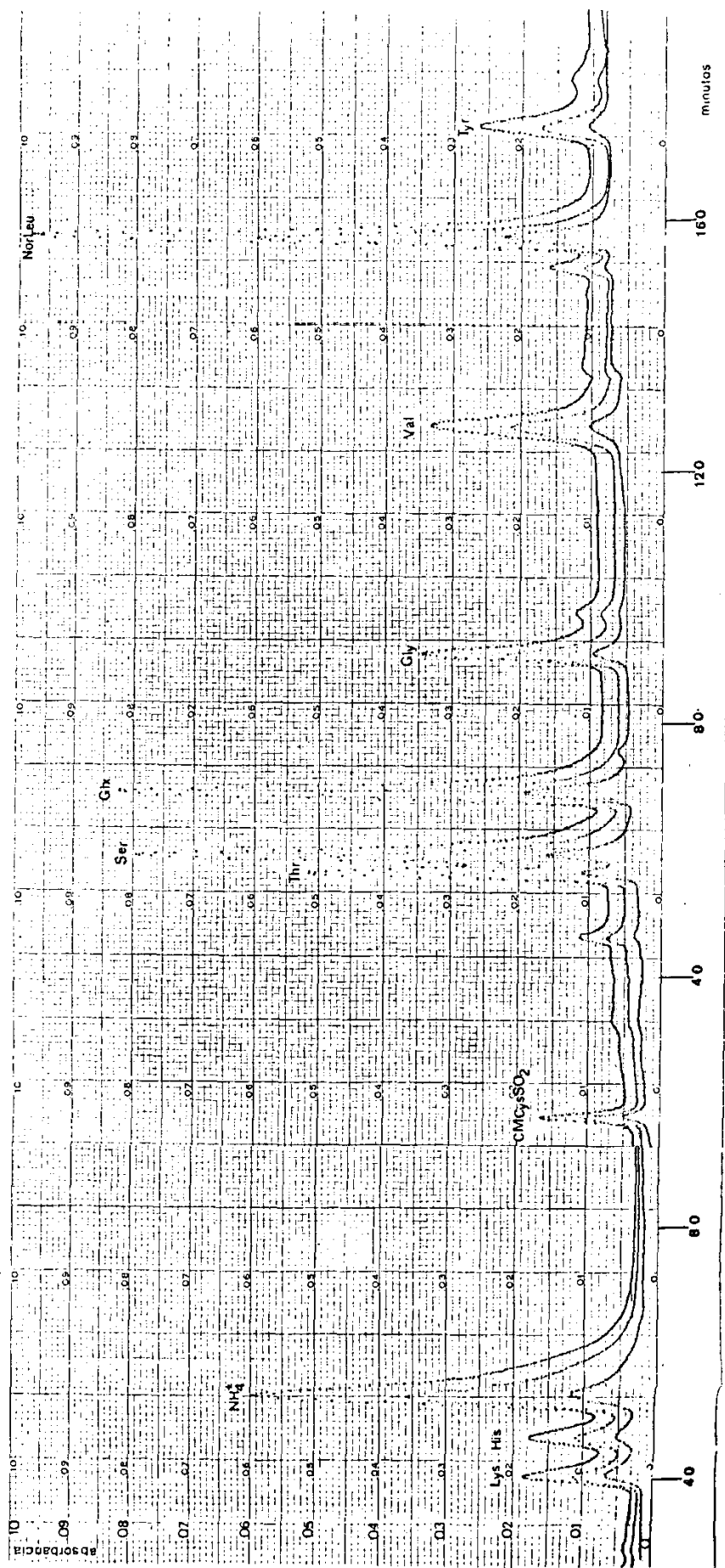


FIGURA 24 - Registro gráfico da análise de aminoácidos da banda radioativa JJO T2, obtida de mapeamento diagonal como descrito (2.13).

TABELA V - COMPOSIÇÃO DE AMINOÁCIDOS, MOBILIDADE ELETROFORÉTICA E RESÍDUO N-TERMINAL DOS PEPTÍDEOS JJOT2, JJOT1, JJOT3 e JJOT5.

Resíduo	JJOT2	JJOT1	JJOT3	JJOT5
	moles de resíduo/mol de peptídeo			
Lys	1.06 (1)			1.15 (1)
Hys	0.89 (1)		0.87 (1)	
Arg			0.90	
CMCysSO ₂	+	+		
Asx		1.54		1.81 (2)
Thr ^a	1.99 (2)	1.54 (2)		
Ser ^a	2.75 (3)	1.07 (1)	0.60 (1)	0.90 (1)
Glx	3.60 (3)	1.02 (1)		0.76 (1)
Pro		1.16 (1)		
Gly	1.20 (1)			
Ala		0.98 (1)		
Val ^b	1.83 (2)	0.81 (1)		
Tyr	0.94 (1)			
Mobilidade pH 6.5	0.27	0.71	-0.56	-0.31
Mobilidade pH 3.5	0.65	0.68	-1.62	-1.06
Resíduo N-terminal	Ser	Thr	Ser	

Resultados das análises de aminoácidos dos peptídeos radioativos JJOT2 e JJOT1 e ninhidrina positivos JJOT3 e JJOT5, obtidos de mapeamento diagonal da proteína JJO reduzida e alquilada: (a) valores não corrigidos para tempo zero de hidrólise; (b) valores não corrigidos para tempo de 72 horas de hidrólise; (c) na posição N-terminal, o resíduo tem seu valor diminuído devido a reação parcial com o revelador diluído, utilizado na detecção dos peptídeos. CMCysSO₂ detectada qualitativamente (+). Entre parênteses, o valor integral mais próximo.

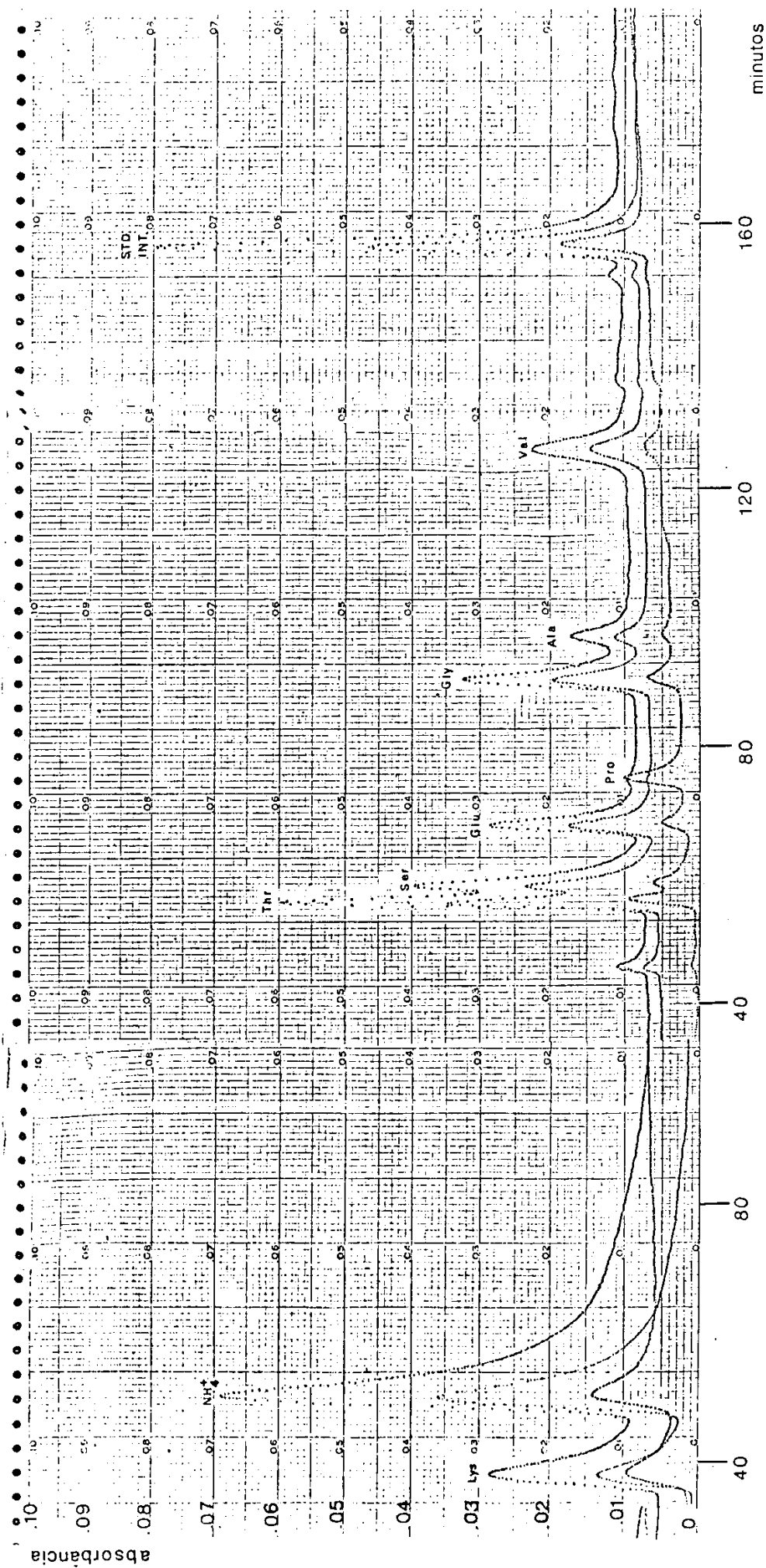


FIGURA 25 - Registro gráfico da análise de aminoácidos do material eluído de JJO T6, obtido após cromatografia em BAWP da região dos peptídeos neutros de mapa diagonal.

