

Tesis de Posgrado

Estructura y actividad biológica de inmunoglobulinas

Celis, Teodoro F. R.

1966

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Celis, Teodoro F. R. (1966). Estructura y actividad biológica de inmunoglobulinas. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1278_Celis.pdf

Cita tipo Chicago:

Celis, Teodoro F. R. "Estructura y actividad biológica de inmunoglobulinas". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1966.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1278_Celis.pdf

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ESTRUCTURA Y ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE INMUNOGLOBULINAS
Tesis para optar al título de doctor de la Universidad de Buenos Aires

Por

Teodoro F. R. Celis

Buenos Aires, República Argentina. 1966.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se inició en el Instituto Nacional de Microbiología, siendo Director del mismo el Dr. Ignacio Piroosky, y fue completado en el Centro de Investigaciones Microbiológicas de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, del cual es Director el Dr. Raul E. Trucco. A ambos, Dres. I. Piroosky y R. E. Trucco mi reconocido agradecimiento.

Al Dr. J. Churchich agradezco sus útiles sugerencias al comienzo del trabajo, y al Dr. C. Milstein la valiosa ayuda en la discusión de numerosos resultados.

Al Dr. J. M. Dellacha agradezco la gentileza al facilitarme muestras de dinitrofenilaminoácidos.

INDICE DE CONTENIDOS

	Pag.
INDICE DE TABLAS	iv
INDICE DE ILUSTRACIONES	v
Capitulos	
I. INTRODUCCION.....	1
II. MATERIAL Y METODOS	17
III. RESULTADOS	30
IV. DISCUSION	56
V. RESUMEN	71
BIBLIOGRAFIA	74

INDICE DE TABLAS

Tabla	Página
1. Análisis de aminoácidos en inmunoglobulinas.....	3
2. Coeficientes de extinción a 280 de gama globulina de conejo y humana intactas y reducidas y carboximetiladas.....	31
3. Peso molecular, mediante equilibrio de sedimentación, de gama globulina reducida y carboximetilada.....	34
4. Peso molecular de gama globulina humana reducida y carboximetilada mediante equilibrio de sedimentación y sedimentación-difusión.....	36
5. Contenido de S-carboximetilcisteína en gama globulina humana y de conejo reducida y carboximetilada.....	40
6. Residuos N-terminales en gama globulina intacta y reducida y carboximetilada.....	41
7. Determinación de recuperación de dinitrofenilaminoácidos sometidos a hidrólisis y cromatografía.....	42
8. Recuperación de proteína en fracciones eluidas de DEAE-celulosa de gama globulina reducida y carboximetilada.....	43

INDICE DE ILUSTRACIONES

Figura	Página
1. Modelo de estructura de gama globulina de conejo.....	7
2. Representación esquemática de un posible modelo de estructura espacial de gama globulina.....	10
3. Sedimentación en ultracentrífuga analítica de gama globulina 7S ...	23
4. Sedimentación en ultracentrífuga analítica de gama globulina reducida y carboximetilada.....	36
5. Difusión de gama globulina reducida y carboximetilada.....	37
6. Homogeneidad de fragmentos de gama globulina reducida y carboximetilada.....	39
7. Cromatografía en DEAE-celulosa de gama globulina reducida y carboximetilada.....	45
8. Ionograma de fracciones I eluidas de DEAE-celulosa, obtenidas de anticuerpos de diferente especificidad.....	47
9. Idem anterior, fracciones II.....	48
10. Idem anterior, fracciones III.....	49
11. Idem anterior, fracciones IV,.....	50
12. Medición de actividad biológica de fragmentos por el test de coprecipitación.....	53
13. Actividad biológica de fracciones eluidas de DEAE-celulosa, determinada por el test de coprecipitación.....	55

ESTRUCTURA Y ACTIVIDAD BIOLÓGICA

DE

INMUNOGLOBULINAS

CAPITULO I

INTRODUCCION

Actividad inmunológica se ha encontrado en tres tipos de globulinas séricas de vertebrados. El componente principal, denominado 7 S gama globulina - o γ_2 - con un bajo contenido en hidratos de carbono y peso molecular aproximado de 150.000, comprende un 85 - 90 % del total. El segundo en importancia, γ_{1M} β_{2M} o 19 S gama globulina de alto peso molecular y alta movilidad electroforética a pH 8, 6, y, finalmente el grupo γ_{1A} β_{2A} , detectado mediante inmunolectroforesis (1) por Grabar y Williams en suero humano, probablemente vinculado a los procesos de sensibilización cutánea (2).

Dada la importancia y la bibliografía acumulada fundamentalmente sobre 7 S gama globulina en esta introducción se tratará, salvo especificación, las propiedades fisicoquímicas y biológicas de esta proteína en las

diferentes especies estudiadas.

Propiedades fisicoquímicas;

La forma de la molécula determinada por microscopía electrónica muestra una asimetría con una relación de ejes de ocho o nueve a uno y dimensiones de 250 a 300 Å (3).

Estudios posteriores concuerdan con estos datos (4), apareciendo la molécula más alargada cuando se la fotografía en presencia del antígeno.

El peso molecular de la molécula ha sido estimado por diversos autores: para gama globulina de conejo se ha informado distintos valores oscilando todos entre 140.000 y 150.000 (5).

Macroglobulinas de caballo y del hombre tienen una constante de sedimentación de 18 - 20 S y un peso molecular aproximado de $1 \cdot 10^6$.

La estructura terciaria de gama globulina ha mostrado por medidas de dispersión rotatoria poco o ningún contenido en péptidos de forma

α - hélice (6). Winkler y Doty (7) han confirmado estos datos y sugerido que el hecho obedecería a un alto contenido en prolina.

Mediante determinaciones de viscosidad, sedimentación, rotación óptica, solubilidad, fluorescencia y espectrofotometría ultravioleta se ha intentado definir las propiedades físicas de la molécula, sometida a cambios de pH y altas concentraciones de úrea o guanidina. Urea en concentración 8 M determina un hinchamiento y desdoblamiento de la molécula, aunque una cierta organización se mantiene y el efecto es reversible (8).

Desorganización total se logra a pH 11-12 y úrea 8 M o en soluciones de detergentes (9).

La actividad biológica de la molécula desaparece por efecto de urea 8 M pero es recuperada después de eliminada la úrea por diálisis (10). Si el anticuerpo se somete a la acción de úrea 10 M por cinco días, la desnaturalización es irreversible (11).

Diversos autores han publicado resultados de análisis de anticuerpos purificados referidos a su contenido porcentual en aminoácidos (12). Los resultados son en general concordantes con los de Crumpton y Wilkinson que se adjuntan a continuación:

Tabla 1

Análisis de aminoácidos de inmunoglobulinas

Residuo (g) / 100 g. de proteína

Aminoácido	Inmunoglobulina de conejo	Inmunoglobulina humana
Lisina	5.76	7.06
Histidina	1.73	2.44
Arginina	4.42	4.02
Acido aspártico	8.08	7.77
Treonina	10.37	7.04
Serina	8.32	9.13
Acido glutámico	11.05	11.18
Prolina	6.79	6.40
Glicina	3.98	3.37
Alanina	3.71	3.29
Valina	8.36	7.82
Metionina	1.13	0.93
Isoleucina	3.49	2.16
Leucina	6.73	7.40
Tirosina	6.17	5.76
Fenilalanina	4.15	4.07
Cistina	2.13	2.07
Triptófano	2.90	2.63
Hidrato de carbono	2.40	2.80

Por mediciones termodinámicas solo el 1 % de estos aminoácidos participaría del centro activo de la molécula o sitio de combinación del anticuerpo (13). Por lo tanto, si se admite un total aproximado de 1.300 aminoácidos, y solo 13 de ellos forman el centro activo, las dificultades en obtener resultados concluyentes que definan especificidad biológica en función de estructura resultan obvias, en el estado actual de la metodología del estudio de proteínas.

Las conclusiones de resultados que vinculan estructura con actividad biológica se complican aún más ante la existencia de grupos alotípicos de gama globulina en un mismo individuo.

Pequeñas diferencias detectadas en el análisis de aminoácidos de dos anticuerpos sintetizados por un mismo conejo inyectado con distintos antígenos indican una cierta correlación entre su estructura y su función (14). Si bien esta diferencia aparece como evidente (4 ácidos aspárticos más y 2 argininas menos en un anticuerpo con respecto al otro) la complejidad estructural de la molécula dificulta extraer conclusiones definitivas.

Análisis de fragmentos de gama globulina

Mediante la hidrólisis enzimática y posterior electroforesis y/o cromatografía de los péptidos resultantes se han obtenido resultados satisfactorios en la correlación de la estructura de algunas proteínas y su función. Tal es el caso de diferentes hemoglobinas anormales estudiadas por Ingram (15).

Haciendo uso de esta técnica se ha intentado detectar diferencias en distintos anticuerpos específicos, por diversos autores. Resultados concluyentes no se han obtenido hasta el presente (16).

En vista de este tipo de dificultades la mayoría de los estudios que tratan de correlacionar estructura con actividad biológica se han orientado al análisis de fragmentos de inmunoglobulinas, obtenidos mediante reducción química o ruptura enzimática.

Mediante hidrólisis con papaína (17) en presencia de cisteína, la molécula da tres fragmentos (Fig. 1) principales con escasa producción de pequeños péptidos. Cada uno de estos fragmentos comprende, aproximadamente un tercio del total de la molécula y dos de ellos son biológicamente activos aunque incapaces de precipitar con el correspondiente antígeno. La movilidad electroforética de estos fragmentos depende de la especie de origen. Obtenidos de anticuerpos de conejo se los conoce como I o de alta movilidad a pH neutro y II o de baja movilidad. Originados en gama globulina humana u otras se los conoce como fragmentos S (18) o A (alta movilidad) y C (baja movilidad) (19). El fragmento restante es conocido como III cuando proviene de conejo y F o B cuando se origina en otras especies. Es biológicamente inactivo, posee un elevado contenido en hidratos de carbono y es fácilmente cristalizable cuando proviene de anticuerpo de conejo.

Utilizando pepsina a pH 5, como agente hidrolítico se obtiene un fragmento de 5 S y peso molecular aproximado de 100.000 junto con pequeños

péptidos (20). Este fragmento de 5 S es capaz de precipitar con el antígeno, y es capaz, asimismo de romperse en mitades por reducción de sus puentes de disulfuro con mercaptoetanol. Cada una de estas mitades es activa biológicamente y semeja a los fragmentos I y II obtenidos con papaína. El fragmento III papáínico es resuelto en varios subfragmentos por hidrólisis péptica, siendo evidente que la molécula es rota por la enzima a nivel de este fragmento (21).

La digestión de gama globulina con tripsina rinde un 50% de fragmentos de 3, 5 S (22) quedando un remanente de 5 S resistente a la digestión aún en presencia de cisteína.

Edelman (23) y Edelman Poullick (24) mediante el uso de úrea y mercapto-etanol lograron romper la molécula en componentes pequeños y demostraron que la proteína estaba formada de varias cadenas polipeptídicas. El dosaje de residuos N-terminales, por otra parte, ha dado un solo residuo para gama globulina de conejo (5) y dos para gama globulina humana(25)

Como una probable explicación de estos resultados contradictorios, se ha supuesto que en la molécula existirían residuos N- terminales sustituidos o bloqueados en su grupo amino.

