

SERGIO MARANGONI

PONTES DISSULFETO INTER CADEIA DE UMA  
PARAPROTEINA M(JJO) IgG1  $\lambda$  G1m(za $\times$ )

Tese apresentada ao Instituto de Bio  
logia da Universidade Estadual de Cam  
pinas para a obtenção do título de  
Doutor em Ciências na área de Biolo-  
gia Celular e Molecular

Orientador - Prof. Dr. Benedito de Oliveira

Campinas - SP

1983

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL



UNICAMP

AUTORIZAÇÃO PARA QUE A UNICAMP POSSA FORNECER, A PREÇO DE CUSTO, CÓPIAS DA TESE A INTERESSADOS

Nome do Aluno: **Sergio Marangoni**

Registro Acadêmico: **795319**

Curso: **Biologia Celular e Molecular**

Nome do Orientador: **Prof. Dr. Benedito de Oliveira**

Título da Dissertação ou Tese: **Pontes Dissulfeto Inter ( De Uma Paraproteína M(330) IgG1  $\lambda$  G1m(zax)**

Data proposta para a Defesa: **8/11/83**

Endereço para Correspondência: **UNICAMP - Instituto de B  
Depto. de Bioquímica 13100 - Campinas**

( O Aluno deverá assinar um dos 3 itens abaixo )

1) Autorizo a Universidade Estadual de Campinas, a partir desta data, a fornecer a preço de custo, cópias de minha Dissertação ou Tese a interessados.

8 / 11 / 83

  
assinatura do aluno

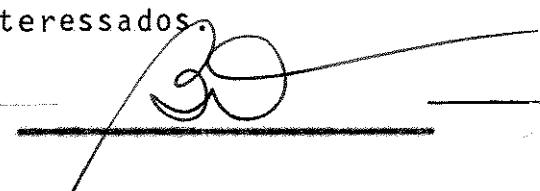
.....  
2) Autorizo a Universidade Estadual de Campinas, a fornecer, a partir de dois anos após esta data, a preço de custo, cópias de minha Dissertação ou Tese a interessados.

    /    /    

\_\_\_\_\_  
assinatura do aluno

.....  
3) Solicito que Universidade Estadual de Campinas consulte-me, dois anos após esta data, quanto à minha autorização para o fornecimento de cópias de minha Dissertação ou Tese, a preço de custo, a interessados.

    /    /    

  
assinatura do aluno

**De acordo**

**Orientador**

Este trabalho foi realizado com os auxílios concedidos pela Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Aos meus pais

À Eliana e Júlio

## AGRADECIMENTOS

Ao Magnífico Reitor da Universidade Estadual de Campinas, Prof. Dr. José Aristodemo Pinotti, ao DD. Diretor do Instituto de Biologia, Prof. Dr. Crodowaldo Pavan e ao chefe do Departamento de Bioquímica, Prof. Dr. Aníbal Eugênio Vercesi pelo incentivo às atividades científicas desenvolvidas na UNICAMP.

Ao Prof. Dr. Benedito de Oliveira, Prof. Titular do Departamento de Bioquímica do Instituto de Biologia da UNICAMP, a quem devemos nossa introdução na atividade de pesquisa.

Ao Prof. Dr. Luiz Sebastião Pringensi, Chefe do Departamento de Patologia Clínica da Faculdade de Medicina da UNICAMP e ao Prof. Dr. C.P. Costa que gentilmente cederam o plasma contendo a paraproteína M(JJO).

Aos colegas do Departamento de Bioquímica que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

## ÍNDICE

|                                                |    |
|------------------------------------------------|----|
| I- INTRODUÇÃO.....                             | 1  |
| II- MATERIAL E MÉTODOS.....                    | 9  |
| 1- Reagentes.....                              | 10 |
| 2- Proteína de mieloma JJ0.....                | 11 |
| 3- Imunodifusão.....                           | 11 |
| 4- Eletroforese em camada delgada.....         | 12 |
| 5- Imunoeletroforese em gel de agar.....       | 13 |
| 6- Eletroforese em gel de poliacrilamida.....  | 14 |
| 7- Precipitação com sulfato de amônio.....     | 16 |
| 8- Cromatografia em DEAE celulose.....         | 17 |
| 9- Análise de aminoácidos.....                 | 18 |
| 10- Hidrólise ácida de peptídeos.....          | 20 |
| 11- Eletroforese de alta voltagem.....         | 22 |
| 12- Oxidação com ácido perfórmico.....         | 24 |
| 13- Redução e alquilação radioativa.....       | 24 |
| 14- Digestão enzimática.....                   | 25 |
| 15- Tipificação química.....                   | 25 |
| 16- Purificação dos peptídeos radioativos..... | 26 |
| 17- Mapa diagonal.....                         | 27 |
| 18- Dansilação.....                            | 29 |
| 19- Degradação de Edman.....                   | 30 |
| 20- Determinação do haplotipo.....             | 31 |

|                                                                          |    |
|--------------------------------------------------------------------------|----|
| III- RESULTADOS.....                                                     | 32 |
| 1- Controles preliminares da proteína JJ0.....                           | 33 |
| 2- Purificação e identificação da proteína JJ0.....                      | 33 |
| 3- Tipificação química.....                                              | 45 |
| 4- Purificação e identificação dos peptídeos radioa<br>tivos.....        | 47 |
| 5- Peptídeos comprometidos com as pontes dissulfeto<br>inter cadeia..... | 48 |
| 6- Haplotipo da proteína JJ0.....                                        | 49 |
| IV- DISCUSSÃO.....                                                       | 59 |
| V- RESUMO E CONCLUSÕES.....                                              | 70 |
| VI- SUMMARY.....                                                         | 74 |
| VII- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....                                     | 77 |

## ABREVIATURAS

CMCys - Carboximetilcisteina

CMCysSO<sub>2</sub> - Carboximetilcisteina sulfona

DEAE-celulose - Dietilaminoetil celulose

$\epsilon$ -DNP-Lys -  $\epsilon$ -dinitrofenillisina

DNS-Cl - Cloro 1-dimetilaminoftaleno-5-sulfanil

DTT - Ditiotreitól

$e$  - Carga elétrica

$m$  - Mobilidade eletroforética

PITC - Fenilisotiocianato

SDS - Dodecil sulfato de sódio

TFA - Ácido trifluoracético

## I - INTRODUÇÃO

Imunoglobulinas são um grupo de proteínas estruturalmente relacionadas, cujo modelo básico é composto de quatro cadeias polipeptídicas, sendo duas cadeias pesadas (peso molecular alto) idênticas e duas cadeias leves (peso molecular baixo) idênticas, unidas covalentemente por pontes dissulfeto intercadeia (EDELMAN, 1959; PORTER, 1959; PORTER, 1962; FLEISCHMAN e colab., 1962 ; EDELMAN e colab., 1969).

A biossíntese de imunoglobulinas ocorre em células linfoides principalmente plasmócitos. A maior parte destas moléculas são encontradas nos fluídos internos e secreções do organismo, constituindo o mecanismo de defesa imune humoral. Uma pequena parte se fixa à superfície de linfócitos e macrófagos e pode funcionar como receptores de antígenos ativando a resposta imune mediada por células (DICKLER, 1976).

Na espécie humana são identificadas cinco classes antigênicas de imunoglobulinas imunoeletroforeticamente distintas: IgG, IgA, IgM, IgD e IgE.

As imunoglobulinas humanas da classe IgG são constituídas de quatro subclasses segundo o tipo de cadeia pesada : IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. Essas subclasses dão reação cruzada (o que demonstra similaridade de estrutura antigênica), mas são de tectados também determinantes antigênicos subclasse específicos localizados na região CH (região constante de cadeia pesada ) (TERRY e colab., 1964; FRANGIONE e colab., 1969a; FRANKLIN, 1976 ).

A classificação antigênica de classes e subclasses de imunoglobulinas é feita em termos de determinantes isotípicos, alotípicos e idiotípicos. Os determinantes isotípicos são marcadores das moléculas de imunoglobulinas das classes IgG, IgM, IgA, IgD e IgE e dos tipos kappa e lambda, presentes em todos os indivíduos de uma mesma espécie. Os marcadores alotípicos distinguem formas polimórficas de imunoglobulinas, que não estão presentes em todos os indivíduos de uma mesma espécie. São as especificidades Gm, Km e A2m (A2m1 e A2m2 característicos de IgA2) codificadas por gens alelos. As variantes idiotípicas caracterizam anticorpos individuais e se localizam no sítio combinatório da molécula de anticorpo e podem caracterizar uma imunoglobulina monoclonal (idiotipo único) ou então um número pequeno de imunoglobulinas (idiotipo compartilhado). (GRUBB, 1970; NATVIG e colab., 1973; SPIEGELBERG, 1974; RODKEY, 1974; SEIDMAN e colab., 1978; BINZ e colab., 1975; CAZENAVE e colab., 1974).

Em camundongo, rato e no homem ocorrem proteínas homogêneas, excretadas por plasmócitos neoplásicos de patologias linfoproliferativa do tipo mieloma múltiplo, sendo que os marcadores antigênicos transportados por estas proteínas permitem sua caracterização como representantes da população normal de anticorpo. Cada população proteica presente no soro paraproteinêmico representa uma super produção de um tipo de molécula de "imunoglobulina normal" em quantidade suficiente para permitir seu isolamento e caracterização imunoquímica precisa (COHEN e

e colab., 1967; POTTER, 1972; SALMON, 1973 ; SOLOMON, 1977).

A primeira cadeia gama completamente sequenciada foi a cadeia  $\gamma 1$  da proteína Eu (EDELMAN e colab., 1969), cujo sistema de numeração é frequentemente usado como base para a comparação entre as cadeias gama.

As cadeias polipeptídicas pesadas (H) e leves (L) estão arranjadas em regiões de homologia (ou domínios) circunscritas por uma ponte dissulfeto intra-cadeia, constituindo uma alça, que engloba 52 a 59 resíduos de aminoácidos.

Foram identificados na cadeia pesada os domínios de região constante CH1, CH2 e CH3 e o domínio de região variável VH; na cadeia leve foram caracterizados os domínios VL (de região variável) e CL (de região constante). Entre os domínios CH1 e CH2 foi descrita a região da dobradiça, que se caracteriza estruturalmente pela presença das pontes dissulfeto inter cadeias H e teor alto do resíduo prolina como marcador natural desta região molecular.

Estudos de sequências desoxinucleotídicas de DNA clonado preparado pela tecnologia de DNA recombinante, mostram que a região constante de cadeia  $\gamma 1$  é codificada por quatro exons, um para cada um dos três domínios (CH1, CH2 e CH3) e outro para a região da dobradiça (TONEGAWA e colab., 1977; LEDER e colab., 1979; SAKANO e colab., 1979 ; HONGO e colab., 1978).

A caracterização da estrutura primária ao redor das pontes dissulfeto intercadeia identifica cada subclasse de IgG

(PINK e colab., 1967a, 1967b ; FRANGIONE e colab., 1969a). Des-  
ta maneira as proteínas IgG1 (Fig.1) se destacam das outras sub-  
classes de IgG por apresentar as pontes dissulfeto intercadeia  
H-L de maneira simétrica e muito próximas das pontes interca-  
deias H-H, enquanto que em IgG2, IgG3 e IgG4 a junção H-L está  
cerca de 90 resíduos distante da junção H-H ( nas proteínas IgG1  
a cisteína na posição 220 de cadeia H é aquela responsável pela  
ponte dissulfeto H-L, enquanto que a cisteína equivalente presen-  
te na cadeia pesada em outras subclasses está na posição 131).

O número de pontes dissulfeto intercadeia H agrupa-  
das na região da dobradiça é variável: IgG1 e IgG4 apresentam  
duas pontes dissulfeto, IgG2 possui quatro e IgG3 onze pontes  
dissulfeto nesta região (FRANGIONE e colab., 1969a ; MICHAELSEN  
e colab., 1977).

Evidências experimentais acumuladas até a presente  
data indicam que os diferentes domínios arranjados linearmente  
nas cadeias polipeptídicas e que constituem o modelo tetraméri-  
co IgG, tem diferentes funções. Os domínios de região variável  
de cadeia leve (VL) e de cadeia pesada (VH) codificados por gens  
independentes, constituem o sítio combinatório da molécula de  
anticorpo responsável pela atividade biológica do reconheci-  
mento antigênico. Observações obtidas de metodologia química tipo  
redução branda ou drástica, alquilação radioativa, fragmentação  
enzimática e clivagem química específica confirmam o papel indi-  
vidual bem como a interação quaternária dos demais domínios de

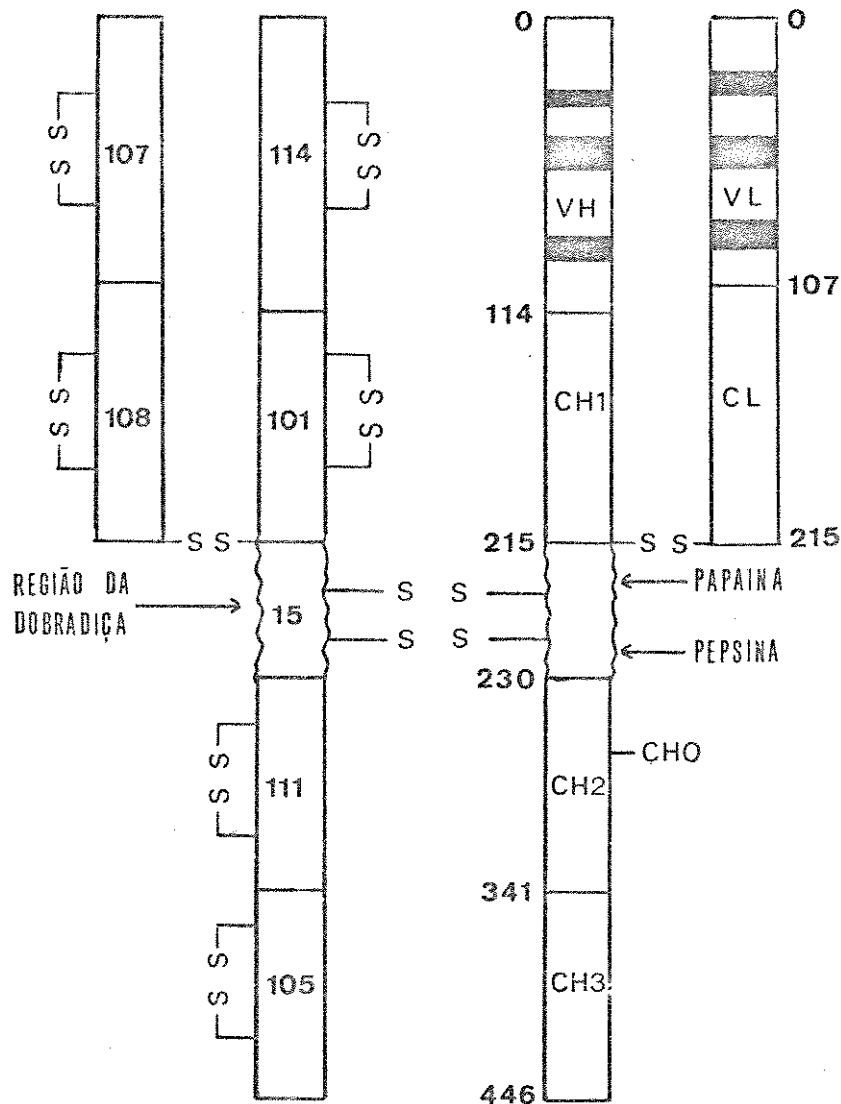


Figura 1 - Esquema estrutural de uma molécula de IgG1 humana com cadeia leve do isotipo lambda. Na hemimolécula representada à esquerda é indicado o número de aminoácidos das regiões de homologia, que integram os domínios e as pontes dissulfeto (-S-S-) intra cadeia e o número de aminoácidos da região da dobradiça, onde se encontram as pontes dissulfeto inter cadeia pesada. Na cadeia pesada (H) e leve (L) da hemimolécula à direita são indicadas as regiões de hipervariabilidade (áreas sombreadas); são também assinalados os números totais de resíduos de aminoácidos para cada cadeia e para cada domínio de cadeia pesada (VH, CH1, CH2 e CH3) e de cadeia leve (VL e CL); o carbohidrato (CHO) está ligado à cadeia pesada no resíduo 297. Na região da dobradiça (linha ondulada) são indicadas as duas pontes dissulfeto inter cadeia pesada (H-H) e a ponte dissulfeto, que faz a junção cadeia pesada com a leve (H-L). São também assinalado os pontos de ataque enzimático da papaina e pepsina. A numeração utilizada está baseada naquela da proteína Eu (EDELMAN e colab., 1969).

cadeia pesada (principalmente aqueles localizados no fragmento Fc) e a importância das pontes dissulfeto inter cadeia pesada H-H (localizadas na região da dobradiça) na mediação de outras interações críticas para a homeostase como a ativação do sistema complemento, atividade citofílica para macrófagos e atividade anafilática (PORTER, 1967; HARTLEY, 1970; EDELMAN, 1970; MOTA e colab., 1974; COLOMB e colab., 1975; ISENMAN e colab., 1975; ALBRECHT e colab., 1976; FRANKLIN, 1976; LOW e colab., 1976; OVARY e colab., 1976; WEIGERT e colab., 1976; DORRINGTON, 1978).