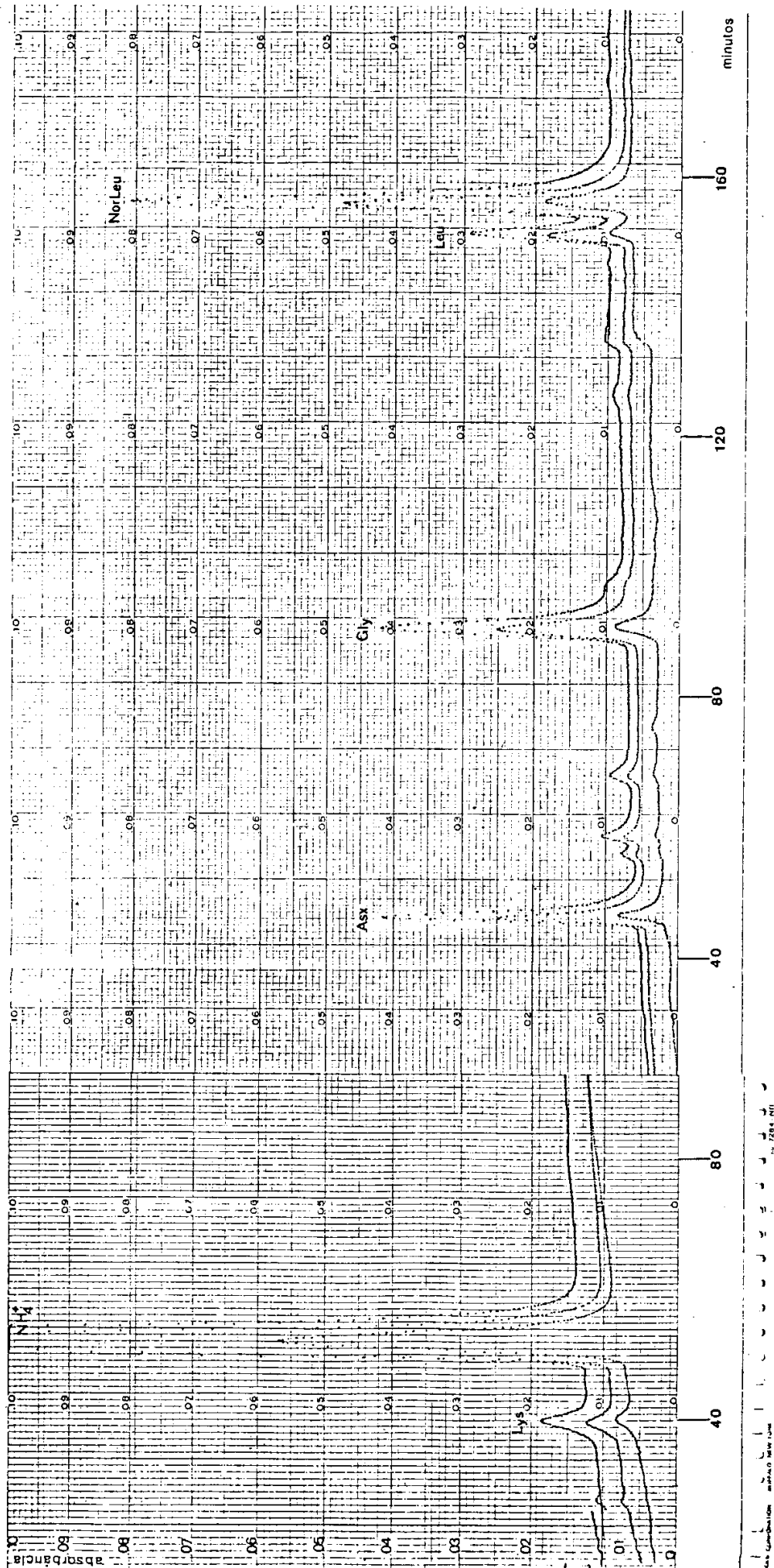


FIGURA 26 - Registro gráfico da análise de aminoácidos do material eluído de JJO Tv2, obtido após cromatografia em BAWP da região dos peptídeos neutros de mapa diagonal.

TABELA VI - COMPOSIÇÃO DE AMINOÁCIDOS, VALOR DE R_f E RESÍDUO N-TERMINAL DOS PEPTÍDEOS JJOT6 E JJOTv2.

Resíduo	JJOT6 moles de resíduo/mol peptídeo	JJOTv2
Lys	1.2 (1)	0.85
Asp		1.0
Thr ^a	2.5 (3)	
Ser ^a	1.4 (1)	
Glu	0.77 (1)	
Pro	1.14 (1)	
Gly	0.95 (1)	1.0
Ala	0.65 (1) ^c	
Val ^b	0.92 (1)	
Leu ^b		0.64 (1) ^c
Valor de R _f	0.40	0.54
Resíduo N-terminal	Ala	Leu

Resultados da análise de aminoácidos dos peptídeos JJOT6 e JJOTv2 obtidos após terceira dimensão (cromatografia em BAWP) da faixa dos peptídeos neutros obtida de mapeamento diagonal da proteína BJP JJO reduzida e alquilada: (a) valores não corrigidos para tempo zero de hidrólise; (b) valores não corrigidos para tempo de 72 horas de hidrólise; (c) na posição N-terminal, o resíduo tem seu valor diminuído devido a reação parcial com o revelador diluído, empregado para a detecção dos peptídeos. Em parênteses, o valor integral mais próximo.

A figura 28 apresenta as manchas detectadas após cromatografia bidimensional da fase de éter, obtida a partir da dinitrofenilação da proteína BJP (JJ0) nativa (não submetida à metanólise). Uma única mancha, cuja posição é compatível com Di-DNP-tirosina, está presente. Em posições características do solvente utilizado, aparecem os dois produtos secundários típicos da reação: DNP-OH e DNP-NH₂; o primeiro teve sua caracterização confirmada pelo seu desaparecimento quando em presença de vapores de ácido fórmico.

A figura 29 mostra o espectro de absorção do eluato da mancha suspeita (obtida de cromatografia bidimensional da proteína JJ0 nativa dinitrofenilada), comparado àqueles dos DNP-derivados padrão: Di-DNP-Tyr e DI-DNP-Lys.

O resultado obtido de eletroforese de alta voltagem em pH 3.5 das fases aquosas correspondentes às diferentes extrações com éter do material dinitrofenilado, previamente submetido ou não submetido à metanólise (denominadas A₁ e A₂), está esquematizado na figura 30.

3.10. Controle do soro de coelho anti-cadeia leve humana do isotipo λ , obtido a partir da proteína BJP (JJ0)

A imunodifusão dupla em duas dimensões (figura 31) utilizando como revelador o anti-soro obtido a partir da imunização de coelhos com a proteína de Bence Jones JJ0, mostra além do arco de precipitação com a proteína BJP (JJ0), um arco de

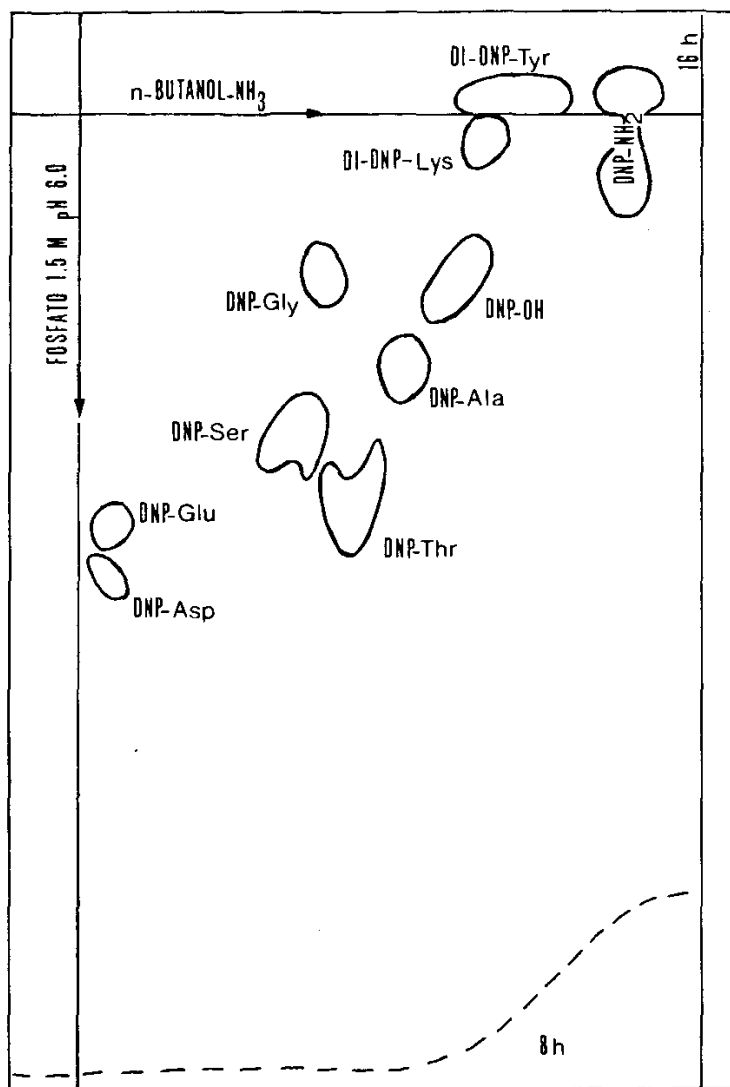


FIGURA 27 - Desenho esquemático de cromatograma bidimensional da proteína de Bence Jones JJO (10 mg), submetida à metanólise durante 18 horas e posteriormente dinitrofenilada. Estão indicadas as duas dimensões de cromatografia nos solventes empregados: $n\text{-butanol-NH}_3$ (1a. dimensão) e tampão fosfato 1.5M pH6.0 (2a. dimensão), bem como as manchas correspondentes aos aminoácidos dinitrofenilados e os produtos secundários da reação (DNP-OH e DNP-NH_2).

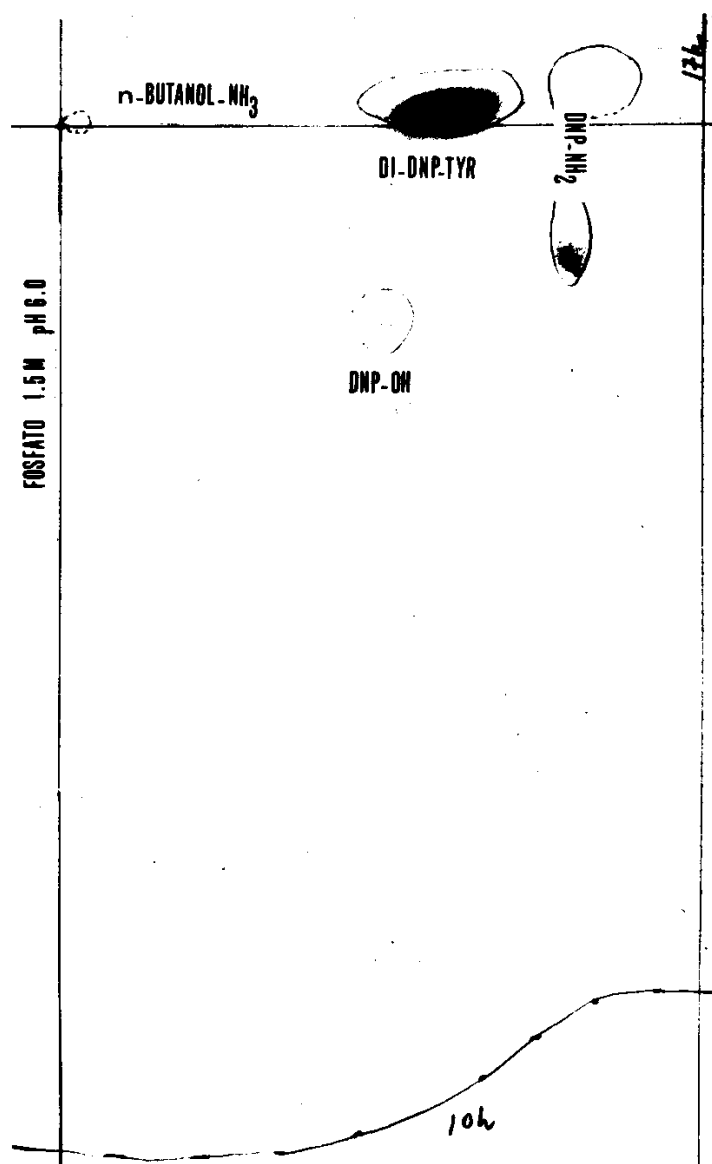


FIGURA 28 - Cromatograma bidimensional da fase de éter, obtido a partir de 10 mg de proteína BJP (JJ0) dinitrofenilada. Nas margens estão indicados os solventes utilizados em cada dimensão, bem como a frente e o tempo de cromatografia. Pode ver-se a mancha característica de di-DNP-Tyr bastante intensa. Os produtos secundários da reação, 2,4-dinitrofenol (DNP-OH) e 2,4-dinitroanilina (DNP-NH₂), estão assinalados.