Los productos de reducción por úrea y mercaptoetanol son difíciles de fraccionar dada su insolubilidad y, por otra parte, la actividad biológica de la molécula no es recuperada después de la reducción.

Fleishman, Pain y Porter (26) redujeron puentes disulfuro de la molécula con mercaptoetanol 0.2 M y evitaron su reoxidación por carboxime-

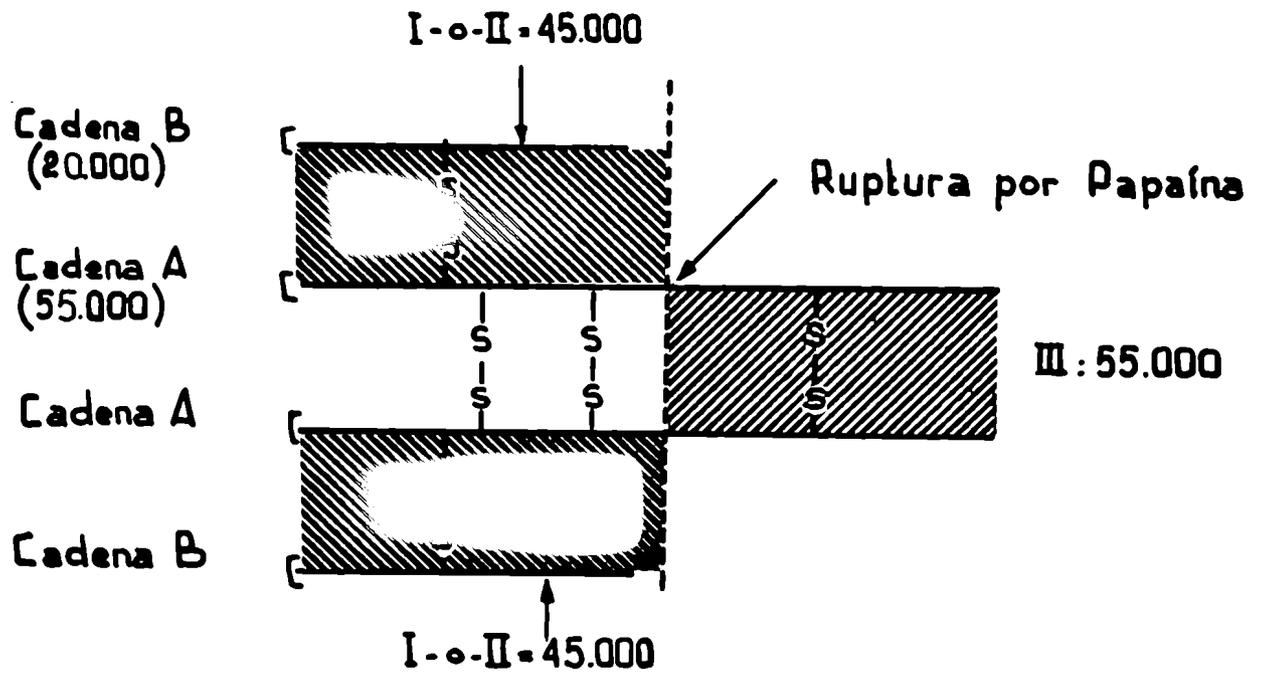


Figura 1: Modelo de estructura de gama globulina de conejo segun

Porter y col. (ref. 70)

tilación con ácido iodoacético. Si en estas condiciones la mezcla de reacción era dializada contra ácido acético 1 N o propiónico 1 N, se lograba separar los fragmentos en dos componentes por pasaje a través de una columna de Sephadex G - 75. El componente mayor se denominó A o cadena pesada, teniendo un peso molecular aproximado de 55.000 y el componente menor B, o cadena liviana de 20.000. La cantidad de proteína recuperada correspondiente a cada fracción: 70-75% para el componente A y 20-25% para el componente B, así como el hecho de que el contenido total de aminoácidos de los distintos componentes, esté en buena correlación con el contenido de la molécula total ha hecho postular a los autores un modelo probable de estructura de gama globulina constituido por cuatro cadenas, 2 A y 2 B (Fig. 1).

Mediante estudios de actividad inmunológica Fleishman y colaboradores determinaron la correlación entre su modelo propuesto y el efecto de la papaína sobre el mismo. Así, suero de cabra inyectada con fragmentos I o II obtenidos por reducción papaínica reaccionaba con cadena A o B indistintamente, en tanto que suero con anticuerpos contra el fragmento III reaccionaba únicamente con cadena A y no con B. Según puede verse en la figura 1 el modelo incluye tres uniones disulfuro entre cadenas A y una entre cada cadena A y B.

Sí bien el modelo propuesto por estos autores tiende a ser aceptado, es solo tentativo y existen ciertos puntos aún por aclararse. Uno de ellos es el hecho de que la reducción con papaína insoluble (27) no conduce a la

liberación del fragmento III a menos que se añada un reductor de unión disulfuro. Esto indicaría que la ruptura de uniones peptídicas en la cadena A, se acompaña de una reducción disulfuro que aparece como indispensable. Otro hecho no aclarado es el que se refiere a datos genéticos sobre estas cadenas. Se ha encontrado que existe un locus que encierra la información para la cadena B y otro para la mitad de la cadena A que forma parte de los fragmentos I o II, llamada pieza A, de la reducción papainica (28). Un tercer locus independiente de los anteriores (29) controlaría la porción de cadena A correspondiente al fragmento III.

Estos datos sugerirían la existencia de más de cuatro cadenas en la molécula, y los mismos autores han postulado un modelo teórico de seis cadenas - 2 A - 2 B y 2 C - aunque no se ha encontrado evidencia experimental para el mismo (30).

Una limitada ruptura de la molécula de gama globulina ha sido comunicada por Cahnmann y colaboradores (31) quienes obtuvieron fragmentos activos de S₂S.

Utsumy y Karush (21) estudiando las distintas fracciones obtenidas por hidrólisis con pepsina separadas posteriormente por Sephadex G - 75 han establecido el punto de ataque de la enzima sobre la gama globulina, y comparado los fragmentos obtenidos por digestión con pepsina y con papaina.

Estabilidad de la molécula de gama globulina

Cecil y Wake han demostrado que en diferentes proteínas la unión disulfuro intercadena es más lábil que la unión disulfuro intracadena (32).

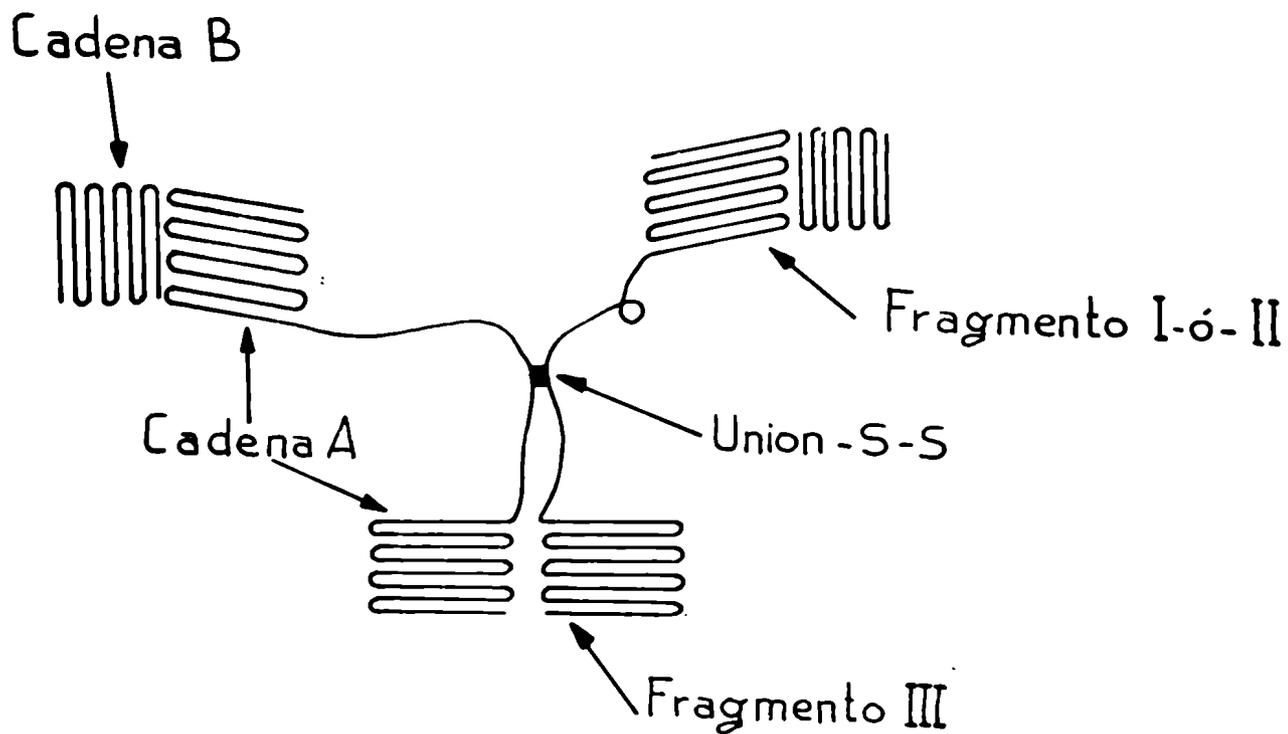


Figura 2: Representación esquemática de un posible modelo de gama globulina según Tanford y col. (ref. 35)

La molécula de gama globulina posee aproximadamente 20-22 uniones disulfuro determinadas por diferentes métodos (33). No existe información concordante respecto al número de uniones disulfuro intercadena de la molécula. Así Porter y colaboradores han determinado cinco uniones disulfuro intercadenas en la reducción y separación de las cuatro cadenas. Hong y Nisonoff (34) han logrado la separación de la molécula en mitades con mercapto etanol con la reducción de solo un puente disulfuro. Finalmente en una experiencia de dosaje de uniones disulfuro Cecil (35) ha encontrado 6, 6 uniones intercadena en proteína de conejo y 6 en globulina humana y ha postulado, que la estabilidad de las uniones disulfuro está determinada por el refuerzo que les es dado por otras uniones no covalentes vecinas.

Tanford y colaboradores (35), analizando datos de depolarización de la fluorescencia de la molécula y teniendo en cuenta que la hidrólisis enzimática efectuada por diversas enzimas específicas, ataca a la proteína en una zona que es común para dichas enzimas ha propuesto un modelo de conformación de gama globulina. En el mismo existiría la porción correspondiente a los fragmentos obtenidos por el efecto enzimático como proteínas globulares típicas, y una zona menos compacta o "aflojada" localizada en la cadena A que vincula los fragmentos de hidrólisis y reducción (Fig. 2). Sobre esta porción menos compacta de la molécula ejercerían su acción las enzimas hidrolíticas.

Centro activo de gama globulina inmune.