Na cadeia pesada de IgG são detectados marcadores genéticos, que se comportam como determinantes antigênicos alotípicos. Na cadeia pesada de IgG1 foram descritos quatro determinantes G1m (a,x,f,z), na cadeia pesada de IgG2 o determinante G2m (n), e na cadeia pesada de IgG3 foram descritos quatorze determinantes alotípicos G3m (b0,b1,b3,etc.). Marcadores genéticos alotípicos estão presentes em cadeia leve do isotipo Kappa, que são os determinantes Km, associados às substituições de aminoácidos nas posições 153 e 191. Alótipo Km (+1 +2 -3): 153 Ala, 191 Leu; alótipo Km (+1 -2 -3): 153 Val, 191 Leu; alótipo Km (-1 -2 +3): 153 Ala, 191 Val (REV. NOT. ALLOT. MARK. HU. IMMUNOL., 1976; STEVENS e colab., 1977).

As sequências de aminoácidos dos peptídeos ao redor das pontes dissulfeto inter cadeia diferem e são características para cada tipo de cadeia pesada gama e classificam os tipos

e subtipos das imunoglobulinas IgG. Baseado nessas diferenças, foi desenvolvido um procedimento em bases químicas, para tipificação de cadeias leves e pesadas (FRANGIONE e colab., 1969a).

Os peptídeos característicos são identificados em mapas autoradiográficos, obtidos por eletroforese de alta voltagem do digesto pēptico-trīptico da proteína reduzida e alquilada radioativamente com ácido iodoacético 1-C<sup>14</sup>.

Esta metodologia também possibilita, que diferenças de mobilidade de algumas bandas possam ser detectadas, indicando a possível presença de mutações não usuais.

O presente trabalho tem como objetivo a caracterização imunoquímica parcial de uma proteína mielomatosa (JJ0) proveniente de paciente com discrasia linfoproliferativa tipo mieloma múltiplo, através do estudo dos peptídeos envolvidos nas pontes dissulfeto intercadeias H-H' e H-L.

Estudos imunoquímicos de proteínas deste tipo fornecem informações detalhadas de valor diagnóstico na avaliação do quadro clínico de pacientes com discrasia de célula plasmática (KYLE e colab., 1976; VANDIVIK e colab., 1976; MORELL e colab., 1977).

## II - MATERIAL E MÉTODOS

## 1- REAGENTES

Acrilamida e Bis-Acrilamida - Pierce Chemical Company, Rockford, Illinois, USA.

Dithiothreitol (DTT) - Sigma Chemical Company, St. Louis, MO., USA.

Pepsina - Sigma Chemical Company, St. Louis, MO., USA.  
(2x cristalizada).

Tripsina - Worthington Biochemical Corp., Freehold, N.J., USA, (tratada com TPCK: L(1-tosylamido-2-fenil)etilcloretilcetona).

Ácido iodoacético ( $1-^{14}\text{C}$ ) - New England Nuclear, Boston, Mass., USA.

Ninhidrina - Pierce Chemical Company, Rockford, Illinois, USA.

DEAE-celulose (diethylaminoethyl cellulose) - Whatman, W. R. Bolston, Ltd., England.

Padrão de aminoácidos - Pierce Chemical Company, Rockford, Illinois, USA.

Todos os outros reagentes usados também foram de grau analítico.

## 2 - PROTEÍNA DE MIELOMA JJO

Plasma, contendo paraproteína M (proteína JJO), proveniente de paciente com discrasia linfoproliferativa tipo mieloma múltiplo, foi gentilmente cedido pelos Drs. L.S.Prigenzi e C.P.Costa do Departamento de Patologia Clínica da Faculdade de Medicina da Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP.

O plasma foi coletado por plasmaferese em bolsa de plástico atóxico (Griven-TR-300) e em seguida guardado a  $-80^{\circ}\text{C}$  em "deep-freezer" Revco (Revco Scientific and Industrial Products, USA).

## 3 - IMUNODIFUSÃO

Análise por imunodifusão dupla em duas dimensões (OUCHTERLONY, 1958; WEIR, 1964), foi realizada com antisoros monoespecíficos, para determinar a subclasse de IgG da proteína JJO.

Foram utilizados antisoros dos tipos IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. As análises foram realizadas da seguinte maneira: Lâminas limpas de microscópio foram recobertas com uma solução quente de agar a 1% (contendo mertiolato 1:1000) em tampão veronal

pH 8,4 de modo a se obter camada de aproximadamente 3 mm de espessura após gelificação, em seguida foram escavados no agar os poços necessários para aplicação do soro e antisoro através de aparelhagem adequada (Grafar Gel punch assembly, Grafar Auto Gel Corporation, Detroit Michigan, USA). No poço central foi aplicada o antisoro monoespecífico e nas laterais às frações a serem identificadas. As lâminas foram deixadas em câmara úmida à temperatura ambiente por 24 horas. Após esse período de tempo as lâminas foram lavadas e coradas pela técnica descrita para eletroforese.

#### 4 - ELETROFORESE EM CAMADA DELGADA

Foi realizada em camada fina de agarose em suporte flexível de plástico transparente contendo 1% de agarose, 5% de sucrose e 0,035% de sal dissódico EDTA (ácido etilenodiaminotetraacético) em tampão barbital 0,065 M, pH 8,6. Foi aplicada uma diferença de potencial de 90V por placa durante 1 hora. Após o término da corrida eletroforética, as placas foram coradas com negro de amido 0,1% em solução de ácido de acético 10% por 10 minutos, e o excesso de corante eliminado com solução de ácido acético glacial 10%.

## 5 - IMUNOELETROFORESE EM GEL DE AGAR

Foi realizada segundo GRABAR e colab. (1953), nas condições descritas em seguida.

### 5.1.- PREPARAÇÃO DAS LÂMINAS

Uma solução de 1% agar (Oxoid- nº 2) em tampão veronal pH 8,4, foi autoclavada a 110°C por 10 minutos, obtendo-se desta maneira um gel de agar límpido e transparente. Lâminas de microscópio em suporte de plástico rígido (Gelman immunoframes, Gelman Instrument Co., Ann Harbor, Michigan, USA), foram recobertas com uma solução quente de agar a 1% em tampão veronal pH 8,4. Depois da solidificação do agar foram escavados poços segundo esquema padrão (Gelman Electrophoresis Punch Set, Gelman Instrument Co., Ann Harbor, Michigan, USA).

### 5.2 - ELETROFORESE

Nas extremidades das lâminas preparadas foram aplicadas tiras de papel de filtro Whatmann nº 3MM, umedecidas com o tampão de corrida, para funcionar como "ponte" entre o agar e os compartimentos contendo, o tampão veronal pH 8,4 da cuba eletroforética desenhada para obtenção de resultados reprodutíveis na

análise de soros humanos normais e patológicos.

Uma diferença de potencial de 200V foi aplicada nos eletrodos por 120 minutos, obtendo-se assim separação das proteínas em estudo. Após eletroforese, o agar das canaletas é removido com uma ferramenta, fabricada para este fim ( Gel knife 6835A, LKB Imunoelectrophoresis Equipment, Sweden), e é cheia com antisoro. As lâminas foram então deixadas em câmara úmida à temperatura ambiente por 24 horas, para a formação das linhas de precipitação.

Após esse período de tempo, as lâminas foram lavadas e em salina por 24 horas, para retirar as proteínas não precipitadas, e em seguida lavadas com água destilada por 2 horas, e recobertas com papel de filtro, umedecido com água, e, finalmente deixadas secar em estufa a 37°C. Quando secas, foram coradas com amido black a 0,5%, e o excesso de corante retirado com uma solução de ácido acético glacial a 4%.

## 6 - ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA

O método utilizado foi essencialmente aquele de SHAPIRO e colab. (1967), WEBER e colab. (1969) com modificações.

## 6.1 - PREPARAÇÃO DO GEL

O gel de concentração contendo 5% e o gel de separação contendo 10% de acrilamida foram preparados a partir de uma solução estoque 0,3 M de acrilamida e 4 mM de bis acrilamida, dissolvidos em água desionizada. Essas soluções foram filtradas em papel de filtro Whatmann nº 1 e mantidas a 4°C em frasco escuro. O gel de concentração foi preparado a partir de tampão tris HCl 1 M pH 6,8 e o de separação com tampão tris HCl 1 M pH 8,6. ambos com SDS 0,1%. A cada gel foi acrescentado 0,025ml(V/V) de N,N,N',N'- tetrametiletilenediamina (Temed) e de uma solução de persulfato de amônio (10%).

O gel de separação foi colocado entre duas placas de vidro plano tipo borosilicato resistente a temperaturas altas e ataques químicos cortado nas dimensões de 160x145 mm (separadas por um espaçador de acrílico de 2 mm de espessura) até a altura de aproximadamente 100 mm. Após a polimerização foi colocado o gel de concentração até a borda da placa de vidro (aproximadamente 40 mm de altura).

## 6.2 - PREPARAÇÃO DA AMOSTRA

As amostras (10 a 50 µl de uma solução de aproximadamente 1 mg de proteína por ml) foram dissolvidas em tampão tris HCl 0,08 M pH 6,8, contendo 2% de SDS, 10% de glicerol e 0,001%

de bromofenol. Estas amostras foram analisadas na sua forma não reduzida e na forma reduzida com ditioneitol na concentração final de 0,1 M. As amostras foram imersas em água em ebulição durante 2 minutos. Como marcadores foram utilizados mioglobina (PM 17200), ovoalbumina (PM 43000) e citocromo C (PM 11700).

A eletroforese foi realizada em tampão tris HCl 0,025M glicina 0,192 M e SDS 0,1% a 100V durante 4 horas.

### 6.3 - COLORAÇÃO

O gel, retirado do suporte de vidro, é corado em Comas sie blue 0,1% a 37°C, e o excesso de corante removido em ácido acético 7%.

### 7 - PRECIPITAÇÃO COM SULFATO DE AMÔNIO

O plasma JJ0 foi precipitado com sulfato de amônio na concentração final de 50% sob agitação lenta a 6°C. O material foi centrifugado a 10000 rpm por 30 minutos a 4°C, e o sobrenadante desprezado. O precipitado de gamaglobulina foi redissolvido em tampão fosfato 0,1 M, pH 8,4 e em seguida dializada contra tampão fosfato 5 mM, pH 8,0 por 24 horas, sendo feitas várias trocas do tampão durante a diálise; a ausência de

Íons sulfato foi confirmada através de teste qualitativo com cloreto de bário a 2%. O material, obtido deste modo, foi centrifugado a 10000 rpm durante 30 minutos, e o precipitado desprezado, sendo o sobrenadante (pseudoglobulina) utilizado no fracionamento.

## 8 - CROMATOGRAFIA EM DEAE CELULOSE

A fração pseudoglobulina foi submetida a cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE celulose (DE-52-Whatman) medindo (20x400)mm previamente equilibrada com tampão fosfato de sódio 5 mM pH 7,8, segundo metodologia descrita (OLIVEIRA e colab., 1970). Em uma experiência típica 10 ml de sobrenadante foi aplicada no topo da coluna de DEAE celulose.

As frações eluídas em fosfato 5 mM, pH 7,8 e NaCl 1 M, foram coletadas com auxílio de aparelhagem Gilson num volume de 4 ml por tubo em fluxo descendente de 20 ml/hora. A leitura dos eluatos foi realizada por absorção em espectrofotômetro Beckman modelo 25, utilizando cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico. As frações obtidas foram dializadas contra água desionizada por um período de 24 horas em câmara fria e em seguida liofilizadas e estocadas a -20°C.

## 9 - ANÁLISE DE AMINOÁCIDOS

### 9.1 - INSTRUMENTAL

As análises de aminoácidos foram realizadas segundo o método de SPACKMAN e colab. (1958), utilizando um auto analisador de componentes modulados, cujas unidades básicas possuem as seguintes características:

1- Desenho geral e sistema automático de aplicação de amostras segundo ALONZO e colab.(1968) do Brookhaven National Laboratory, Upton, New York, modificado.

2- Sistema analítico de duas colunas, uma para a resolução dos aminoácidos básicos (coluna B) de 13,0x1,0 cm, e a outra para a resolução dos aminoácidos ácidos e neutros (coluna AN) de 53,0x1,0 cm.

3- Para a coluna B, foi utilizada resina Aminex A5, e para a coluna AN resina Aminex A6 (Bio Rad.Labs.Richmond,Cal. USA).

4- Tampão da coluna B: citrato de sódio 0,5N,pH5,25; tampão coluna AN: citrato de sódio 0,2 N, pH 3,25 e citrato de sódio 0,2 N, pH 3,25, ambos contendo 0,25% de tioglicol.

5- Controle de temperatura: circulador de solução refrigerante, Haake tipo F (Brinkman Instruments, Westbury, New York) com dois termoreguladores, ajustados para 52,5°C e 60°C.

6- Fotômetro (M.E.R. 1020, Mountain View, Cal. USA ) equipado com três células: uma para determinações em comprimento de onda de 440 nm e caminho óptico de 12 mm, e as outras duas para determinações em comprimentos de onda a 570 nm e caminhos ópticos de 6,6 e 12 mm respectivamente.

7- Registrador tipo Eletronik 15 Strip Chart Multi-point Recorder, Honeywell Ltd., Ontario, Canada), equipado para leitura e registro gráfico em escala de 0 a 0,1 unidades de absorbância.

8- Unidade de controle programado: aquela descrita por ALONZO e HIRS (1968).

9- Sensibilidade: valores médios de 20 nmoles para cada aminoácido produzem um cromatograma, cujos picos situam-se dentro da escala e são de fácil leitura e cálculo.

## 9.2 - SOLUÇÃO PADRÃO DE AMINOÁCIDOS

Foi usada como referência uma solução padrão( Amino Acid Standard H, Pierce). As leituras são integradas em 570 nm (12 mm de caminho óptico), exceto para prolina, cuja leitura é integrada no canal de 440 nm (12 mm de caminho óptico). As integrações foram realizadas pelo método manual, utilizando-se as constantes determinadas a partir da solução padrão segundo a relação:  $K = A/M$ , onde:  $K$  = constante de integração;  $A$  = área determinada por integração manual;  $M$  = quantidade absoluta de aminoácido padrão expressa em nanomoles.

Para cada análise, norleucina foi acrescentada às amostras, como controle do parâmetro tempo de eluição. As amostras ( 50  $\mu$ l) foram dissolvidas em volumes iguais de tampão citrato de sódio 0,2 N pH 2,2 e polietilenoglicol 30%.

A figura 2 mostra uma análise automática da solução de aminoácidos. A identificação qualitativa de cada aminoácido é dada pelo tempo de sua eluição da coluna, e está relacionado diretamente com a posição do pico, que é registrado graficamente; assim os valores de abscissa em minutos são utilizados como critério de identificação.

## 10 - HIDRÓLISE ÁCIDA DE PEPTÍDEOS

Em todos os casos as hidrólises foram efetuadas em tubos pirex de 13,0x0,9 cm, fechados a vácuo em presença de HCl 6 M, acrescentado de fenol 1 mg/ml, para evitar a formação de clorotirosina ( SANGER e colab., 1963).

As hidrólises foram realizadas à temperatura de 106°C em uma estufa Forma Scientific, com convecção forçada e com variação de temperatura não superior a  $\pm 0,5^\circ\text{C}$ . Para os diferentes peptídeos obtidos, o tempo de hidrólise foi de 24 horas.

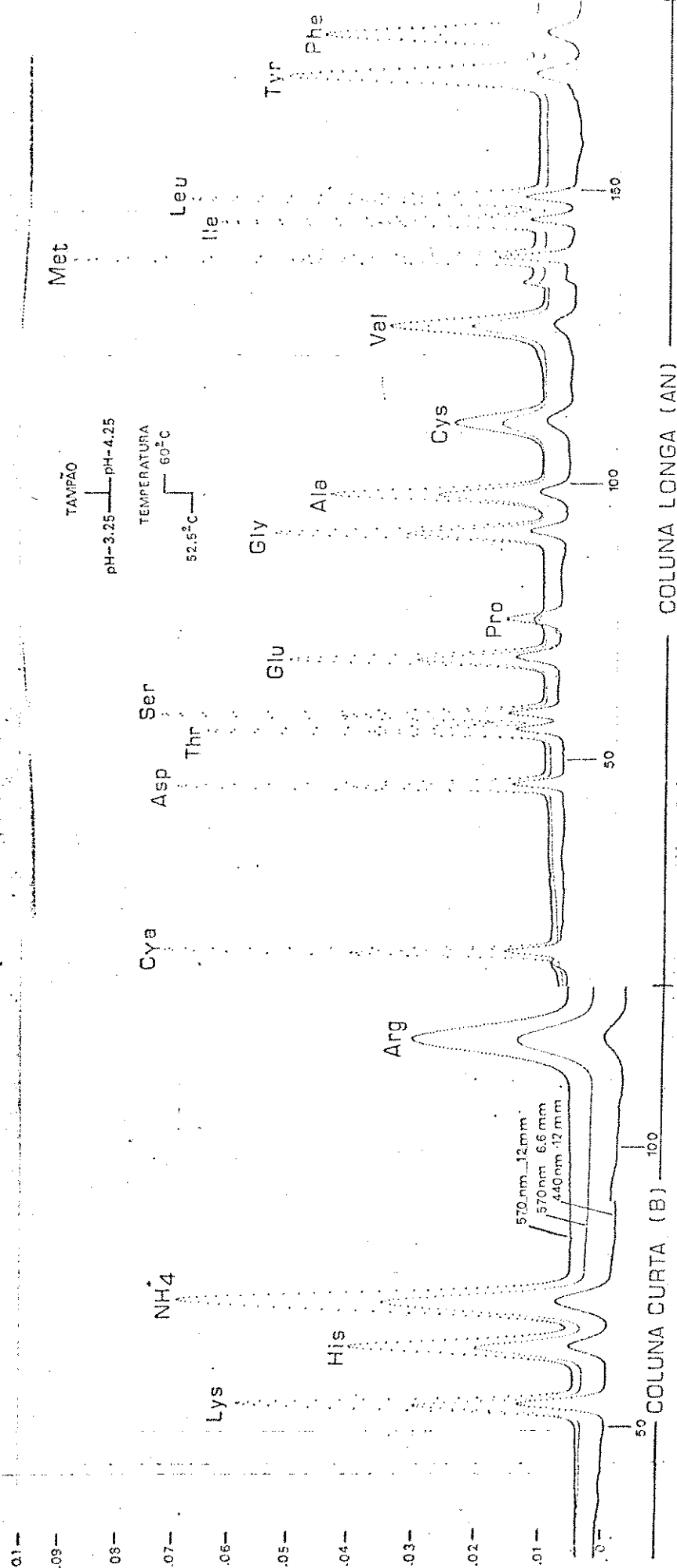


Figura 2- Registro gráfico de uma análise automática de aminoácidos. Foram aplicados 20µl de uma solução padrão de aminoácidos em cada coluna. Uma pequena variação na linha de base, detectada nos três canais aos 147 minutos na coluna longa, indica sistematicamente a mudança de tampão de pH 3.25 para pH 4.25.

