

JOSÉ CAMILLO NOVELLO

TIPIFICAÇÃO QUÍMICA DA CADEIA LEVE KAPPA
DE IMUNOGLOBULINA G DE *Tayassu tajacu*

*Este exemplar corresponde
à redação final da tese
defendida pelo candidato
José Camillo Novello e aprovada
pela Comissão Julgadora*

Tese apresentada ao Instituto
de Biologia da Universidade
Estadual de Campinas para ob
tenção do título de Mestre em
Ciências Biológicas - Área de
Bioquímica.

Orientador: Prof.Dr. Benedito de Oliveira

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

Aos meus pais pelo apoio recebido. A Ligia, Eduardo e Guilherme, dedico.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof.Dr. Benedito de Oliveira pela orientação científica incentivo e a quem devemos nossa introdução na atividade de pesquisa.

Ao Prof.Dr. Sérgio Marangoni pela sua atenção e ajuda na execução das técnicas. Pela discussão e sugestões apresentadas.

Ao Prof.Dr. Avelino Rodrigues de Oliveira, pelo incentivo e sugestões apresentadas.

A Profa Dra Nilce Correa Meirelles, pela leitura da Tese
A estudante Gabriela Rennebeck pelo auxílio na confecção das figuras.

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

INDICE

	PAG.
1. INTRODUÇÃO	01
2. MATERIAL E MÉTODOS	06
2.1. REAGENTES	07
2.2. ANIMAIS E EXPERIMENTAÇÃO	08
2.3. PREPARO DE ANTI-SOROS	08
2.4. DOSAGEM DE PROTEÍNAS	09
2.5. IMUNODIFUSÃO	09
2.6. ANÁLISE IMUNOELETRÓFORÉTICA	09
2.7. ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA	10
2.8. SALTING-OUT DA FRAÇÃO GAMAGLOBULINA	11
2.9. CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA	11
2.10. ANÁLISE DE AMINOÁCIDOS	12
2.11. ELETROFORESE DE ALTA VOLTAGEM	14
2.12. OXIDAÇÃO COM ÁCIDO PERFÓRMICO	17
2.13. DIGESTÃO PÉPTICO-TRÍPTICA	17
2.14. MAPA DIAGONAL	18
2.15. DANSILAÇÃO	18
2.16. DEGRADAÇÃO DE EDMAN	19
3. RESULTADOS	20
4. DISCUSSÃO	35
5. RESUMO E CONCLUSÕES	41
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43

1 - I N T R O D U Ç Ã O

INTRODUÇÃO

O sistema imune de vertebrados partilha de certas propriedades gerais com outros sistemas complexos em organismos superiores e pode servir como um modelo ideal para estudos dos aspectos de diferenciação e evolução (HOOD e PRAHL, 1971).

O sistema imune de vertebrados pode responder a um número imenso de estímulos antigênicos através da elaboração de moléculas específicas de anticorpo (LANDSTEINER, 1947). Esta diversidade funcional da molécula de anticorpo é determinada pela correspondente diversidade na sequência de aminoácidos (HABER, 1968).

A estrutura básica da molécula de imunoglobulina como ilustrado na figura 1 é composta de duas cadeias leves (L) (P.M. - 25.000 daltons) e duas cadeias pesadas (H) (P.M. 53.000 - 70.000 daltons) ligadas por pontes dissulfeto e interações não covalentes. A molécula se dobra em três domínios compactos que são conectados pela região da dobradiça na cadeia pesada (EDELMAN e GALL, 1969). Estes três domínios podem ser claramente delineados por microscopia eletrônica (VALENTINE e GREEN, 1967) e por cristalografia de raio-X (POLJAK e colabs., 1976). Uma variedade de enzimas proteolíticas quebra a molécula nativa na região da dobradiça ou próximo desta dando um fragmento Fc e dois fragmentos Fab (COHEN e PORTER, 1964, GIVOL e DELORENZO, 1968). Alguns destes domínios estão ligados a funções da molécula de anticorpo, como o fragmento Fc, que é efetor de uma série de funções como a fixação do complemento, transferência placentária e sensibilização da pele (COHEN e PORTER, 1964). A estrutura de quatro cadeias mostrada da figura 1, é a IgG que é a estrutura básica para todas as classes de imunoglobulinas sendo o tipo mais comum encontrado

em animais superiores. As maiores classes de imunoglobulinas humanas são IgG, IgA e IgM. Duas classes adicionais menores IgE e IgD foram identificadas no soro humano. Estas classes (IgG, IgA, IgM, IgD e IgE) são definidas pela presença específica de cadeias pesadas (γ , α , μ , δ , e ϵ). Duas cadeias leves K (kappa) e λ (lambda) foram definidas. Todos os animais possuem cadeias leves análogas ou K ou λ . Nenhuma outra classe de cadeia leve foi descrita. O sistema imune está presente desde os ancestrais dos vertebrados de hoje, acerca de três milhões de anos. O risco de infecção tem sido um fator importante na evolução de imunoglobulinas.

O estudo de imunoglobulinas em um grande número de espécies tem fornecido muitas perspectivas no mecanismo de evolução de sistemas genéticos complexos em organismos superiores.

Todos os vertebrados tem resposta imune. A habilidade de desenvolver uma resposta imune foi investigada em várias espécies de mamíferos, aves, répteis, anfíbios e peixes (FUNDENBERG e colab.).

Desde seu aparecimento o sistema de imunoglobulinas está envolvido em fabricar uma complexa família de cadeias de proteínas. Três estágios nesta evolução podem ser sumarizados: Primeiro, formação de regiões variáveis e constantes, cadeias leves e pesadas que produzem a molécula de anticorpo funcional. Segundo, formação das classes de cadeias pesadas e cadeias leves. Terceiro, a recente evolução de subclasses de várias destas classes. Mutação e duplicação gênicas são processos fundamentais neste estágio. Um esquema para estudo da evolução de cadeias de imunoglobulinas pode ser feito usando os resultados de filogenia e sequência de aminoácidos. O grau de similaridade entre suas proteínas homólogas é a medida de como elas evoluíram a partir de um ancestral comum.

A evolução das cadeias leves tem sido estudada por dois caminhos. No primeiro, são feitos estudos imunológicos de mapea

mento peptídico e estudos de sequência em "pools" de cadeias leves - de várias espécies de vertebrados. No segundo, a evolução das clas ses K e L são investigadas pelos estudos de sequência de aminoácidos de proteínas mielomatosas (HOOD e colab., 1967).

Um dos principais problemas da imunquímica é a relação entre estrutura e função específica dos anticorpos. As mais importantes limitações nessa área são devidas a dois fatores. Um fator é a heterogeneidade dos anticorpos. O segundo fator limitante é a quantidade de proteína disponível (FRANEK, 1967).

O presente trabalho teve por objetivo isolar através de mapeamento péptico diagonal o extremo C terminal de cadeia leve de IgG de T.tajacu. Através de estudos de sequência de aminoácidos identificá-lo quanto a classe e fazer estudos de homologia com sequências de outras cadeias leves.

Utilizamos como modelo o Tayassu tajacu, animal da fauna sul americana da família tayassuidae que tem origem no oligoceno, portanto interessante do ponto de vista do estudo da evolução molecular quando comparado com outros vertebrados.