Numerosos intentos se han hecho para ubicar en las distintas cadenas peptídicas o fragmentos obtenidos a partir de gama globulina inmune el sitio de combinación del anticuerpo. De los fragmentos obtenidos por digestión papáinica ninguno es capaz de precipitar con el antígeno, pero el I o el II son activos en mediciones cuantitativas de actividad biológica por el Test de inhibición o coprecipitación del antígeno con el anticuerpo. De esto se puede inferir, de acuerdo al modelo de cuatro cadenas, que el centro activo está localizado en cadena B o en pieza A. Cuando se mide actividad inmune utilizando cadena A o cadena B, Fleischmann y colaboradores (36) encontraron que la cadena A de gama globulina inmune de caballo inyectado con gama globulina de conejo es un 70 - 80 % tan activa como la molécula intacta en coadyuvar la precipitación antígeno-anticuerpo. Con el mismo anticuerpo pero sintetizado contra toxoide diftérico la cadena A es capaz de inhibir la reacción de precipitación y es tan eficaz como el anticuerpo intacto. En ambos casos la cadena B es totalmente inactiva.

Edelman y colaboradores (37) encontraron que si se separaba anticuerpos de cobayo de diferentes especificidades en sus cadenas A y B y luego se las comparaba por electroforesis en gel de almidón en úrea 8 M a pH 3, 5, la cadena A daba manchas idénticas en distintos anticuerpos y aún con respecto a gama globulina inerte. En cambio la electroforesis de diferentes cadenas B indicaba diferencias localizadas en esta cadena. Esto sugería que en este tipo de anticuerpos la cadena B contiene el centro ac-

tivo o por lo menos contribuye a él. Sin embargo, estas diferencias observadas en los modelos electroforéticos de cadenas B pertenecientes a distintos anticuerpos no se observan cuando los anticuerpos provienen de conejo o de caballo. Más aún si la electroforesis en almidón se hace a pH neutro y úrea 8 M no se observan diferencias en las manchas dadas por cadenas B provenientes de anticuerpos de cualquier especie (38).

Cuando se reducía y separaba, en sus cadenas A y B, anticuerpo de conejo antilisozima, la inhibición de la enzima por precipitación se lograba con un componente que era fundamentalmente cadena B con algo de pieza A (39).

Pressman y Poholt (40) y Roholt y colaboradores (41) marcaron con I^{131} un precipitado de anticuerpo antihapteno en presencia del hapteno y con I^{125} en ausencia del hapteno. Los dos preparados fueron mezclados, digeridos con pepsina, separados sus péptidos por ionoforesis en papel y medida la radiactividad de las distintas manchas. La mayoría de las manchas revelaba radiactividad para ambos marcadores pero había 3 fracciones que mostraban una marcación solo con I^{125} cuando provenían del anticuerpo en ausencia del hapteno. Esto indicó que algunos residuos tirosílicos estarían protegidos por el antígeno en el precipitado. Cuando se disoció estos preparados y usó sus cadenas pudo verse que estas fracciones marcadas preferencialmente con I^{125} pertenecían a cadenas B.

Metzger y Singer (42) usaron anticuerpos de conejo contra dinitrofenil-lisina como hapteno. Si el anticuerpo era reducido y separado en sus cuatro

cadenas, pero previamente se le agregaba el hapteno, éste aparecía finalmente en la fracción correspondiente a la cadena A, aunque el rendimiento de la cadena B, después de la cromatografía en Sephadex, descendía del 25 % a un 16%. Se interpretó esto como que parte de la cadena B estaba involucrada en la unión hapteno - anticuerpo o bien la combinación impedía un total desdoblamiento de cadena e indirectamente de la liberación de la cadena B.

Giveol y Sela (43) usando como antígeno un complejo de politioril - gelatina encontraron que precipitaba con su anticuerpo; si posteriormente se lo sometía a un efecto de colagenasa se hidroliza la gelatina y queda el anticuerpo copulado a los grupos politirosilos. Si se usaba politirosina C¹⁴ y determinaba radiactividad después de redacido y fragmentado el complejo anticuerpo - antipolítirosil C¹⁴, se encontraba un 80 % de radiactividad en un pico correspondiente a politirosilos libres y un 20 % asociado a cadena A o a su dímero. Cadena B no contenía radiactividad.

Los resultados de estas experiencias dan una idea de lo difícil, hasta el momento, de ubicar en la molécula el sitio de combinación del anticuerpo. Eclécticamente tiende a pensarse que estaría distribuido en ambas cadenas o por lo menos requeriría la participación de las dos para manifestarse.

Tampoco existe acuerdo acerca de cuál de las estructuras de la proteína primaria, secundaria o terciaria - es la responsable de su actividad inmunológica.

Desde este punto de vista tres posibilidades se han planteado:

- 1) La gran variedad de especificidades estaría determinada por diferencias en las secuencias de aminoácidos en su cadena primaria (44);
- 2) La especificidad estaría determinada por la disposición de sus uniones disulfuro (10). Una vez que la disposición de uniones disulfuro se determina la molécula se plegaría en una exclusiva conformación de acuerdo a las exigencias fisiológicas;
- 3) Por último la especificidad estaría determinada, fundamentalmente por uniones no covalentes, determinadas en el sitio de su biosíntesis por la presencia del antígeno. (45)

Dada la heterogeneidad estructural y biológica, aún de moléculas altamente específicas es difícil discernir entre estas posibilidades.

Experiencias de destrucción de la estructura terciaria de la molécula con 8 M úrea, con restitución de su actividad biológica después de reconstituida la proteína, han descartado prácticamente la posibilidad 3 (8).

Pérdida de actividad se ha observado por ruptura de uniones disulfuro, especulándose con este tipo de datos para asignar a estas uniones un papel decisivo en el centro activo de la molécula. Aún no se ha logrado una recuperación de actividad por destrucción y reconstitución de uniones disulfuro, experiencia que definiría esta posibilidad.

En la actualidad la tendencia más admitida atribuye a la secuencia de aminoácidos en su cadena primaria la responsabilidad por el sitio de combinación del anticuerpo. Por otra parte, so bien no existen evidencias con-

cluyentes, los modelos propuestos sobre plegamiento de proteínas tienden a indicar que tanto la estructura terciaria como la secundaria son definidas en última instancia por la disposición de sus aminoácidos en la cadena primaria (46).

En este trabajo se presentan los resultados y conclusiones de un método para reducir y fragmentar inmunoglobulinas 7 S de conejo sintetizadas contra distintos antígenos. El agente reductor usado es el borohidruro de sodio en presencia de úrea 8 M. La molécula en estas condiciones se fragmenta en componentes de aproximadamente un octavo de su peso total con formación de péptidos pequeños en escasa proporción.

La molécula así tratada es soluble en soluciones salinas comunes (0.16 M) y es inmunológicamente activa.

Comparativamente se ha utilizado además, en algunas mediciones, gama globulina humana 7 S.

CAPITULO II

MATERIAL Y METODOS

Purificación de gama globulina

Gama globulina de conejo fué purificada mediante el Método de la triple precipitación con sulfato de sodio usado Kekwik (47).

El plasma obtenido por sangría total de uno o varios conejos fué separado de los elementos formes de la sangre por centrifugación a 3,000 RPM durante 15 minutos. Sulfato de sodio, 18 gramos % se añadió al plasma con agitación constante y centrifugó 15 minutos a 3,000 RPM, redisolviendo el precipitado con un búffer de fosfato de pH 8 y fuerza iónica de 0.1 a un 40% del volumen inicial. La segunda y tercera precipitación se hicieron con sulfato de sodio 12 %. La proteína así purificada fué dializada contra grandes volúmenes de agua destilada hasta eliminar todo el sulfato y finalmente se liofilizó y mantuvo en el congelador.

Gama globulina humana, así como algunas preparaciones de gama globulina de conejo, fueron preparadas mediante columnas de dietilaminoetilcelulosa descritas por Sober y Peterson (48). Columnas del adsorbente (2 por 25 cm.) eran equilibradas con búffer de fosfato de pH 7 y 0.005 M.

El plasma dializado contra el mismo búffer era sembrado en la resina y eluido inicialmente con el búffer de equilibrio. Gradientes de pH-7.0 a 6.0- y fuerza iónica (fosfato 0.005 a fosfato 0.05- cloruro de sodio 0.05 M) permiten una efectiva separación de los componentes proteicos del plasma. El control de pureza se hizo para ambos procedimientos mediante ultracentrifugación analítica.

En algunas determinaciones se usó gama globulina humana fracción II de Cohn, obtenida por precipitación alcohólica, proveniente de Mann Research Laboratory.

Inmunización de conejos

Conejos machos, de 1.000 a 1.500 gramos de peso fueron inoculados con distintos antígenos: albúmina de bovino, ovoalbúmina o gama globulina humana.

Cien mg. de antígeno eran disueltos en bicarbonato de sodio junto con hidróxido de aluminio (3 por mil) como adyuvante. Se inyectó un total de 71 mg. por animal por vía subcutánea, comenzando con 1 mg. el primer día, duplicando la dosis cada tres días hasta llegar a 12 mg. por dosis que se mantenía como tope hasta el final de la inmunización. Una semana después de la última inyección se medían los títulos de anticuerpos por diluciones y se sangraban los animales.

En algunos casos se utilizó el antígeno con adyuvante de Freund (49) dando en una única dosis el total de antígeno inyectado en la almohadilla plantar de una o dos patas de conejo. En estos casos se purificaba anticuer

pos a los 29 días de la inyección.

Reducción y carboximetilación de la proteína

Inmunoglobulina de conejo y gama globulina humana fueron reducidas en úrea 8 M (1 %) con borohidruro de sodio (1 %) a 41°C, con agitado permanente en un frasco de reacción abierto, durante una hora. Finalizado este tratamiento y una vez alcanzada la temperatura ambiente (20 minutos) la mezcla de reacción era tratada con ácido iodoacético 0.025 M. Después de 20 minutos la mezcla se dializaba durante 24 - 36 horas contra agua destilada o búffer en un ambiente a 4° C y con agitación permanente.

Determinación de recuperación

La cantidad de péptidos originados en la molécula reducida y carboximetilada, que no difundían a través del saco de diálisis, fué estimada por dos procedimientos. Uno de ellos consistió en diálisis exhaustiva contra agua destilada del material fragmentado y posterior liofilización. Por peso seco se determinaba lo recuperado.

En otro procedimiento se diluía el contenido no difusible del saco de diálisis y se leía a 280, la cantidad de proteína retenida, previo conocimiento de los coeficientes de extinción de los respectivos fragmentos.

Coefficientes de extinción específicos

Para gama globulina de conejo y gama globulina humana ambas reducidas y carboximetiladas fueron determinados sus coeficientes de extinción. Para ello después de reducida la molécula era dializada contra agua y lio-

filizada hasta peso constante. Con búffer de borato pH 6,4, 0,16 M se hicieron diferentes concentraciones y sus absorbancias se leyeron a 280.

Determinación del coeficiente de sedimentación

Coeficientes de sedimentación -S- se determinaron para fragmentos de inmunoglobulinas de conejo, fragmentos de gama globulina humana, así como en el control de pureza al preparar anticuerpos de conejo y gama globulina de suero humano, de acuerdo al procedimiento descrito por Schachman (51).

Todas las determinaciones se hicieron en una ultracentrífuga analítica modelo E, con control de temperatura y el sistema óptico de Schlieren. En el cálculo de la constante de sedimentación se usó la fórmula de Kegeles y Gutter (52).

$$S = \frac{2,303}{w^2 \cdot 60} \cdot \frac{\log. X_2 - \log. X_1}{t_2 - t_1}$$

donde la velocidad angular, $w = 2 \pi \cdot \frac{\text{RPM}}{60} \text{ seg}^{-1}$

X_2 y X_1 son las distancias desde el centro de rotación al máximo de los picos observados en los tiempos t_2 y t_1 respectivamente.