## 11 - ELETROFORESE DE ALTA VOLTAGEM

A eletroforese de alta voltagem foi realizada em papel Whatman nº 3 MM e em tanques Savant, completados com varsol e refrigerados por circulação de metanol 5% a baixa temperatura, segundo procedimento descrito na separação de aminoácidos e peptídeos (DREYER e colab., 1967).

Os tampões empregados foram os seguintes: pH 6,5 (piridina - ácido acético - água, 10:1:200, V/V), pH 3,5 (piridina - ácido acético - água 1:10:440, V/V), pH 2,1 (ácido fórmico - ácido acético - água 1:4:45, V/V).

Utilizaram-se os seguintes marcadores de referência: tinta vermelha marca Pilot que tem um componente de mobilidade eletroforética semelhante à do ácido aspártico em pH 6,5,  $\epsilon$ -dinitrofenil lisina ( $\epsilon$ -DNP-Lys), ácido aspártico, ácido glutâmico, lisina e o dipeptídeo glicina-alanina (Gly-Ala).

As mobilidades (m) dos peptídeos a pH 6,5 foram expressos como relativas à distância entre  $\epsilon$ -DNP-Lys e ácido aspártico, e a carga líquida ( $\epsilon$ ) a pH 6,5 dos peptídeos foi determinada segundo OFFORD (1966), conforme a figura 3.

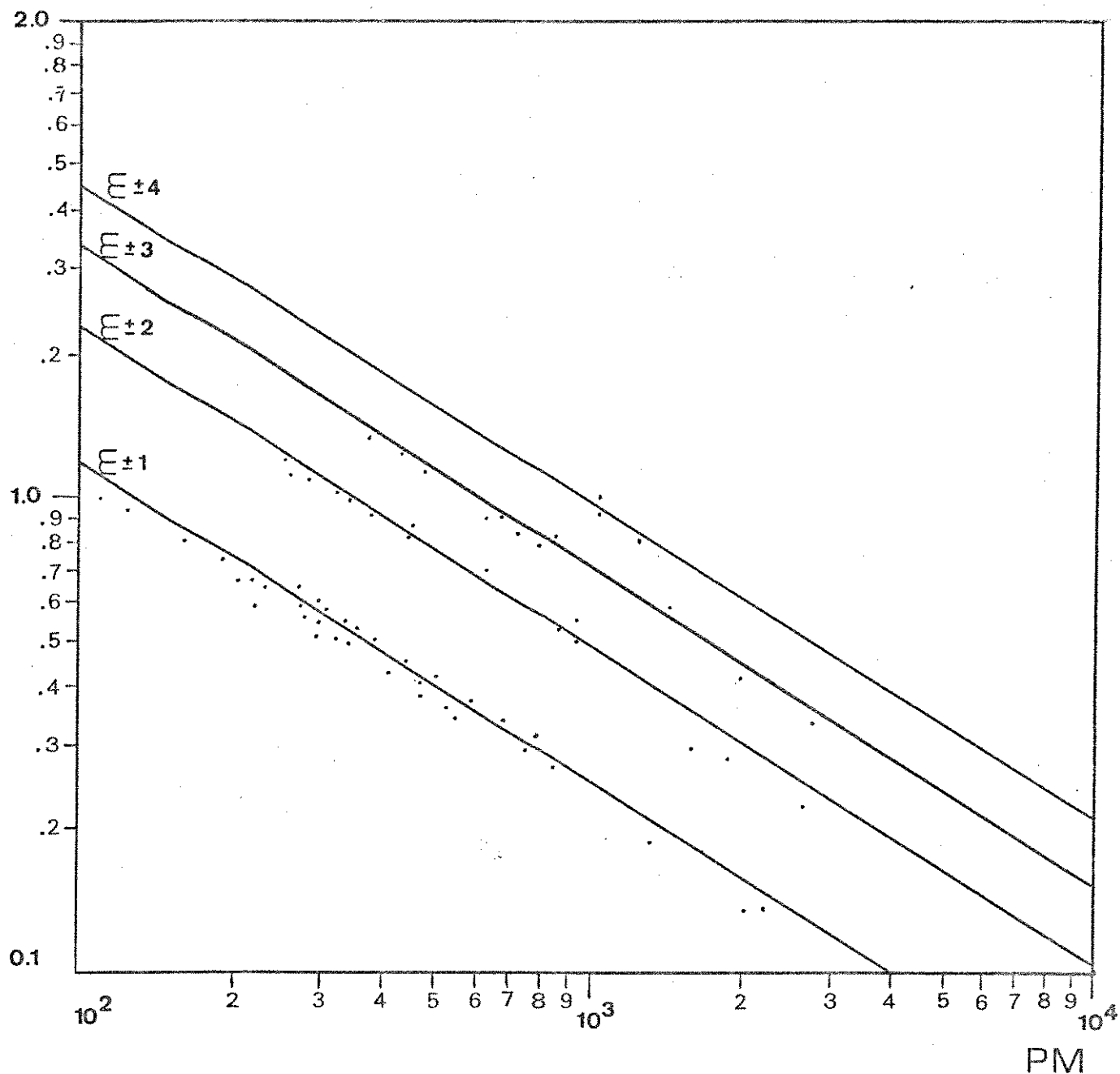


Figura 3- Gráfico de Offord (OFFORD, 1966) em escala ampliada (cedida pelo Dr. M.E. Lamm da New York University, N.Y., USA). Este gráfico exprime em escala logarítmica a mobilidade eletroforética em pH 6.5 em função do peso molecular para peptídeos sem histidina ou ácido cisteico. P.M.= peso molecular ; m= mobilidade ;  $\epsilon$ =carga líquida.

## 12 - OXIDAÇÃO COM ÁCIDO PERFÔRMICO

Peptídeos, contendo resíduo de cisteína na forma carboximetilada (CMCys), foram oxidados na etapa de purificação, sendo esse resíduo posteriormente identificado por cromatografia no auto analisador de aminoácidos como resíduo na forma de carboximetilcisteína sulfona (CMCysSO<sub>2</sub>).

Foram recortadas do mapa eletroforético as bandas radioativas, que contêm os peptídeos CMCys (HARRIS, 1967) e oxidados com vapor de ácido perfôrmico (solução oxidante: 50 ml de ácido fôrmico, 98% + 2,5 ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 30%) por 3 horas em um dessecador a temperatura ambiente. As bandas oxidadas foram removidas do dessecador e secadas sob uma capela, equipada com renovador de ar.

## 13 - REDUÇÃO E ALQUILAÇÃO RADIOATIVA

A proteína JJO foi dissolvida em tampão tris- HCl 0,27 M, pH 8,2, na concentração de 20 mg/ml (WOLFENSTEIN e colab. 1971). A proteína sofreu redução branda com solução recentemente preparada de ditioneitol (DTT, 10 mg/ml). Esta mistura foi incubada durante 60 minutos a temperatura ambiente sob atmosfera de nitrogênio.

A proteína, reduzida foi aquilada com ácido iodoacético ( $^{14}\text{C}$ ), 0,16 M, 0,75 mCi/nmol. A reação foi efetuada a temperatura ambiente durante 60 minutos e depois dializada contra ácido fórmico 5% por 24 horas.

#### 14 - DIGESTÃO ENZIMÁTICA

A proteína JJ0, parcialmente reduzida e carboximetilada foi digerida com pepsina (10 mg/ml, relação enzima/substrato 1:50) em ácido fórmico a 5% durante 16 horas à temperatura de  $37^{\circ}\text{C}$ , em banho maria, e em seguida liofilizada. Após a liofilização, o material foi dissolvido em bicarbonato de amônia 0,2 M pH 8,3 e digerida com tripsina (10 mg/ml, relação enzima/substrato 1:50) por um período de 4 horas a  $37^{\circ}\text{C}$  em banho maria e em seguida liofilizado.

#### 15 - TIPIFICAÇÃO QUÍMICA

O digesto pēptico-trīptico da proteína JJ0 parcialmente reduzida e carboximetilada, foi submetido a eletroforese de alta voltagem em pH 3,5. O digesto foi dissolvido em 100  $\mu\text{l}$

de  $H_2O$  e aplicado em banda situada a 12 cm da margem inferior de uma folha de papel Whatman nº 3 MM (60x40 cm), (FRANGIONE e colab., 1969a).

Os marcadores eletroforéticos foram aplicados na mesma linha traçada para aplicação da amostra, sendo aplicada uma diferença de potencial de 60 V/cm, durante 1 hora. O mapa foi retirado do tanque de eletroforese, e o excesso de varsol e do tampão eliminados em um forno com convecção forçada (Prescision Scientific) termoestabilizado a 80°C.

Os peptídeos radioativos foram detectados por autoradiografia, realizada da seguinte forma: o mapa eletroforético foi colocado em contato com uma chapa de raio X Sakura 35,6x43,2 cm em câmara escura por um período de tempo de 16 horas. A revelação da chapa de raio X foi feita por processamento automático no ambulatório de raio X da Faculdade de Medicina da UNICAMP.

As bordas laterais com os marcadores eletroforéticos foram recortadas do mapa e coradas com ninhidrina 0,2% em acetona

## 16 - PURIFICAÇÃO DOS PEPTÍDEOS RADIOATIVOS

Após a primeira dimensão a pH 3,5 as bandas, que contêm os peptídeos com radioatividade mais intensa, foram recortadas do mapa eletroforético e oxidadas com vapor de ácido

perfôrmico por 3 horas em um dessecador a temperatura ambiente. Esta oxidação converte as carboximetilcisteínas presentes em seu derivado sulfona mais anódico.

As bandas, após oxidação, foram costuradas em uma nova folha de papel Whatman nº 3 MM e submetidas a uma segunda dimensão em pH 3,5. O mapa eletroforético foi seco e autoradiografado como descrito anteriormente; as bandas, que contêm os peptídeos com radioatividade mais intensa, foram recortadas e purificadas sucessivamente por eletroforese de alta voltagem a pH 6,5 e pH 2,1. Todas as dimensões foram realizadas em um mesmo sentido de migração eletroforética.

A banda, contendo o peptídeo de interesse, foi recortada, e o material eluído com ácido fórmico a 5% e seco. Foi realizada hidrólise ácida desse material, e a composição de aminoácidos determinada no auto analisador de aminoácidos.

## 17 - MAPA DIAGONAL

O mapeamento diagonal foi feito segundo BROWN e colab. , 1963, 1966).

A proteína JJ0 reduzida e alquilada conforme descrito em Material e Métodos (12) foi dializada contra ácido fórmico 5% por 24 horas e submetida à digestão com pepsina (rela-

ção enzima/substrato, 1:50) por 16 horas a 37°C; em seguida foi liofilizada e dissolvida em uma solução de tripsina TPCK (relação enzima/substrato, 1:50) em bicarbonato de amônio 0,2M pH 8,3 por 4 horas a 37°C.

O digesto foi liofilizado, dissolvido em 0,1 ml de água desionizada e aplicado em uma banda de 5 cm em folha de papel Whatman nº 3 MM e submetido a eletroforese de alta voltagem a pH 3,5 por 1 hora, sendo aplicada diferença de potencial de 60V/cm. Peptídeos, contendo carboximetilcisteína (CMCys), foram detectados por autoradiografia.

A tira de papel, contendo a banda eletroforética, foi recortada e sofreu oxidação com vapor de ácido perbórico em um dessecador por 3 horas a temperatura ambiente.

Esta tira de papel contendo os peptídeos oxidados foi costurada em outra folha de papel whatman nº 3 MM e submetida a uma segunda eletroforese de alta voltagem nas mesmas condições anteriores, sendo que a direção dessa segunda dimensão foi em ângulo reto em relação à primeira.

Os peptídeos radioativos na segunda dimensão foram detectados por autoradiografia. O mapa peptídico foi corado com ninhidrina-cádmio, cuja solução contém acetato de cádmio 14 % (6 g de acetato de cádmio em ácido acético 30%) em ninhidrina 1% em acetona.

## 18 - DANSILAÇÃO

A determinação do resíduo N-terminal foi feita pelo método de dansil nas condições descritas por GRAY (1967,1972), utilizando-se reativo de dansil (cloro 1 dimetilaminoftaleno-5-sulfonil) da Sigma Chemical Co., St.Louis, Mo, USA.

O produto, obtido, foi identificado por cromatografia bidimensional em camada delgada de gel de poliamida (WOODS e colab., 1967), utilizando-se como referência um padrão de DNS-aminoácidos, obtido comercialmente (Sigma Chemical Co, St.Louis, Mo, USA).

Ao peptídeo ( $10^{-3}$   $\mu$ mol), dissolvido em 10 $\lambda$  de  $\text{NaHCO}_3$  0,2 M, foi acrescentado 10 $\lambda$  de uma solução de cloreto de dansil em acetona (10 mg/ml). A reação se processou a 37°C por 1 hora.

A hidrólise foi realizada em 50 $\lambda$  de HCl 6 N, contendo fenol (1 mg/ml) durante 16 horas a 110°C.

Os seguintes solventes foram utilizados na cromatografia bidimensional em placa de poliamida: 1ª dimensão: 1) ácido fórmico 1,5% (V/V); 2ª dimensão: 2) benzeno-ácido acético (9:1 V/V), 3) acetato de etila-ácido acético-metanol (20:1:1 V/V).

A localização do produto fluorescente foi feita por observação da placa à luz ultra-violeta, comparando-se as manchas, obtidas com as manchas do padrão, resolvido na outra face da placa.

## 19 - DEGRADAÇÃO DE EDMAN

A metodologia seguida baseou-se essencialmente na técnica descrita por EDMAN (1970), sendo adaptada na seguinte forma: para a degradação de EDMAN empregou-se um método manual, auxiliado por um dispositivo de incubação e secagem, que funciona permanentemente a vácuo ou a baixa corrente de nitrogênio.

O peptídeo (50-100 nmoles) é colocado em um tubo de vidro pirex (13,0x 0,9 cm), comumente usado para hidrólise ácida de proteínas. A etapa do acoplamento deu-se na presença de 50 µl de piridina-água (3:1; V/V) e com 2µl de fenilisotiocianato (PITC -grau de sequência). O tempo de reação foi de 45 minutos a uma temperatura constante de 50°C. Antes e durante a reação, efetuou-se um fluxo de nitrogênio, purificado em piroganol alcalino, para evitar a disulfuração oxidativa, EDMAN (1970). O conteúdo do tubo foi a vácuo em presença de pentóxido de fósforo (10 minutos). A etapa de ruptura e ciclização foi realizada com 200 µl de ácido trifluoracético (TFA), durante 15 minutos a 50°C. A secagem do material foi efetuada a vácuo durante 10 minutos em presença de NaOH, e o resíduo foi dissolvido em 200 µl de HCl 1 M e foi extraído três vezes com 200 µl de acetato de butila a 0°C.

Dos extratos obtidos com acetato de butila, a feniltioidantoina, resultante da conversão da correspondente anili-

notiazolinona, foi utilizada para a recuperação do resíduo N-terminal (EDMAN e colab. , 1956).

A conversão foi realizada a baixo fluxo de nitrogênio com 100  $\mu$ l de HCl 1 M, durante 10 minutos a 80°C, e após a secagem adicionou-se 100  $\mu$ l de HCl 6 M com mercaptoetanol(1: 2000 V/V); o material foi submetido alternadamente a vácuo e corrente de N<sub>2</sub> pelo menos por 4 vezes a temperatura de -20°C. Ao final, o tubo foi fechado a vácuo e hidrolizado a 130°C durante 24 horas; o resíduo foi detectado por análise de aminoácidos.

## 20 - DETERMINAÇÃO DO HAPLOTIPO

A metodologia,utilizada para o estudo (1) do haplotipo da proteína JJ0,é o da inibição da hemaglutinação passiva, cuja técnica baseia-se na possibilidade de fixar antígenos a superfície de hemácias ou partículas inertes ( coloide, latex etc), tornando-as aglutináveis pelos respectivos anticorpos.

Na inibição da hemaglutinação passiva, faz-se a mistura do antígeno ao soro contendo anticorpos, os quais reagem com o antígeno. Esta mistura colocada em presença do antígeno,adsorvido a superfície das hemácias ou partículas inertes , não mais produzirá a aglutinação passiva.

---

(1) Agradecemos a determinação do haplotipo da proteína JJ0 realizada pela Dra. Erna Van Loghem do Central Laboratory of the Netherlands, Red. Cross Blood Transfusion Service, Amsterdam

### III - RESULTADOS

## 1 - CONTROLES PRELIMINARES DA PROTEÍNA JJ0

A figura 4a mostra a eletroforese de soro humano normal, onde se nota a heterogeneidade molecular das gamaglobulinas, localizadas na região catódica. A figura 4b mostra a eletroforese do plasma do paciente JJ0, onde a região de gamaglobulina se apresenta como uma banda compacta, o que demonstra homogeneidade molecular característica de mieloma múltiplo monoclonal.