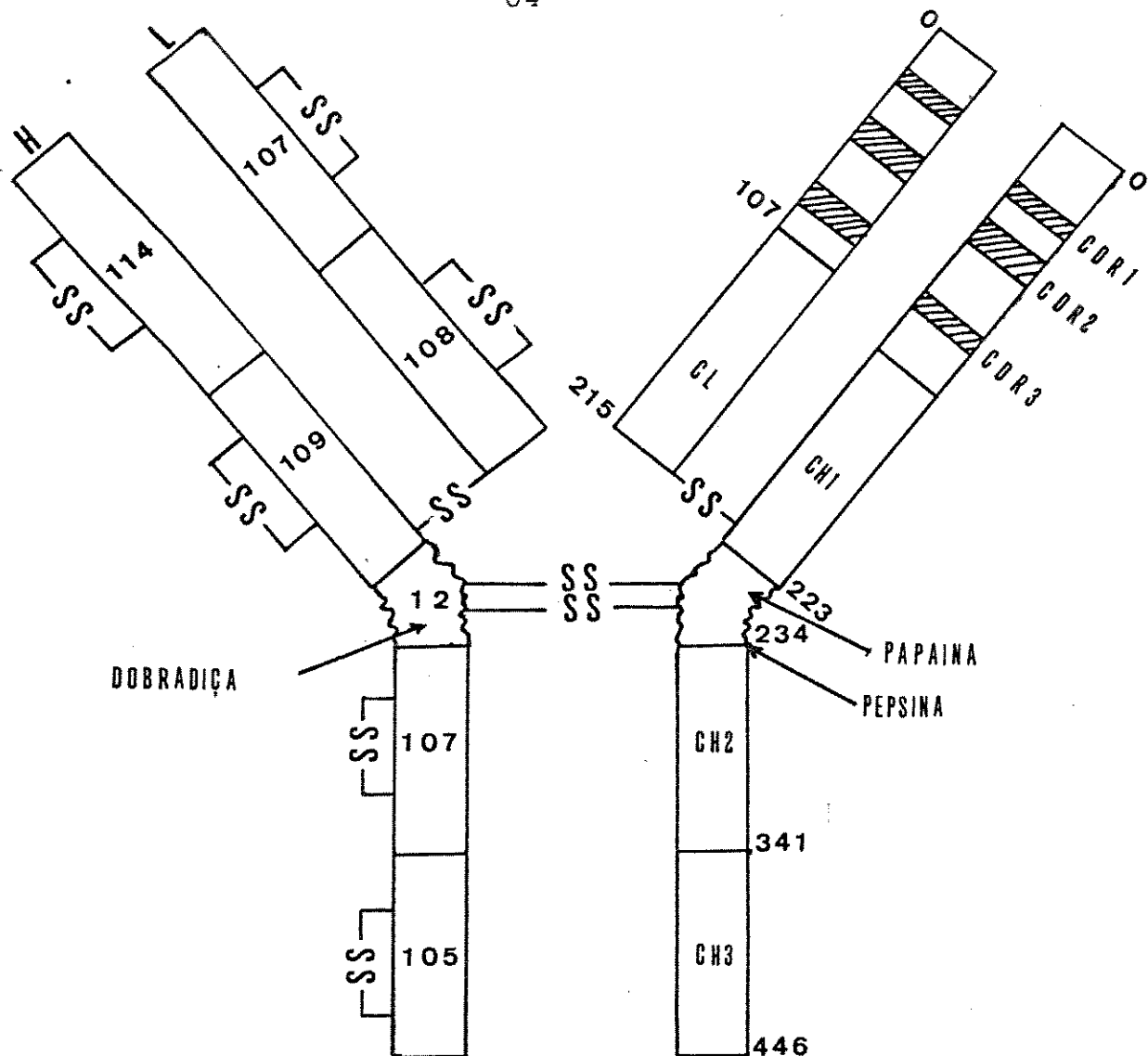


Figura 1. De uma molécula do Isotipo IgG (No caso uma proteína IgG1 humana - Proteína Eu descrita por Edelman e colab. 1969). São representadas duas hemimoléculas destacando a simetria deste tipo molecular. À esquerda são representadas as cadeias polipeptídicas pesada (H) e leve (L), o número de aminoácidos das regiões de homologia que constituem os "domínios" onde se localizam as pontes dissulfeto intra cadeia, e os aminoácidos que constituem a região da dobradiça onde estão localizadas as pontes dissulfeto inter cadeia H e inter H-L. A direita nas áreas sombreadas estão assinaladas as regiões de hipervariabilidade, CDR1, CDR2, CDR3, presentes nas cadeias H e L. Nos domínios de cadeia pesada (VH, CH1, CH2, CH3) e de cadeia leve (VL e CL) são indicados os números totais de resíduos de aminoácidos. O resíduo 297 da cadeia pesada está comprometido com a ligação glicoproteica (No caso da proteína Eu). Os locais de ação da papaina e pepsina estão indicados.

TABELA 1

AS CLASSES E SUBCLASSES DE IMUNOGLOBULINAS EM VÁRIOS MAMÍFEROS
(GOODMAN e colab. 1980).

Ordem	Espécie	IgG
Logomorfo	Coelho	IgG
Roedor	Camundongo	IgG1, IgG2a, IgG2b
	Rato	IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG2c
	Cobaia	IgG1, IgG2
	Hamster	IgG1, IgG2
Carnívoro	Cachorro	IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG2c
Artiodactilo	Porco	IgG1, IgG2
	Vaca	IgG1, IgG2
	Carneiro	IgG1, IgG2
Perissodactilo	Cavalo	IgG2a, IgG2b, IgG2c, IgG(T)
Primatas	Macaco	IgG1, IgG2, IgG3
	Homem	IgG1, IgG2, IgG3, IgG4

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. 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) etilclorometilcetona.

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

DEAE - Celulose (dithylaminoethyl cellulose)-Whatman, W.K., Boston. Ltda., England.

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

Todos os outros reagentes usados foram de grau analítico.

MATERIAL E MÉTODOS

2.2. ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO

Exemplares de T.tajacu, foram mantidos em cativeiro no Departamento de Cirurgia Experimental da FCMB de Botucatu, UNESP.

2.3. PREPARO DE ANTI SOROS

2.3.1. Obtenção de Soro de Coelho Anti Soro total de T.tajacu

Os coelhos (não foram utilizados raças definidos) foram inoculados com soro total de T.tajacu emulsificado em adjuvante completo de Freund na concentração final de 10 mg de proteína/ml e diluído em solução de NaCl 0,15 M na concentração final de 10 mg de proteína/ml utilizando-se o seguinte esquema: 1. Os coelhos foram - imunizados com 1.0 ml de antígeno em adjuvante distribuído pelos quatro coxins plantares. 2. Após 7, 14 e 21 dias foram aplicados - 1.0 ml do antígeno em salina por via intradérmica no dorso do animal. Após o aparecimento de reação inflamatória no local de aplicação do antígeno foi feita sangria nos animais. Os soros coletados - foram testados contra soro de T.tajacu e guardados em congelador.

2.3.2. Obtenção de Soro de T.tajacu Anti BGG (Gama Globulina Bovina)

Exemplares de T.tajacu foram inoculados com BGG - emulsificada em adjuvante completo de Freund na concentração de 10 mg de proteína/ml e diluído em solução de NaCl 0,15 M na concentração de 1,0 mg da proteína/ml no seguinte esquema: 1. No 1º dia

foram aplicados nos animais 10 ml de antígeno em adjuvante completo distribuído próximos as patas do animal. 2. Nos 7º, 14º e 21º dia foram aplicados 1.0 ml de adjuvante em salina intradermicamente no dorso do animal. A inoculação com salina continuou a cada 7 dias - até o aparecimento de reação inflamatória no local. Após o aparecimento de reação no local o sangue foi coletado e o soro de cada animal testado e catalogado.

2.4. DOSAGEM DE PROTEÍNAS

A dosagem de proteínas foi realizada pelo método do Biureto (MOKRASCH e colab., 1936).

2.5. IMUNODIFUSÃO

A dupla difusão em gel de agar (OUTCHERLONY, 1956) foi realizada em agar a 1% em tampão veronal 0,05 M pH 8.6 sobre lâmina de microscópio. O gel foi perfurado e o material aplicado. Após 24 horas de reação a lâmina foi lavada em solução salina por 48 h, seca e corada em negro de amido 0,1%.

2.6. ANÁLISE IMUNOELETROFORÉTICA

A imunoeletroforese (GRABAR e WILLIAMS, 1955) foi realizada em gel de agar a 1%. O agar fundido (15 ml) foi colocado sobre duas lâminas de vidro de 25 x 75 mm dispostas em suporte de plástico. Os poços e as canaletas foram impressos no agar gelificado utilizando-se um impressor metálico.

A eletroforese foi realizada em tampão veronal pH 8.6, 0,05 M, utilizando-se fonte estabilizadora Beckman Duostat e corrente de 15 MA/lâmina durante 90 minutos.

Após aplicação dos antisoros as lâminas foram colocadas em câmara úmida por 24 horas. A lavagem foi feita em solução salina fisiológica. As lâminas foram secas e coradas com "amido black" 0,1%. A descoloração foi realizada em metanol-ácido acético - H₂O (2:1: 2 x/v).

2.7. ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA

O método utilizado na análise eletroforética em poliacrilamida foi modificado de LAEMLI (1970).

A partir de solução de acrilamida a 30% e Bis-acrilamida a 0,8% foram obtidos os géis de concentração e separação. Esta solução foi preparada em água deionizada, filtrada e mantida sob refrigeração a 4°C.

O gel de concentração contendo 5% de acrilamida em tampão tris: HCl 0,125 M pH 6.8 e SDS (Dodecil Sulfato de Sódio) a 0,1% foi polimerizado pela adição de TEMED (N'N'N' tetramiletilene diamina) e persulfato de amonio a 0,5%.

O gel de separação contendo 10% de acrilamida em tampão tris-HCl 0,375 M, pH 8.8, SDS 1%, persulfato de amonio 1% e TEMED 0,025%.

O gel de separação foi colocado entre duas placas de vidro plano, separadas por espaçadores de acrílico com 2 mm de espessura. Após a polimerização foi colocado o gel de separação e inserida entre as placas a peça para impressão dos poços.

As amostras (entre 20-50 mg de proteína) foram dissolvidas em 100 ul de tampão tris-HCl pH 6,8 na concentração de

0,0625 M. Contendo SDS a 2% 10% de glicerol e 0,001% de azul de bromofenol, como marcadores foram utilizados ovoalbumina (P.M. 43.000) anidrase carbônica (P.M. 32.000) mioglobina (P.M. 17.200) e a proteína de Bence Jones (P.M. 23.000). A eletroforese foi realizada em tampão Tris-HCl 0,025 M, glicina 0,192 e SDS 0,1% à 100 V.

O gel foi corado em Comassie Blue 0,1% em ácido acético: metanol: H₂O (1:8:1) v/v.

2.8. SALTING-OUT DA FRAÇÃO GAMAGLOBULINA

O soro de T.tajacu foi precipitado com sulfato de amônio na concentração final de 50%, 0.6°C

O material foi centrifugado a 11,2 g por 30 min a 4°C e o sobrenadante desprezado. O precipitado de gamaglobulina foi redissolvido em tampão fosfato 5 mM, pH 8,0 por 24 horas, sendo feitas várias trocas de tampão durante a diálise. O material obtido deste modo foi centrifugado a 11,2g durante 30 min., e o precipitado desprezado sendo o sobrenadante utilizado no fracionamento.

2.9. CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA

O sobrenadante do "Salting Out" foi purificado em DEAE celulose (DE-52-Whatman) a partir de tampão fosfato de sódio 0,005 M pH 8.0 (OLIVEIRA e colabs., 1970).

Em uma purificação característica 4.0 ml do sobrenadante foram aplicados a uma coluna de 300 x 20 mm, com um fluxo de 25 ml/hora e coletados 4 ml/tubo utilizando-se um coletor de frações Gilson modelo VL.