Correcciones de S para obtener $S_{20, w}^0$ se hicieron determinando la constante - en el caso de globulinas fragmentadas - a distintas concentraciones, y mediante los factores de corrección de acuerdo a la fórmula de Svedberg y Pedersen

$$S_{20, w} = S_{\text{obs.}} \cdot \frac{\lambda_h t}{\lambda_{h20}} \cdot \frac{(1 - \nabla \rho)_{20, w}}{(1 - \nabla \rho)}$$

η_t es la viscosidad del solvente a la temperatura de la experiencia.

η_{20} - es la viscosidad del agua a 20°C.

\bar{V} es el volumen parcial específico de la proteína y ρ es la densidad del solvente. La densidad del búffer fué determinada en un picnómetro de 5 ml. a dos temperaturas, 27 y 37 grados. La viscosidad del búffer fué medida en un viscosímetro de Ostwald a 37° con dos mililitros de búffer y 2 mililitros de agua destilada sucesivamente. El cálculo se hizo según la fórmula de Schachman (51).

$$\frac{\eta}{\eta_0} = \left[\frac{t}{t_0} \right] \left[\frac{\rho}{\rho_0} \right]$$

η_0 , t_0 y ρ_0 son viscosidad, tiempo de flujo y densidad del agua destilada η , t y ρ son los correspondientes valores del búffer.

Determinación del coeficiente de difusión

En fragmentos obtenidos a partir de gama globulina humana se determinó el coeficiente de difusión en un equipo de electroforesis libre y difusión modelo K, equipado con un sistema óptico Schlieren y de interferencia Rayleigh. Una microcelda de 3 ml. se usó en un baño a temperatura constante de 4 grados C.

Las fotografías fueron tomadas a distintos intervalos después de formado el límite solución - solvente, usando las muestras del sistema de interferencia Rayleigh para el cálculo de la constante de difusión según el método de Longworth (51).

En este método se supone que la distribución de la concentración en el

límite es Gaussiana y se puede, por lo tanto, utilizar tablas de funciones de probabilidad. El número de franjas obtenidas por el sistema Rayleigh en cada fotografía fué medido en un microcomparador deslizable y simultáneamente la distancia que separa las franjas entre sí. Apareando franjas separadas es posible medir la distancia que las separa y conocer el valor de la función

$$\frac{2}{\sqrt{\pi}} \int_0^X e^{-x^2} dx$$

directamente de los datos obtenidos. En la tabla de función de probabilidades se obtienen los límites de esta integral, $X = \frac{h}{(4 \cdot Dt)^{\frac{1}{2}}}$ de donde se puede obtener D.

Determinación de peso molecular por equilibrio de sedimentación

El peso molecular de los fragmentos obtenidos por reducción, hidrólisis y carboximetilación de gama globulina de conejo y humana fué calculado por el método de Archibald (51).

$$P M = \frac{R \cdot T}{(1 - \bar{V}) w^2} \frac{(dc / dx)_m}{X_m C_m}$$

donde (dc / dx) m es el gradiente de concentración en el menisco, X_m es la posición del menisco y C_m es la concentración en el menisco.

Cuando el cálculo involucra el segmento inferior o "bottom" de la solución se usa (dc / dx)_b, C_b y X_b.

El valor de (dc / dx) y X se determinan directamente leyendo la ampliación

de la placa fotográfica calcada en papel milimetrado.

El valor de C se determina según la ecuación de Klainer y Kegeles (54).

$$C_m = C_0 - \frac{1}{X_m^2} \int_{X_m}^X X^2 (dc / dx) dx$$

X es una región de la meseta donde dc / dx es igual a 0.

C_0 se determina por medición del área encerrada por el pico de una corrida en celda de límite sintético a baja velocidad. Determinaciones a distintas concentraciones permiten extrapolar a una concentración $\underline{0}$ graficando $1 / PM_{ap}$ versus concentración.

Estudio de homogeneidad de los fragmentos

Dada la tendencia de estos fragmentos a agregarse se hizo una determinación de homogeneidad según el procedimiento ideado por Van Holde y Baldwin (55). Con este procedimiento se hace un equilibrio de sedimentación utilizando columnas cortas de solución (1 a 3 mm.), con lo cual se logra el equilibrio en un corto tiempo.

Con los datos obtenidos en diferentes tiempos de la experiencia se grafica

$$\int_a^r X dr \quad \text{versus} \quad Z / r$$

donde Z es la deflección de la imagen dada por el Schlieren, \underline{a} es la zona

del menisco y \underline{r} es la distancia del centro de rotación.

Los valores de esta integral para cada valor de \underline{r} se determinan por integración numérica del área correspondiente.

Medición del número de uniones disulfuro reducidas y carboximetiladas

Esta determinación se hizo midiendo la cantidad de S - carboximetilcisteína formada al reducirse las uniones disulfuro de la molécula y posterior complejamiento con ácido iodoacético. Una alícuota de inmuno-globulina de conejo y otra de gama globulina humana reducidas, carboximetiladas, dializadas contra agua exhaustivamente y liofilizadas hasta peso constante fueron usadas.

Con este material se hizo una hidrólisis en ácido clorhídrico 5, 7 N durante 24 horas en baño de tolueno a 110°C. El material a hidrolizar fué colocado en una ampolla de vidrio junto con el ácido clorhídrico, la solución fué congelada y cerrada la ampolla previo vacío con una bomba de aceite.

Finalizada la hidrólisis, el material fué secado en un desecador con pentóxido de fósforo y ácido sulfúrico a 37°C. El material fué rediseuelto en agua y vuelto a secar, repitiendo este paso hasta eliminar el ácido clorhídrico. Una alícuota de este hidrolizado fué sembrada a 8 cm. de ambos bordes del extremo de un papel Whatman Nro. 1, con el objeto de efectuar una cromatografía bidimensional descendente.

El solvente usado en la primera dirección fue fenol-agua (80:20), Etilendiaminotetracetato 5. 10⁻⁴ M. en una cuba de vidrio saturada con

amoníaco. Después de 48 horas el papel fué retirado, dejado secar alrededor de 15 a 20 horas y sometido durante 36 horas, al solvente de segunda dimensión: ácido butílico - ácido propiónico (50:50). Acido butílico se preparaba en proporción de 250 ml. del mismo con 17 ml. de agua; ácido propiónico era mezcla de 124 ml. de propiónico con 158 ml. de agua (56).

Utilizando como standard S - carboximetilcisteína en otra hoja de papel Whatman 1 era posible localizar la mancha que contenía el aminoácido en la mezcla hidrolizada por revelado con ninhidrina (0,5 % en acetona) y 10 minutos a 80°C.

Como la cantidad así obtenida era excesivamente alta se hizo una nueva separación por eluido de la zona de papel correspondiente al Rf del aminoácido, antes de ser rociado con ninhidrina, y pasaje a través de una columna de Amberlita CG - 120 de 0,9 x 20 cms. y pH 3.25 (57).

El aminoácido eluido con el mismo búffer (pH 3.25, ácido cítrico - hidróxido de sodio - ácido clorhídrico) aparece en los primeros tubos colectados.

La medición final de la S - carboximetilcisteína separada por hidrólisis cromatografía en papel y en Amberlita 120 fue hecha según el método de Crall y Hanan (58). Una alícuota calentada con cianuro de potasio - piridina (2 ml. de cianuro 0.01 M en 100 ml. de piridina) y fenol 80 % se llevan a ebullición con ninhidrina (5% en alcohol absoluto) durante 3 a 5 minutos; finalmente se diluye con alcohol 80 % y se lee a 570.

Síntesis de S - carboximetilcisteína

El aminoácido fué sintetizado según el método de Michaelis y Schubert(59).

5.5 g. de clorhidrato de cisteína y 3.6 gramos de ácido iodoacético se disuelven en 10 ml. de agua y se añade 17 ml. de hidróxido de potasio 6.7 M. Se añade ácido acético y filtra la cistina. Se acidifica con ácido clorhídrico y se enfría durante dos horas en hielo; el precipitado es disuelto en agua hirviendo, y es reprecipitado de agua varias veces. Se midió el punto de fusión y se controló su pureza por cromatografía en papel. Con este material, usado como testigo, era posible detectar la mancha correspondiente al mismo en la separación cromatográfica del hidrolizado y calcular la pérdida del método.

Medición de residuos N -terminales en gama globulina intacta y en gama globulina reducida y carboximetilada

El método del 2 -4 dinitrofluorobenceno fue utilizado en esta determinación (60).

Los distintos tipos de proteína disueltos en bicarbonato de sodio 5 % eran marcados con el dinitrofluorobenceno, eliminado el exceso de droga y secados al aire. Hidrólisis de alícuotas diferentes se hicieron en tres condiciones: con ácido clorhídrico 5.7 N a ebullición durante 24 horas, con ácido clorhídrico 5.7 N a ebullición durante 4 horas y con ácido clorhídrico 12 N a ebullición durante 24 horas.

El hidrolizado era extraído con éter, secado en vacío, y lavado con agua repetidas veces hasta eliminar todo el ácido clorhídrico. Con pocas gotas de etanol era sembrado en papel Whatman Nro. 4 previamente lavado con búffer de ftalato 0.05 M, pH 6.

El solvente usado en la cromatografía fué alcohol amflico terciario equilibrado con el búffer de ftalato, la corrida tenía una duración de 20 horas. Para el cálculo de pérdidas se midió la recuperación de una mezcla de dinitrofenol - aminoácidos sometidos al proceso de hidrólisis y cromatografía. Esta mezcla a su vez contenía una cierta cantidad de gama globulina intacta. Finalmente las manchas de los diferentes dinitrofenolaminoácidos-previo secado del papel- eran cortadas y eluidas con 4 ml. de bicarbonato de sodio 1 %, 15 minutos a 60 grados y leyó su absorbancia a 360.

En todas estas determinaciones se analizó solo los dinitrofenolaminoácidos solubles en éter.

Cromatografía en dietilaminoetilcelulosa

Inmuno globulina de conejo y gama globulina humana reducidas-carboximetiladas fueron fraccionadas en una columna (2 x 20 cms) de dietilaminoetilcelulosa. La resina fué lavada inicialmente con ácido clorhídrico 0.5 N, llevada a neutralidad y lavada nuevamente con hidróxido de sodio 0.2 N. El equilibrio se hizo con búffer de carbonato de amonio pH 8.2, 0.01 M. La proteína después de fragmentada fué exhaustivamente dializada contra este búffer y sembrada en la columna. La elución se hizo inicialmente con el mismo búffer de equilibrio y posteriormente con carbonato de amonio pH 9 y diferentes concentraciones salinas (0.1 M, 0.2 M, y 0.5 M). La velocidad de flujo fue de 20 ml. por hora y el total eluido de 700-800 ml. La proteína eluida fué determinada por lectura de

su absorbancia a 280.

Análisis de péptidos por electroforesis en alto voltaje

Los péptidos obtenidos del fraccionamiento en la columna de dietilaminoetil-celulosa fueron analizados por ionoforesis en papel Whatman 3 MM.