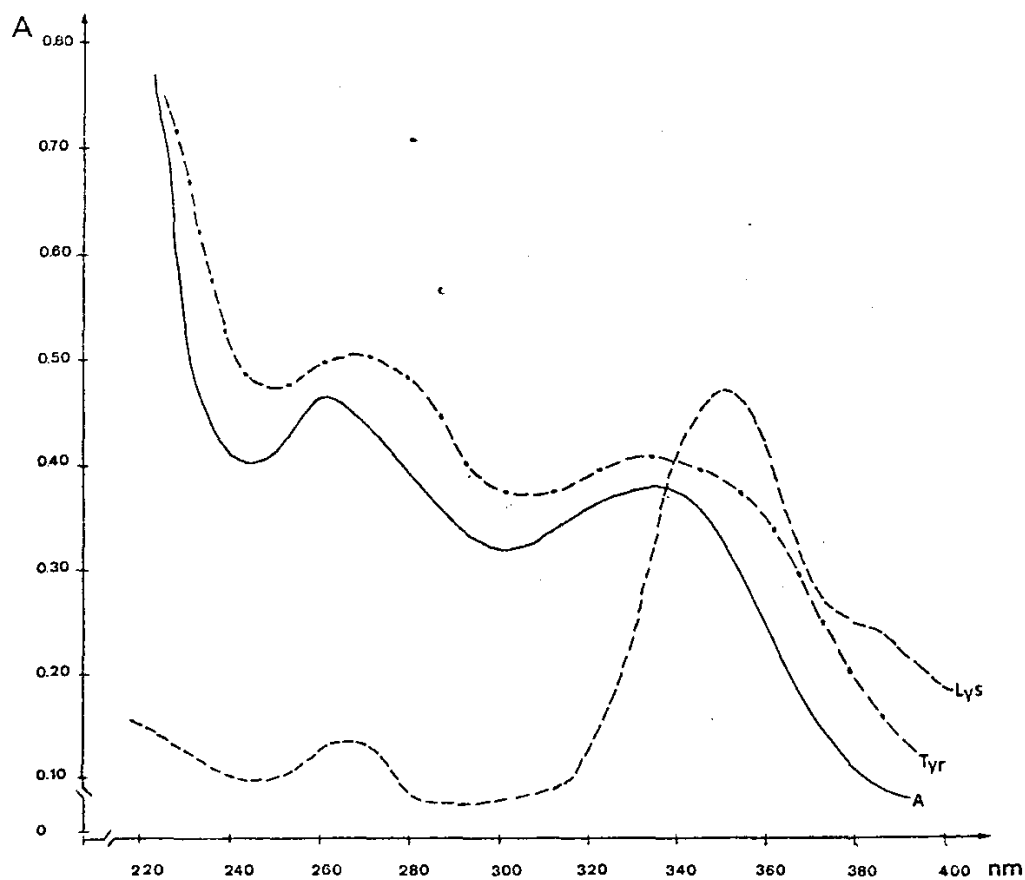


FIGURA 29 - Espectro de absorção obtido a partir da eluição da mancha de di-DNP-Tyr (figura 28) com bicarbonato de sódio 1% pH 8.0 a 55°C (A) (—), comparado ao espectro de di-DNP-Tyr (Tyr) (•-•-•) padrão e de di-DNP-Lys(Lys)(- - -) padrão. Os brancos utilizados nas leituras foram obtidos da eluição de áreas vizinhas iguais às de cada mancha, respectivamente.

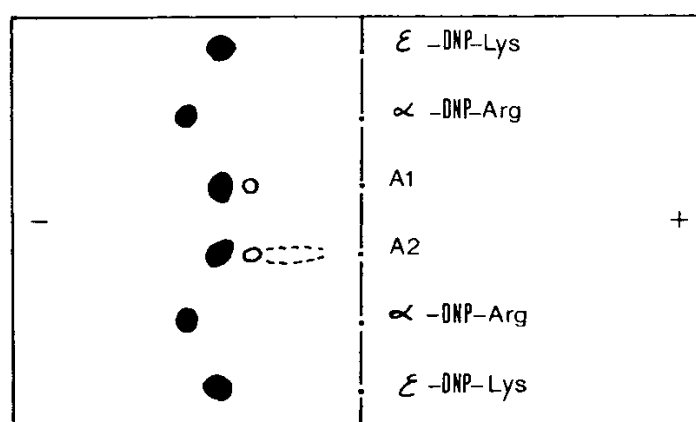


FIGURA 30 - Eletroforese de alta voltagem das amostras A_1 e A_2 dinitrofeniladas que correspondem respectivamente à fase aquosa da proteína JJO nativa e à fase aquosa da proteína JJO submetida a metanólise. Como marcadores foram utilizados ϵ -DNP-Lys e α -DNP-Arg. A mancha mais clara observada nas amostras corresponde provavelmente a DNP-Im-His.

precipitação com a proteína de Bence Jones Mau de mesmo tipo antigênico. Foi detectado um "*esporão*" entre as duas proteínas. Não foi observada reação deste anti-soro com a proteína BJP (GOB) do isotipo kappa.

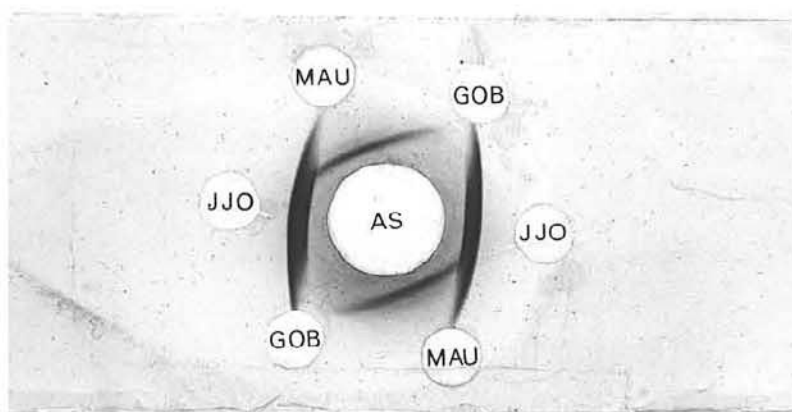


FIGURA 31 - Imunodifusão dupla das proteínas BJP λ (JJO), BJP K (GOB), BJP λ (Mau) reveladas por soro de coelho imunizado com proteína BJP λ (JJO) (Ra-a-BJP λ (JJO)). A proteína de isotipo K não é revelada pelo anti-soro anti-cadeia leve do tipo antigênico λ .

4. DISCUSSÃO

Os resultados obtidos pela técnica de eletroforese em camada delgada de agarose (Fig. 8) identificam no plasma mielo_{matoso} JJ0 a presença do componente M característico de patolo_{gias} moleculares linfoproliferativas tipo mieloma múltiplo (KYLE et al., 1970); e, na urina, a proteína de Bence Jones cor_{respondente}. Nem sempre a presença de paraproteína M e proteí_{na} de Bence Jones são concomitantes (PUTNAM, 1962) (KUNKEL, 1968). A presença de banda monoclonal no plasma JJ0 (que apre_{senta} mobilidade eletroforética idêntica àquela de proteína de Bence Jones na urina) poderia levar à especulação de que ca_{deias} leves do componente M (JJ0) estariam circulando no plas_{ma} sob a forma de proteína de Bence Jones. Esta especulação se justifica pelo fato de terem sido descritas proteínas de Bence Jones séricas (WILLIAMS, et al., 1966) (SOLOMON & Mc LAUGHLIN, 1969) (CAGGIANO et al., 1969).

As diferentes mobilidades eletroforéticas das proteí_{nas} BJP (JJ0) e BJP (Mau) indicam que este critério não distin_{gue} proteínas do mesmo isotipo.

Os resultados sorológicos obtidos pela técnica de Ouchterlony (Fig. 6) tipificam a proteína JJ0 como pertencente ao tipo sorológico λ , o que é demonstrado pelo arco de pre_{cipitação} característico revelado pelo anti-soro específico

(Ra-a-Mau), além de reação de identidade com a proteína BJP (Mau) do mesmo isotipo. O esporão observado entre a proteína Mau e JJ0 (analisadas pelo soro de coelho anti-BJP Mau) poderia indicar que a proteína JJ0 é deficiente, em termos de determinantes antigênicos, em relação à proteína Mau; se estes determinantes estão localizados na região VL ou CL desta proteína, os dados disponíveis não nos permitem uma interpretação satisfatória.

A fração cromatográfica BJ1, obtida de fracionamento em DEAE-celulose da urina JJ0 (Fig. 7), posteriormente reciclada em idênticas condições experimentais e, submetida ao controle imunoeletrorético em gel de agarose (Fig. 9) mostrou ausência dos contaminantes presentes na amostra recebida (vide Figura 5) e indica grau de pureza.

A obtenção de uma única banda pela técnica de PAGE/SDS (Fig. 10) serviu como critério para justificar a determinação da composição global de aminoácidos da proteína BJP (JJ0). Este critério é largamente utilizado como indicativo de grau de pureza compatível com estudos de determinação de estrutura primária de proteínas homogêneas monoclonais e/ou seus fragmentos (GARCIA-PARDO et al., 1981).