O perfil densitométrico do plasma humano mielomatoso (fig.5b), quando comparado com aquele do soro "normal", (fig.5a) evidencia concentração alta de gamaglobulina de mobilidade eletroforética restrita; observação compatível com quadro clínico característico de mieloma múltiplo.

## 2 - PURIFICAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DA PROTEÍNA JJ0

O fracionamento do plasma mielomatoso JJ0 em DEAE celulose é mostrado na figura 6. Foi obtida uma fração, que sai no tampão de equilíbrio da resina - fração A. Foi eluída em NaCl 1 M uma fração cromatográfica denominada RC.

O controle eletroforético da fração A, (fig.7c) mostra uma única banda homogênea e concentrada de mobilidade ele-

troforética compatível com gamaglobulina; não foram detectados traços de proteínas contaminantes. Em 7a e 7b são mostrados os controles do soro humano normal e do soro mielomatoso JJ0, onde se pode observar a presença do componente M característico.

A análise imunoeletroforética da fração A, obtida do plasma JJ0, revelado por soro de coelho anti soro humano normal (fig.8), evidencia um arco de precipitação correspondente a um único componente proteico de mobilidade eletroforética catódica compatível com a de gamaglobulina livre de contaminações de outras proteínas plasmáticas. Este antisoro evidencia (fig.8) no plasma JJ0 o arco de precipitação correspondente à paraproteína M, espesso e de mobilidade eletroforética restrita, o que é indicativo de homogeneidade molecular e concentração elevada.

A figura 9 mostra o controle imunoeletroforético de soro humano normal e da fração A, revelados com soro de coelho específico anti gamaglobulina humana. Notar que a fração A foi revelada como um único arco de precipitação típico na região de mobilidade eletroforética das gamaglobulinas, e confirma o resultado, obtido com soro de coelho anti soro humano normal. O arco correspondente à fração A é nitidamente mais estreito que aquele da gamaglobulina normal, o que indica homogeneidade.

A figura 10 mostra a fração A, revelada por soro de coelho anti cadeia leve do isotipo lambda e soro de coelho anti -kappa. Somente o soro anti cadeia leve do tipo lambda é capaz de precipitar a fração A. O soro específico anti cadeia kappa não reage com a fração A.

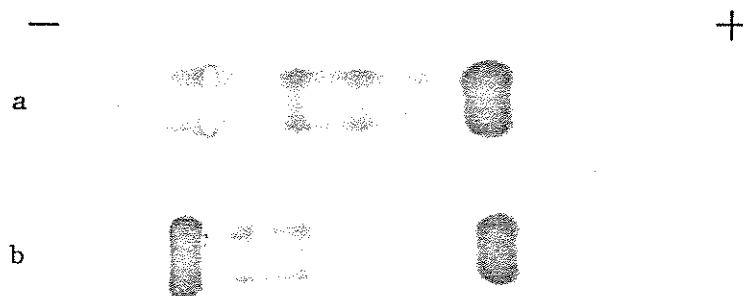
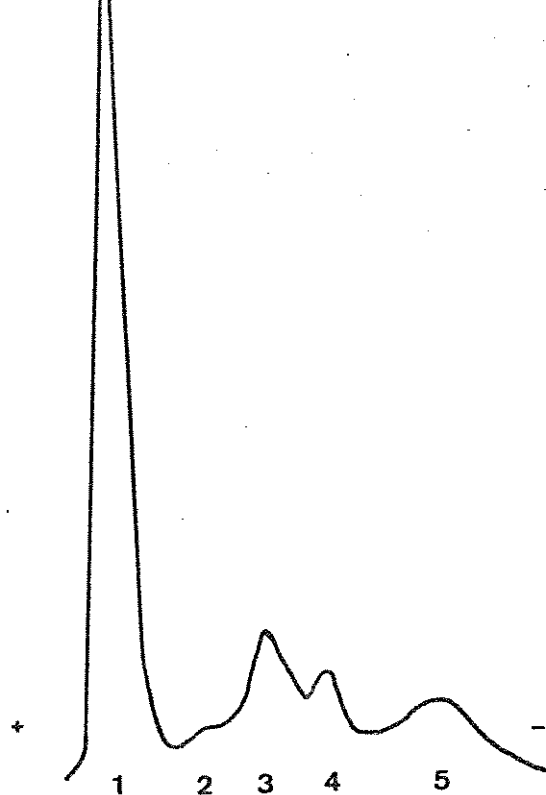
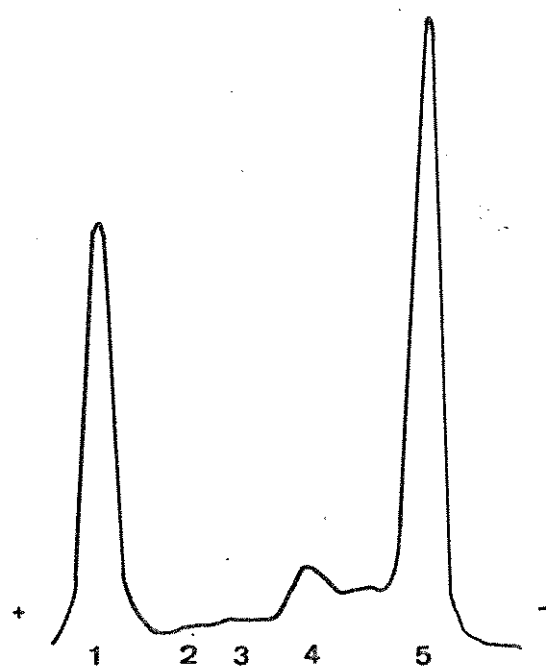


Figura 4- Controle eletroforético do plasma do paciente mielomatoso JJO (b) comparado com aquele do soro de indivíduo normal (a). Notar a banda monoclonal catódica presente no plasma de paciente com esse tipo de discrasia linfoproliferativa.



5a- Soro Humano Normal

| Proteínas   | %   | g/100 ml |
|-------------|-----|----------|
| 1- Albumina | 47  | 3.337    |
| 2- Alfa 1   | 5   | 0.355    |
| 3- Alfa 2   | 17  | 1.207    |
| 4- Beta     | 10  | 0.710    |
| 5- Gama     | 21  | 1.491    |
| Total       | 100 | 7.100    |



5b- Plasma Humano Mielomatoso(JJO)

| Proteínas   | %   | g/100 ml |
|-------------|-----|----------|
| 1- Albumina | 32  | 1.856    |
| 2- Alfa 1   | 3   | 0.174    |
| 3- Alfa 2   | 5   | 0.290    |
| 4- Beta     | 8   | 0.464    |
| 5- Gama     | 52  | 3.011    |
| Total       | 100 | 5.812    |

Figura 5- Perfil densitométrico de eletroforese em agarose de plasma humano mielomatoso(JJO) e de soro humano normal. No plasma JJO (fig.5b), a fração gamaglobulina está presente em alta concentração(3.011g/100ml), quando comparada com aquela do soro humano normal(1.491g/100ml)(fig.5a) e sua mobilidade eletroforética, restrita, fica evidenciada pelo pico estreito e de maior amplitude que aquele da proteína presente em maior concentração no soro humano normal que é a albumina.

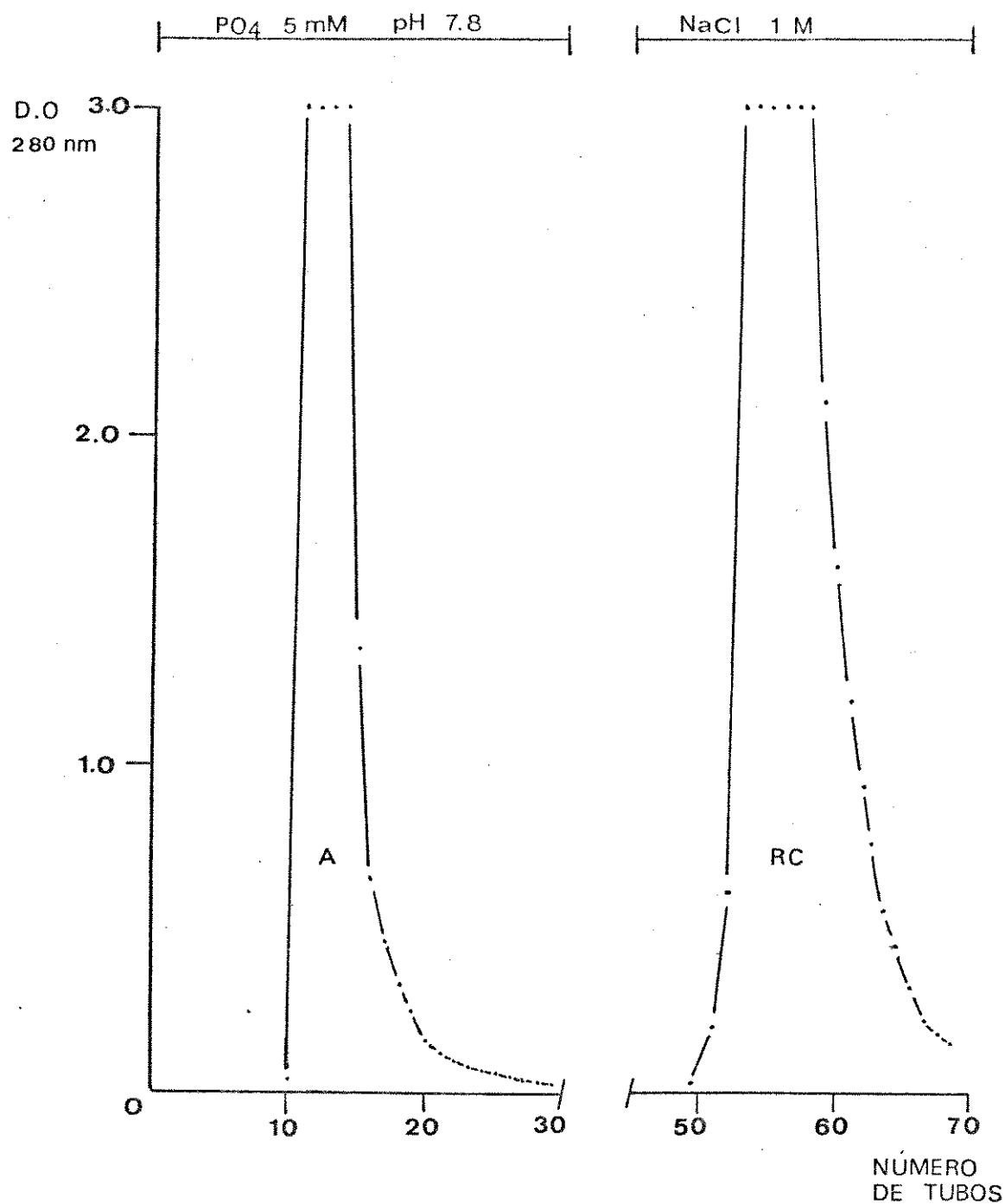


Figura 6- Cromatografia da fração pseudoglobulina do plasma JJO em coluna (2.0x40.0cm) de DEAE celulose, equilibrada em tampão fosfato (PO<sub>4</sub>) 5mM pH 7.8. O pico A é obtido no tampão de equilíbrio da coluna, e a fração RC é eluída em NaCl 1M. D.O.= densidade ótica.

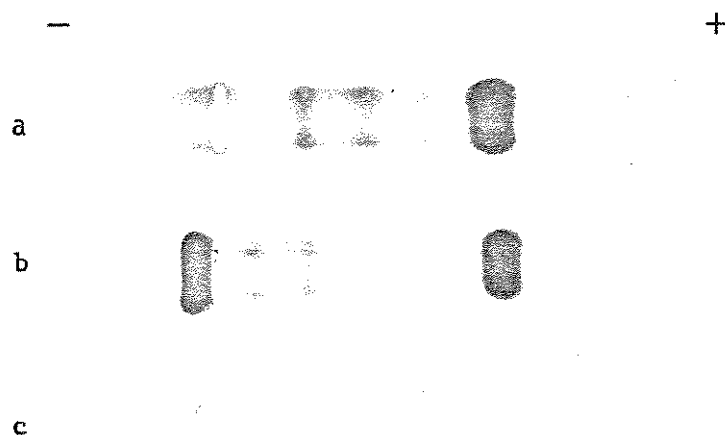


Figura 7 - Controle eletroforético de cromatografia em DEAE celulose do plasma do paciente JJ0. A fração A(c) apresenta uma única banda homogênea de mobilidade eletroforética catódica compatível com aquela do componente M do plasma JJ0 (observar ausência de proteínas contaminantes). Em (a) é mostrado o controle eletroforético do soro normal, onde se nota a heterogeneidade da fração gamaglobulina e em (b) o plasma mielomatoso JJ0 total, antes da cromatografia.

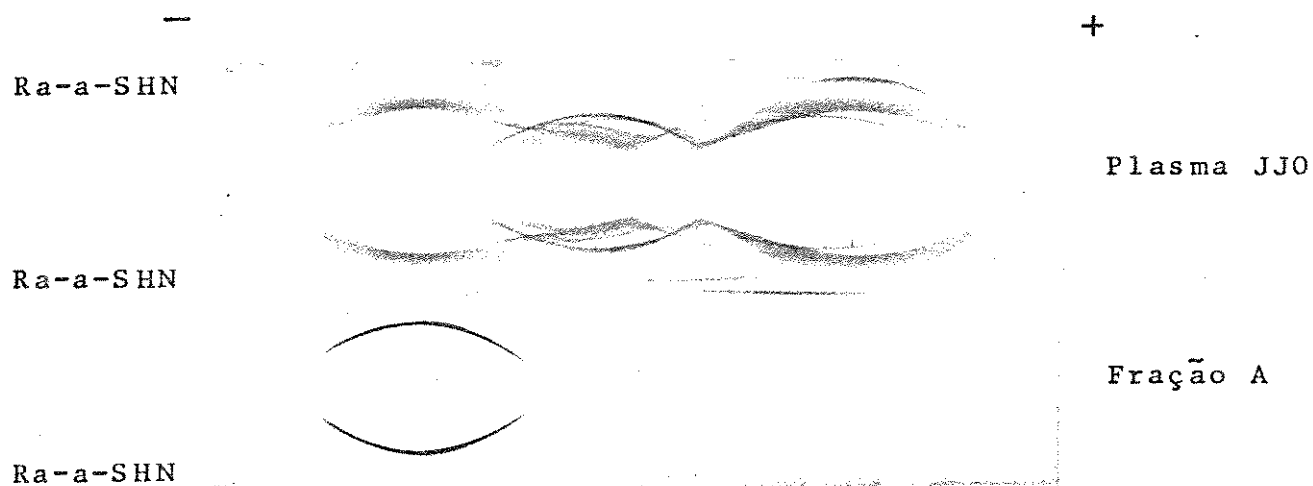


Figura 8- Análise imunoelctroforética da fração A obtida de cromatografia em DEAE celulose do plasma JJO, sendo utilizado nas canaletas soro de coelho antisoro humano normal(Ra-a-SHN). Esta fração mostra um único arco de precipitação típico gamaglobulina, livre de contaminações e que corresponde à paraproteína M purificada do plasma JJO. Este arco de precipitação (M) está presente no plasma JJO antes da purificação.



Figura 9 - Controle imunoelctroforético da fração A e soro humano normal utilizando-se como revelador soro de coelho anti gamaglobulina humana (Ra-a-GGH). A fração A se apresenta como um arco de precipitação de mobilidade eletroforética restrita compatível com aquela da paraproteína M, descrita em gamopatias monoclonais tipo mieloma múltiplo. O arco de precipitação correspondente às gamaglobulinas do soro humano normal (SHN) evidencia a heterogeneidade molecular esperada.

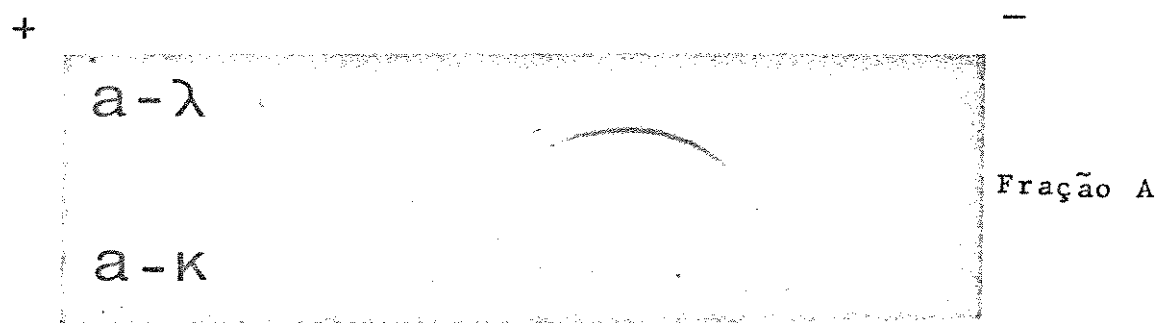


Figura 10 - Análise imunoeletroforética da fração A revela da com soro de coelho anti cadeia leve do tipo lambda ( $a-\lambda$ ) e anti cadeia leve do tipo kappa ( $a-\kappa$ ). Somente o soro an ti cadeia lambda é capaz de revelar a fração A. O soro de especificidade kappa não reage com esta fração.

A análise por imunodifusão dupla em gel de agar da fração A é mostrada na figura 11 (OUCHTERLONY, 1958). Somente o soro anti cadeia pesada IgG1 (b) deu reação de precipitação com a fração A (a); os outros antisoros de especificidade IgG2 (e), IgG3 (f) e IgG4 (g) não reagiram positiva com esta fração (2).

O antisoro de coelho anti soro humano normal (c) e soro de coelho específico anti gamaglobulina humana (d) revelaram uma única linha de precipitação, mostrando reação de identidade.