El búffer usado fue ácido fórmico - piridina - agua (3:0.5:96,5) pH2, 4 colocado en una cuba de 55 x 44 x 23 cm. La cuba fué llenada con búffer en cantidad correspondiente a unos 7 cm. de altura en el fondo y varsol en el resto. Un caballete de material aislante permitía sostener la hoja de papel y sumergir sus bordes en los dos compartimentos de búffer destinados a cada uno de los electrodos de platino.

A 8 cm. de uno de los bordes de la tira de papel - 25 x 102 cms. - se sembraron alcuotas de los correspondientes picos obtenidos por cromatografía. Para esto, la proteína correspondiente a cada fracción eluída era dializada exhaustivamente contra agua y luego liofilizada. Este material era disuelto en unas pocas gotas de búffer y sembrado en el papel. La separación se hizo en un período de dos horas, se aplicaban 2.000 volts y 120 miliamperes.

El papel era finalmente secado al aire y revelado con ninhidrina 0.5% en acetona y posterior calentamiento a 85 grados durante 15 minutos.

Actividad biológica de los fragmentos de inmuno globulina

Fragmentos de globulinas de conejo antibovino sueroalbúmina y anti-gama globulina humana fueron medidos en su capacidad para precipitar

con el antígeno específico y para participar en coprecipitación del mismo sistema (62).

La capacidad de precipitar con el antígeno se hizo determinando la zona de equivalencia de cada uno de los sistemas y luego ensayando dentro de ella distintas cantidades de proteína reducida y fragmentada.

En la prueba de coprecipitación se mezcló antígeno y anticuerpo en cantidades equivalentes de acuerdo a la zona de equivalencia, y a ésta mezcla se añadió en un caso distintas cantidades de anticuerpo purificado e intacto, en otro el mismo anticuerpo reducido y carboximetilado y, finalmente fragmentos de anticuerpos inespecíficos, o sea provenientes de otro sistema antígeno anticuerpo.

Tanto antígeno, anticuerpo, así como fragmentos de anticuerpo eran disueltos en búffer de borato de sodio pH, 8,2, 0.16 M, mantenidos a temperatura ambiente durante una hora y luego de 5 a 7 días a 4°C. Durante este período el precipitado era agitado diariamente, y al final del mismo se centrifugó a 3.000 RPM durante 30 minutos. Se lavó con solución salina 0.16 M dos veces, se disolvió con hidróxido de sodio 0.01 N y se leyó a 280 en el espectrofotómetro.

CAPITULO III

RESULTADOS

Reducción y carboximetilación de gama globulina

Cuando la molécula era reducida con borohidruro de sodio en presencia de 8 M úrea, complejada con ácido iodoacético y finalmente dializada contra agua destilada aparecía en el saco un precipitado y un sobrenadante después de una prolongada diálisis (48 - 72 horas).

Esta misma situación se repetía dializando contra un búffer de pH 8 y fuerza iónica 0.16 y aún si la diálisis se efectuaba contra soluciones más ácidas. Si en cambio el búffer de diálisis tenía un pH de 8,2 - 8,4 y fuerza iónica 0.16 no se observaba precipitado. En virtud de esta observación el búffer de diálisis que se utilizaba en las diferentes determinaciones respondía a estas características (pH 8.2 - 8.4, fuerza iónica 0.16), salvo expresa indicación.

Recuperación de la proteína después de diálisis

Después de una diálisis de 24 horas contra grandes volúmenes de agua el peso del contenido del saco de diálisis liofilizado a peso constante oscilaba entre un 85 a 90 % del original de la proteína.

Cuando esta recuperación se medía por absorbancia a 280, lo recuperado oscilaba entre un 83 - 88 %. En vista del material que se pierde por manipuleo, la conclusión fue que la mayoría de la proteína reducida y fragmentada quedaba dentro del saco de diálisis.

Coefficientes de extinción específicos

En búffer de borato de sodio - cloruro de potasio, pH 8.4, 0.16 M se determinó el coeficiente de extinción de fragmentos de distintos orígenes y de la molécula intacta.

Tabla 2

Coefficientes de extinción específicos a 280 de gama globulina de conejo y humana intactas y reducidas y carboximetiladas

	1 % E 1 cm. a 280
Gama globulina de conejo intacta	13,1
Gama globulina humana intacta	13,0
Gama globulina de conejo reducida y carboximetilada	11,8
Gama globulina humana reducida y carboximetilada	12,4

Coefficiente de sedimentación

Gama globulina de conejo y gama globulina humana purificadas por precipitación con sulfato o columnas de dietilaminoetilcelulosa fueron analizadas por ultracentrifugación analítica, utilizando una celda de aluminio standard de 12 mm. y 4° de amplitud.

La temperatura de la corrida fue de 20° C, la concentración de proteína de 1 % en búffer de borato 0.16 M y pH 8.4. Las fotografías fueron tomadas cada 8 minutos después de alcanzado el máximo de velocidad prefijado en 59.780 RPM.

En el cálculo final de la constante se graficó el logaritmo de las distancias entre el pico a tiempos sucesivos versus estos tiempos.

Con ambos tipos de proteína se obtuvo un solo pico regularmente simétrico, con un valor aproximado de $S=6,8$. Esto permitió suponer que en la purificación se obtenía un preparado homogéneo y puro en cuanto se refiere a su velocidad de sedimentación.

El coeficiente de sedimentación para fragmentos de la molécula fué determinado en una celda de límite sintético, dado que en la celda standard no se detectaba ningún pico.

La velocidad aplicada fue de 59.780 RPM, 20° C la temperatura, la celda fue de 12 mm. y 4°, midiéndose varias concentraciones de proteína a los fines de extrapolar la concentración cero graficando $1/S$ versus c .

El búffer utilizado fue el de diálisis del tratamiento posterior a la reducción y las concentraciones se determinaron por lectura a 280.

El cálculo de la constante de sedimentación no dio diferencias significativas entre fragmentos de gama globulina reducida de origen humano o de conejo. En ambos casos el valor de la constante fue de 1.5, hechas las correcciones correspondientes. El valor del volumen parcial específico, en todas las determinaciones fue el de la proteína intacta (0.745) (63).

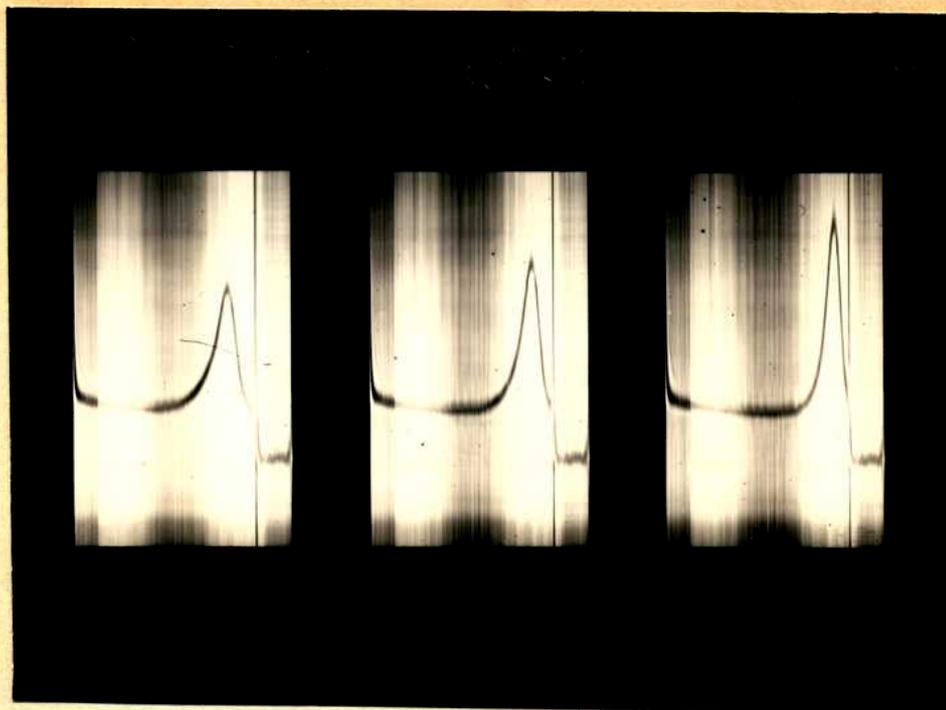


Figura 3: Sedimentación en ultracentrifuga analítica de gama globulina de conejo purificada por precipitación con sulfato de sodio.

RPM: 59.780; T: 20^o; concentración : 1%. Fotografías cada 16 min. Celda standard, pieza central de aluminio, 12 mm y 4^o.

Peso molecular por el método de Archibald

Fragmentos de gama globulina de conejo y gama globulina humana fueron analizados en experiencias de equilibrio de sedimentación.

Soluciones de diferentes concentraciones, en búffer de borato pH 8.4, 0.16 M, fueron corridas en una celda de doble sector, de 12 mm. 4°, con una pieza central Filled - Epon, en una ultracentrífuga analítica modelo E a 12.500 RPM.

Fotografías a diferentes tiempos de la corrida, una vez logrado el equilibrio-4 ó 5 horas después de alcanzada la velocidad máxima-, fueron tomadas y calcadas en papel milimetrado después de ser ampliadas unas 12 veces.

La inversa de los valores de peso molecular aparente, obtenido con este método, fueron graficados versus concentración.

El peso molecular determinado para fragmentos originados en la reducción e hidrólisis de los dos tipos de proteína se da en la siguiente tabla:

Tabla 3

Determinación de peso molecular mediante equilibrio de sedimentación de gama globulina humana y de conejo, reducidas y carboximetiladas.

Fragmentos de gama globulina de conejo	18.000
Fragmentos de gama globulina humana	19.200

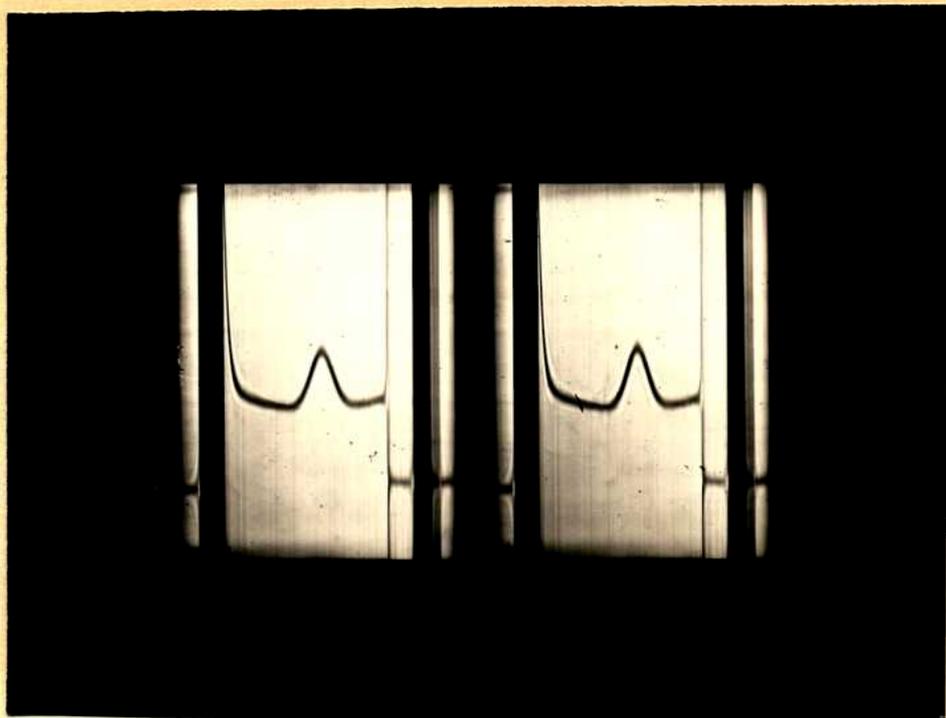


Figura 4: Velocidad de sedimentación de gama globulina de conejo reducida y carboximetilada en celda de límite sintético, 12 mm. 4° .