A composição global de aminoácidos determinada para a proteína JJ0 foi similar à de outras proteínas deste tipo. Os resultados obtidos para a proteína JJ0, bem como para qualquer cadeia polipeptídica L de gamaglobulina, não devem ser tomados como típicos, uma vez que somente 50% da cadeia homóloga (CL) contribui para dados semelhantes. Os 50% restantes (VL) podem produzir uma dispersão dos resultados, já que nesta região molecular é observada variabilidade na composição e se-

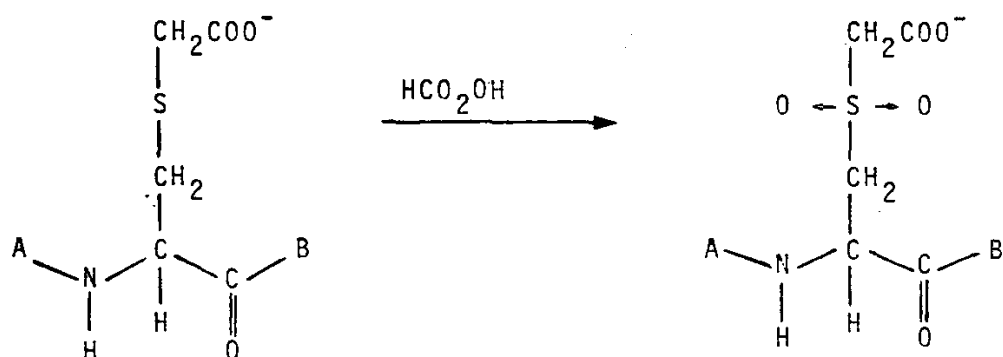
quência de aminoácidos, provavelmente devida ao intrincado papel biológico de reconhecimento antigênico efetuado por essa região, juntamente com a região VH de cadeia pesada (KABAT et al., 1977).

A metodologia utilizada não permitiu a determinação de triptofano devido sua destruição durante a hidrólise ácida (BAILEY, 1962).

O conteúdo observado para meia cistina (5 moles de resíduo/mole de proteína tomada como 22600) sugere que a proteína JJ0 está arranjada como dímero. Esta observação corrobora os resultados obtidos em eletroforese em gel de poliacrilamida (Fig. 10), uma vez que a mobilidade eletroforética da proteína JJ0 sofreu alteração após redução com DTT, mostrando mobilidade eletroforética idêntica àquela da banda que corresponde à cadeia leve da paraproteína M JJ0 reduzida. Este arranjo é compatível com uma ponte dissulfeto intercadeia, através dos resíduos de cisteína vizinhos à serina C-terminal característica de cadeia leve do isotipo lambda (MILSTEIN, 1967) (TITANI, et al., 1967).

As proteínas de Bence Jones podem ocorrer como monômeros (contendo uma cisteína extra ligada àquela situada na região C-terminal da cadeia L) (MILSTEIN, 1966), dímeros estabilizados por uma ponte dissulfeto intercadeia na região C-terminal da molécula (MILSTEIN, 1966), tetrâmeros (presentes no soro) (CAGGIANO et al., 1969) e mesmo como domínios independentes CL e VL presentes na urina ou no plasma (SOLOMON & Mc LAUGHLIN, 1969).

A metodologia empregada para a purificação de segmentos de cadeias polipeptídicas de proteínas que apresentam em sua estrutura pontes de dissulfeto (como é o caso de proteínas de Bence Jones) se baseia no princípio de que peptídeos contendo cisteína após carboximetilação são oxidados para a forma de sulfona segundo a reação:



que altera o valor de pK do grupo S-carboximetil (pK = 4.0) e que o aproxima do comportamento de um grupamento carboxila (pK = 2.0). Desta maneira ao se efetuar uma eletroforese em pH 3.5, este grupo ainda está ionizado e sobra uma fração de carga que altera a mobilidade eletroforética do peptídeo oxidado (BAILEY, 1962).

Os resultados obtidos do isolamento do pentapeptídeo peptico-tríptico C-terminal de cadeia leve Pro-Thr-Glu-Cys-Ser permitem caracterizar a proteína BJP (JJ0) como pertencente ao tipo químico que corresponde ao tipo antigênico lambda (FRANGIONE et al., 1969).

A análise de mapeamento peptídico e mapeamento diagonal da proteína BJP (JJ0) mostram a presença do peptídeo T1

(MILSTEIN et al., 1968) de sequência Thr-Val-Ala-Pro-Thr-Glu-Cys-Ser que corresponde ao octapeptídeo triptico C-terminal característico de cadeias leves do isotipo λ . Esses dados corroboram aqueles da tipificação química desta proteína.

Os dados de mapeamento peptídico e mapeamento diagonal caracterizam T3 como o tripeptídeo Ser-His-Arg (correspondente ao segmento 188-190 da região C λ), e levam à interpretação da proteína JJ0 como uma proteína de Bence Jones Oz (-) (EIN & FAHEY, 1967) (APPELA & EIN, 1967), devido à presença do resíduo arginina na posição 190.

O pentapeptídeo T5 obtido de mapeamento peptídico e mapeamento diagonal, cuja sequência é Gln-Ser-Asn-Asn-Lys (correspondente ao segmento 167-171 do domínio C λ), identifica a proteína JJ0 como Mz (-) (MILSTEIN, 1967) em relação à posição 171. Como este peptídeo é portador de um único resíduo de lisina e é oriundo de quebra triptica, isso nos permite inferir a presença de lisina na posição C-terminal.

A composição de aminoácidos (Ala₃, Pro₃, Ser₃, Val, Thr, Leu₂, Phe, Glu₂, Asn, Lys), determinada para o peptídeo T9 obtido de terceira dimensão a partir do mapeamento peptídico triptico da proteína BJP (JJ0) é compatível com o setor polipeptídico de região C λ compreendido entre a posição 111 e 129 e que está relacionado com a expressão da variante não alélica Mcg, no que se refere às posições 112 e 114. A presença de alanina na posição 112 e serina na posição 114 caracterizam JJ0 como uma proteína de Bence Jones Mcg (-) (FETT & DEUTSCH, 1974; 1975).

A composição de aminoácidos, mobilidade eletroforética e estudos de homologia permitem caracterizar o peptídeo T2 obtido de mapa diagonal da proteína BJP (JJ0) reduzida e alquilada, como o peptídeo de região C λ que compreende os resíduos 191 a 200. Este peptídeo, em cuja composição foi detectado um resíduo de meia cistina, pôde, através de estudos de homologia, ser identificado como o resíduo Cys 134 que está envolvido na ponte dissulfeto intracadeia que estabiliza a região C λ . A obtenção de serina como único resíduo dansilado após cromatografia em placa de poliamida corrobora o grau de pureza do peptídeo obtido.

Os resultados obtidos da análise do peptídeo T6 oriundo de mapeamento diagonal da proteína de Bence Jones JJ0 reduzida e alquilada, de sequência Ala-Gly-Val-Glu-Thr-Thr-Thr-Pro-Ser-Lys permitem sua interpretação como o segmento 157-166 do domínio constante de cadeia leve lambda. Esta região engloba a variante Way (FETT & DEUTSCH, 1976) e uma das posições comprometidas com a expressão da variante Mcg (FETT & DEUTSCH, 1974; 1975). A presença de alanina na posição 157 (posição N-terminal do peptídeo) permite a caracterização de JJ0 como uma proteína de Bence Jones Way (-) e, treonina na posição 163 confirma a identificação desta proteína como uma proteína (Mcg(-)).

As informações conseguidas através da identificação das variantes não alélicas de região C λ da proteína JJ0 poderiam sugerir que esta proteína pudesse pertencer ao arranjo Oz(-) Kern(-) Mcg(-) Weir(-) Ev(-) Way(-) Mz(-) ou ao arranjo Oz(-) Kern(+) Mcg(-) Weir(-) Ev(-) Way(-) Mz(-), dentre os oito ti

pos descritos (FETT & DEUTSCH, 1976). A identificação indireta, através de sequência de aminoácidos dos peptídeos de região C λ da proteína JJ0, de um dos seis a nove gens que codificam a região C λ (HIETER et al., 1981) (TAUB et al., 1983) fica consequentemente em pendência.

A detecção de variantes não alélicas de região C λ não deve ser colocada como uma questão hermética, pois é de se esperar a descrição de novas substituições, como aquela descrita mais recentemente para a proteína H11 no que se refere à substituição de valina por isoleucina na posição 155 (LOPEZ DE CASTRO et al., 1978).

Seria de se prever ácido pirrolidona-carboxílico (PCA) como resíduo N-terminal da proteína BJP (JJ0) λ , uma vez que de sessenta proteínas λ investigadas somente vinte e cinco não exibem o resíduo piroglutâmico N-terminal (KABAT et al., 1979). Dentre as proteínas deste isotipo, aquelas pertencentes aos subgrupos de região variável V λ III, V λ IV e V λ VI não apresentam PCA na posição N-terminal (KABAT et al., 1979).

O conhecimento destes dados nos conduziram a submeter a proteína JJ0 a um tratamento inicial com a mistura metanol/HCl que tem a propriedade de romper o anel pirrolidona do ácido piroglutâmico, permitindo assim a identificação do resíduo N-terminal nesta circunstância (KAWASAKI & ITANO, 1972).

Os resultados obtidos de metanólise, seguida de dinifrofenilação da proteína BJP (JJ0) mostram sete resíduos dinifrofenilados. A mancha mais intensa foi aquela correspondente à di-DNP-tirosina que se posiciona em local próximo àquele esperado para resíduos do tipo di-DNP-lisina. Este resultado poderia ser interpretado como uma indicação possível de que a pro

teína não tivesse resíduo N-terminal bloqueado e/ou o tempo de reação prolongado, com a conseqüente quebra de ligação peptídica pela mistura metanol/HCl. A presença de um derivado tipo di-DNP de coloração intensa em relação aos demais resíduos monosubstituídos detectados sugeriria a presença de tirosina ou lisina como resíduo N-terminal.

Paralelamente procedemos a uma dinitrofenilação direta da proteína JJO nativa, que apresenta peso molecular elevado (50.000 no estado dimérico), no sentido de tirar proveito da propriedade que esta metodologia oferece, ou seja, discriminar resíduos dinitrofenilados em função de sua solubilidade nas fases aquosa e de éter (BAILEY, 1962).

A dinitrofenilação da proteína nativa deixou evidente que o resíduo N-terminal poderia ser interpretado como tirosina.

Tirosina quando resíduo N-terminal é de difícil identificação, uma vez que sua presença sob a forma de di-DNP-derivado tem Rf próximo do de di-DNP-Lys nas condições de cromatografia descritas (2.20.1.) (KOCH & WEIDEL, 1956). A confirmação de sua identificação foi feita pela análise do espectro de absorção do eluato da mancha suspeita, obtido como descrito (2.20.1.), comparado ao espectro obtido a partir de di-DNP-tirosina e di-DNP-lisina padrão. A semelhança entre o espectro de absorção da amostra e do padrão di-DNP-tirosina λ (posição dos picos e relação entre eles) confirma a identificação sugerida pela cromatografia.

O controle, através de eletroforese da fase aquosa, corrobora os resultados obtidos.

Estes resultados caracterizam como $V\lambda III$ a região variável da proteína BJP (JJ0) (KABAT et al., 1979).