O monitoramento do eluato foi feito em um espectrofotômetro Beckman modelo 25, em um comprimento de onda de 280 nm.

2.10. ANÁLISE DE AMINOÁCIDOS

2.10.1. Analisador

O aparelho utilizado para as análises foi construído segundo esquema de ALONZO e HIRS (1968), com algumas modificações. O método utilizado para análise foi o de SPACKMAN e colab. (1958).

O sistema utilizado foi o de duas colunas: uma para resolução de aminoácidos ácidos e neutros (coluna AN) de 530 x 10 mm e outra para resolução de aminoácidos básicos (coluna B) de 130 x 10 mm. A resina da coluna AN foi do tipo Aminex A₆ e na coluna B utilizou-se a resina Aminex A₅ (Bio Rad).

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 termorreguladores ajustados para 52,5°C (coluna B) e 52,5 a 60,0°C (coluna AN) acoplados a um circulador.

O registro gráfico correspondente às leituras das três células do fotômetro 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 12 mm; é feito por pontos, por um registrador do tipo Eletronik 15 Strip Chart Mutipoint Recordes (Honeyewell Ltd, Ontario) em escala de 0 a 0.1 unidades de absorbância.

A reação com ninhidrina (Pierce Chemical Co., Rockford IL) ocorreu a 97[±] 1,0°C em um banho (S.G.A.Scientific. Inc.)

com temperatura regulada por reostato tipo 116 B (The Superior Electric. Co., Conn).

2.10.2. Solução Padrão e Constante de Integração

Amostras contendo valores médios de 20 nmoles para cada aminoácidos, obtidas a partir de uma solução padrão de aminoácidos (Amino Acid Standard H, Pierce Chemical Co., Rockford, IL) - 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 de 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 de base) e as constantes de integração obtidos 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 2 mostra uma análise automática de aminoácidos padrão.

2.10.3. Preparação das Amostras

As amostras hidrolisadas foram dissolvidas em volumes iguais de tampão citrato sódio 0,2 N pH 2.2 e polietilenoglicol (PEG) 30%.

2.10.4. CÁLCULOS

Os valores obtidos são expressos em número de moles de resíduo por mol de proteína. O valor calculado para cada resíduo representa a média dos valores obtidos nos diferentes tempos de hidrólise, exceto para os aminoácidos cujos valores não são constantes com o tempo de hidrólise.

Os valores de treonina e serina foram extrapolados para tempo zero, uma vez que tendem a diminuir com o tempo de hidrôlise. 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).

2.10.5. 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 e colab., 1968), ou como carboximetilcisteína sulfona.

Os resíduos de metionina foram determinados como metionina sulfona.

2.11. ELETROFORESE DE ALTA VOLTAGEM

As eletroforeses foram realizadas em papel Whatman 3 MM a 60 V/cm. 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 C tampão f^órmico - acético pH 2.1 (ácido f^órmico - ácido acético - água, 1:4:45 v/v).

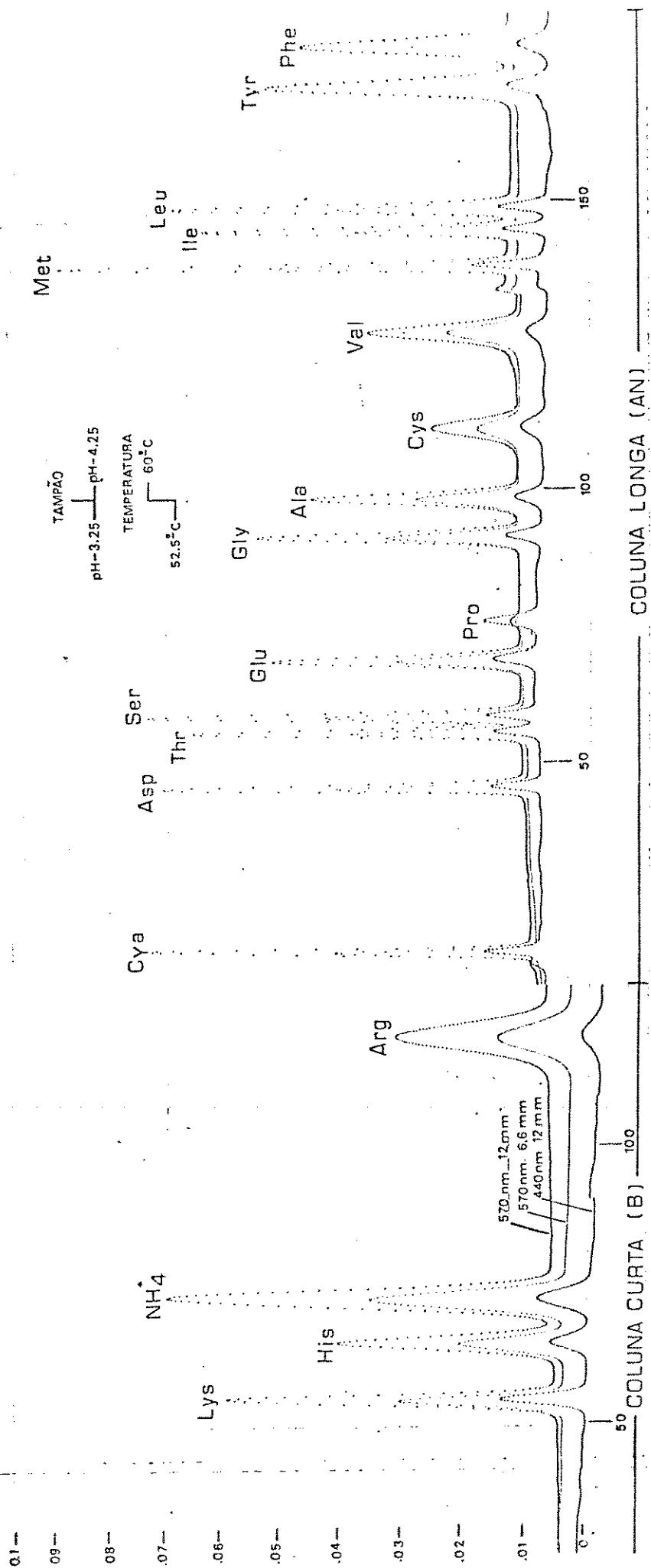


Figura 2- Registro gráfico de uma análise automática de aminoácidos. Foram aplicados dos 20µl de uma solução padrão de aminoácidos em cada coluna. Uma pequena variação na linha de base, detectada nos três canais aos 147 minutos na coluna longa, indica sistematicamente a mudança de tampão de pH 3.25 para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

m

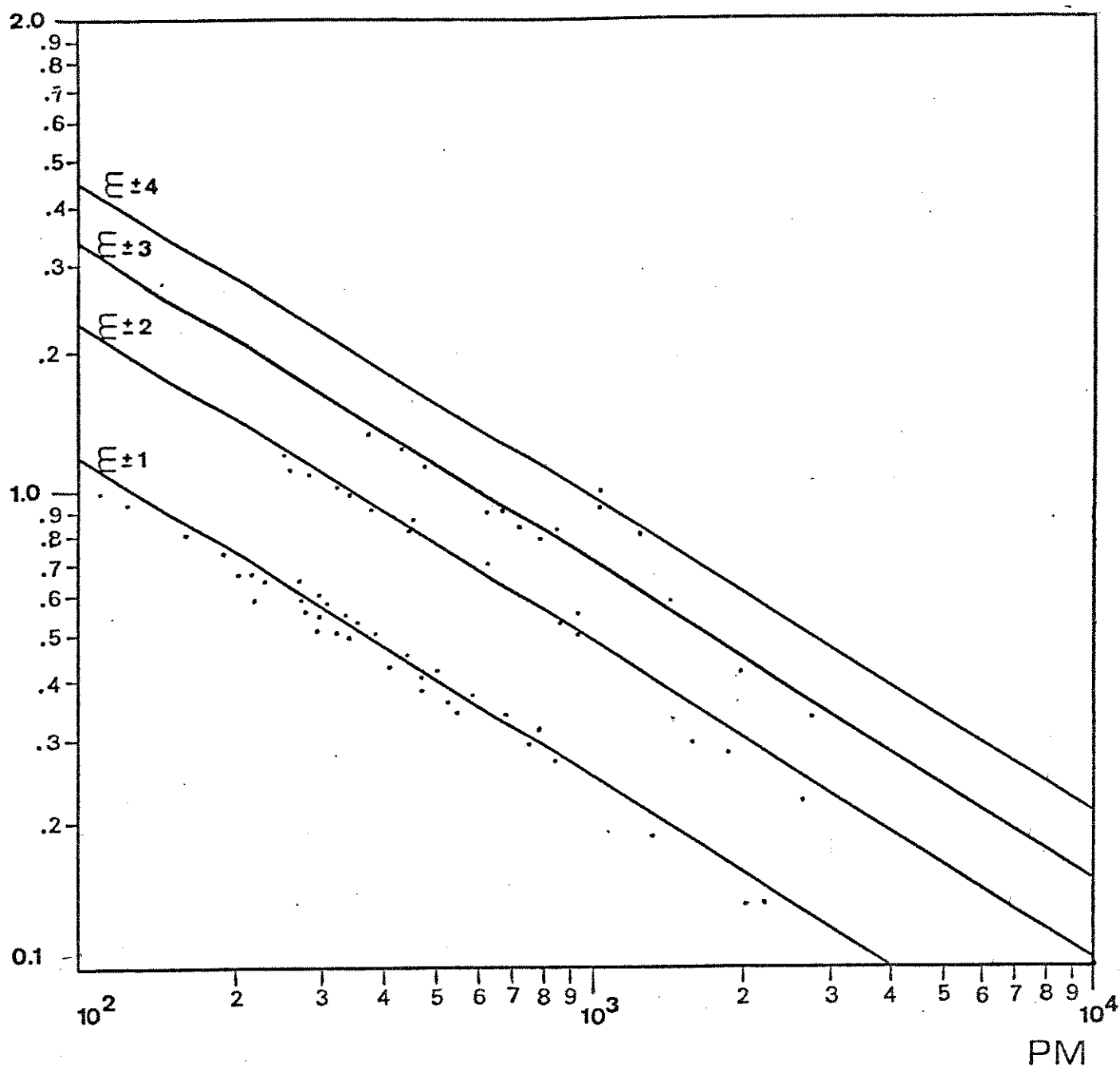


Figura 3- Gráfico de Offord (OFFORD, 1966) em escala ampliada (cedida pelo Dr. M.E. Lamm da New York University, N.Y., USA). Este gráfico exprime em escala logarítmica a mobilidade eletroforética em pH 6.5 em função do peso molecular para peptídeos sem histidina ou ácido cisteico. P.M.= peso molecular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