RPM: 59780 ; T: 29° ; conc. 0.5%. Fotografías cada 8 min.

Peso molecular del fragmento de gama globulina humana reducida por sedimentación-difusión

La constante de difusión D, permitió comparar los dos métodos de medición de peso molecular.

La experiencia de difusión libre se hizo con una concentración de 0.5 % de proteína por un período de 40 horas a 4° C.

Correcciones de la constante se hicieron según la fórmula siguiente:(51)

$$D_{20, w} = D \text{ med. } \frac{293}{293 + T} \left[\frac{\eta_{\text{sol.}}}{\eta_w} \right] \left[\frac{\eta_{tw}}{\eta_{20w}} \right]$$

T es igual a temperatura del experimento.

η_{sol}/η_w es la viscosidad del solvente relativa a la del agua.

η_{tw} = viscosidad del agua a la temperatura del experimento.

η_{20w} = viscosidad del agua a 20° C.

El valor final obtenido fue de $D_{20, w} = 7.1 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2 / \text{seg.}$

. El peso molecular según los dos métodos usados, para este fragmento, se da en la tabla siguiente:

Tabla 4

Determinación de peso molecular de gama globulina humana reducida y carboximetilada mediante equilibrio de sedimentación y sedimentación - difusión

Método	$S^{\circ}_{20, w}$	$D_{20, w}$	Peso molecular
Sedimentación-difus.	1,8	7,1	20.100
Equilibrio-sediment.	--	---	19.200

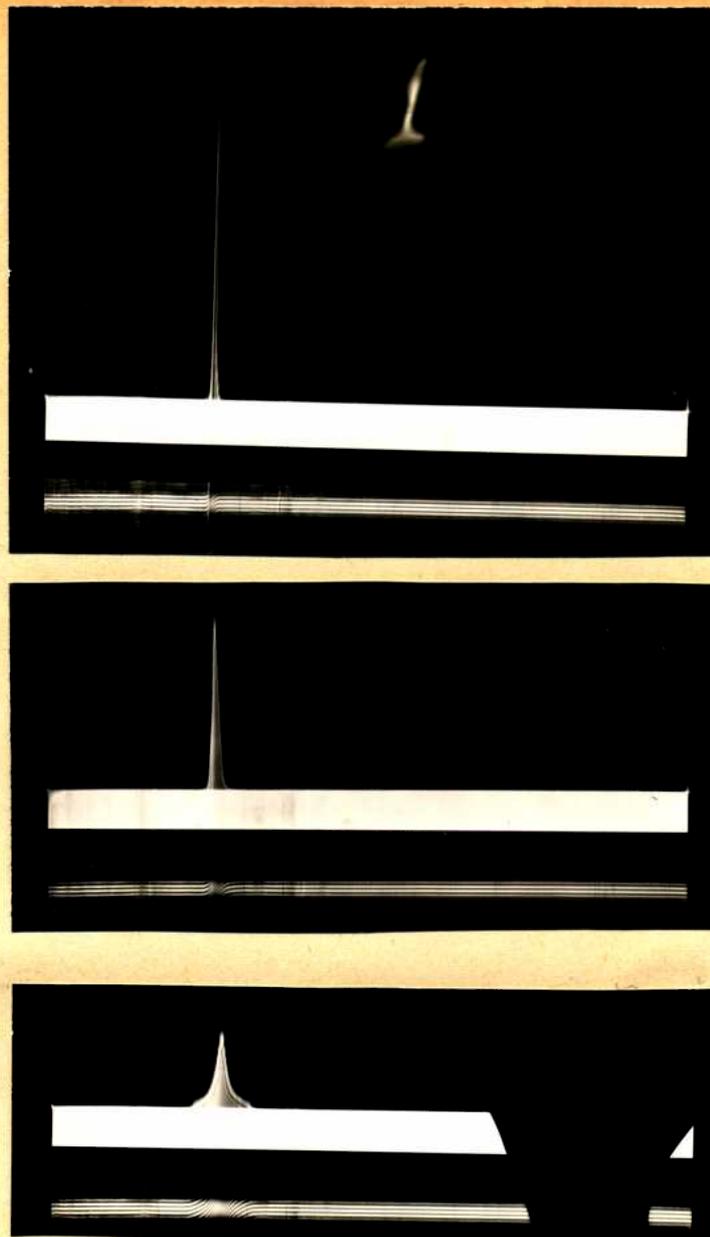


Figura 5 : Imagen schlieren e imagen rayleigh en la determinación de la constante de difusión de gama globulina humana reducida y carboximetilada. Experiencia en equipo de electroforesis libre y difusión Spinco modelo H. Celda de 3 mm, T: 4⁰; fotografías a los 84, 460 y 1.890 minutos.

Homogeneidad de los fragmentos de inmunoglobulina de conejo

Con columnas de 1.5 mm. de solución en una celda de doble sector y pieza central Filled-Epon se determinó homogeneidad de los fragmentos según el procedimiento de Van Holde y Baldwin (55).

Las concentraciones fueron determinadas en una celda de límite sintético a baja velocidad.

La temperatura de la experiencia se mantuvo a 20° C., impresionando la placa fotográfica a diferentes tiempos. La medición de la deflección por la imagen del schlieren así como las distancias al centro de rotación se hicieron en un microcomparador, previo conocimiento de las diferentes constantes de la ultracentrífuga para las dimensiones del rotor y las distancias del camino óptico.

En los extremos de la columna, los valores de r eran tomados cada 0.05 cms.

El gráfico de la integral versus Z/r dio una recta regularmente derecha. La falta de concavidad hacia arriba permitió suponer que no había agregación en el sistema o si existía era mínima, (Fig. 6).

Número de uniones disulfuro reducidas por el borohidruro en presencia de úrea 8 M.

En la tabla 5 se dan los valores medidos de uniones disulfuro reducidas, detectadas como S - carboximetilcisteína.

Hidrólisis de 5 - 10 mg. de gama globulina humana y de conejo reducidas, carboximetiladas, dializadas y liofilizadas se hicieron según el procedimiento descrito en Métodos.

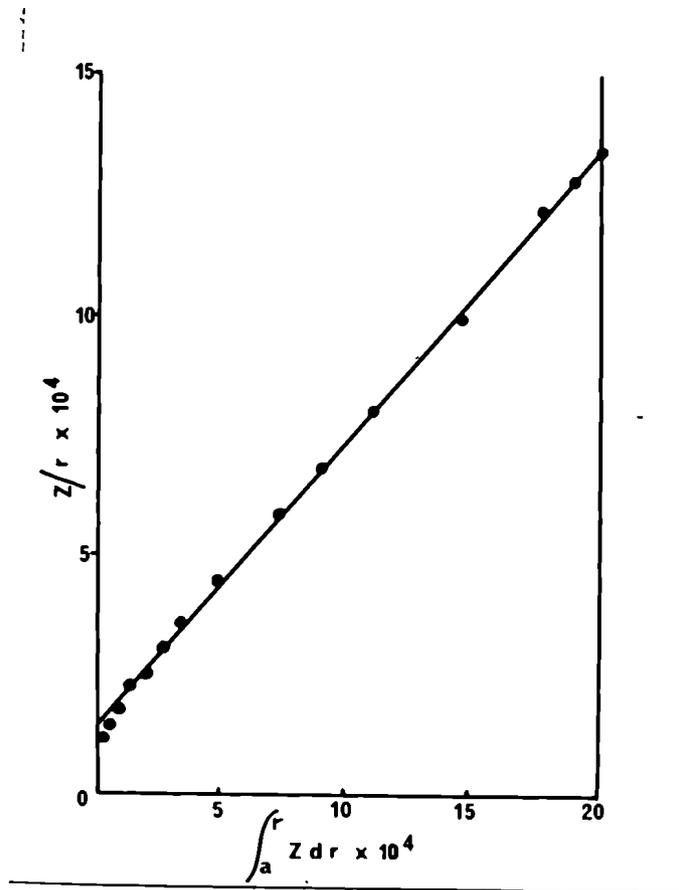


Figura 6: Test de homogeneidad de gama globulina de conejo reducida y carboximetilada segun Van Holde y Baldwin. Z es la desviación de la imagen por el schlieren(en cms.), a es la posición del menisco y r es la distancia al centro de rotación.

La separación por cromatografía de papel permitió visualizar una mancha perfectamente separada del resto de aminoácidos cuando era revelada con ninhidrina y comparada con el standard.

Cuando esta mancha era cortada y medida cuantitativamente por elución con cloruro de cadmio 0.1 % en metanol 60 % y leída a 520, se obtenían cifras anormalmente altas para el contenido de cisteína de la molécula. Esto hizo pensar que el sistema era ineficaz para separar algunos aminoácidos análogos estructurales de la carboximetilcisteína. En experiencias de prueba se pudo comprobar que el ácido glutámico se desplazaba con los solventes usados con el mismo Rf de la carboximetilcisteína.

Ello obligó a una nueva separación, que fué lograda con Amberlita CG 120 a pH 3.25, obteniéndose la carboximetilcisteína pura eluída en los primeros tubos de la columna.

Tabla 5

Contenido de S carboximetilcisteína en gama globulina humana y de conejo, reducidas y carboximetiladas (1)

Tipo de proteína	S-carboximetilcisteína mol/mol proteína (2)
Conejo	18,1
Humana	20,9

(1) Promedio de cuatro determinaciones

(2) El peso molecular de la proteína se supone 150.000 g.

La recuperación del aminoácido en toda la experiencia incluyendo hidrólisis, cromatografía en papel y en la columna osciló entre un 80 y 90 %.

Residuos N terminales en la molécula intacta y en la molécula reducida y carboximetilada

Tabla 6

Aminoácidos N terminales en la proteína intacta y reducida y carboximetilada (1)

Moles de aminoácidos N terminal por Mol de proteína (2)

Dinitrofenil aminoácido	glob. de conejo intacta	glob. de conejo reduc. y carboxim.	glob. humana intacta	glob. humana reduc. y carboxim.
Ac. aspártico	0.39	2.10	0.71	2.13
Ac. glutámico	0.10	1.70	1.08	1.40
Serina	0.21	1.44	0.10	1.50
Glicina	trazas ³	trazas	---	---
Treonina	0.13	1.50	0.10	1.30
Alanina	1.00	2.10	0.10	1.30
Valina	trazas	trazas	---	---

(1) Promedio de cinco determinaciones.

(2) Los resultados se expresan Moles de residuos N terminal por 150.000 g. de proteína.

(3) Menos de 0.05 Moles.