A proteína JJ0, purificada, foi submetida à análise de gel de poliacrilamida a 10% em SDS na forma não reduzida e reduzida em DTT 0.1 M.

Na forma não reduzida (fig.12.2) a proteína IgG(JJ0) não penetra no gel de corrida (devido ao peso molecular de 150000 daltons) e é identificada como uma banda de maior intensidade na interface gel da concentração-gel de corrida. Outras bandas de menor intensidade estão localizadas no topo do gel de corrida.

Na forma reduzida (fig.12.5) são identificadas duas bandas: uma, correspondente ao peso molecular em torno de 50K (50000 daltons)(Banda A) e outra, de peso molecular ao redor de

---

(2) Agradecemos ao Dr.Marco A.Pizzolato, chefe do Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Farmacia y Bioquímica, Universidade de Buenos Aires, Argentina pela cessão dos antisoros específicos anti IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 utilizados.

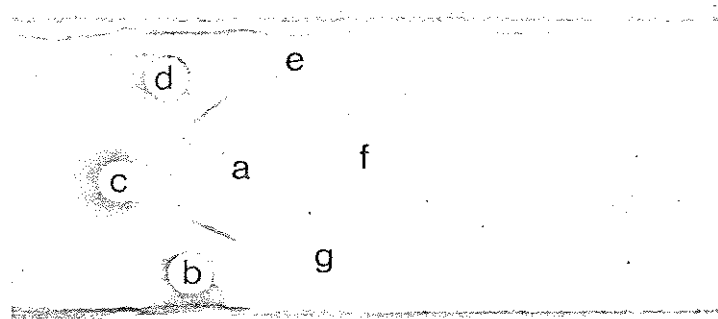


Figura 11- Imunodifusão dupla em gel de agar da fração A(a) contra antisoros específicos anti cadeia pesada dos tipos IgG1(b), IgG2(e), IgG3(f) e IgG4(g). Somente o antisoro anti cadeia pesada IgG1 deu reação de precipitação com a fração A. Os demais não reagiram. Antisoro anti soro humano normal (c) e antisoro anti fração gamaglobulina humana (d) reagiram com a fração A.

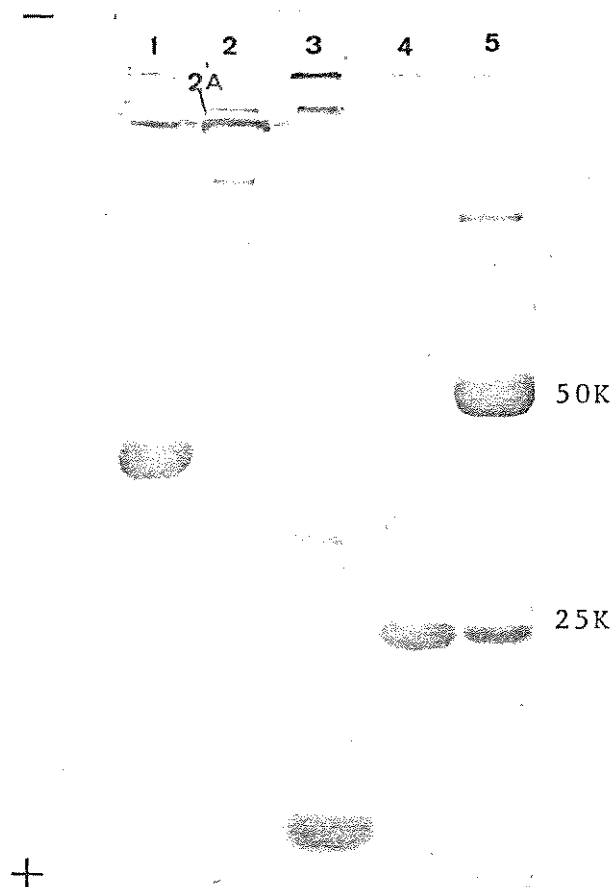


Figura 12- Eletroforese em gel de poliacrilamida (10%) em SDS da proteína JJO não reduzida (2) e reduzida em DTT 0.1 M (5). Observa-se bandas de 50K e 25K após a redução da proteína purificada. A proteína JJO não reduzida se apresenta como uma banda principal (2A) na região limítrofe do gel de corrida e o gel de concentração. Ovalbumina, citocromo C mioglobina (3) e proteína de Bence Jones na forma dimérica (1) e na forma monomérica (reduzida com DTT) (4), foram utilizados como marcadores de peso molecular.

25K (25000 daltons) (Banda B). Bandas de intensidade fraca são reveladas pelo corante Comassie Blue 0,1%. Os marcadores, utilizados para determinação de peso molecular, foram aplicados conforme indicado na figura 10.

### 3 - TIPIFICAÇÃO QUÍMICA

A proteína JJ0, purificada, reduzida, alquilada e submetida a digestão peptico-trípica, foi aplicada em banda em folha de papel Whatman 3 MM e tipificada quimicamente como descrito em Material e Métodos. Os resultados (figura 13) mostram quatro bandas radioativas, denominadas J1, J2, J3 e J4, com mobilidade eletroforética em pH 3,5, expressa em relação ao depeptídeo Gly-Ala, tomado como valor 1.

A banda mais intensa (J2) é a banda que migra na região eletroforética de  $\epsilon$ -DNP-Lys a pH 3,5 (região dos peptídeos neutros) e possui mobilidade eletroforética de -0.1.

Na região catódica está presente uma banda radioativa (J1) de mobilidade -0.21.

Na região anódica entre  $\epsilon$ -DNP-Lys e ácido glutâmico situa-se a banda radioativa J3 de mobilidade eletroforética -0.36. Nesta mesma região entre ácido glutâmico e ácido aspártico, nota-se a banda J4 de mobilidade eletroforética -0.98.

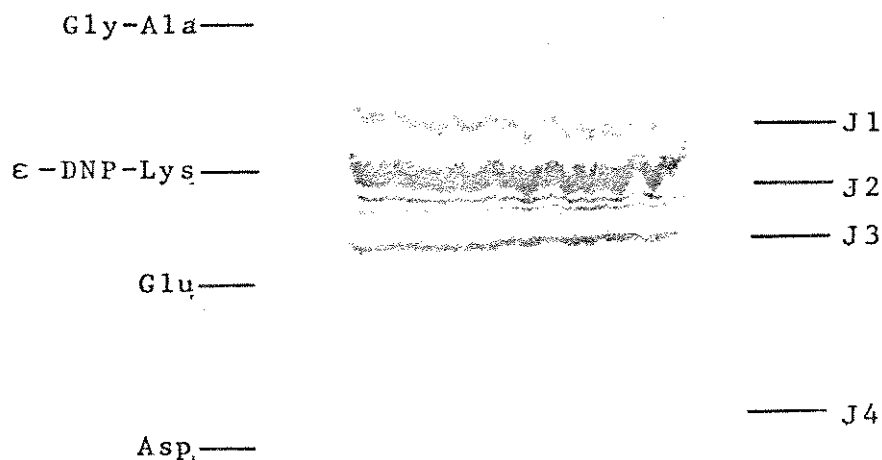


Figura 13- Autoradiografia obtida após eletroforese de alta voltagem a pH 3.5 do digesto p  ptico-tr  ptico da proteína JJ0 parcialmente reduzida e alquilada com iodoacetato  $C^{14}$ . JJ0 é uma imunoglobulina G de cadeia pesada do tipo gama 1, onde são observados facilmente quatro bandas principais: uma de maior radioatividade (J2), localizada na região dos peptídeos neutros (mobilidade eletroforética de  $\epsilon$ -DNP-Lys), uma banda catódica (J1) de mobilidade  $m = -0.21$  e duas bandas radioativas J3 e J4 observadas na região anódica, cuja mobilidade eletroforética     $m = -0.36$  e  $m = -0.98$  respectivamente. Do lado esquerdo da figura estão indicadas as posi  es de referência dos marcadores eletroforéticos: Asp, Glu,  $\epsilon$ -DNP-Lys (mobilidade zero) e Gly-Ala.

#### 4 - PURIFICAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DOS PEPTÍDEOS RADIOATIVOS

A figura 14 mostra as bandas radioativas que correspondem aos peptídeos J1, J2 e J3 em pH 3,5 e 6,5.

As figuras 15, 16 e 17 mostram os cromatogramas das análises de aminoácidos do material purificado, contido nas bandas J1, J2 e J3.

A composição de aminoácidos dos peptídeos J1, J2, J3 e J4 é apresentada nas tabelas 1, 2, 3 e 4 respectivamente.

A composição de aminoácidos de J1 (tabela 2) demonstra a presença do peptídeo (Ser, Cys, Asp, Lys). A análise deste peptídeo pela técnica de Dansyl-Edman mostra a presença de Ser como resíduo N-terminal. Este peptídeo também foi caracterizado por sua mobilidade eletroforética a pH 6,5 ( $m = 0.38$ ) e a pH 3.5 ( $m = -0.21$ ), ver tabela 2.

A composição de aminoácidos do peptídeo J2 (tabela 3) é a seguinte: Thr, His, Thr, Cys, Pro, Pro, Cys, Pro, Ala, Glu, Leu; onde se destaca o conteúdo de quatro resíduos de prolina e de dois resíduos de cisteína. A análise pela técnica de Dansyl-Edman confirma a presença de Thr e His como resíduos N-terminais.

Este peptídeo também é caracterizado por sua mobilidade eletroforética a pH 6,5 ( $m = 0.56$ ) e a pH 3,5 ( $m = -0.1$ ) (ver tabela 3).

A análise de aminoácidos de peptídeo J3 (tabela 4) mostra a composição (Pro, Thr, Glu, Cys, Ser), e a análise de Dansyl-Edman confirma a presença de Pro e Thr como resíduos N-terminais. Este peptídeo também foi caracterizado por sua mobilidade eletroforética a pH 6,5 ( $m = 0.85$ ) e pH 3,5 ( $m = -0.36$ ), ver tabela 4.

A composição global de aminoácidos do peptídeo J4 indica, que se trata de um dipeptídeo Cys, Ser, e possui mobilidade eletroforética a pH 3,5 de  $m = -0.98$ .

## 5 - PEPTÍDEOS COMPROMETIDOS COM AS PONTES DISSULFETO INTER CADEIA.

A figura 18 mostra o mapeamento diagonal da proteína JJ0, obtido após oxidação perfórmica e nova eletroforese em relação a primeira dimensão.

Na parte inferior da figura, está localizada a autoradiografia da eletroforese em pH 3,5 do digesto peptídico-trípico da proteína JJ0, parcialmente reduzida a carboximetilada (1ª dimensão), onde são detectadas as bandas J1, J2, J3 e J4, mostrando radioatividade intensa.

As manchas radioativas fora da diagonal correspondem aos peptídeos J1, J2, J3 e J4, obtidos na primeira dimensão.

## 6 - HAPLOTIPO DA PROTEÍNA JJ0

---

Os resultados de determinação do haplotipo caracterizam a paraproteína JJ0 como IgG1 G1m(zax).

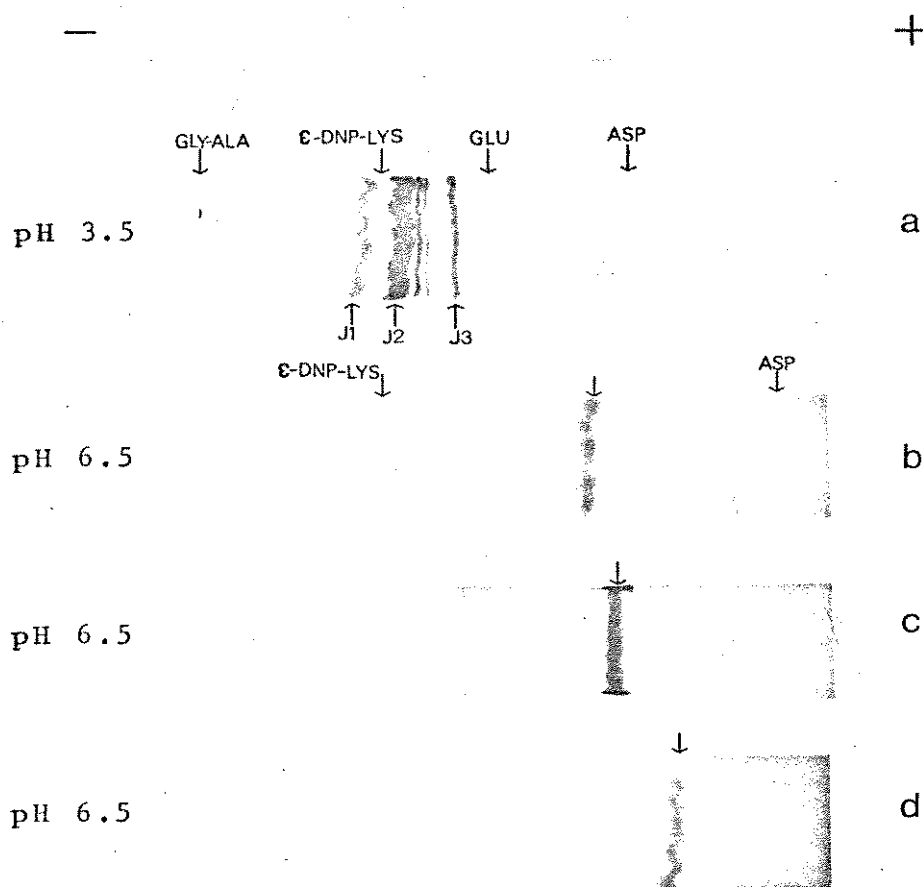


Figura 14- Eletroforese de alta voltagem em pH 6.5 dos peptídeos J1(b), J2(c) e J3(d) purificados. Os peptídeos foram obtidos após tipificação química da proteína, como é mostrado em (a). Estes peptídeos mostram mobilidade eletroforética característica: em pH 6.5, J1, J2 e J3 apresentam respectivamente mobilidade eletroforética de 0.38, 0.56 e 0.85 em relação ao marcador de região anódica, que é o ácido aspártico, tomado como valor 1; em pH 3.5 J1, J2 e J3 mostram respectivamente mobilidade eletroforética de -0.21, -0.1 e -0.36 em relação ao dipeptídeo Gly-Ala, tomado como valor 1.

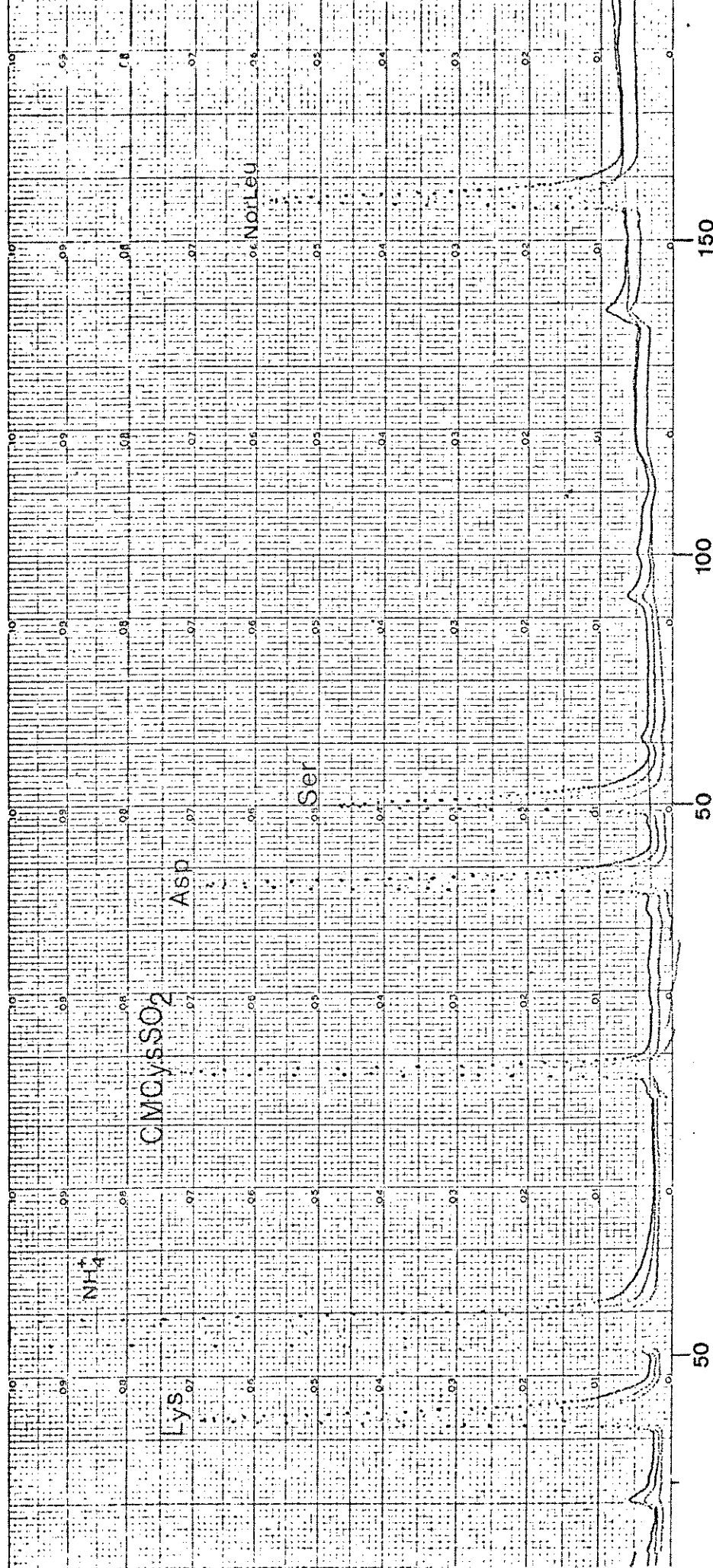


Figura 15- Registro gráfico da análise de aminoácidos do material eluido da banda radioativa J1 após purificação.