Para a caracterização dos peptídeos foram aplicados os seguintes marcadores de referência: ácido aspártico, ácido glutâmico, lisina, ϵ -dinitrofenol - lisina (ϵ -DNP-Lys) e tinta vermelha (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 a distância entre ϵ -DNP-L-Lys e ácido aspártico (m = 1.0) e a carga líquida (E) foi determinado utilizando-se o "plot" de OFFORD (OFFORD, 1966).

2.12. OXIDAÇÃO COM ÁCIDO PERFÔMICO

A IgG de T.tajacu contida em tira de papel recortada após eletroforese de alta voltagem em pH 6,5 (1.^a dimensão de mapeamento diagonal) foi montada em suporte de vidro e colocada em recipiente saturado com vapor de ácido perfômico. Ao fim de 4 horas, o papel foi retirado e colocado a 80°C até a secagem.

2.13. DIGESTÃO PÉPTICO-TRÍPTICA

A IgG de T.tajacu parcialmente reduzida e carboximetilada foi digerida com pepsina (10 mg/ml) em ácido fórmico a 5% durante 16 horas à temperatura de 37°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) por um período de 4 horas a 37°C em banho-Maria e em seguida liofilizada.

2.14. MAPA DIAGONAL

Foi realizada após modificação do método descrito por BROWN e HARTLEY (1966). O digesto tríptico liofilizado da proteína reduzida e carboximetilada foi dissolvido em 0,1 ml de água desionizada e aplicado em uma banda de 70 x 10 mm dobre 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, costurada em outra folha de papel e submetida a uma segunda eletroforese - em pH 3,5 (2.^a dimensão) em direção perpendicular a primeira.

Em seguida o mapa foi corado a 37°C com uma solução de ninhidrina 1% em acetona.

2.15. DANSILAÇÃO

A determinação do resíduo N-terminal dos peptídeos - foi realizada utilizando-se cloreto de dansil (cloro-1-dimetilllami-nonaftaleno-5-sulfonil, nas condições descritas por GRAY (1967,1972).

Aliquotas dos peptídeos (5 nmoles) foram secas à vácuo. Ao material dissolvido em 10 ml de bicarbonato de sódio 0,2 M - foram acrescentados 10 μ l de uma solução 2.5 mg/ml de cloreto de dansil em acetona. A reação ocorreu à 37°C por 60 min.

A hidrólise do material dansilado foi realizada em HCl 6N a 105°C durante 16 horas. O material dansilado foi seco, dissolvido em aproximadamente 5 μ l de piridina-água (1:1 v/v), aplicado sobre placa de camada delgada de poliamida de 75 x 75 MM e submetido a cromatografia bidimensional segundo WOODS e WANG, 1967.

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

2.16. DEGRADAÇÃO DE EDMAN

A degradação de Edman foi realizada após adaptação - da metodologia descrita (EDMAN, 1980). A identificação do resíduo N-terminal removido foi realizada pela determinação da composição de aminoácidos do peptídeo antes e após cada degradação.

O peptídeo (40-90 nmoles), foi dissolvido em 100 μ l de água. Foram acrescentados 100 μ l de uma solução de fenilisotiocianato (PITC) 5% em piridina e incubado a 45°C durante 60 m. Após isto o material foi seco à vácuo. Foram adicionados 150 μ l de ácido trifluoracético (TFA) a 45°C por 30 m, sendo posteriormente seco à vácuo. Adicionou-se 200 μ l de acetato de butila centrifugou-se o material.

O material contido na fase de acetato de butila foi convertido na feniltiodantoina ao ser dissolvido em 100 μ l de HCl 1M a 80°C por 10 minutos. A hidrólise foi realizada em 100 μ l de HCl 6M a 130°C por 24 horas, e o produto identificado por análise de aminoácidos.

3. RESULTADOS

3.1. IDENTIFICAÇÃO DAS FRAÇÕES IgG2 e IgG1 NO SORO HIPERIMUNE DE T.tajacu.

As frações (IgG2, RC) obtidas no fracionamento do soro hiperimune de T.tajacu em DEAE celular equilibrado em tampão fosfato de sódio 5 mM pH 8,0 foram analisadas por imunoeletroforese em gel de ágar utilizando-se como revelador soro de coelho anti soro total de T.tajacu (Ra - a -Tay). A figura 4 mostra a análise imunoeletroforética da fração IgG2, onde se nota um único arco de precipitação correspondente ao componente proteico de mobilidade eletroforética lenta em relação ao anodo compatível com a das gamaglobulinas IgG2, e está livre de outras contaminações proteicas do soro. Como controle este mesmo antisoro foi utilizado para revelar soro total de T.tajacu onde notamos a fração IgG2 de mobilidade eletroforética do tipo gama lenta.

O controle imunoeletroforético da fração RC (soro total esvaziado da fração IgG2) é mostrado na figura 5 onde notamos um arco de precipitação na região de mobilidade eletroforética de gamoglobulina mais rápida como aquela descrita para IgG1 e a ausência da fração IgG2 de mobilidade eletroforética lenta, como se nota quando comparada com a imunoeletroforese do soro total de T.tajacu (TAY.NS).

A figura 6 mostra o controle imunoeletroforético da fração IgG1 purificada da fração RC através de cromatografia de exclusão molecular em Sephadex G-200 equilibrada em tampão fosfato 50 mM pH 8,0. O soro Ra a.Tay revela um único arco de precipitação na região eletroforética compatível com as de imunoglobulinas de



Figura 4. Análise imunoeletroforética de soro total (Tay.a.DNP.BGG) de T.tajacu imunizado com DNP₅₄ BGG (gamaglobulina bovina dinitrofenilada). A imunoglobulina IgG2 purificada através de precipitação em sulfato de amônio saturado seguida de cromatografia em DEAE celulose foi aplicado no poço inferior se apresentou como um único arco, o que é indicativo do seu grau de pureza.

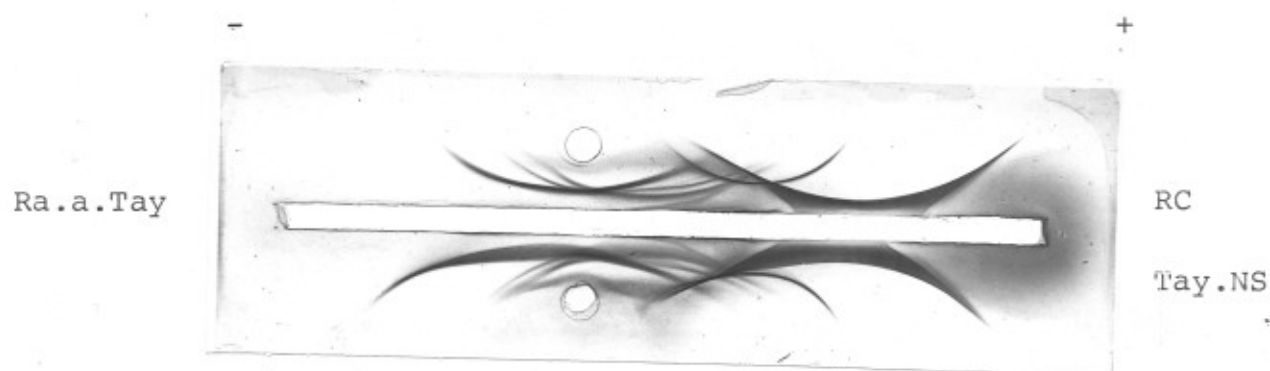


Figura 5. Imunoeletroforese em gel de ágar a 1% de soro total de T.tajacu (Tay NS) e da fração RC obtida de cromatografia em DEAE-celulose. Como revelador foi utilizado soro policlonal de coelho imunizado com soro total de T.tajacu (Ra.a.Tay). Na região de migração de gamaglobulina está indicada a população molecular de migração lenta em relação ao anodo (IgG2) presente no soro total e, na fração RC a população de IgG de mobilidade lenta (IgG1). O anodo está assinalado a direita.



Figura 6. Controle imunoeletroforético do grau de pureza das imunoglobulinas IgG2 e IgG1 obtidos de soro imune de T.tajacu (Tay.a.DNP.BGG). A imunoglobulina IgG1 se distingue da IgG2 por sua mobilidade mais rápida em relação ao anodo assinalado a direita.

mobilidade rápida características de IgG1; que se distingue da imunoglobulina IgG2 de mobilidade mais lenta em relação ao anodo.