El número de DNF aminoácidos encontrado se mantuvo constante y su valoración cuantitativa estaba en las distintas determinaciones dentro de un rango del 15-20 % al comparar una con otra.

En la tabla siguiente se dan los porcentajes de recuperación de aminoácidos dinitrofenilados sometidos a hidrólisis en idénticas condiciones, y posteriormente cromatografiados.

Tabla 7

Determinación de recuperación de dinitrofenilaminoácidos sometidos a hidrólisis y cromatografía

	% recuperado
Dinitrofenil Aspártico	70.0
" Glutámico	72.5
" Alanina	85.0

Para determinar esta recuperación 0.2 mg. de cada uno de los correspondientes dinitrofenilaminoácidos fueron sometidos, junto con 20 mg. de gama globulina intacta a hidrólisis con ácido clorhídrico 5.7 N, durante 24 horas. Después de eliminado el ácido clorhídrico se cromatografiaron en papel Whatman Nro. 4 con búffer de alcohol amflico terciario como solvente.

Los resultados de la valoración cuantitativa de residuos N terminales de la molécula no tratada, sea de origen humano o de conejo concuerdan con los datos publicados por diferentes autores.

Separación de fragmentos de gama globulina reducida y carboximetilada

La obtención de un solo pico regularmente simétrico después de la reducción e hidrólisis de la molécula por ultracentrifugación analítica, junto con la recuperación en el saco de diálisis de la mayor parte de la proteína inicial, permitió suponer su fraccionamiento en componentes de igual o similar peso.

En vista de esto se planteó la posibilidad de separar estos fragmentos.

Después de intentar diferentes tipos de resina de intercambio iónico, pudo establecerse que en dietilaminoetilcelulosa el material era retenido en su mayor parte, (Fig. 7).

Diferentes cantidades de proteína -entre 100 y 200 mg. - de inmunoglobulinas de conejo de diferentes especificidades, o gama globulina humana fueron reducidas y cromatografiadas.

La elución se hizo a flujo continuo con un colector de fracciones automático durante 48 - 50 horas. Las condiciones de elución, fueron descritas en el capítulo de Métodos.

La recuperación obtenida en cada uno de los picos se da en la tabla siguiente:

Tabla 8

Determinación de la cantidad de proteína recuperada en cada una de las fracciones eluidas de la columna de dietilaminoetilcelulosa.

Fracción eluida	% del total sembrado
I	19
II	29
III	18
IV	<u>15</u>
Total recuperado	81

Por cambios en las condiciones de elución no se obtuvo ninguna otra fracción.

Un gradiente lineal aplicado a la columna en condiciones similares a la elución por "Step-wise" dio resultados similares.

Sin embargo la separación de los distintos componentes no era tan altamente satisfactoria como en la elución por pasos.

Análisis de péptidos eluidos de la columna de DEAE-celulosa por electroforesis en alto voltaje

Después de dializado contra agua, el material correspondiente a cada fracción eluida de la columna era liofilizada hasta total sequedad.

Alícuotas en cantidades idénticas eran sembradas en papel Whatman 3 MM en las condiciones y solventes explicados en Métodos.

Cuando el material analizado correspondía a cada uno de los picos de la columna pertenecientes a la misma molécula fragmentada, se comparaba el grado de diferencias en las cuatro fracciones obtenidas por separación cromatográfica.

Con estos ionogramas era posible confirmar que el material correspondiente a cada una de las fracciones representaba péptidos diferentes.

Comparación por ionoforesis de péptidos pertenecientes a distintos anticuerpos.

Gama globulina de conejo antisuero albúmina de bovino y gama globulina de conejo antigama globulina humana fueron separadas en sus cuatro fracciones por cromatografía en DEAE celulosa, previa reducción con borohidruro y carboximetilación.

Cada fracción fué dializada y liofilizada. Una alícuota de cada una de ellas fue sembrada en papel Whatman 3 MM junto con la fracción análoga

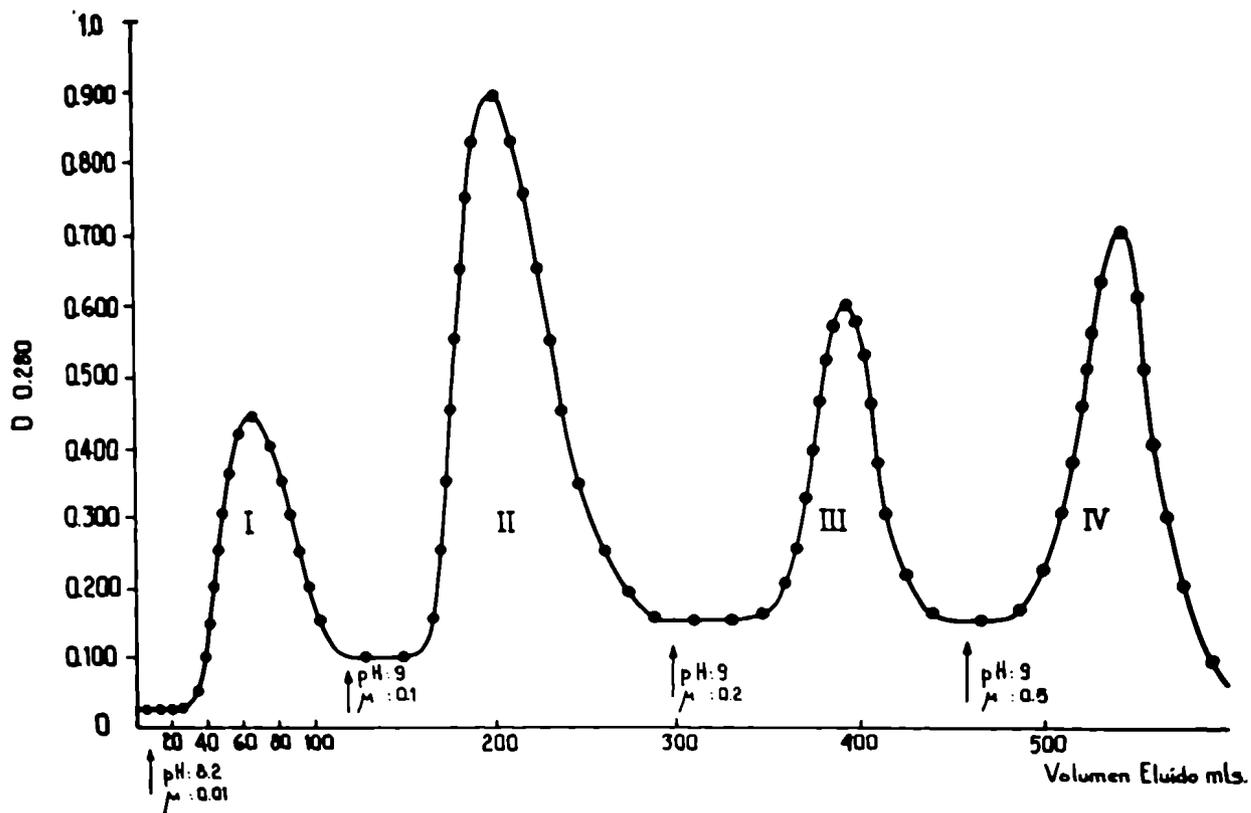


Figura 7: Cromatografía de gama globulina de conejo reducida y carboximetilada en dietilaminoetilcelulosa. La columna- 20 x 2 cms. - fue equilibrada con buffer de carbonato de amonio, pH 8.2 , 0.01 M. Con este buffer se eluyó la fracción I; fracciones II, III y IV fueron eluidas con el mismo buffer de pH 9 y fuerza iónica indicada. Proteína sembrada:100mg.

correspondiente a la otra molécula de anticuerpo.

El análisis de los ionogramas peptídicos permitía observar analogías y diferencias entre las fracciones de distinto origen.

Comparando los péptidos pertenecientes a las fracciones I ó II obtenidos a partir de los dos anticuerpos indicados, los ionogramas eran idénticos.

Si en cambio la fracción III o la fracción IV eran comparadas con sus análogas, ciertas diferencias era posible visualizar.

Estas experiencias fueron repetidas con material proveniente de distintos animales, manteniéndose los mismos modelos ionoforéticos.

Medida de la actividad biológica de Inmunoglobulina reducida y carboximetilada

La medida de la actividad biológica se hizo determinando la capacidad de precipitar y de coprecipitar de la molécula reducida y fragmentada.

a) Prueba de precipitación de los fragmentos con el antígeno.

Para esta medición se determinó previamente la zona de equivalencia en el sistema gama globulina antisuero albúmina de bovino-suero albúmina de bovino.

A un volumen constante de suero inmune se le añadieron cantidades crecientes del antígeno, se llevó a volumen con búffer de pH 8.2 y fuerza iónica 0.16 e incubó a 37°C una hora y luego una semana en la cámara fría (4° C). La cantidad de precipitado se valoró a 280 disolviendo con hidróxido de sodio 0.01 N.

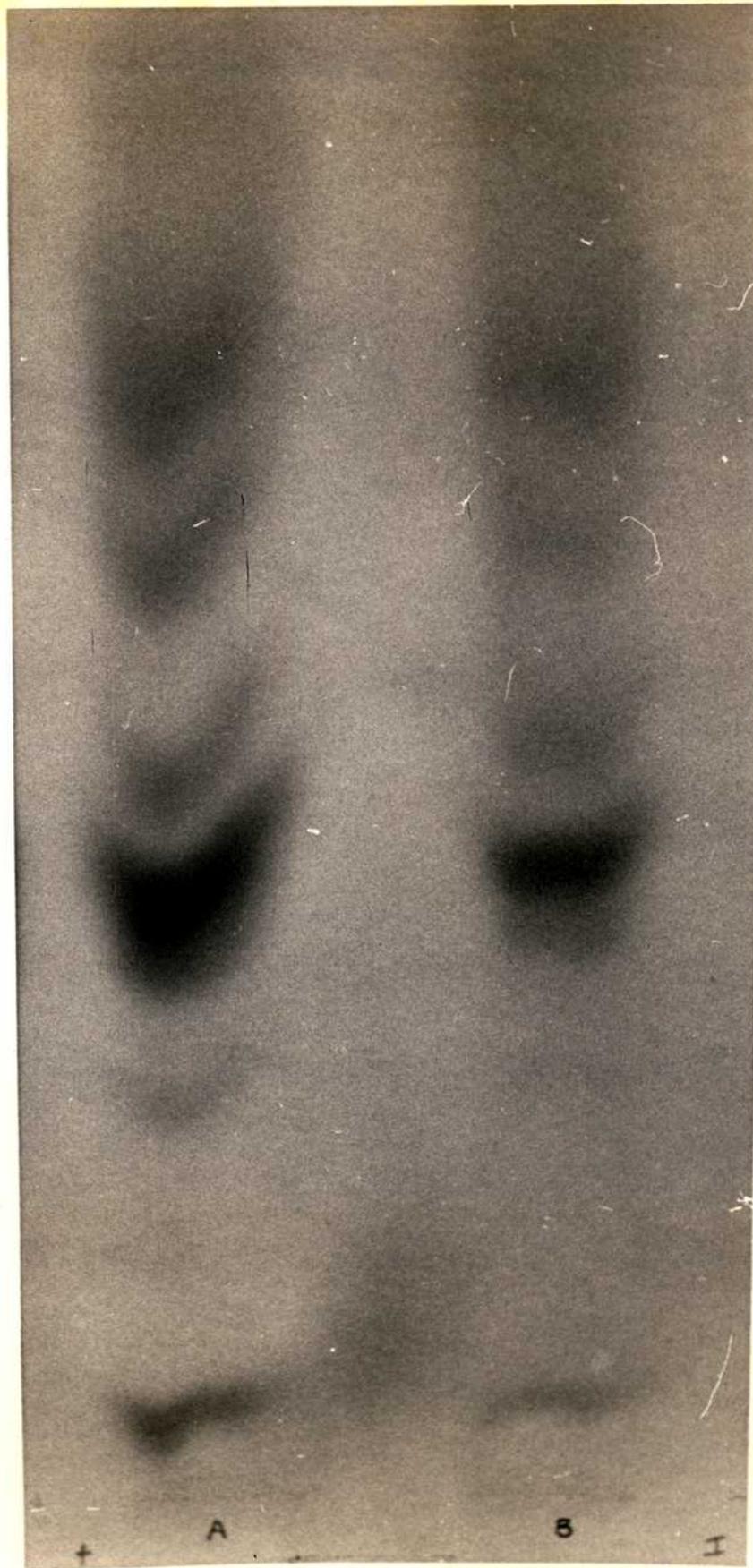


Figura 8: Ionograma de fracciones I, eluidas de dietilaminoetilcelulosa. A: fracción proveniente de gama globulina de conejo que contiene anticuerpos contra sueroalbumina de bovino. B: fracción proveniente de gama globulina de conejo que contiene anticuerpos contra gama globulina humana.