A inspeção do "*pattern*" obtido de mapeamento peptídico triptico da proteína de Bence Jones JJ0 oxidada mostrou a presença do peptídeo de composição (Thr, Gly, Pro, Gly, Lys, Leu₂, Val) denominado arbitrariamente Tv1. Por homologia não foi possível identificar Tv1 como peptídeo de região constante de cadeia λ ; os dados disponíveis não permitem identificá-lo como pertencente aos segmentos FR1, FR2, FR3 e FR4 que constituem o "*framework*" da região variável. É possível que este peptídeo possa ser parte constituinte das regiões CDR1, CDR2 ou CDR3 que determinam complementariedade em relação ao antígeno.

Estudos de homologia do peptídeo TV2 (Leu-Gly-Asp-Lys) proveniente de mapeamento diagonal da proteína JJ0 reduzida e alquilada indicam que se deve tratar de peptídeo oriundo de quebra triptica na região $V\lambda$. Os resultados não permitem localizar este peptídeo como pertencente às regiões envolvidas no "*framework*" da região $V\lambda$; entretanto a região $V\lambda III$ apresenta um segmento (compreendendo as posições 28—31) de mesma composição localizado na região CDR1. Considerando que a proteína BJP (JJ0) apresenta tirosina N-terminal, e portanto deve pertencer ao subgrupo de região variável $V\lambda III$, é tentador se especular que este peptídeo pudesse se tratar de peptídeo homólogo, com a ressalva da dificuldade de interpretação de possíveis relações de homologia em regiões de hipervariabilidade.

Na figura 32 estão representados esquematicamente detalhes estruturais relativos aos domínios $V\lambda$ e $C\lambda$, deriva-

dos dos resultados obtidos com a proteína BJP (JJ0). Na figura 33 estes resultados são comparados com aqueles da região V λ III da proteína H11 (LOPEZ DE CASTRO et al., 1978) e com aqueles provenientes de diferentes proteínas que indicam as posições características das variantes não alélicas da região C λ .

Os resultados do controle do soro de coelho anti-cadeia λ humana, obtido a partir da proteína de Bence Jones JJ0 (Figura 31) mostram relação antigênica de identidade parcial entre as proteínas BJP (JJ0) e BJP (Mau), revelada pelo "esporão" resultante da confluência dos arcos de precipitação correspondentes; este "esporão" (conforme observado anteriormente na figura 6, referente à tipificação sorológica da proteína BJP (JJ0) poderia indicar a presença de determinantes antigênicos peculiares à proteína JJ0, não compartilhados por proteína de mesmo isotipo BJP (Mau); provavelmente o soro de coelho anti-BJP (JJ0) estaria revelando determinantes antigênicos não alélicos do tipo St, VOR e III típicos da região variável de proteínas de Bence Jones do isotipo λ . No entanto, não dispondo de anti-soros capazes de discriminar os determinantes antigênicos específicos do domínio VL e CL, mais uma vez torna-se difícil a especulação a respeito de uma eventual possibilidade de reação de identidade parcial entre BJP (JJ0) e BJP (Mau) ou outras proteínas de mesmo isotipo.

Estes resultados, mais a evidência de que o soro de coelho anti- λ não reagiu com proteínas do isotipo Kappa, demonstram a especificidade do soro de coelho obtido e permitem sua utilização na tipificação sorológica de outras proteínas de Bence Jones e/ou cadeias leves de imunoglobulinas.

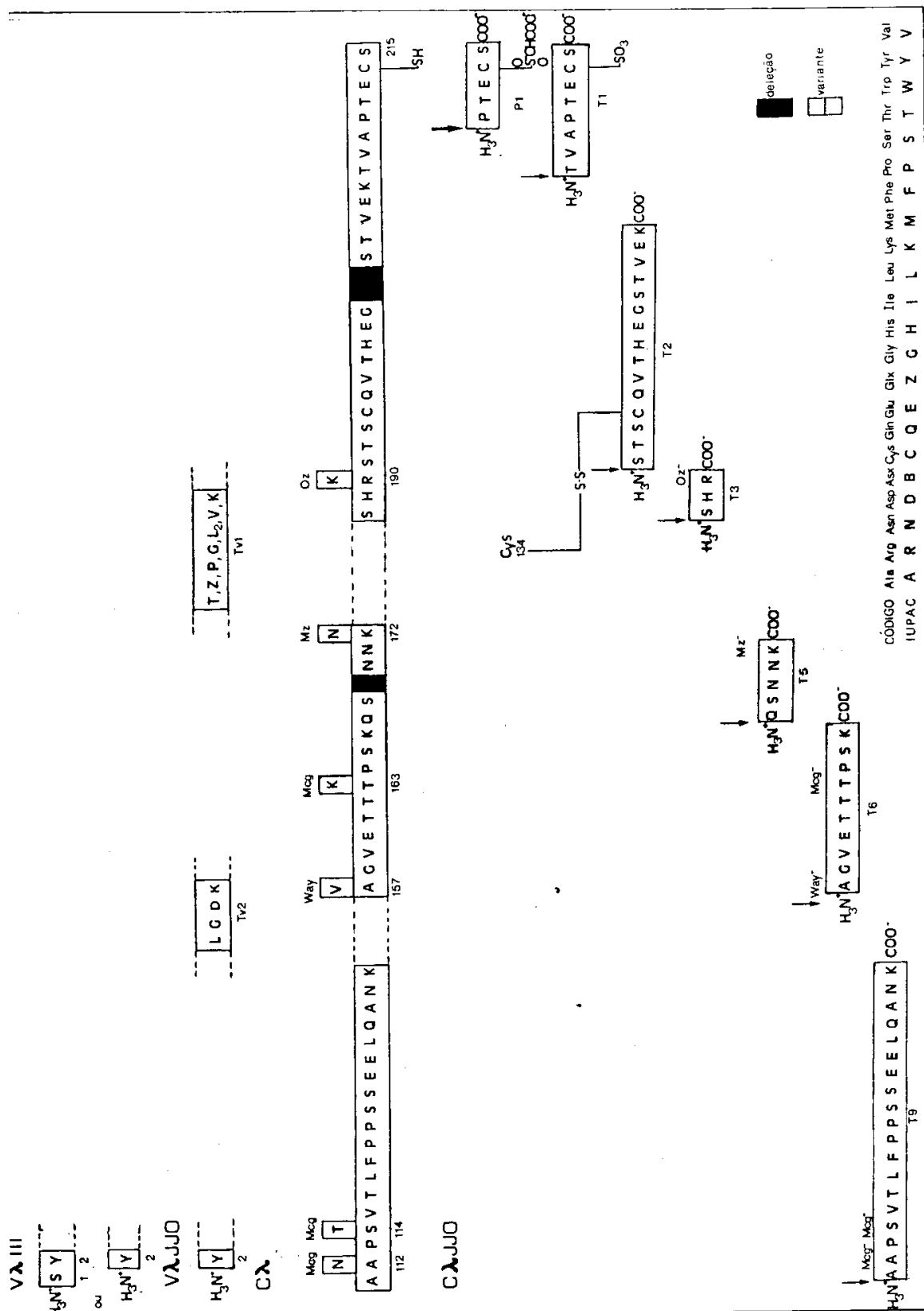


FIGURA 32 - Esta figura representa o resumo dos resultados obtidos no estudo da proteína de Bence Jones (JJO), referentes à determinação do resíduo N-terminal do domínio Vλ e à caracterização parcial do domínio Cλ, através do isolamento dos peptídeos portadores das variantes não alélicas características desta região da molécula. Está indicada a presença do resíduo tirosina N-terminal, característico do subgrupo VλIII (KABAT et al., 1979). Os peptídeos Tv1 e Tv2, obtidos a partir da região variável da proteína JJO estão assinalados. As setas e ∇ indicam os pontos de hidrólise enzimática pela tripsina e pepsina, respectivamente. Os aminoácidos foram indicados segundo o código de uma letra (IUPAC, 1968). A numeração foi tomada de KABAT et al., 1979.