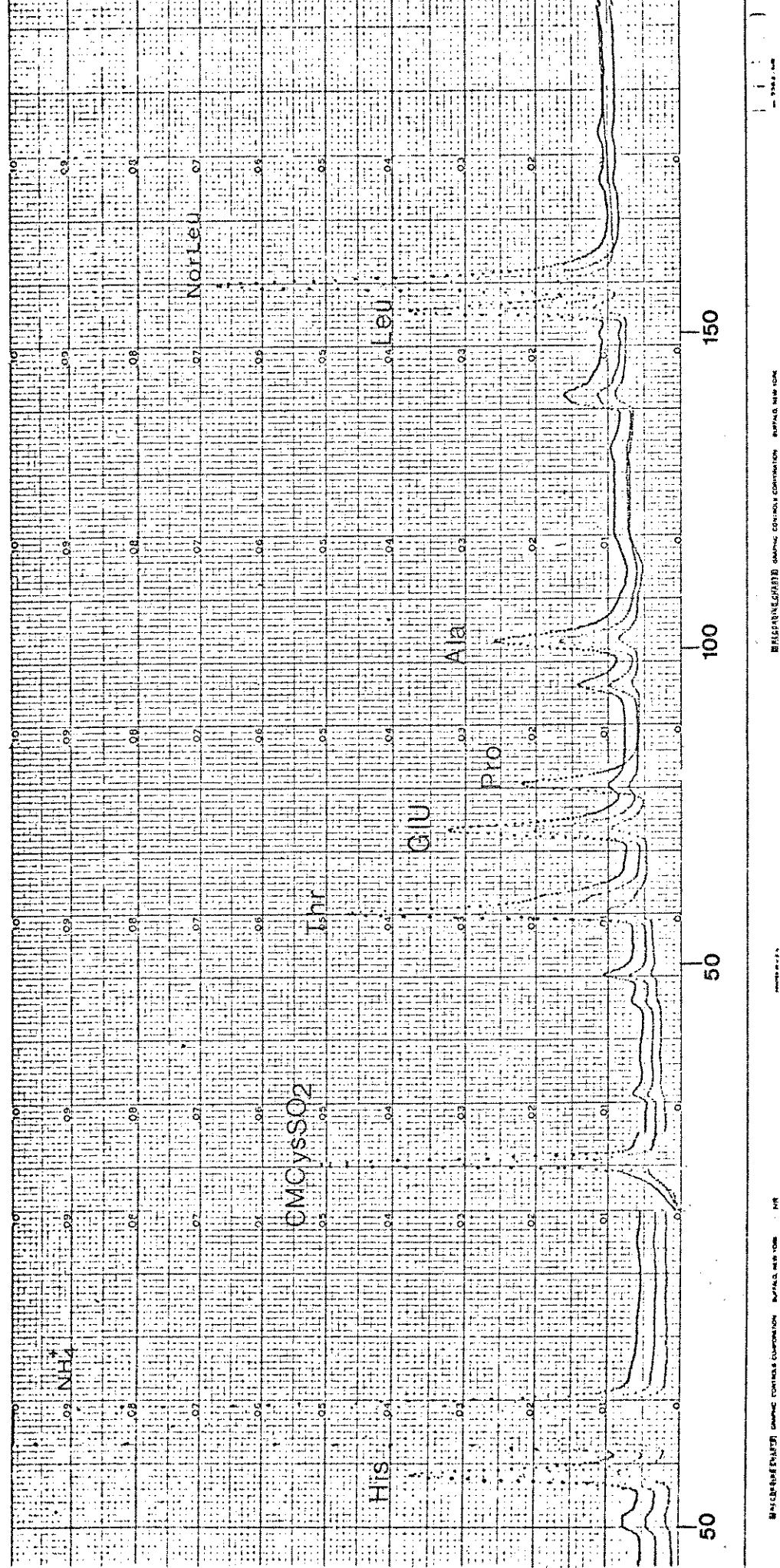
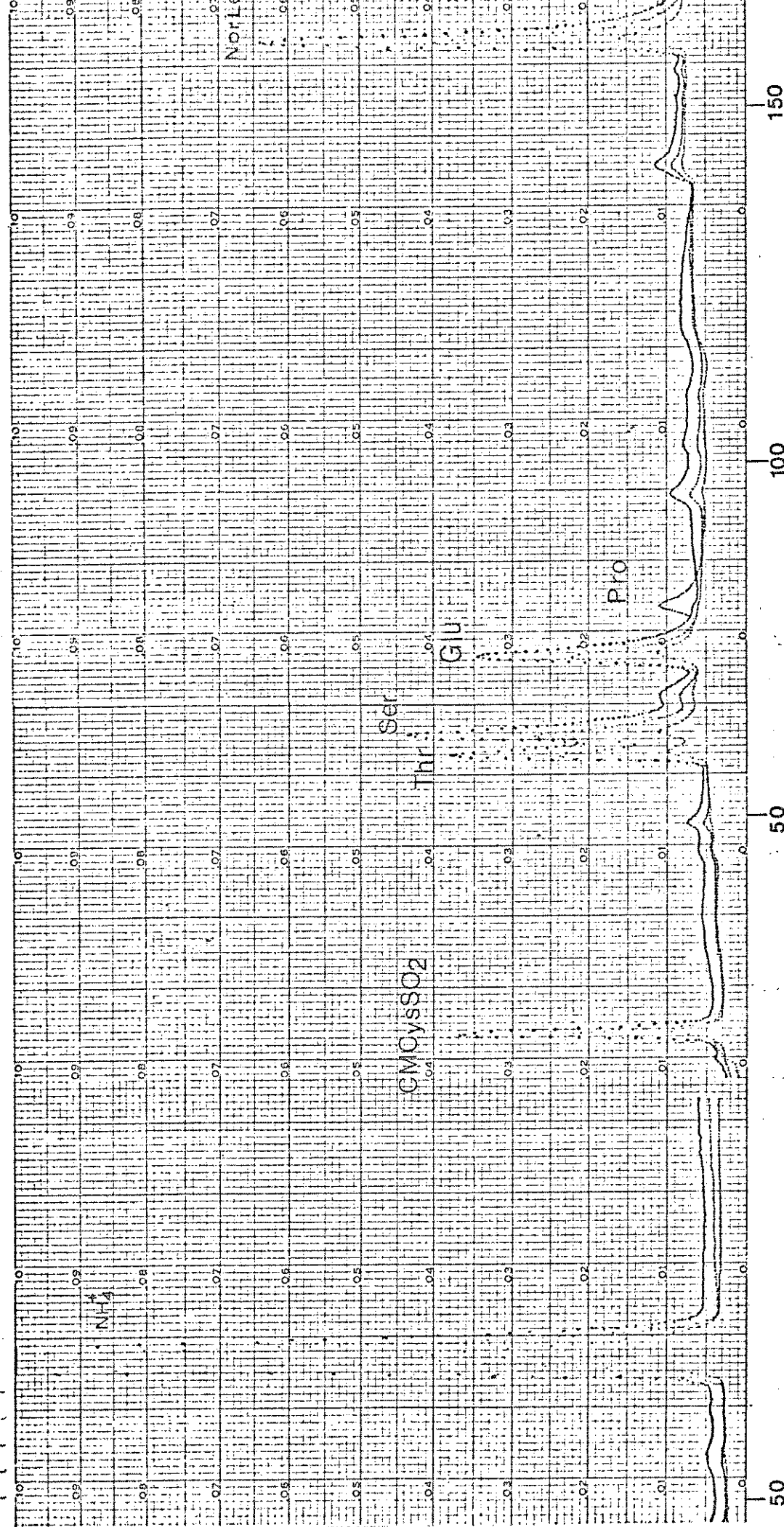


Figura 16- Registro gráfico da análise de aminoácidos do material eluído da banda radioativa J2 após purificação.



SHIMADZU SCIENTIFIC INSTRUMENTS CORPORATION BUFFALO, NEW YORK

Model 10-5A

SHIMADZU SCIENTIFIC INSTRUMENTS CORPORATION BUFFALO, NEW YORK

Figura 17- Registro gráfico da análise de aminoácidos do material eluído da banda radioativa J3 após purificação.

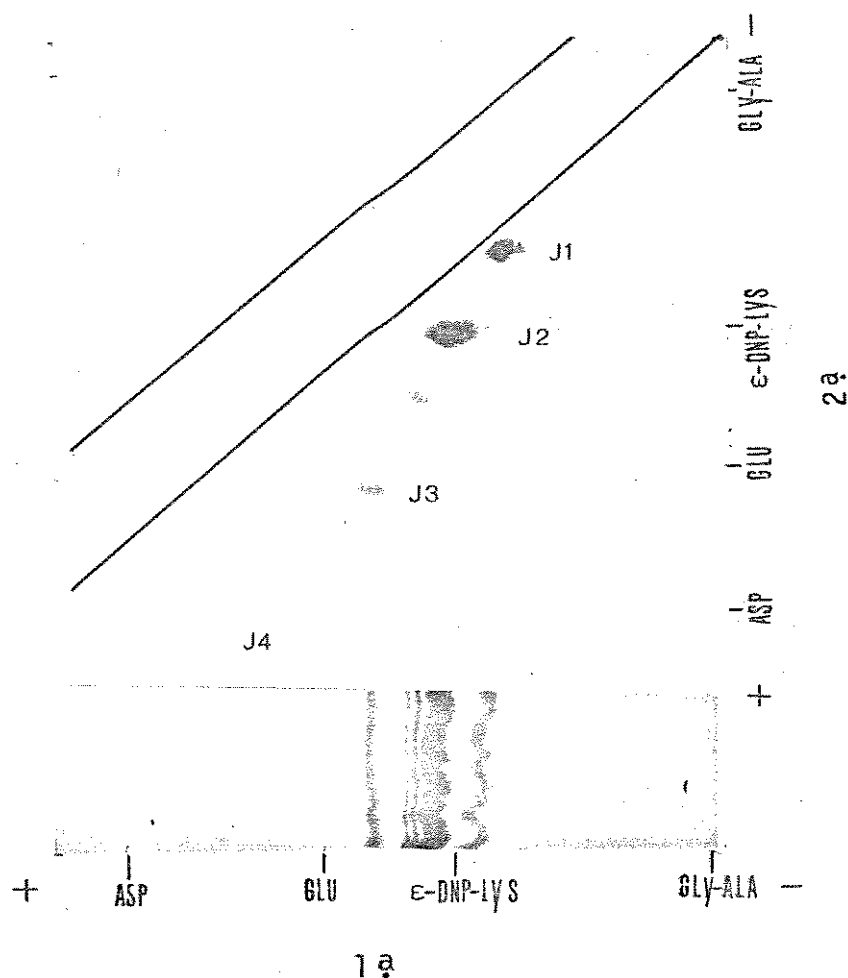


Figura 18- Mapa diagonal da proteína JJO submetida a uma redução branda com DTT e alquilada com ácido iodoacético  $C^{14}$  e submetida a digestão peptídica-trípica. O digesto foi submetido a eletroforese de alta voltagem a pH 3.5 (1ª dimensão), e os peptídeos, contendo carboximetilcisteína (CMCys), foram detectados por autoradiografia (parte inferior da figura). Após oxidação perfôrmica, foi realizada a segunda dimensão em eletroforese a pH 3.5 em sentido perpendicular a 1ª dimensão, e os peptídeos, contidos na diagonal delimitados por traçado de linha cheia. Os peptídeos J1, J2, J3 e J4, localizados fora da diagonal, foram identificados. O peptídeo J1 corresponde ao peptídeo H-L de cadeia pesada que faz a junção com a cadeia leve. O peptídeo J2 corresponde ao peptídeo H-H de cadeia pesada, que contém as pontes dissulfeto intercadeias pesada. O peptídeo J3 corresponde ao peptídeo L C-terminal de cadeia leve do tipo lambda. O peptídeo J4 corresponde ao dipeptídeo Cys-Ser. Os marcadores eletroforéticos estão indicados na parte lateral da figura.

TABELA 1

COMPOSIÇÃO DE AMINOÁCIDOS, MOBILIDADE ELETROFORÉTICA E DETERMINAÇÃO DO RESÍDUO N-TERMINAL DO PEPTÍDEO J1

| Resíduos             | J1                               |
|----------------------|----------------------------------|
|                      | moles de resíduo/mol de peptídeo |
| CMCysSO <sub>2</sub> | 0.93 (1) <sup>(b)</sup>          |
| Lys                  | 1.11 (1)                         |
| Asp                  | 1.12 (1)                         |
| Ser <sup>(a)</sup>   | 0.83 (1)                         |
| mobilidade pH 6.5    | 0.38                             |
| mobilidade pH 3.5    | -0.21                            |
| N-terminal           | Ser                              |

(a)- Valor não corrigido para tempo zero de hidrólise

(b)- Entre parênteses o valor teórico integral

TABELA 2

COMPOSIÇÃO DE AMINOÁCIDOS, MOBILIDADE ELETROFORÉTICA E DETERMINAÇÃO DO RESÍDUO N-TERMINAL DO PEPTÍDEO J2.

| Resíduos             | J2                               |
|----------------------|----------------------------------|
|                      | moles de resíduo/mol de peptídeo |
| CMCysSO <sub>2</sub> | 1.41 (2) <sup>(b)</sup>          |
| His                  | 1.30 (1)                         |
| Thr <sup>(a)</sup>   | 1.62 (2)                         |
| Glu                  | 1.34 (1)                         |
| Pro                  | 3.96 (4)                         |
| Ala                  | 1.22 (1)                         |
| Leu                  | 1.15 (1)                         |
| mobilidade pH 6.5    | 0.56                             |
| mobilidade pH 3.5    | -0.1                             |
| N-terminal           | Thr                              |

(a)- Valor não corrigido para tempo zero de hidrólise

(b)- Entre parênteses, o valor teórico integral

Tabela 3

COMPOSIÇÃO DE AMINOÁCIDOS, MOBILIDADE ELETROFORÉTICA E DETERMINAÇÃO DO RESÍDUO N-TERMINAL DO PEPTÍDEO J3

| Resíduos             | J3                               |
|----------------------|----------------------------------|
|                      | moles de resíduo/mol de peptídeo |
| CMCysSO <sub>2</sub> | 0.69 (1) <sup>(b)</sup>          |
| Thr <sup>(a)</sup>   | 0.94 (1)                         |
| Ser                  | 1.30 (1)                         |
| Glu                  | 0.99 (1)                         |
| Pro                  | 1.08 (1)                         |
| mobilidade pH 6.5    | 0.85                             |
| mobilidade pH 3.5    | -0.36                            |
| N-terminal           | Pro                              |

(a) - Valor não corrigido para tempo zero de hidrólise

(b) - Entre parênteses, o valor teórico integral

TABELA 4

COMPOSIÇÃO DE AMINOÁCIDOS E MOBILIDADE ELETROFORÉTICA DO PEPTÍDEO J4

| Resíduos             | J4                               |
|----------------------|----------------------------------|
|                      | moles de resíduo/mol de peptídeo |
| CMCysSO <sub>2</sub> | 0.83 (1) (a)                     |
| Ser (a)              | 1 (1)                            |
| mobilidade pH 3.5    | -0.98                            |

(a)- Valor não corrigido para tempo zero de hidrólise

(b)- Entre parênteses, o valor teórico integral

#### IV-D I S C U S S Ã O

Mieloma múltiplo é um tipo de imunoglobulinopatia, derivado da super produção de imunoglobulinas de um único clone de plasmócitos originado de uma única célula "progenitora", que se torna neoplásica.

O alto grau de homogeneidade da paraproteína M é característico de imunoglobulinopatias monoclonais do tipo mieloma múltiplo e oferece oportunidade de se fazer análise físico-química refinada, importante para a compreensão do papel biológico da molécula de anticorpo.

A proteína monoclonal IgG1 constitui aproximadamente 75% dos casos de mieloma múltiplo do tipo IgG estudados (GREY e colab., 1964; MACKENZIE e colab., 1972).

É muito importante a estocagem à baixa temperatura ( $-70^{\circ}\text{C}$ ) do plasma paraproteinêmico logo após a coleta, o que favorece a preservação de suas propriedades físico-químicas e biológicas.

Os resultados de análise eletroforética, seguida de densitometria do plasma JJ0, são característicos de caso típico de mieloma múltiplo monoclonal com paraproteína M de migração eletroforética gama. A banda compacta de mobilidade eletroforética tipo gamaglobulina lenta indica homogeneidade molecular característica de gamopatia monoclonal.

O controle eletroforético da fração A, obtida de cromatografia de troca iônica em DEAE celulose do plasma patológico JJ0, evidencia a purificação do componente M mielomatoso, li-

vire de contaminações de outras proteínas plasmáticas, o que atesta a eficiência da metodologia de separação.

A análise imunoeletroforética do fracionamento do plasma JJ0 confirma a presença da paraproteína M (JJ0) purificada, em concentração elevada sob a forma de um único arco de precipitação catódico de migração eletroforética característica de gamaglobulina lenta, o que corrobora os resultados obtidos do controle eletroforético.

Os imune-soros de diferentes especificidade tipificaram sorologicamente a fração A, obtida de cromatografia de troca iônica do plasma JJ0, como uma imunoglobulina IgG do isotipo IgG1 portadora de cadeias leves do tipo antigênico lambda. A ausência de reação de precipitação entre a fração A e o imuno-soro específico anti cadeias leves do isotipo kappa sugere que o componente M purificado está livre de contaminações de proteínas séricas constituintes do espectro total de IgG.