3.2. CONTROLE ELETROFORÉTICO EM GEL DE POLIACRILAMIDA (PAGE)

A análise em gel de acrilamida das formas nativa e reduzida das imunoglobulinas IgG1 e IgG2 purificadas é apresentada na figura 7. Foram utilizadas para comparar uma IgG1 λ mielomatoso, IgG3 λ e uma proteína de Bence Jones na forma dimérica.

Na forma nativa (não reduzida) as imunoglobulinas IgG se apresentam como uma banda principal na interface gel de concentração e gel de corrida (running gel). Outras bandas de menor intensidade são observadas. Na forma reduzida são identificadas duas bandas, uma correspondente ao peso molecular 50K (50.000 daltons) e outra de peso molecular de 25K (25.000 daltons) em relação aos marcadores utilizados.

3.3. COMPOSIÇÃO GLOBAL DE AMINOÁCIDOS DAS PROTEÍNAS IgG

Dos registros gráficos das análises de aminoácidos das proteínas IgG1 e IgG2, purificadas, oxidadas e não oxidadas obtidas de diferentes tempos de hidrólise mostrados nas figuras 8 e 9 foi montada a tabela 2.

Nesta tabela são apresentados os valores em moles de resíduo/moles proteína, encontrados para cada resíduo de aminoácido presente nas proteínas IgG1 e IgG2. O número de meios cistinas determinadas como ácido cisteico (Cya) foi igual a 39 -

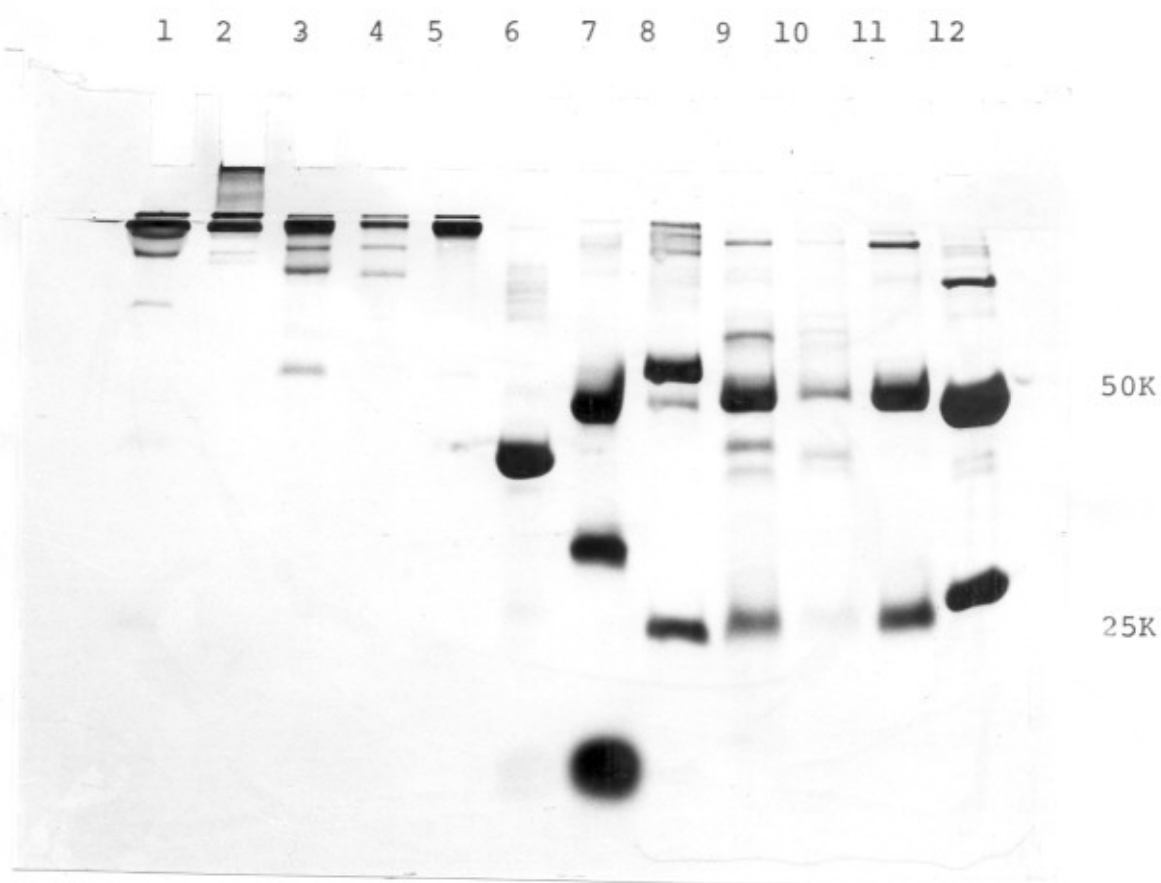


Figura 7. Eletroforese em gel de poliacrilamida (10%) em SDS das imunoglobulinas IgG1 nativa (3) e (4) e reduzida (9) e (10), IgG2 nativa (5) e reduzida (11). Como marcadores de peso molecular foram utilizados: Proteína de Bence-Jones (6), ovoalbumina, anidrase carbônica e mioglobi na (7), IgG2 λ humana, nativa (1) e reduzida (12) e IgG3 λ humana, nativa (2) e reduzida (8).

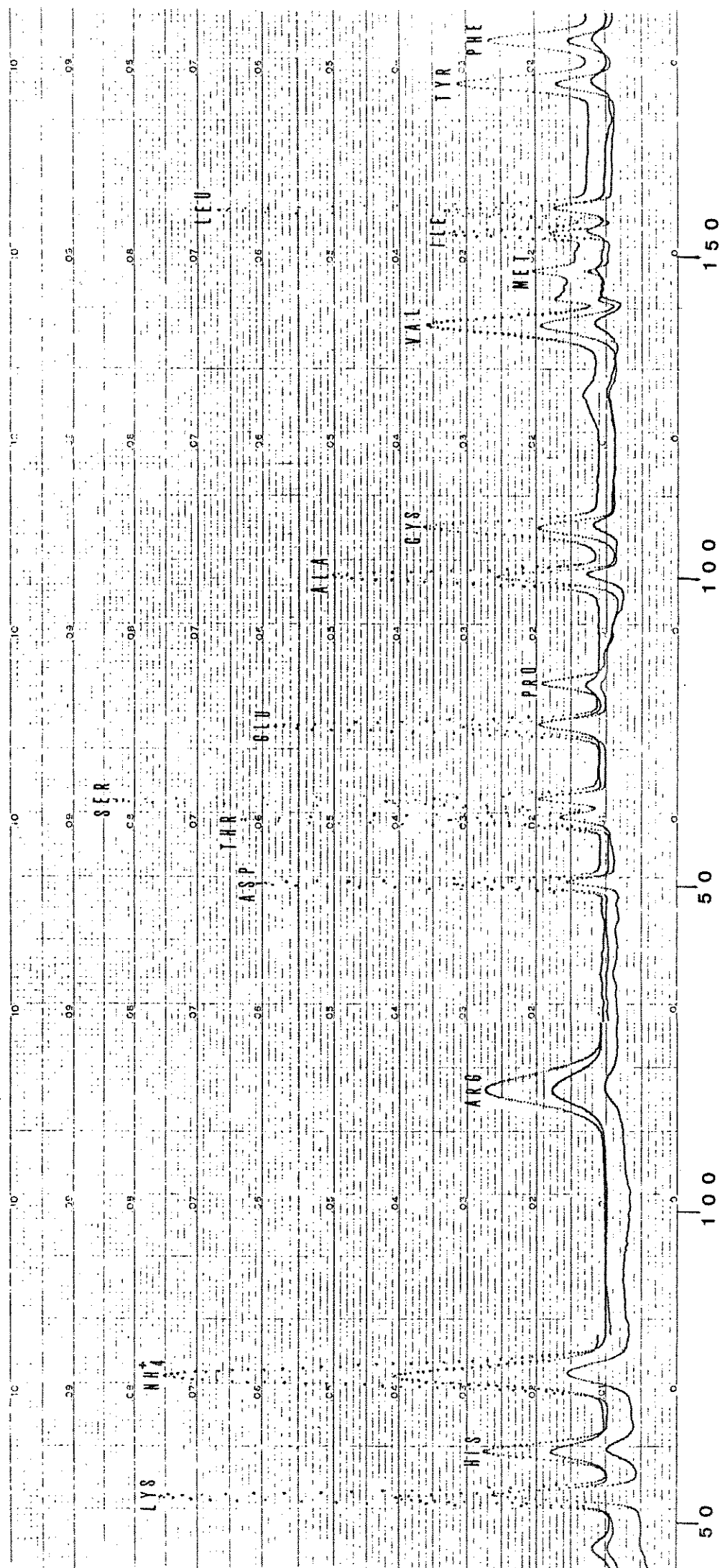


Figura 8. Registro gráfico da análise de aminoácidos da proteína IgG1 de T.tajacu