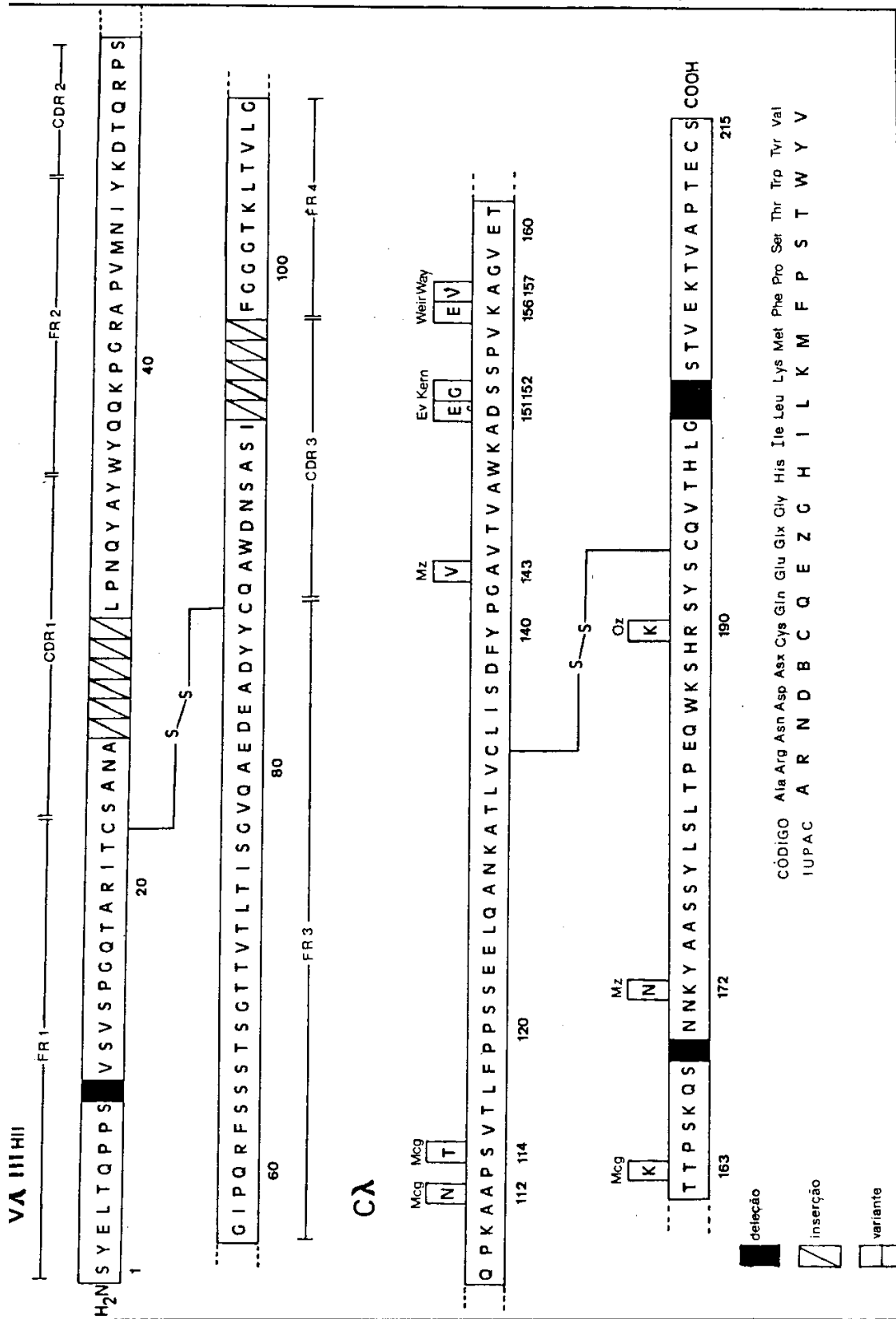


FIGURA 33 - Esta figura mostra a estrutura primária da região variável da proteína H11 (LOPEZ DE CASTRO et al., 1978), pertencente ao subgrupo VAII; estão representadas as regiões que determinam complementariedade em relação ao antígeno (CDR1, CDR2 e CDR3) e as regiões que representam o arcabouço polipeptídico, denominadas "framework" (FR1, FR2, FR3 e FR4 ou "switch" region). No domínio Cλ estão representados os pontos de substituição dos resíduos que caracterizam as variantes conhecidas (Oz, Kern, Mcg, Ev, Mz, Weir e Way). Os aminoácidos foram indicados segundo o código de uma letra (IUPAC, 1968). A numeração foi tomada de KABAT et al., 1979.

5. RESUMO E CONCLUSÕES

Urina de paciente da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, com quadro clínico de gamopatia monoclonal tipo mieloma múltiplo e apresentando proteínúria de Bence Jones característica, foi purificada através de diálise exaustiva, seguida de cromatografia de troca iônica. Seu grau de pureza foi avaliado através de imunodifusão em gel de ágar, imunoeletroforese em agarose e eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS.

Através de anti-soro específico a proteína de Bence Jones JJ0 foi tipada sorologicamente como pertencente ao tipo antigênico λ .

A composição global de aminoácidos da proteína de Bence Jones JJ0 mostrou: a) a presença de cinco meias cistinas, b) presença de um resíduo de metionina, c) número total de resíduos (excluindo triptofano) igual a 206, d) um padrão de resíduos compatível com as proteínas de Bence Jones descritas.

O pentapeptídeo radioativo P1 de sequência de aminoácidos Pro-Thr-Glu-Cys-Ser, isolado de autoradiografia do digesto péptico-tríptico da proteína BJP (JJ0) reduzida e alquilada, tipifica quimicamente JJ0 como uma proteína do isotipo λ .

O isolamento e caracterização do peptídeo T1 de sequência Thr-Val-Ala-Pro-Thr-Glu-Cys-Ser e que compreende a região C-terminal da cadeia, confirma a tipificação química de BJP (JJ0) como uma proteína λ .

A evidência obtida de PAGE/SDS de que após redução, a proteína de Bence Jones JJ0 migra como uma única banda de mesma mobilidade de cadeias leves de imunoglobulinas monoclonais reduzidas, permite caracterizar seu arranjo como dimérico.

O isolamento e caracterização do tripeptídeo Ser-His-Arg, permite classificar a proteína JJ0 como Oz(-) em relação à expressão desta variante sorológica (Arg 190).

O pentapeptídeo denominado T5 (Gln-Ser-Asn-Asn-Lys), onde está inserida a posição 171 correlacionada com a expressão da variante Mz, permite caracterizar parcialmente JJ0 como uma proteína Mz(-).

O peptídeo Ala-Ala-Pro-Ser-Val-Thr-Leu-Phe-Pro-Pro-Ser-Ser-Glu-Glu-Leu-Glu-Ala-Ser-Lys, obtido de mapeamento diagonal, compreende a região delimitada pelos resíduos 111 a 129 do domínio C λ , onde estão localizadas duas das três posições características da variante Mcg. A presença de alanina na posição 112 e serina na posição 114 caracterizam parcialmente a proteína JJ0 como Mcg(-).

O peptídeo Ala-Gly-Val-Glu-Thr-Thr-Thr-Pro-Ser-Lys permite caracterizar a proteína de Bence Jones JJ0 como uma proteína na Way(-), uma vez que alanina foi o resíduo presente na posição 157. Treonina na posição 163 caracteriza a terceira posição envolvida na expressão da variante Mcg e conseqüentemente

permite classificar JJ0 como uma cadeia leve Mcg(-).

A sequência de aminoácidos determinada para o peptídeo Ser-Tyr-Ser-Cys-Gln-Val-Thr-His-Glu-Gly-Ser-Thr-Val-Gly-Lys, permite caracterizá-lo como o peptídeo de região constante de cadeia leve do isotipo lambda que compreende os resíduos 191 a 205 e que contém um dos resíduos de cisteína da ponte dissulfeto intradomínio C λ .

As informações conseguidas através da identificação das variantes não alélicas de região C λ da proteína JJ0 poderiam sugerir dois arranjos possíveis dentro dos oito descritos (FETT & DEUTSCH, 1976): Oz(-) Kern(+) (Mcg(-) Weir(-) Ev(-) Way(-) Mz(-) ou Oz(-) Kern(-) Mcg(-) Weir(-) Ev(-) Way(-) (Mz(-). Estes dois arranjos poderiam corresponder à codificação das duas sequências Oz⁻Kern⁻ e Oz⁻ Kern⁺ dentre as quatro formas não alélicas da região C λ descritas (HIETER et al., 1981).

A presença de tirosina determinada como resíduo-N-terminal através da técnica de dinitrofenilação, permite classificar a proteína BJP (JJ0) como pertencente ao subgrupo V λ III.

A composição de aminoácidos (Leu, Gly, Asp, Lys) obtida a partir de eluição do material contido na mancha Tv2 bem como a determinação de leucina na posição N-terminal, poderia sugerir relação de homologia com o segmento 28 — 31 da região de hipervariabilidade CDR1 da proteína X (MILSTEIN, 1968) pertencente ao subgrupo de região variável V λ III (KABAT, 1979).

O peptídeo Tv1 de composição Thr, Glx, Pro, Gly, Leu₂, Val, Lys não foi localizado por homologia nas regiões CDR e FR de nenhum dos seis subgrupos de região variável descritos(KABAT,

1979), o que indicaria a possibilidade de se tratar de um peptídeo de região determinante de complementariedade da proteína JJ0.

De imunização de coelhos com a proteína de Bence Jones JJ0 purificada, foi obtido anti-soro anti-cadeia λ humana. Este anti-soro não revelou proteínas do isotipo kappa, o que atesta sua especificidade.

6. SUMMARY

Urine of a patient (J.J.O.) with osteolytic neoplasia characteristic of multiple myeloma was obtained from the School of Medicine, Universidade Estadual de Campinas.

Through the qualitative heat test it was detected a Bence Jones proteinuria.

Urine JJ0 was exhaustively dialyzed against deionized water and purified by anion exchange on DEAE - cellulose chromatography.

Bence Jones protein JJ0 was serologically typed as λ and its dimeric configuration shown by SDS polyacrylamide gel electrophoresis.

The amino acid composition of protein JJ0 showed: a) 5 moles of half-cystine/mole of protein (which is in agreement with the evidence of dimeric form); b) 1 mole of methionine/mole of protein; c) total number of residues estimated in 206 (not including tryptophane) and d) results similar to the data available for other proteins of this type.

Chemical typing was achieved by the isolation of the radioactive C-terminal Pro-Thr-Glu-*CMCys-Ser pentapeptide characteristic of λ type L chains; these data are in agreement with the serological typing.

The tryptic T1 octapeptide (Thr-Val-Ala-Pro-Thr-Glu-Cys-Ser) corroborates the chemical typing of JJ0 as a λ Bence Jones protein.

The tryptic T3 peptide (Ser-His-Arg), obtained from peptide mapping, supports the characterization of JJ0 as a 190 Arg Oz(-) lambda chain.

The isolation of the Gln-Ser-Asn-Asn-Lys pentapeptide from peptide mapping allows the partial characterization of JJ0 as far as position 171 is concerned.

The assignement to the Mcg variant was accomplished by the isolation of the peptide Ala-Ala-Pro-Ser-Val-Thr-Leu-Phe-Pro-Pro-Ser-Ser-Glu-Glu-Leu-Glu-Ala-Ser-Lys, which includes two of the three positions involved in the expression of this variant. The detection of Ala 112 and Ser 114 provides evidence of the partial characterization of JJ0 as an Mcg(-) L chain.

The peptide Ala-Gly-Val-Glu-Thr-Thr-Thr-Pro-Ser-Lys, obtained from the neutral region of diagonal mapping showed the presence of alanine in position 157, allowing the classification of JJ0 as a Way(-) variant. The partial characterization of BJP (JJ0) as Mcg(-) was confirmed by the presence of threonine in position 163 in this peptide.

One of the half-cystines involved in the C λ intradomain disulphide bridge was detected through the isolation of the tryptic T2 peptide (Ser-Tyr-Ser-Cys-Gln-Val-Thr-His-Glu-Gly-Ser-Thr-Val-Gly-Lys).

Based on the information concerning the study of the C domain of the λ protein JJ0 and the eight types of C λ domains proposed by FETT & DEUTSCH (1976), one of the following arrangements is suggested: Oz(-) Kern(+) Mcg(-) Weir(-) Ev(-) Way(-) Mz(-) or Oz(-) Kern(-) Mcg(-) Weir(-) Ev(-) Way(-) Mz(-).

These could be interpreted as two (Oz^- Kern $^-$ and Oz^- Kern $^+$) of the four non-allelic forms of the human λ constant region, coded by the clustered arrangement of the six to nine genes responsible for the expression of the C λ region (HIETER et al., 1981) (TAUB et al., 1983).

The analysis of the $V\lambda$ domain of protein JJ0 using the Sanger dinitrophenyl method revealed an unblocked residue, identified as tyrosine. This result indicates that JJ0 may belong to $V\lambda$ III subgroup. Furthermore, it was possible to obtain two peptides derived from the JJ0 $V\lambda$ domain: a) one of them (Leu-Gly-Asp-Lys) was shown to share homology relationship with a CDR1 segment (positions 28 $\rightarrow$ 31) of protein X described by MILSTEIN et al., 1968; b) the peptide Thr, Glx, Pro, Gly, Leu₂, Val, Lys was found to share no homology with neither one of the FR regions nor the CDR regions of any of the six $V\lambda$ subgroups described. Therefore, it is suggested that it could be derived from one of the CDR regions present in protein JJ0.