A presença de uma única banda correspondente à fração A não reduzida em PAGE/SDS (eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio) evidencia o grau de pureza do componente M (JJ0). As bandas eletroforéticas de peso molecular em torno de 50000 e 25000 daltons (determinado em relação a marcadores de peso molecular conhecido) em PAGE/SDS da amostra reduzida com DTT podem ser interpretadas como as cadeias polipeptídicas H (cadeia pesada) e L (leve) constituintes do modelo tetramérico de IgG. Esta é uma evidência, que confirma o

grau de pureza da proteína mielomatosa JJ0, e que estimula a realização de estudos imunoquímicos em nível molecular.

O número, arranjo das pontes dissulfeto intercadeia polipeptídica H (pesada) e L (leve) e a sequência de aminoácidos dos peptídeos, envolvidos nas junções inter H-H e inter H-L, caracterizam cada classe e subclasse de imunoglobulinas ( COHEN e colab., 1967; FRANGIONE e colab., 1969a ; DORRINGTON, 1978).

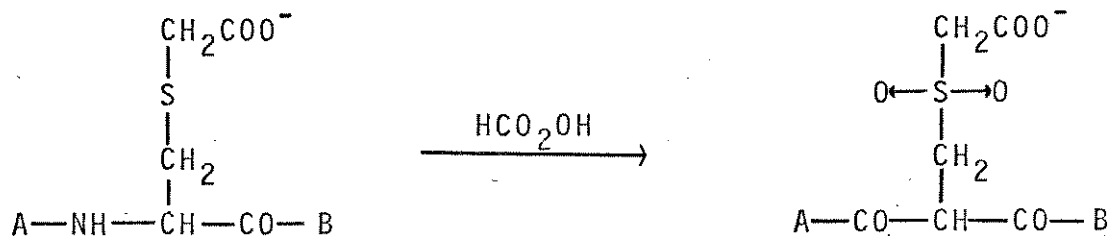
Para a tipificação química da proteína M (JJ0) foram purificados, caracterizados e isolados os peptídeos comprometidos com as pontes dissulfeto intercadeia. A tipificação química (FRANGIONE e colab., 1969a), baseada essencialmente na redução branda das pontes dissulfeto intercadeia seguida de alquilação radioativa e eletroforese de alta voltagem do digesto peptico-tríptico, fornece um "pattern" autoradiográfico característico de cada isotipo. Esta metodologia tem a vantagem de dispensar o soro imune-específico, propiciando uma classificação em base química.

Os peptídeos carboximetilados, que participam das pontes dissulfeto intercadeia (FRANGIONE e colab., 1969a), apresentam a seguinte estrutura e mobilidade eletroforética:

| TIPO | FRAGMENTO PEPTICO-TRÍPTICO                  | MOBILIDADE |        |
|------|---------------------------------------------|------------|--------|
|      |                                             | pH 3.5     | pH 6.5 |
| L    | Pro-Thr-Glu-Cys-Ser                         | -0.22      | 0.85   |
| H-L  | Ser-Cys-Asp-Lys                             | -0.21      | 0.38   |
| H-H  | Thr-His-Thr-Cys-Pro-Pro-Cys-Pro-Ala-Glu-Leu | -0.10      | 0.56   |

Da autoradiografia da eletroforese em pH 3.5 do digesto pēptico-trīptico da proteīna JJ0 reduzida e carboximetilada, foi obtido um "pattern" caracterīstico da subclasse IgG1 com cadeias leve do isotipo lambda, onde as bandas radioativas J1, J2 e J3 contēm os peptīdeos H-L, H-H e L respectivamente. A presença de outras bandas radioativas na região de mobilidade eletroforētica do peptīdeo H-H pode ser interpretada como decorrente do tempo de digestão trīptica. Apōs quatro horas de digestão, surge uma banda adicional, que contēm o peptīdeo H-L unido ao peptīdeo H-H, e que nāo estā presente apōs oito horas de digestão (FRANGIONE e colab., 1969a). Este peptīdeo grande (HL+HH) contēm trēs resīduos CMCys (carboximetilcisteina), e ē proveniente de digestão incompleta na altura do resīduo de Lys (222) situada entre os peptīdeos H-L e H-H. Esta digestão incompleta ē devido ā presença de um grupo polar (Asp) vizinho ao resīduo de Lys, o que diminue a velocidade de hidrōlise (NEEDLEMAN, 1970).

Utilizando o conhecimento, que peptīdeos com carboximetilcisteina podem ser oxidados para a forma sulfona segundo a reação:



foram purificados os peptīdeos, que caracterizam a cadeia pesada e cadeia leve da proteīna JJ0.

Após oxidação o valor de pK do grupo S - carboximetil (pK = 4.0) vizinho ao átomo de enxofre sofre uma alteração e se aproxima das propriedades de um grupamento  $\alpha$ -carboxila (pK=2.0).

Na eletroforese em pH 3.5 este grupo permanece ionizado e resta uma fração de carga elétrica, que altera a mobilidade do peptídeo oxidado. Em pH 6.5 os peptídeos contaminantes com mobilidade eletroforética idêntica, devido à ionização das carboxilas  $\beta$  e  $\gamma$  de ácido aspártico e ácido glutâmico (pK<sub>2</sub>Asp= 3.90, pK<sub>2</sub>Glu= 4.2, BAILEY, 1967), permanecem inertes ao tratamento de oxidação e suas cargas em pH 3.5 estão atenuadas e suas mobilidades eletroforéticas correspondentes estão consequentemente alteradas. Em pH 3.5 os peptídeos contaminantes, que não possuem grupamentos laterais ionizáveis, não têm sua mobilidade modificada.

Durante as etapas de purificação do peptídeo H-H da proteína JJ0 foram detectadas três bandas radioativas contaminantes de menor intensidade, cujas composições de aminoácidos foram compatíveis com a da banda principal. Este resultado é explicado pela oxidação incompleta dos dois resíduos CMCys presentes neste peptídeo (FRANGIONE e colab., 1968).

A análise de aminoácidos do peptídeo J1 mostra uma composição típica do peptídeo H-L. A presença de Asx justifica determinar o grau de amidação deste aminoácido, que pode ser deduzido a partir do valor de mobilidade medida a pH 6.5 e do peso molecular calculado da análise de aminoácidos. A figura 3 re

produz o gráfico de Offord, que relaciona a mobilidade eletroforética dos peptídeos em função da carga e do seu peso molecular (OFFORD, 1966). Para o valor de mobilidade  $m = 0.38$  e um  $PM = 542$ , o valor de carga corresponde a  $\epsilon = -1$ , o que permite concluir que Asx corresponde a um resíduo de ácido aspartico e não de asparagina (Asn). Esses resultados, somados àqueles que mostram serina como resíduo amino terminal, confirmam o isolamento peptídico de cadeia pesada, que fez a junção H-L através de uma ponte dissulfeto.

A composição de aminoácidos do peptídeo J2 indica a presença de Glx, cujo estado de amidação foi deduzido pelo gráfico de Offord. Para o valor de mobilidade  $m = 0.56$  e um  $PM=1344$  o valor de carga corresponde a  $\epsilon = -2.5$ ; este valor fracionário é esperado devido ao âmbito do valor de  $pK$  do grupamento imidazóil (5.8 - 7.5), que faz com que peptídeos, contendo histidina se comportam de maneira imprevisível em pH 6.5 (OFFORD, 1966). Esses valores indicam a presença de ácido glutâmico e não de glutamina (Gln).

A presença de quatro prolina neste peptídeo é muito importante pelo fato deste resíduo alterar a estrutura  $\alpha$ -hélice das cadeias polipeptídicas (BAILEY, 1967), o que confere flexibilidade estrutural a este segmento molecular. As duas meias cistina, detectadas neste peptídeo, indicam a presença de duas pontes dissulfeto, fazendo a junção H-H na proteína JJ0.

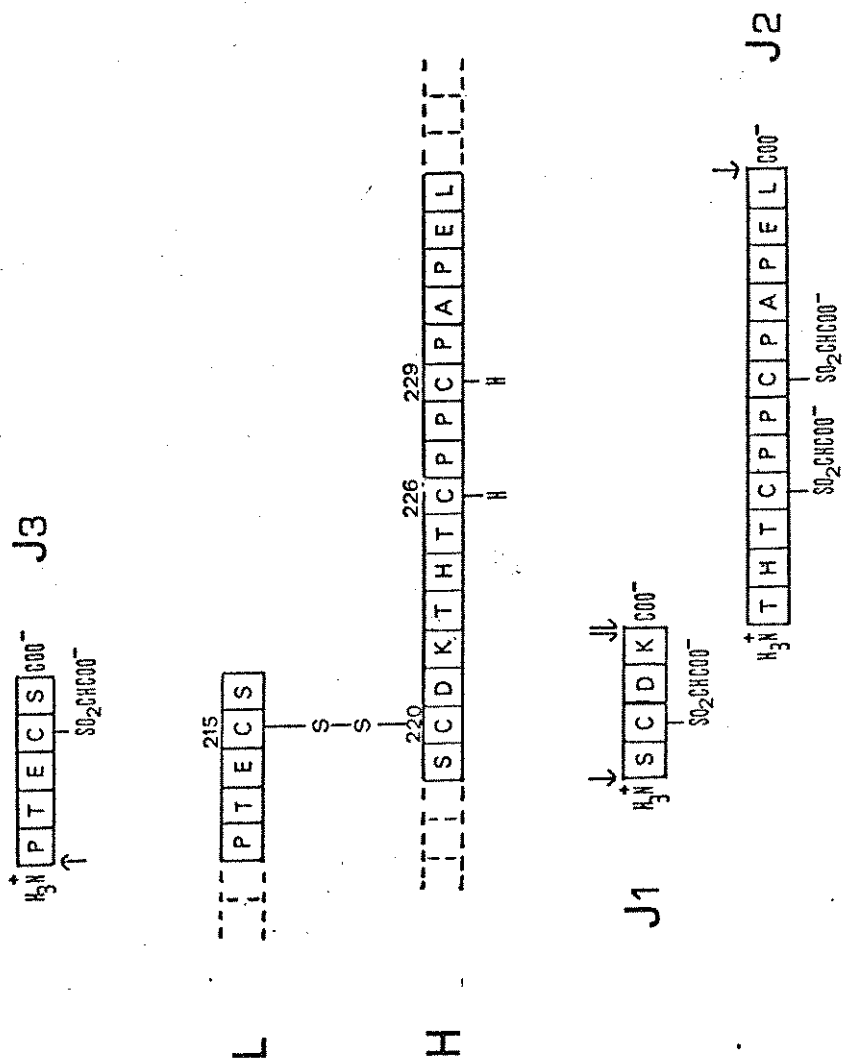
Esses resultados mais aqueles, que indicam Thr e His como resíduos amino terminais, confirmam o isolamento do peptídeo H-H da região da dobradiça, que caracteriza a proteína JJ0, como pertencente a subclasse IgG1.

A composição de aminoácidos que indica Glx no peptídeo radioativo J3, justifica a determinação do seu estado de amidação a partir do valor de mobilidade eletroforética, medida a pH 6.5 e do peso molecular, calculado de análise de aminoácidos.

Para o valor de mobilidade  $m = 0.38$  e  $PM = 542$ , o valor de carga correspondente do peptídeo J3 é  $\epsilon = -2$ . Estes resultados indicam que Glx corresponde a um resíduo de ácido glutâmico e não ao de glutamina (Gln).

Essas evidências mais aquelas de Pro como resíduo amino terminal confirmam o isolamento do peptídeo C-terminal, que caracteriza a cadeia leve da proteína JJ0 como do isotipo lambda portadora da única ponte dissulfeto, que faz a junção com a cadeia pesada.

A análise de aminoácidos do peptídeo J4, obtido de mapeamento diagonal e de eletroforese de alta voltagem do digesto pepsítico-tríptico da proteína JJ0, reduzida e carboximetilada em pH 3.5, mostrou que se trata de um dipeptídeo de composição global Cys,Ser. Este peptídeo é oriundo de quebra pepsítica e é característico da porção C-terminal de cadeia leve do isotipo lambda (PERRY e colab., 1972). Na figura 19 estão representados esquematicamente os peptídeos J1, J2, J3 isolados da proteína M(JJ0).



CÓDIGO DE  
UMA LETRA

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gly | Ala | Val | Leu | Ile | Ser | Thr | Pro | Cys | Met | His | Lys | Arg | Asp | Glu | Asn | Gln | Asx | Glx | Tyr | Phe | Trp |
| G   | A   | V   | L   | I   | S   | T   | P   | C   | M   | H   | K   | R   | D   | E   | N   | Q   | B   | Z   | Y   | F   | W   |

Figura 19 - Esta figura mostra os peptídeos da proteína JJO, que participam das pontes dissulfeto inter cadeia constituinte do arranjo estrutural de uma imunoglobulina do isotipo IgG1. Em H é indicado o setor da região constante da cadeia pesada (região da dobradiça ou "hinge region") que faz a junção com a cadeia pesada homóloga e a junção com a cadeia leve heteróloga. Nas posições 226 e 229 (numeração da proteína Eu; EDELMAN e colab., 1969) estão localizadas as pontes dissulfeto inter cadeia H; na posição 220 se localiza a única ponte dissulfeto responsável pela estabilização H-L. As setas  $\downarrow$  e  $\downarrow$  indicam os pontos de hidrólise enzimática pela tripsina e pepsina respectivamente, que levam à obtenção dos peptídeos J1 e J2. J1 é o peptídeo que contém a ponte dissulfeto H-L, e J2 o que contém as pontes dissulfeto H-H. Em L está representado o peptídeo C-terminal de cadeia leve do isotipo lambda e na posição 214 a cisteína, comprometida com a ponte dissulfeto L-H. O peptídeo J2 é derivado de quebra peptínica como indicado ( $\downarrow$ ) e contém a meia cistina de cadeia leve da ponte dissulfeto inter L-H. Os aminoácidos foram indicados segundo o código de uma letra (IUPAC, 1968). O resíduo carboximetilcisteína sulfona está representado como C-SO<sub>2</sub>CHCOO<sup>-</sup>.

A proteína JJ0 foi estudada através de mapeamento diagonal, que é uma técnica útil para a localização dos peptídeos, envolvidos nas pontes dissulfeto (FRANGIONE e colab., 1968). Esta metodologia está baseada na oxidação dos peptídeos, que contêm cistina, e que migram sob a forma de par. A banda, que contém o peptídeo de interesse, é exposta a vapor de ácido perfôrmico, que faz a clivagem oxidativa das pontes dissulfeto, levando a ácido cisteico, que confere carga negativa ao peptídeo (HARTLEY, 1970). Este mapeamento difere do mapa diagonal clássico (BROWN e colab., 1966) neste caso as proteínas são submetidas à redução branda com DTT e em seguida marcadas seletivamente com ácido iodoacético  $C^{14}$ .

Os resultados, obtidos do mapeamento diagonal da proteína JJ0, permitem localizar os peptídeos carboximetilados J1, J2, J3 e J4 que se situam fora da diagonal devido ao valor de pK do grupo carboximetilcisteína que é menor quando oxidado na forma de sulfona (HARRIS, 1967). Esses peptídeos correspondem respectivamente aos peptídeos H-L, H-H, L (peptídeo C-terminal de cadeia lambda) e ao dipeptídeo Cys, Ser, derivados da primeira dimensão (Fig. 12) que caracterizam quimicamente a proteína JJ0.

Foi demonstrado que raças distintas vivendo em circunstâncias diferentes mostram predominância de haplotipos, que são herdados como unidades. A proteína M(JJ0) IgG1 G1m (zax) apresenta haplotipo descrito para as imunoglobulinas IgG1 de indivíduos de todas as raças com exceção daqueles de raça negra (van LOGHEM, 1971).

O marcador alotípico G1m (z) está localizado no domínio CH1 de IgG1 e corresponde ao resíduo de Lys na posição 214.

O alotipo G1m (a) corresponde aos resíduos Arg-Asp - Glu-Leu referente às posições 355 a 358, localizadas no domínio CH3 de IgG1. O alotipo G1m (x) está localizado no domínio CH3 de IgG1 (GRUBB, 1970; NATVIG e colab., 1973).

V - R E S U M O   E   C O N C L U S Õ E S

De paciente (JJ0) da Faculdade de Medicina da Unicamp com quadro clínico característico de mieloma múltiplo foi obtido plasma com alta concentração de paraproteína M. A presença de uma banda compacta indicativa de homogeneidade molecular característica de plasma patológico mielomatoso e de mobilidade eletroforética tipo gamaglobulina lenta, foi detectada através de análise eletroforética seguida de densitometria.

O fracionamento do plasma JJ0 em DEAE celulose, levou a obtenção da fração A, cujo controle eletroforético evidenciou a purificação do componente M mielomatoso, livre de contaminações de outras proteínas plasmáticas.

A fração A foi tipificada sorologicamente como uma imunoglobulina IgG do tipo IgG1 com cadeias leves do isotipo lambda.

O grau de pureza da proteína JJ0 (fração A) foi confirmado em eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS. A amostra, analisada na forma reduzida, mostrou a presença de bandas eletroforéticas com peso molecular em torno de 50000 e 25000 daltons em relação aos marcadores e que correspondem às cadeias pesada (H) e leve (L) respectivamente.

A proteína M(JJ0) foi caracterizada quimicamente como uma imunoglobulina IgG1 com cadeias leves do isotipo lambda, através de autoradiografia da eletroforese em pH 3.5 do digesto peptídico-trípico da proteína JJ0, reduzida e carboximetilada. Deste tratamento químico foram obtidas as bandas radioativas J1, J2 e J3 de mobilidade eletroforética dos peptídeos H-L, H-H e L respectiva

mente, e que caracterizam o padrão IgG1 lambda.