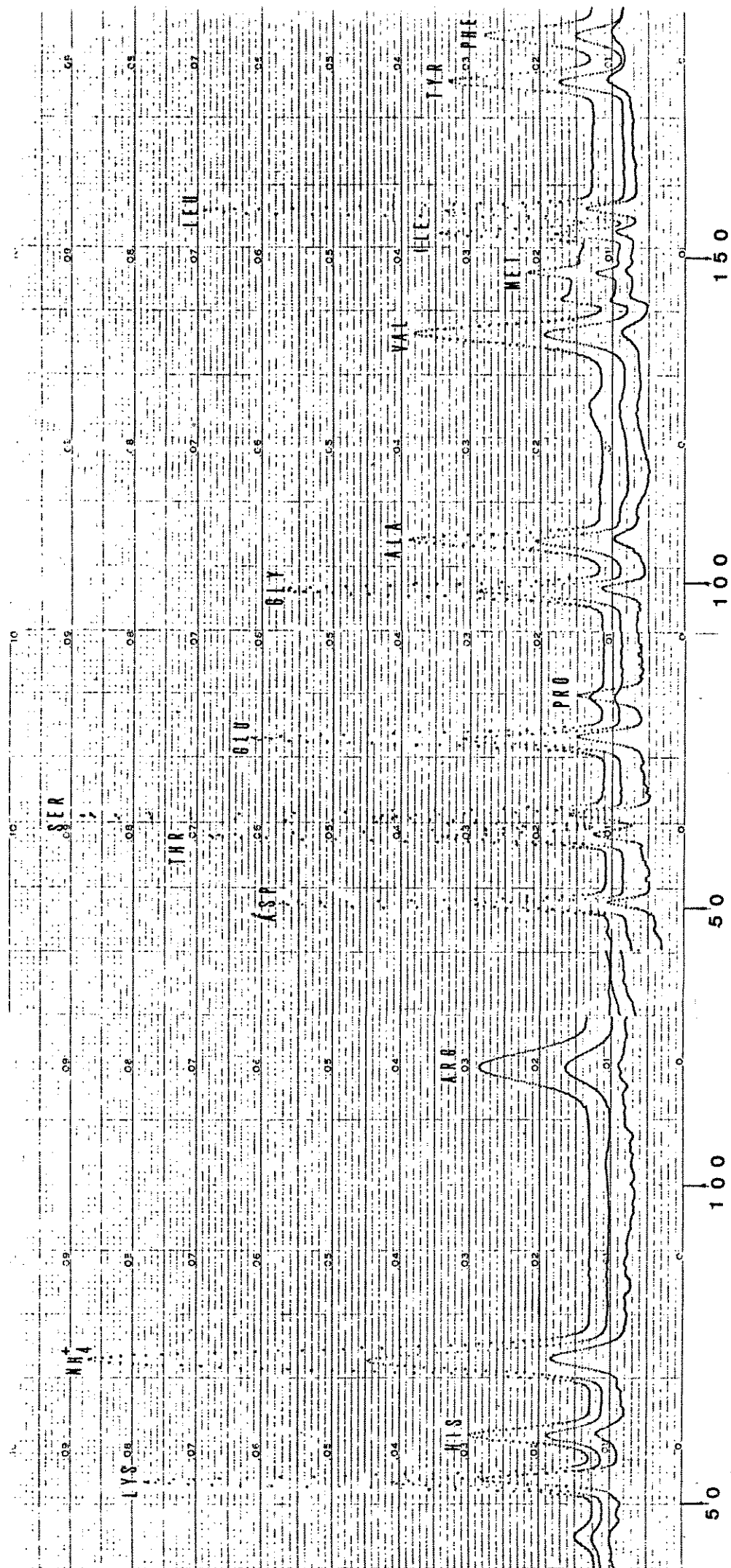


Figura 9. Registro gráfico da análise de aminoácidos da proteína IgG2 de *T. tajacu*

TABELA 2

COMPOSIÇÃO EM AMINOÁCIDOS DE TAY IgG2 E TAY IgG1 (1)

Resíduo	Tay IgG2	Tay IgG1
Lys	48.7	47.7
His	19.3	20.1
Arg	30.8	33.1
Asp	88.8	95.3
Thr	115.4	109.8
Ser	154.2	150.2
Glu	129.5	130.4
Pro	112.0	111.9
Gly	108.3	111.3
Ala	83.9	84.4
Cys/2 ⁽²⁾	38.4	39.0
Val	122.3	125.5
Met ⁽³⁾	16.2	17.7
Ile	42.2	40.4
Leu	100.7	104.6
Tyr	55.0	55.1
Phe	42.3	44.4
Total ⁽⁴⁾	1308	1314

(1) Moles de resíduo/moles de proteína

(2) Determinado como Cya (ácido cisteico)

(3) Determinado como Met SO₂ (Metionina Sulfona)

(4) Os totais das proteínas Tay estão normalizados para um mesmo valor. Não foram considerados os resíduos Triptofano.

para a IgG1 e 38 para IgG2. O número de resíduos metionina detectados na forma de metionina oxidada foi detectados na forma de metionina oxidada foi 18 para IgG1 e 16 para IgG2.

O número total de resíduos estimado foi de 1314 para IgG1 e 1308 para IgG2 (não incluindo o triptofano).

3.4. PURIFICAÇÃO E ISOLAMENTO DOS PEPTÍDEOS COMPROMETIDOS COM AS PONTES DISSULFETO INTER H E INTER H-L.

A figura 10 mostra o mapeamento diagonal da IgG2 de T.tajacu digerida com pepsina e tripsina e submetida a eletroforese de alta voltagem em pH 6,5 (1.^a dimensão) em seguida submetida a oxidação perfrômica e a uma segunda eletroforese em alta voltagem em pH 6,5 no sentido ortogonal a primeira (2.^a dimensão). Os marcadores eletroforéticos (Asp, Lys, ϵ -DNP Lys) estão destacados lateralmente, sendo as mobilidades eletroforéticas determinadas em relação a do ácido aspártico.

Na segunda dimensão foram detectadas na porção anódica fora da diagonal os peptídeos PT1 de mobilidade eletroforética 1.03 e o peptídeo PT2 de mobilidade eletroforética 0,58. Estes dois peptídeos possuem a mesma mobilidade eletroforética na 1.^a dimensão. Na segunda dimensão na região dos neutros fora de diagonal foi detectado o peptídeo PT3 de mobilidade eletroforética 0.03.

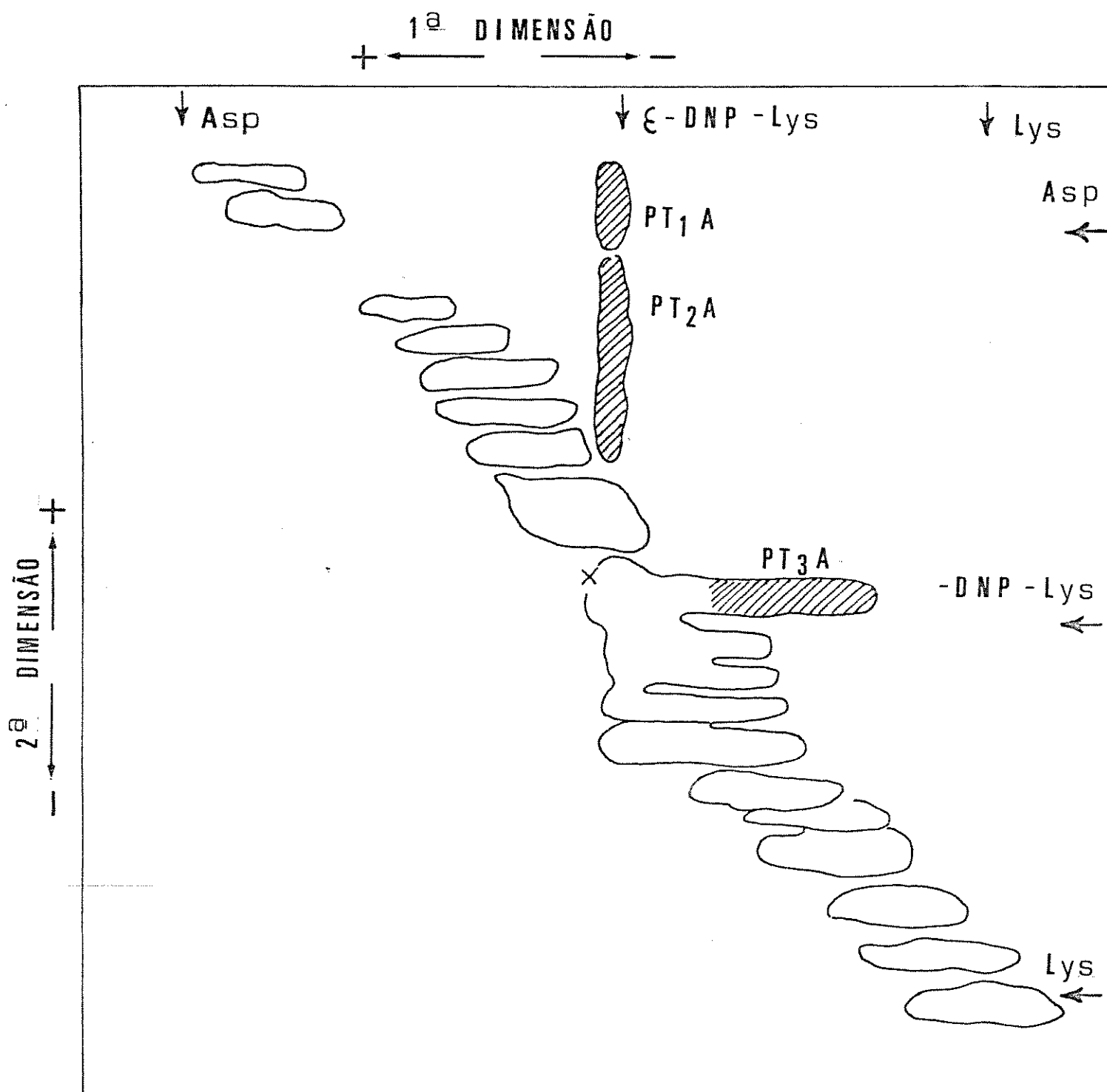


Figura 10. Mapa diagonal do digesto péptico - tri ptico da proteína IgG2 de *T.tajacu* reduzida e alquilada, obtida após eletroforese em pH 6.5 (1.  dimensão) seguida de oxida o e eletroforese em pH 6.5 (2.  dimensão). Os marcadores eletroforéticos estão assinalados através de setas.