The antiserum obtained from immunization of rabbits with BJP (JJ0) showed no cross-reactivity with κ proteins, suggesting it's suitable for serological typing of Bence Jones proteins and/or light chains of immunoglobulins.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALONZO, N. & HIRS, C.H.W. Automation of sample application in amino acid analyzers. Analyt. Biochem., 23:272-88, 1968.
- APPELA, E. & EIN, D. Two types of λ polypeptide chains in human immunoglobulins based on an amino acid substitution at position 190. Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A., 57:1449-54, 1967.
- BAILEY, J.L. Techniques in protein chemistry. 2 ed. Amsterdam, Elsevier, 1962. 310 p.
- BEALE, D. & FEINSTEIN, A. Structure and function of the constant region of immunoglobulins. Q. Rev. Biophys., 9: 135-80, 1976.
- BERNARD, O., HOZUMI, N. & TONEGAWA, S. Sequences of mouse immunoglobulin light chain genes before and after somatic changes. Cell, 15:1133-44, 1978.
- BERNIER, G.M. & PUTNAM, F.W. Monomer-dimer forms of Bence-Jones proteins. Nature, 200:223-5, 1963.
- BISERTE, G., HOLLEMAN, J.W., HOLLEMAN, DEHOVE, J. & SAUTIERE, P. Chromatographie sur papier des dinitrophénylaminoacides. J. Chromatog., 2:225-71, 1959.

BLOMBERG, B., TRAUNECKER, A., EISEN, H. & TONEGAWA, S. Organization of four mouse λ light chain immunoglobulin genes. Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A., 78:3765-9, 1981.

BRACK, C. & TONEGAWA, S. Variable and constant parts of the immunoglobulin light chain gene of a mouse myeloma cell are 1250 nontranslated bases apart. Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A. 74:5652-6, 1977.

BRACK, C., HIRAMA, M., LENHARD-SCHULLER, R. & TONEGAWA, S. A complete immunoglobulin gene is created by somatic recombination. Cell, 15:1-14, 1978.

BROWN, J.R. & HARTLEY, B.S. Location of disulphide bridges by paper electrophoresis. The disulphide bridges of bovine chymotrypsinogen A. Biochem. J., 101:214-28, 1966.

CAGGIANO, V., DOMINGUEZ, C., OPFELL, R.W., KOCHWA, S. & WASSERMAN, L.R. IgG myeloma with closed tetrameric Bence Jones proteinemia. Am. J. Med., 47(6):978-85, 1969.

CANNON, D.C., OLITZKY, J. & INKPEN, J.A. Proteins. In: HENRY, R.J., CANNON, D.C. & WINKLEMAN, J.W. Clinical Chemistry : Principles and Technics. 2. ed. Hagerstown, Harper & Row, 1974. c.16, p.480-3.

CAPRA, J.D. & KEHOE, J.M. Hypervariable regions, idiotype and antibody combining site. Adv. Immunol., 20:1-40, 1975.

CHASE, M.W. Buffers (Appendix II). In: WILLIAMS, C.A. & CHASE M. W. Methods in Immunology and Immunochemistry. New York, Academic Press, 1968, p.365-408.

CUNNINGHAM, B.A., GOTTLIEB, P.D., PFUMM, M.N. & EDELMAN, G. M. Immunoglobulin Structure: diversity, gene duplication and domains. In: AMOS, B. Progress in Immunology. 2 ed. New York, Academic Press, 1971. p.4-24.

DREYER, W.J. & BENNETT, J.C. The molecular basis of antibody formation: a paradox. Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A., 54(3): 864-9, 1965.

EDELMAN, G.M. Dissociation of gammaglobulin. J. amer. Chem. Soc., 81:3155-6, 1959.

EDELMAN, G.M. & GALLY, J.A. The nature of Bence-Jones proteins. Chemical similarities to polypeptide chains of myeloma globulins and normal γ -globulins. J. exp. Med., 116:207-27, 1962.

EDELMAN, G.M., CUNNINGHAM, B.A., GALL, W.E., GOTTLIEB, P. D., RUTISHAUSER, V. & WAXDAL, M. The covalent structure of an entire γ G immunoglobulin molecule. Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A., 63:78-85, 1969.

EDMAN, P. Sequence determination. In: Needleman, S.B. Protein sequence determination. Berlin, Springer-Verlag, 1970. c.8. p.211-55.

EIN, D. & FAHEY, J.L. Two types of polypeptide chains in human immunoglobulins. Science, 156:947-8, 1967.

EIN, D. Non-allelic behavior of the Oz groups in human λ immunoglobulin chains. Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A., 60: 982-5, 1968.

FETT, J.W. & DEUTSCH, H.F. Primary structure of the Mcg λ chain. Biochemistry, 13(20):4102-13, 1974.

FETT, J.W. & DEUTSCH, H.F. A new λ -chain gene. Immuno - chemistry, 12:643-52, 1975.

FETT, J.W. & DEUTSCH, H.F. The variability of human λ chain constant region and some relationships to V-region sequences. Immunochemistry, 13:149-55, 1976.

FLEISHMAN, J.B., PAIN, R. & PORTER, R.R. Reduction of γ globulins. Arch. Biochem. Biophys. Suppl. 1, 179-80, 1962.

FRANGIONE, B., MILSTEIN, C. & FRANKLIN, E.C. Chemical typing of immunoglobulins. Nature, 221:149-50, 1969a.

FRANGIONE, B., MOLOSHOK, T. & SOLOMON, A. Primary structure of the variable region of a human λ VI light chain: Bence Jones protein. Sut. J. Immun., 131(5):2490-3, 1983.

FREUND, J. The mode of action of immunologic adjuvants. Adv. Tuber. Res., 7:130- , 1965.

GARCIA-PARDO, A., LAMM, M.E., PLAUT- A.G. & FRANGIONE, B. J chain is covalently bound to both monomer subunits in human secretory IgA. J. biol. Chem., 256(22):11734-8, 1981.

GIBSON, D., LEVANON, M. & SMITHIES, O. Heterogeneity of normal human immunoglobulin light chain. Non-allelic variation in the constant region of λ chains. Biochemistry, 10(16):3114-22, 1971.

GILBERT, W. Why genes in piece? Nature, 271:501, 1978.

GIVOL, D. Affinity labeling and topology of the antibody combining site. Essays Biochem., 10:1-29, 1974.

GOTTLIEB, P.D. Immunoglobulin genes. Mol. Immun., 17:1423-35, 1980.

GRABAR, P. et WILLIAMS, Jr., C.A. Méthode permettant l'étude conjuguée des propriétés électrophorétiques et immunochimiques d'un mélange de protéines - application à un sérum sanguin. Biochem. biophys. Acta, 10, 193-4, 1953.

GRAY, W.R. Dansyl chloride procedures. Meth. Enzym., 11:139-51, 1967.

GRAY, W.R. End-group analysis using dansil chloride. Meth. Enzym., 25:121-38, 1972.

HESS, M. & HILSCHMANN, N. Genetischer polymorphismus im konstanten teil von humanen immunoglobulin-L-ketten vom λ Typ. Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem., 135:67-73, 1970.

HIETER, P.A., MAX, E.E., SEIDMAN, J.G., MAIZEL Jr., J. V. & LEDER, P. Cloned human and mouse kappa immunoglobulin constant and J region genes conserve homology in functional segments. Cell, 22:197-207, 1980.

HIETER, P.A., HOLLIS, G.F., KORSMEYER, S.J., WALDMAN, T.A. & LEDER, P. Clustered arrangement of immunoglobulin λ constant region genes in man. Nature, 294:536-40, 1981.

HIRS, C.H.W., MOORE, S. & STEIN, H. Peptides obtained by tryptic hidrolysis of performic acid-oxidized ribonuclease. J. biol. Chem., 219:623-42, 1956.

HOOD, L., GRAY, W.R., SANDERS, B.G. & DREYER, W.J. Light chain evolution. Symp. Quant. Biol., 32:133-46, 1967.

HOOD, L. & EIN, D. Immunoglobulin chain structure. Two genes, one polipeptide chain. Nature, 220:764-7, 1968.

HOOD, L. & TALMAGE, D.W. Mechanism of antibody diversity: germ line basis for variability. Science, 168:325-34, 1970.

HOOD, L. Two genes, one polypeptide chain-fact or fiction? Fedn. Proc., 31(7):177-91, 1972.

HOZUMI, N. & TONEGAWA, S. Evidence for somatic rearrangement of immunoglobulin genes coding for variable and constant regions. Proc. natn. acad. Sci., 73:3628-32, 1976.

IUPAC-IUB. Commission on Biochemical Nomenclature. A one letter notation for amino acid sequences. Tentative rules. J.biol. Chem., 243:3557-9, 1968.

JONES, H.B. Papers on Chemical Pathology. Lecture III. Lancet, 2:88-92, 1847. Apud DAY, E.D. The Light Chain of Immuno-globulins. In: Advanced Immunochemistry. Baltimore, Williams & Wilkins, 1972. c.1, p.3-44.

JONES, H.B. On a new substance occurring in the urine of a patient with mollities ossium. Phil. Trs. Roy. Soc. London, 138:55-67, 1848. Apud EDELMAN, G. & GALLY, J.A. The nature of Bence-Jones proteins. Chemical similarities to polypeptide chains of myeloma globulins and normal γ -globulins. J.exp. Med., 116:207-27, 1962.

KABAT, E.A., WU, T.T. & BILOFSKY, H. Unusual distributions of amino acids in complementary-determining (hypervariable) segments of heavy and light chains of immunoglobulins and their possible roles in specificity of antibody-combining sites. J.biol. Chem., 252(19):6609-16, 1977.

KABAT, E.A., WU, T.T. & BILOFSKY, H. Variable regions genes for the immunoglobulin framework are assembled from small segments of DNA - A hypothesis. Proc. natn. Acad. Sci.U.S.A., 75(5):2429-33, 1978.

KABAT, E.A., WU, T.T. & BILOFSKY, H. Sequences of immunoglobulin chains. 2ed. U.S. Department of Health, Education and Welfare. NIH, 1979. 185p.

KABAT, E.A., WU, T.T. & BILOFSKY, H. Evidence somatic supporting assembly of the DNA segments (mini-genes) coding for the framework and complementarity-determining segments of immunoglobulin variable regions. J. exp. Med., 149:1299-334, 1979.

KABAT, E.A. Origins of antibody complementarity and specificity — Hipervariable regions and the minigene hypothesis(Opinion). J. Immun., 125(3):961-9, 1980.

KAWASAKI, I. & ITANO, H.A. Methanolysis of the pyrrolidone ring of amino-terminal pyroglutamic acid in model peptides. Analyt. Biochem., 48:546-6, 1972.

KOCK, G. & WEIDEL, W. Über die receptorsubstantz für den Phagen T5 IV. Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem., 303:213-18, 1956.