O peptídeo J1 de composição Ser,Cys,Asp,lys confirma o isolamento do peptídeo de cadeia pesada gama 1, que faz a junção H-L através de uma ponte dissulfeto com o resíduo Cys 214 de cadeia lambda.

O peptídeo J2 de composição Thr,His,Cys,Pro.Pro,Cys,Pro,Ala,Glu,Leu demonstra o isolamento do peptídeo H-H da região da dobradiça, que caracteriza a proteína M(JJ0) como pertencente a subclasse IgG1.

O peptídeo J3 de composição Pro,Thr,Glu,Cys,Ser ratifica o isolamento do peptídeo C-terminal, que caracteriza a cadeia leve da proteína JJ0 como do isotipo lambda portadora da única ponte dissulfeto, que faz a junção com a cadeia pesada.

O peptídeo J4 de composição Cys,Ser comprova o isolamento do dipeptídeo C-terminal de cadeia leve lambda oriundo de quebra peptídica-trípica.

Os resultados de mapeamento diagonal da proteína JJ0 permitiram localizar os peptídeos radioativos J1, J2, J3 e J4 situados fora da diagonal e que correspondem respectivamente aos peptídeos H-L, H-H, L e ao dipeptídeo Cys,Ser, obtidos na caracterização química da proteína JJ0.

O haplotipo determinado caracteriza a proteína M(JJ0) como IgG1 G1m(zax), descrito para as IgG1 de indivíduos de todas as raças com exceção daqueles de raça negra.

O isolamento e caracterização de paraproteínas M são de importância para a imunoquímica aplicada e abrem perspectiva para o correlacionamento do isotipo com a patologia correspondente e ainda fornece suporte para estudos de filogenia molecular do modelo IgG.

VI - S U M M A R Y

Plasma from a patient (JJ0) with multiple myeloma showing high levels of M paraprotein was obtained from the Faculdade de Medicina, Universidade Estadual de Campinas.

The results of electrophoretic analysis followed by densitometry showed a compact band indicative of molecular homogeneity characteristic of patient presenting monoclonal gamopathy.

Fraction A containing myeloma protein was isolated from the pathologic serum JJ0 by ion exchange chromatography in DEAE cellulose. Electrophoretic control of this fraction indicates the purification of the M component, without contamination with other plasma proteins.

Fraction A was typed serologically as an IgG1 immunoglobulin with lambda light chains.

The purity of JJ0 protein (fraction A) was confirmed in SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. The reduced JJ0 protein showed two bands of 50 and 25K corresponding to heavy and light chains respectively.

The M(JJ0) paraprotein was chemically typed as an IgG1 protein with lambda light chains by autoradiography of high voltage electrophoresis of a pepsin-trypsin digests of myeloma protein partially reduced and alkylated with iodoacetate- $C^{14}$ . This material produces a consistent autoradiographic pattern, which shows radioactive bands J1, J2 and J3 of electrophoretic mobility characteristic the H-L, H-H and L peptides respectively.

The amino acid composition of J1 peptide (Ser, Cys, Asp, Lys) identifies the peptide that links covalently H to L chains through Cys-214, located on the C-terminal region of lambda chains.

The amino acid composition of J2 peptide (Thr, His, Cys, Pro, Pro, Cys, Pro, Ala, Glu, Leu) identifies JJ0 to be an IgG1 protein.

The amino acid composition of J3 peptide (Pro, Thr, Glu, Cys, Ser) identifies the C-terminal peptide of lambda light chains present in JJ0 protein, and contain the half-cystine which joins L to H chains.

The amino acid composition of J4 peptide (Cys, Ser) identifies the C-terminal dipeptide of lambda light chain obtained after identifies the C-terminal dipeptide of lambda light chain obtained after pepsin-trypsin digestion.

The diagonal map of the JJ0 protein allows the identification of radioactive H-L, HH, L and to the Cys, Ser dipeptide, obtained in the chemical characterization of the JJ0 protein.

The haplotype determined characterizes the JJ0 protein as IgG1 G1m(zax) present in  $\gamma$ 1 chains of all races with the exception of negroes.

Isolation and characterization of paraproteins M is important to applied immunochemistry and makes possible a correlation of a particular isotype with the the corresponding pathology; these studies give further evidence to understand the phylogeny of the IgG model in a molecular basis.

VII - REFÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBRECHI, R.M. and HONG, R. (1976). Basic and clinical considerations of the monocyte-macrophage system in man. *J. Pediatr.*, 88, 751.
- ALONZO, N. and HIRS, C.H.W. (1968). Automation of sample application in amino acid analyses. *Analyt. Biochem.* 23, 272.
- BAILEY, J.L. (1967). *Techniques in protein Chemistry*. 2nd edition. Ed. Elsevier Publ. Co.
- BINZ, H. and WIGZELL, W. (1975). Shared idiotypic determinants on B and T lymphocytes reactive against the same antigenic determinants. I- Demonstration of similar as identical idiotypes on IgG molecules and T cell receptor with specificity for the same alloantigens. *J. Exp. Med.*, 142, 197.
- BRACK, C., HIRAMA, M., LENHARD-SCHURLER, R. and TONEGAWA, S. (1978). A complete immunoglobulin gene is created by somatic recombination. *Cell*, 15, 1.
- BROWN, J.R. and HARTLEY, B.S. (1963). The disulphide bridges of chymotrypsinogen-A. *Biochem. J.*, 89, 59.
- BROWN, J.R. and HARTLEY, B.S. (1966). Location of disulphide bridges by paper electrophoresis. The disulphide bridges of bovine chymotrypsinogen-A. *Biochem. J.*, 101, 214.
- CAZENAVE, P.A. and CATHOU, R.E. (1977). Similar idiotypes in antibody-forming cells synthesizing immunoglobulins without detectable functions. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 286, 669.

CHAN, L.M. and CATHOU, R.E. (1977). The role of the inter-heavy chain disulphide bond in modulation the flexibility of immunoglobulin G antibody. J. Mol. Biol., 112, 653.

COHEN, S. and MILSTEIN, C. (1967). Structure and biological properties of immunoglobulins. Adv. in Immunology, 7, 1.

COLOMB, M. and PORTER, R.R. (1975). Characterization of a plasmin digest fragment of rabbit immunoglobulin gamma that antigen and complement. Biochem. J., 145, 177.

DICKLER, H.B. (1976). Lymphocytes receptors for immunoglobulins. Adv. Immunol., 24, 167.

DORRINGTON, K.J. (1978). The structural basis for the functional versatility of immunoglobulin G. Can. J. Biochem., 56, 1087.

DREYER, W.J. and BYNUM, E. (1967). High voltage paper electrophoresis. Methods enzymol., 11, 32.

EDELMAN, G.M. (1959). Dissociation of gammaglobulin. J. Amer. Chem. Soc., 81, 3155.

EDELMAN, G.M., CUNNINGHAM, B.A., GALL, E.W., GOTTLIEB, P.D., RUTISHASER, U. and WAXDAL, M. (1969). The covalent structure of EU entire  $\gamma$ G immunoglobulin molecule. Pro. Natl. Acad. Sci., 63, 78.

EDELMAN, G.M. (1970). The covalent structure of a human  $\gamma$ G immunoglobulin. XI- Functional implications. Biochemistry, 9, 3197.

EDMAN, P. and EJAQUIST, J. (1956). Identification and semiquantitative determination of phenylthiohydantoin. Acta Chem. Scand., 10, 1507.

EDMAN, P. (1970). Protein sequence determination. Ed. by Needleman, S.B. London. Chapman & Hall Limited Springer Verlag, Berlin. Heidelberg, New York, p.211.

EIN, D. and FAHEY, J.L. (1967). Two types of lambda-polypeptide chains in human immunoglobulins. Science, 156, 954.

ELZINGA, M. (1970). Amino acid sequence studies on rabbit skeletal muscle actin. Cyanogen bromide cleavage of the protein and determination of the sequences of seven the resulting peptides. Biochemistry, 9, 1365.

FLEISCHMAN, J.B., PAIN, R. and PORTER, R.R. (1962). Reduction of  $\gamma$ -globulins. Arch Biochem. Biophys. Suppl., 1, 174.

FRANGIONE, B. and MILSTEIN, C. (1967). Disulphide bridges of immunoglobulin G heavy chains. Nature, 216, 939.

FRANGIONE, B., MILSTEIN, C. and FRANKLIN, E.C. (1968). Intrachain disulphide bridges in immunoglobulin G heavy chains. Biochem. J., 106, 15.

FRANGIONE, B., MILSTEIN, C. and FRANKLIN, E.C. (1969a). Chemical typing of immunoglobulins. Nature, 221, 149.

FRANGIONE, B., MILSTEIN, C. and PINK, J.R.L. (1969b). Structural studies of immunoglobulins G. Nature, 221, 145.

- FRANGIONE, B. (1973). A technique for the detection of deleted immunoglobulin heavy chains. *Biochemistry*, 12, (17), 3355.
- FRANKLIN, E.C. (1976). Some impacts of clinical investigation on immunology. *The New England Journal of Medicine*, 294, 531.
- GRABAR, P. and WILLIAMS, C.A. (1953). Méthode permettant l'étude conjuguée des propriétés électrophorétiques et immunochimiques d'un mélange de protéines application au sérum sanguin. *Biochim. Biophys. Acta.*, 10, 193.
- GRAY, W.R. (1967). *Methods in Enzymology*. Ed. by Colowick, S.P., and Kaplan, N.O., New York. Academic Press Inc. vol. 11, p. 469.
- GRAY, W.R. (1972). End-groups analysis using Dansyl chloride. *Methods in Enzymology*, 25, 121.
- GREY, H.M. and KUNKEL, H.G. (1964). H chains subgroups of myeloma proteins and normal 7S  $\gamma$ -globulin. *J. Exp. Med.*, 120, 253.
- GRUBB, R. (1970). *The genetic markers of human immunoglobulins*. N.Y. Springer.
- HARRIS, J.I. (1967). Peptides containing methionine and carboxymethionine. *Methods Enzymol.*, 11, 390.
- HARTLEY, B.S. (1970). Strategy and tactics in protein chemistry. *Biochem. J.*, 119, 805.
- HONGO, T. and KATUOKA, T. (1978). Organization of immunoglobulin heavy chains genes and allelic deletion model. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 75, 2140.

- ISENMAN, D.E., DORRINGTON, K.L. and PAINTER, R.H. (1975). The structure and function of immunoglobulin domains. II- The importance of interchain disulfide bonds and the possible role of molecular flexibility in the interaction between immunoglobulin G and complement. J. Immunol., 114, 1726.
- IUPAC-IUB (1968). Commission on Biochemical Nomenclature. A one letter notation for amino-acid sequences. Tentative rules. J. Biol. Chem., 243, 3557.
- KABAT, E.A., WU, T.T. and BILOFSKY, H. (1979). Sequence of immunoglobulin chains. Public Health Service National Institute of Health. N.Y. USA.
- KATZ, D.H. (1977). Lymphocyte differentiation recognition, and regulation. Academic Press, N.Y.
- KYLE, R.A. and BAYRD, E.D. (1976). The monoclonal gammopathy multiple myeloma and related plasmacytoid disorders. Charles C. Thomas, Publishers Springfield, Illinois.
- LEDER, P., SEIDMAN, J.G., MAX, E., NISHIODA, Y., LEDER, A., NORMAN, B. and NAU, M. (1979). The arrangement, rearrangement and origin of immunoglobulin genes. Academic Press, p. 133.
- van Loghem, E. (1971). Formal genetics of the immunoglobulin systems. Annals of the New York Academic of Sciences, 190, 136.
- LOW, T.L.K., LIU, YU-SHENG, V. and PUTNAN, F.V. (1976). Structure, function and evolutionary relationships of Fc domains of human immunoglobulin A, G, M and E. Science, 191, 390.

- MACKENZIE, M.R. and FUNDENBERG, H.H. (1972). Macroglobulinemia: an analysis of 40 patients. *Blood*, 39, 874.
- MICHAELSEN, T.E., FRANGIONE, B. and FRANKLIN, E.C. (1977). Primary structure of the "hinge" region of human IgG3. *J. Biol. Chem.*, 252, 883.
- MORELL, A., KASER, H., SCHER, R. and SKVARIL, F. (1977). Uncommon Gm phenotypes in sera from neuroblastoma patients. *J. Immunol.*, 118, 1083.
- MOTA, I., and CATTY, D. (1974). Biological actions of anaphylactic antibodies. *Progress in Immunology*, vol. 4, p. 306.
- NATVIG, J.B. and KUNKEL, H.G. (1973). Immunoglobulins: classes, subclasses, genetic variants and idiotypes. *Adv. Immunol.*, 16, 1.
- NEEDLEMAN, S.B. (1970). Protein Sequence Determination Springer Verlag Berlin. Heidelberg. New York. pg. 155.
- OFFORD, D.E. (1966). Electroforetic mobilities of peptides on paper, and their use in the determination of amide groups. *Nature*, 221, 591.
- OLIVEIRA, B., OSLER, A.C., SIRAGANIAN, R.P. and SANDBERG, A.L. (1970). The biologic activity of guinea pig antibodies. I- Separation of  $\gamma 1$  and  $\gamma 2$  immunoglobulin and their participation in allergic reactions of immediate type. *J. Immunochimistry*, 140, 320.
- OUCHTERLONY, O. (1958). Diffusion in gel methods for immunological analysis. *Prog. Aller.*, 5, 78.

- OVARY,Z., SALUK,P.H., QUIJADA,L. and LAMM,M.E. (1976).Biologic activities of rabbit immunoglobulin G in relation to domains of the Fc region. J. Immunolog., 116, 1265.
- PERRY,M.B. and MILSTEIN,C. (1970). Interchain bridges of human IgD. Nature, 228, 934.
- PINK,J.R.L. and MILSTEIN,C. (1967a). Inter heavy-light chain disulphide bridges in immunoglobulins. Nature, 214, 92.
- PINK,J.R.L. and MILSTEIN,C. (1967b). Disulphide bridges of a human immunoglobulin G protein. Nature, 216, 941.
- PORTER,R.R. (1959). The hydrolysis of rabbit gamma globulin and antibodies with crystalline papain. Biochem. J., 73, 119.
- PORTER,R.R. (1962). Basic Problems of Neoplastic disease,( Cech, A. and Hirscheberg,E., Eds.), Columbia University.
- PORTER,R.R. (1967). The structure of the heavy chain of immunoglobulin and its relevance to the nature of the antibody-combining site. Biochem. J., 105, 417.
- POTTER,M. (1972). Immunoglobulin-producing tumor and myeloma proteins of mice. Physiol. Rev., 52, 631.
- Review of the notation for the allotypic and related marker of human immunoglobulins (1976). Eur. J. Immunol., 6, 599.
- RODKEY,L.S. (1974). Production and characterization of autoantidiotypic antisera. J. Exp. Med., 139, 712.

SALMON, S.E. (1973). Immunoglobulin synthesis and tumor kinetics of multiple myeloma. *Semin. Hematol.*, 10, 135.

SAKANO, H., HOGERS, J.H., HUPPI, K., BRACK, C., TRAUMECKER, A., MAKI, R., WALL, R. and TONEGAWA, S. (1979). Domain and the hinge region of an immunoglobulin heavy chain are encoded in separate DNA segments. *Nature*, 227, 627.

SANGER, F. and THOMPSON (1963). Halogenation of tyrosine during acid hydrolysis. *Biochim. Biophys. Acta.*, 71, 468.

SEIDMAN, J.G., LEDER, A., NAU, M., NORMA, B. and LEDER, P. (1978). Antibody diversity. *Science*, 202, 627.

SHAPIRO, A.L., VINUELA, E. and MAIZEL, Jr. J.V. (1967). Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 28, 815.

SOLOMAN, A. (1977). Homogeneous (monoclonal) immunoglobulins in cancer. *The American J. Med.*, 63, 169.

SPACKMAN, D.H., STEIN, W.H. and MOORE, S. (1958). Automation recording apparatus for use in the chromatography of amino acids. *Analyt. Chem.*, 30, 1190.

SPIEGELBERG, H.L. (1974). Biological activities of immunoglobulins of different classes and subclasses. *Adv. Immunol.*, 19, 259.

STEVENS, J.O. and SCHANFIELD, M.S. (1977). Biological differences in the immune clearance of human IgG1 and IgG3 allotypes as measured in vitro and in vivo. Fed. Proc. 36, 1266.

TERRY, W.D. and FAHEY, J.L. (1964). Subclasses of human  $\gamma$ 2-globulin based on differences in the heavy polypeptide chains.

TONEGAWA, S., BRACK, C., HOZUMI, N., MATTHYSSENS, G. and SHULLER, R. (1977). Dynamics of immunoglobulin genes. Immunol. Rev., 36, 73.

VANDIVIK, B., NATVIG, J.B. and WIGER, D. (1976). IgG subclasses restriction of oligoclonal IgG from cerebrospinal fluids and brain extracts in patients with multiple sclerosis and subacute encephalitis. Scand. J. Immunol., 5, 427.

WEBER, K. and OSBORN, M. (1969). The reliability of a molecular weight determination by sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. J. Biol. Chem., 244, 4406.

WEIGERT, M. and RIBLET, R. (1976). Genetic control of antibody variable regions. Cold. Spring. Harbor Symp. Quant. Biol., 41, 837.

WEIR, D.M. (1967). Handbook of experimental immunology. F.A. Davis Company, Philadelphia, USA.

WOLFENSTEIN, C., FRANGIONE, B., MIHAESCO, E. and FRANKLIN, E.C. (1971). Structure of immunoglobulin A. I-Interchain disulfide bridges of a  $\gamma$ A1 myeloma protein. Biochem. J., 10, (22), 4140.

WOODS, K.R. and WANG, K.T. (1967). Separation of dansyl-amino acids by polyimide layer chromatography. Biochem. Biophys. Acta, 133, 369.