3.5. IDENTIFICAÇÃO DO PEPTÍDEO C-TERMINAL DE CADEIA LEVE DA IgG2 de T.tajacu.

A composição de aminoácidos do peptídeo PT1 (Tabela 3) mostra a presença dos resíduos (Asp, Glu, Cys, Gln e Ala). Ácido aspártico detectado por dansilação como resíduo N-terminal. O peso molecular de 613,1 determinado através da análise de aminoácidos (figura 11) e utilizando o Gráfico de Offord que relaciona peso molecular de peptídeo e mobilidade eletroforética em pH 6,5 foi possível determinar que o peptídeo PT1 possui carga líquida-3.

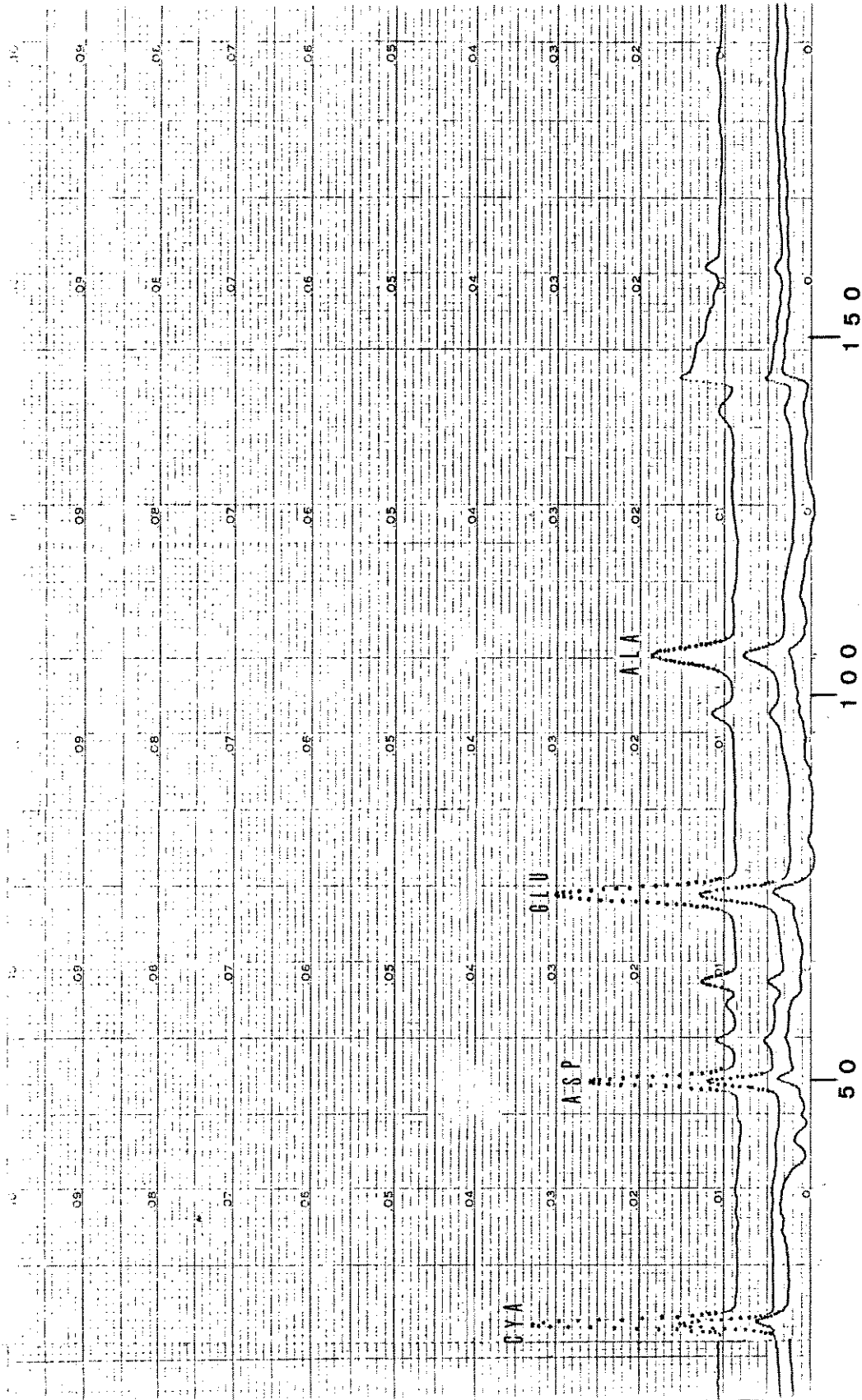


Figura 11. Registro gráfico da análise de aminoácidos do material eluído da banda PTL

TABELA 3

COMPOSIÇÃO DE AMINOÁCIDOS DO PEPTÍDEO PT1

Resíduo	PT1 moles resíduo/moles peptídeo
CmCysSO ₂	1.00 (1) ***
Asp	0,91 (1)
Glx	1.82 (2)
Ala	0,93 (1)
N-terminal: Asp	
Mobilidade eletroforética: -1.03	

* Valor não corrigido para tempo zero de hi
drólise.

** Entre parênteses o valor teórico integral

4 - DISCUSSÃO

De sangue colhido cirurgicamente da artéria femoral de Tayassu tajacu, imunizado com BGG foram isoladas duas populações de anticorpos de mobilidade eletroforética lenta (característica de proteínas IgG) coeficiente de sedimentação 7S e peso molecular ~150.000 daltons (determinado pelo volume de eluição por filtração em gel de Sephadex G-200). Por analogia com o sistema cobaia (OLIVEIRA.B.1970) estes anticorpos foram denominados IgG1 e IgG2. As frações IgG1, obtida por filtração em gel de Sephadex G-200, e IgG2 obtida por cromatografia em DEAE celulose e submetidas ao controle imunoeletroforético em gel de agar mostraram ausência de contaminantes (vide Fig. 4 a6) o que indica grau de pureza.

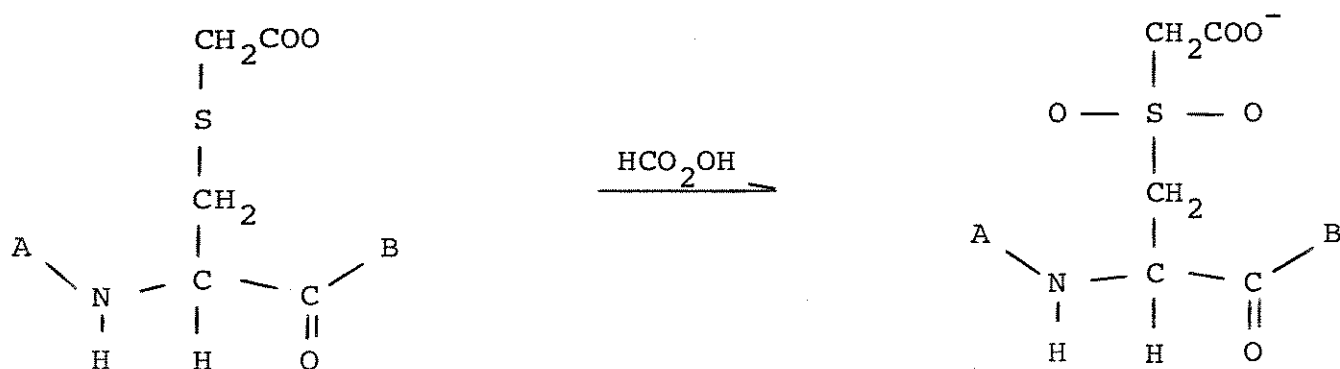
A obtenção de uma única banda pela técnica de PAGE/SDS (Fig 7) serviu como critério para justificar a determinação da composição global de aminoácidos das proteínas IgG1 e IgG2. Este critério é largamente utilizado como indicativo de grau de pureza compatível com estudos de determinação de estrutura primária de proteínas homogêneas e/ou seus fragmentos (GARCIA PARDO et al., 1981).

A composição global de aminoácidos determinada para as proteínas IgG1 e IgG2 foi similar a outras proteínas deste tipo. (CRUMPTON et al., 1963, WEIR et al., 1966). As diferenças detectadas quando comparadas entre si e com as IgG de composição de aminoácidos conhecida e a esperada levando-se em consideração que somente ~50% - da cadeia L e ~75% da cadeia H contribuem para a obtenção de resultados semelhantes no arranjo molecular característico 2H + 2L das imunoglobulinas do isotipo IgG.

A metodologia utilizada não permitiu a determinação de triptofano devido sua destruição durante a hidrólise ácida (BAILEY 1962). O número total de meias cistinas/mole de IgG determinadas (tomando-se como peso molecular 146.000 daltons) foi 38. Deduzindo-se

do número total de meias cistinas) mole determinado, às meias cistinas comprometidas com as pontes dissulfeto intra cadeia que contribuem para estabilização dos domínios VL, CL, VH, CH1, CH2 e CH3 e aquelas que fazem a junção H-L, se obtém um número que sugere a presença de cinco meias cistinas na região da dobradiça no caso das proteínas IgG1 e IgG2 de Tayassu tajacu. Comparação da composição de aminoácidos revela que a imunoglobulina IgG2 é mais rica em lisina, arginina e prolina e a imunoglobulina IgG1 em metionina e leucina (Tabela 4) (LESLIE et al, 1970).