KORNGOLD, L. & LIPARI, R. Immunological studies of Bence-Jones proteins. Proc. Am. Assoc. Cancer Res., 2:29-30, 1955.

KUNKEL, H.G. The "abnormality" of myeloma proteins. Cancer Res., 28:1351-6, 1968.

KYLE, R.A.; BIEGER, R.C. & GLEICH, G.J. Diagnosis of syndromes associated with hyperglobulinemia. Med. Clins. N. Am., 54: 917-38, 1970.

KYLE, R.A. & BAYRD, E.D. The monoclonal gammopathies. Multiple myeloma and related plasma-cell disorders. Springfield, - Charles C. Thomas, 1976. 415 p.

LANGER, B., STEINMETS-KAYNE, M. & HILSCHMANN, N. Z. Physiol . Chem., 349:945-51, 1968. Apud KABAT, E.A., WU, T.T. & BILOFSKY, H. Sequences of immunoglobulin chains. 2ed. U.S. Department of Health, Education and Welfare, NIH, 1979. 185p.

LEDER, P. The genetics of antibody diversity. Scient. Am., 246(5):102-15, 1982.

LENHARD-SCHULLER, R., HOHN, B., BRACK, C., HIRANA, M. & TONEGAWA, S. DNA clones containing mouse immunoglobulin k chain genes isolated by "*in vitro*" packaging into phage λ coats. Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A., 75:4709-13, 1978.

- LOPEZ DE CASTRO, J.A., CHIU, Y-Y.H. & POLJAK, R.J. Amino acid sequence of the variable region of the light (λ) chain from human myeloma cryoimmunoglobulin IgG H11. Biochem., 17(9) : 1718-23, 1978.
- MANNIK, M. & KUNNEL, H.G. Classification of myeloma proteins, Bence-Jones proteins and macroglobulins into two groups on the basis of common antigenic characters. J. exp. Med., 116: 859-77, 1962.
- MARANGONI, S., POSKUS, E., MERLIN, G. & OLIVEIRA, B. Chemical characterization of a Bence Jones protein (Mau). Amino acid composition. IRCS Med. Sci., 7, 163, 1979.
- MARANGONI, S., POSKUS, E., MERLIN, G. & OLIVEIRA, B. Chemical characterization of a Bence Jones protein (MAU). Assignment to the λ 190 Arg. Oz(-) Mz(-) isotype. IRCS Med. Sci., 3, 390-1, 1980.
- MAX, E.E., SEIDMAN, J.G. & LEDER, P. Sequences of five potential recombination sites encoded close to an immunoglobulin k constant region gene. Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A., 76: 3450-4, 1979.

- MICHAELSEN, T.E., FRANGIONE, B. & FRANKLIN, E.C. Primary structure of the "hinge" region of human IgG3. J. biol.Chem. 252:883-92, 1977.
- MILLS, G.L. Biochem. J., 50:707, 1952. Apud NARITA, K. End group determination. In: NEEDLEMAN, S.B. Protein sequence determination. Berlin, Springer-Verlag, 1970. c.3 p.25-38.
- MILSTEIN, C. The disulphide bridges of immunoglobulin k chains. Biochem. J., 101:338-51, 1966.
- MILSTEIN, C. Variations in the C-terminal half of immunoglobulin λ -chains. Biochem. J., 104; 28-306, 1967.
- MILSTEIN, C., CLEGG, J.B. & JARVIS, J.W. Immunoglobulin λ chains. The complete aminoacid sequence of a Bence Jones protein. Biochem. J., 110:631-652, 1968.
- MILSTEIN, C. & PINK, J.R.L. Structure and evolution of immunoglobulin. Prog. Biophys. molec. Biol., 21:209-20, 1970.
- MILSTEIN, C. & SVASTI, J. Expansion and Contraction in the evolution of immunoglobulin gene pools. In: AMOS, B. Progress in Immunology. 2 ed. New York, Academic Press, 1971. p.33-45.

OFFORD, R.E. Electrophoretic mobilities of peptides on paper and their use in the determination of amide groups. Nature, 211:591-3, 1966.

OLIVEIRA LIMA, A. e DIAS DA SILVA, W. Eletroforese e Imunoelctroforese. In: _____ . Imunologia, Imunopatologia e Alergia (Métodos). 1. ed. Rio de Janeiro, Guanabara-Koogan, 1970. c.37, p. 559-64 e 573-4.

OLIVEIRA, B.; OSLER, A.G.; SIRAGANIAN, R.P. & SANDBERG, A. L. The biologic activities of guinea pig antibodies. I. Separation of gamma 1 and gamma 2 immunoglobulins and their participation in allergic reactions of the immediate type. J. Immun. 104 (2):320-8, 1970.

OLIVEIRA, B. & LAMM, M.E. Interchain dissulphide bridges of guinea pig γ 2, immunoglobulin. Biochem, 10(1):26-31, 1971.

OUCHTERLONY, Ö. Diffusion-in-gel methods for immunological analysis. Prog. Allergy, 5:78-82, 1958.

PUTNAM, F.W. Structural relationships among human γ -globulin, myeloma globulins and Bence Jones proteins. Biochem. biophys. Acta, 63:539-46, 1962.

PUTNAM, F.W. & EASLEY, C.W. Structural studies of the immunoglobulins. J. biol. Chem., 240:1626-38, 1965.

- PUTNAM, F.W., SHINODA, T., TITANI, K. & WIKLER, M. Immuno-
globulin structure: Variation in amino acid sequence and
length of human lambda light chains. Science, 157:1050-3,
1967.
- REID, M.S. & BIELESKY, R.L. A simple apparatus for vertical
flat-sheet polyacrylamide gel electrophoresis. Anal. Biochem.
22:374-81, 1968.
- RIVAT, L., RIVAT, C. & ROPARTZ, C. Human immunoglobulin light
chain subgroups: serological typing. Ann. Immun. (Inst.
Pasteur), 125c:697-703, 1974.
- RIVAT-PERAN, L., TISCHENDORF, F.W., DUMITRESCO, S-M., RIVAT, C.,
TISCHENDORF, M.M., HAAS, H., DEUTSCH, H.F. The variable
region of human immunoglobulins. I Serologic and structural
correlations of antigenic markers common to $V\lambda I$ and $V\lambda IV$
proteins (isotypic cross-reactivities). J. Immun., 125(1):
270-7, 1980.
- SANGER, F. The free amino groups of insulin. Biochem. J.,
39:507-15, 1945.
- SAKANO, H., HÜPPI, K., HEINRICH, G. & TONEGAWA, S. Sequences
at the somatic recombination sites of immunoglobulin light-
chain genes. Nature, 280:288-94, 1979.

SEIDMAN, J.G. & LEDER, P. The arrangement and rearrangement of antibody genes. Nature, 276:790-5, 1978.

SEIDMAN, J.G.; MAX, E.E. & LEDER, P. A k-immunoglobulin gene is formed by site-specific recombination without further somatic mutation. Nature, 280:370-5, 1979.

SHAPIRO, A.L., VIÑUELA, E. & MARZEL, Jr., J.V. Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS polyacrylamide gels. Biochem. biophys. Res. Comm., 28(5): 815-20, 1967.

SOLOMON, A. & McLAUGHLIN, C.L. Bence Jones proteins and light chains of immunoglobulins. Formation and characterization of amino-terminal (variant) and carboxyl-terminal (constant) halves. J. biol. Chem., 244(12):3393-404, 1969.

SOLOMON, A. Bence Jones proteins and light chains of immunoglobulins. XVI. Immunochemical recognition of the human lambda light-chain constant region isotype Mcg. Immunogenetics, 5:525-33, 1977.

SPACKMAN, D.H.; STEIN, W.H. & MOORE, S. Automation recording apparatus for use in the chromatography of aminoacids. Anal. Chem., 30:1190-206, 1958.

TAUB, R.A., HOLLIS, G.F., HIETER, P.A., KORSMEYER, S., WALDMANN, T.A. & LEDER, P. Variable amplification of immunoglobulin λ light chain gene in human populations. Nature, 302:172-4, 1983.

TISCHENDORF, F.W., TISCHENDORF, M.M. & OSERMAN, E.F. Sub-group specific antigenic marker of immunoglobulin λ chains. Identification of three sub-groups of the variable region. J. Immun., 105:1033-41, 1970.

TISCHENDORF, F.W., MICHELITSCH, B., LEDDEROSE, G. & TISCHENDORF, M.M. Non-allelic nature of the basic sequences of the variable region of human immunoglobulin lambda chains. J. mol. Biol. 61:261-3, 1971.

TISCHENDORF, F.W., TISCHENDORF, M.M. & WITTMAN-LIEBOLD, B. Immunoglobulin diversity: correlation of non-allelic markers with the basic sequences of the variable region of human lambda chains. Z. Naturforsch., 31c, 758-66, 1976.

TITANI, K., WIKLER, M. & PUTNAM, F.W. Evolution of immunoglobulins: structural homology of kappa and lambda Bence Jones proteins. Science, 155:828-35, 1967.

- TITANI, K., SHINODA, T. & PUTNAM, F.W. The amino acid sequence of a K type Bence-Jones protein. III - The complete sequence and the location of the disulphide bridges. J. biol. Chem. 244:3550-60, 1969.
- TONEGAWA, S., MAXAM, A.M., TIZARD, R., BERNARD, O. & GILBERT, W. Sequence of a mouse germ-line gene for a variable region of an immunoglobulin light chain. Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A., 75(3):1485-9, 1978.
- TONEGAWA, S. Somatic generation of antibody diversity. Nature, 302:575-81, 1983.
- WALDENSTRÖM, J. Mieloma múltiplo: diagnóstico e tratamento. Barcelona, Científico-Médica, 1973. 235p.
- WEBER, K. & OSBORN, M. The reability of molecular weight determination by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. J. biol. Chem., 244(16):4406-12, 1969.
- WEIGERT, M., GATMAITAN, L., LOH, E., SCHILLING, J. & HOOD, L. Rearrangement of genetic information may produce immunoglobulin diversity. Nature, 276:785-95, 1978.
- WEILER, E. Differential activity of allelic globulin genes in antibody-producing cells. Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A., 54:1765-72, 1965.

WILLIAMS Jr., R.C., BRUNNING, R.D. & WOLLHEIM, F.A. Light-chain disease. An abortive variant of multiple myeloma. Ann. intern. Med., 65(3):471-85, 1966.

WOODS, K.R. & WANG, K.T. Separation of dansyl-aminoacids by polyamide layer chromatography. Biochem. biophys. Acta., 133:369-70, 1967.

WU, T.T. & KABAT, E.A. An analysis of the sequences of the variable regions of Bence Jones proteins and myeloma light chains and their implications for antibody complementarity. J. exp. Med., 132:211-16, 1970.