A metodologia empregada para a purificação de segmentos de cadeias polipeptídicas de proteínas que apresentam em sua estrutura pontes dissulfeto (como é o caso das IgG) se baseia no princípio - que peptídeos contendo cisteína após carboximetilização 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 do peptídeo oxidado (BAILEY, 1962).

O digesto peptídico triptico da imunoglobulina IgG2 - foi submetido a mapeamento diagonal para detectar os pares H-H e HL característicos do arranjo H₂L₂ das cadeias polipeptídicas desta popu

lação molecular (Fig 10). Nos mapas realizados em duplicata foi obtido o peptídeo designado PT1. Este peptídeo é acídico, de mobilidade eletroforética idêntica ao ácido aspártico em pH 6.5 (Tabela 3); apresenta composição de aminoácidos "limpa" (Fig 11), característica de peptídeo puro. A sequência de aminoácidos determinada foi: Asp, Glu, Cys, Gln e Ala).

Estudos de homologia, composição de aminoácidos, sequência e mobilidade eletroforética sugerem que PT1 corresponde ao peptídeo C terminal de cadeia leve do isotipo Kappa de porco doméstico - (HOOD, L. et al, 1967; NOVOTNY, J. et al, 1968).

TABELA 4

COMPOSIÇÃO EM AMINOÁCIDOS DE TAY IgG2 E TAY IgG1
COMPARADAS COM AS IgG2 E IgG1, DE COBAIA (1) (2)

Resíduo	Tay IgG2	Tay IgG1	GP IgG2	GP IgG1
Lys	48.7	47.7	76.2	67.0
His	19.3	20.1	19.8	19.1
Arg	30.8	33.1	45.5	40.5
Asp	88.8	95.3	103	106
Thr	115.4	109.8	117	121
Ser	154.2	150.2	157	180
Glu	129.5	130.4	124	117
Pro	112.0	111.9	98.3	91.7
Gly	108.3	111.3	84.6	94.7
Ala	83.9	84.4	83.6	81.0
Cys/2 ⁽³⁾	38.4	39.0	35.2	34.6
Val	122.3	125.5	112	97.8
Met ⁽⁴⁾	16.2	17.7	15.6	17.1
Ile	42.2	40.4	47.7	49.9
Leu	100.7	104.6	87.0	101
Tyr	55.0	55.1	546	535
Phe ⁽⁵⁾	42.3	44.4	43.9	48.1
Total	1308	1314	1305	1320

(1) Lamm.M. (1969) - Immunochemistry, Vol 6, pp.235-240

(2) Moles de resíduo/moles de proteína

(3) Determinado como Cya (ácido cisteico)

(4) Determinado como Met SO₂ (Metionina Sulfona)

(5) Os totais das proteínas Tay estão normalizados para um mesmo valor. Não foram considerados os resíduos Triptofano.

TABELA 5

K	H	Phe Asn Arg Gly Glu Cys
	M	Phe Asn Arg Asn Glu Cys
	P	Phe Asn Arg Asn Glu Cys Gln Ala
Tay PT ₁		Asp Glu Cys Gln Ala
λ	H	Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
	M	Lys Ser Leu Ser Arg Ala Asp Cys Ser Pro Glu
	P	Thr Val Thr Pro Ser Glu Cys Ala
	Ch	Lys Arg Ser Glu Cys

Comparação da sequência de aminoácidos do resíduo PT₁ com a sequência de aminoácidos de peptídeos C terminais de cadeia leve de IgG do homem (H), camundongo (M), porco (P) e galinha (Ch).

5 - RESUMO E CONCLUSÕES

De soro de Tayassu tajacu imunizado com gama globulina Bovina (BGG) foram isoladas duas populações de imunoglobulinas IgG1 e IgG2. Seu grau de pureza foi avaliado através de imunoeletroforese em agar e eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS.

A composição global de aminoácidos das proteínas IgG1 e IgG2 mostrou: a) presença de 39 meia cistinas para ambas moléculas ; b) o número total de resíduos (excluindo o triptofano) igual a 1314 para IgG1 e 1308 para IgG2. c) um padrão de resíduos compatível com as IgG.

Os resultados do número de resíduos de meia cistinas sugerem um número de cinco meia cistinas na região da dobradiça.

O pentapeptídeo PTL de sequência de aminoácidos Asp - Glu - Cys - Gln - Ala isolado do digesto p $\acute{e}$ ptico-tr $\acute{r}$ ptico da proteína IgG2 tipica quimicamente a proteína IgG2 como uma proteína do isotipo Kappa.

- BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

- ALONZO, N. & HIRS, C.H.W. Automation of sample aplication in aminoacid analysers. Analyt Biochem. 23: 272-88, 1968.
- BAILEY, J.L. Techniques in protein chemistry 2 ed. Amsterdam, Elsevier, 310 p. 1962.
- BROWN, J.R. and HARTLEY, B.S. The dissulphide bridges of chymotrypsinogen-A. Biochem. J. 89: 59-64, 1963.
- BROWN, J.R. and HARTLEY, B.S. Location of dissulphide bridges by paper electrophoresis. The dissulphide bridges of bovine chymotrypsinogen-A. Biochem. J. 101: 214-28, 1966.
- COHEN, S. and PORTER, R.R. Immunoglobulins. Advan. Immunol. 4, 287-291, 1964.
- CRUMPTON, M.S. and WILKSON, J.M. Aminoacid composition of human and rabbit γ globulins. Biochem. J. 88: 228-34, 1963.
- EDELMAN, G.M., CUNIGHAM, B.A., GALL, E.W., GOTTLIED, P.D., RUTISHAVSER V. and WAXDAL, M. The covalent structure of an entire γ immunoglobulin molecule. Proc. Natl. Acad. Sci. 63: 78-85, 1969.
- EDELMAN, G.M. and GALL, W.E. Ann. Rev. Biochem. 38, 415-442, 1969
- EDMAN, P. Sequence determination. In: Needleman, S.B. Protein sequence determination. Berlin, Springer - Verlag, 1970, C.8 p. 211-53.
- FRANEK, F. Heterogeneity and structure of pig immunoglobulins. Nobel Symp. 3, 211-22, 1967.

FUNDENBEG, H.H., PINK, J.R.L., STITES, D.C. and WANS, A.C., Basic Immunogenetics. New York, 1972. 214 p.

GARCIA-PARDO, A., LAMM, M.E., PLAUT, A.G. & FRANGIONE, B. J.Chain 15 covalent bound to both monomer subunits in human secretory IgA. J. Biol. Chem. 256(22): 11734-8, 1981.

GIVOL, D. and De LORENZO, F., J. Biol. Chem. 243, 1886-89, 1968.

GOODMAN, J.W. and WANG, A.C. In Fundenberg, H.H. Imunologia Básica e Clínica. 2a ed. R.J. Guanabara Koogan, 1980, 35.

GRABAR, P. & WILLIAMS, C.A. Methode permettant l'étude conjuguée des propriétés électrophorétiques et immunochimiques d'un mélange de protéines application au sérum sanguin. Biochim. Biophys. Acta. 10: 193-94, 1953.

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

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

HABER, E. Ann. Rev. Biochem. 37, 497-532, 1968.

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

HOOD, L. and PRAHL, J. The immune system: A model for differentiation in higher organisms. Adv. Immunol. 14: 291-351, 1971.

LAEMMLI, U.K. Nature, 277, 680, 1970.

LAMM, M. Further comparison of guinea pig $\gamma 1$ and $\gamma 2$ immunoglobulins Amino acid composition of the polypeptide chains and papain fragments. Immunochemistry. 6: 235-40, 1969.

- LANDSTEINER, K. "The specificity of serological reactions", rev. HARVARD UNIV. PRESS. Cambridge, Mass, 1947.
- LESLIE, R.G.Q. and COHEN, S. Chemical properties of guinea pig immunoglobulins $\gamma 1G$, $\gamma 2G$ and γM . Biochem. J. 120: 787-95, 1970.
- MILSTEIN, C., CLEGG, J.B. and JARVIS, J.W. Immunoglobulin λ chains. Biochem. J. 110: 631-652, 1968.
- NOVOTNY, J., FRANEK, F., MARGOLIES, M.N. and HARBER, E. Amino acid sequence of normal (microheterogenous) porcine immunoglobulin chains. Biochemistry, 16: 17: 3765-72, 1977.
- OLIVEIRA, B., OSLER, A.C., SIRANIAN, R.P. and SANDBERG, A.L. The biologic activity of guinea pig antibodies. I. Separation of $\gamma 1$ $\gamma 2$ immunoglobulin and their participation in allergic reactions of immediate type. J. Immunol. 104: 320-28, 1970.
- OFFORD, D.E. Electrophoretic mobilities of peptides on paper, and their use in the determination of amide groups. Nature, 221: 591-3, 1966.
- OUCHTERLONY, O. Diffusion in gel methods for immunological analysis. Prog. Allerg. 5: 78-82, 1958.
- POLJAK, K.J., AMZEL, L.M. and PHIZACKERLEY, R.P. Studies on the three dimensional structure of immunoglobulins. Prog. Biophys. Molec. Biol. 31: 67-93, 1976.
- SPACKMAN, D.H., STEIN, W.H. & MOORE, S. Automation recording apparatus for use in the chromatography of amino acids. Anal. Chem. 30: 1190-206, 1958.

VALENTINE, R.C. and GREEN, N.M. J.Mol.Biol. 27: 615-32, 1967

WEIR, R.C. and PORTER, R.R. Comparision of the structure of immunoglobulins from horse serum. Biochem. J. 100: 63-8,1966.

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