Figura 9: Ionograma de fracciones II de la columna de DEAE-celulosa. A: fracción que proviene de inmunoglobulina de conejo antisueroalbumina bovina. B: fracción que proviene de inmunoglobulina de conejo anti gama globulina humana.

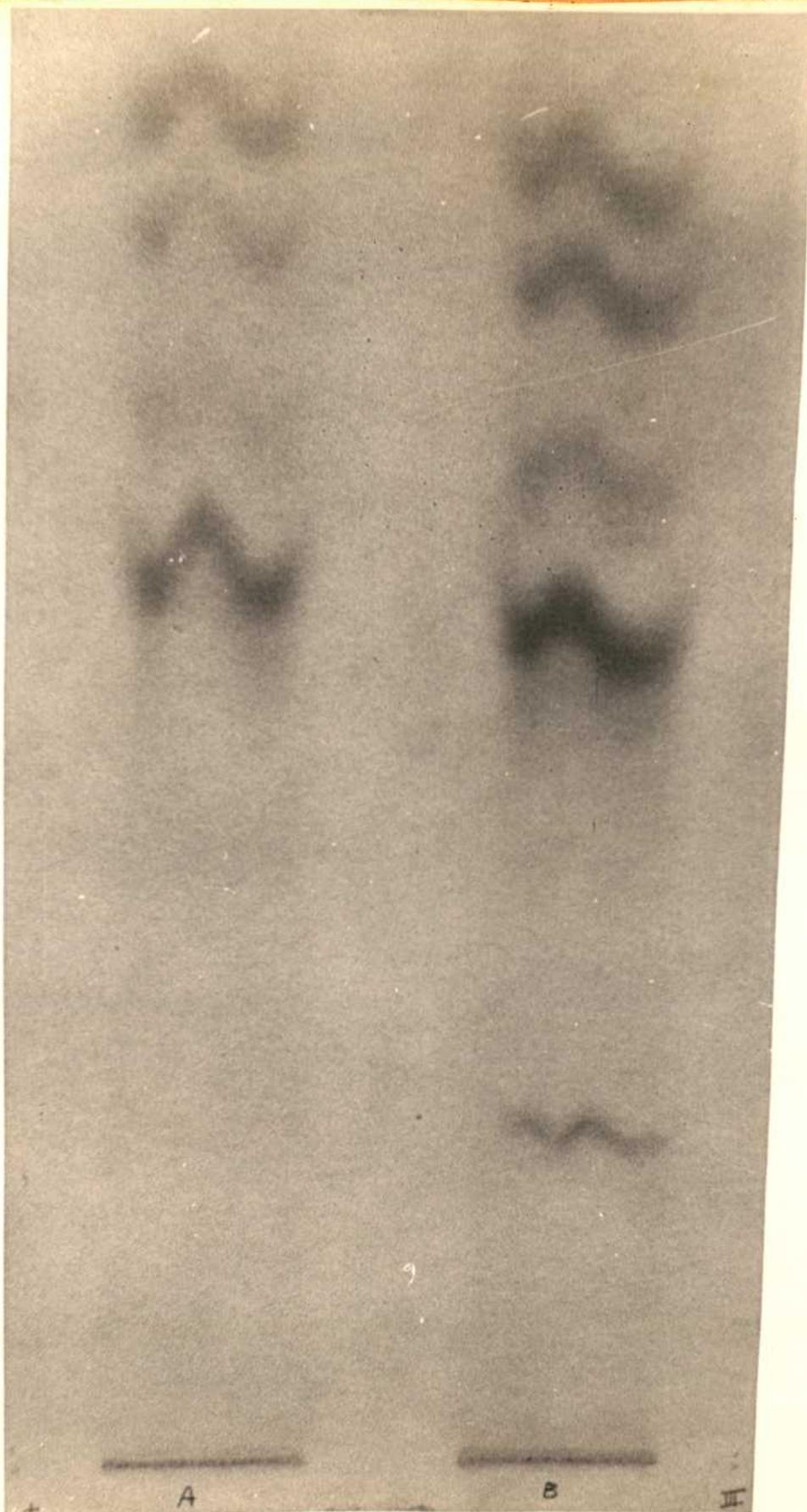


Figura 10: Ionograma de fracciones III, eluidas de DEAE-celulosa. A: fracción obtenida de inmunoglobulina de conejo antisueroalbumina bovino. B: ídem ant. anti-gama globulina humana.

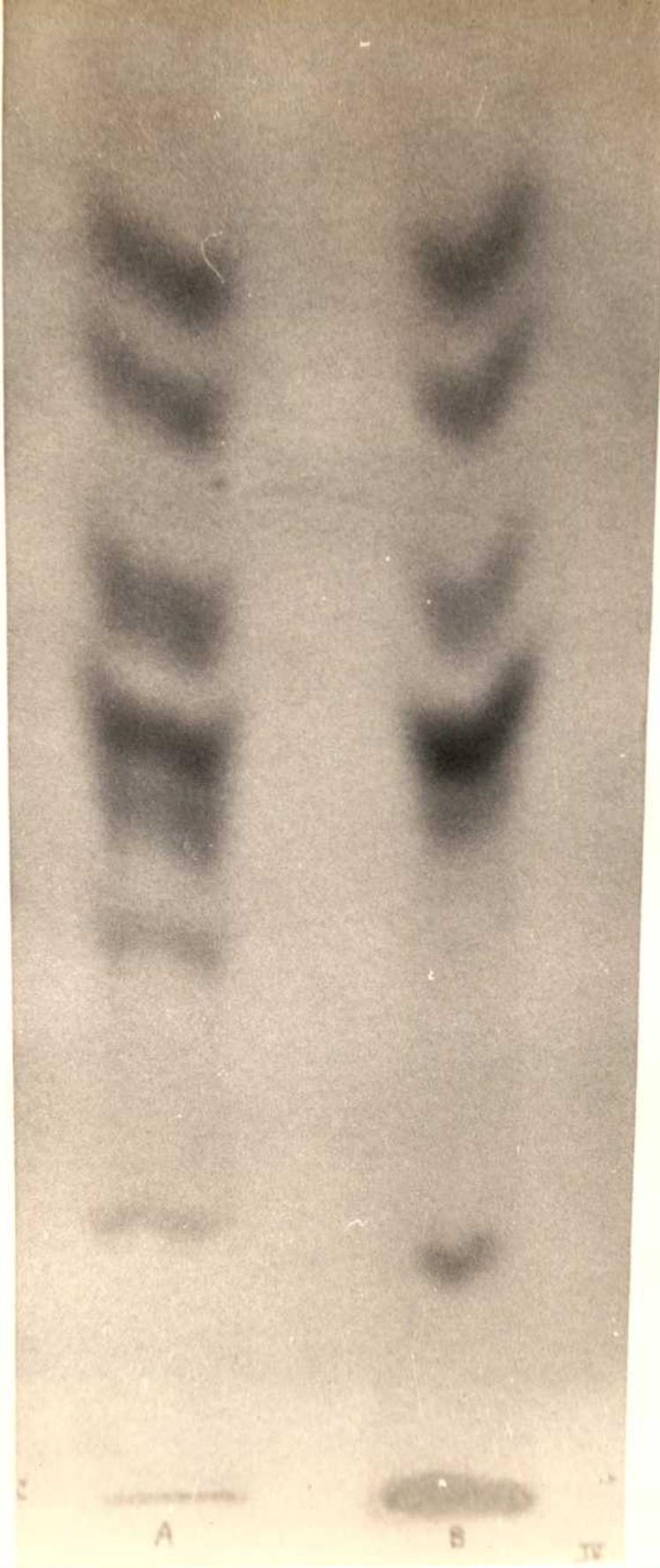


Figura 11: Ionograma de fracciones IV, eluidas de DEAE-celulosa. A: fracción de inmunoglobulina de conejo anti-sueroalbumina de bovino. B: ídem anterior anti-gama globulina humana.

Una vez determinada la zona de equivalencia, y conociendo los coeficientes de extinción específicos de antígeno y anticuerpo, fue posible conocer la cantidad de proteína en el precipitado, perteneciente al anticuerpo.

Zona de equivalencia en el sistema sueroalbúmina de bovino - antisuero - albúmina de bovino

Suero inmune (ml.)	Antígeno (mg.)	D. O. a 280
0.1	0.08	0.100
"	0.09	0.120
"	0.10	0.130
"	0.11	0.160
"	0.12	0.165
"	0.13	0.170
"	0.14	0.180
"	0.15	0.160
"	0.16	0.120
"	0.17	0.100
"	0.18	0.070
"	0.19	0.040
"	0.20	0.020

Dentro de la zona de equivalencia numerosas experiencias de precipitación del antígeno se hicieron, utilizando el anticuerpo específico purificado, reducido y fragmentado según el método informado.

En ningún caso se observó precipitación.

b) Análisis por prueba de coprecipitación

En el sistema gama globulina de conejo antisuero albúmina bovina-suero albúmina bovina fue testada la capacidad biológica para participar en coprecipitación del anticuerpo fragmentado.

0.1 ml. de suero inmune y 0.14 mg. de antígeno se usó como patrón (fig. 12).

A una serie de tubos con esta mezcla se les añadió cantidades crecientes de anticuerpo purificado intacto y estos valores fueron tomados como capacidad máxima de la molécula para coprecipitar (100%).

Cuando el anticuerpo intacto era reemplazado por anticuerpo fragmentado en cantidades equivalentes la coprecipitación alcanzaba un 60 - 70 % del total logrado con la molécula no tratada.

Si se usaban fragmentos obtenidos por reducción de gama globulina de conejo anti gama globulina humana, la coprecipitación era nula. Tampoco se lograba coprecipitación si se agregaban fragmentos obtenidos a partir de gama globulina de conejo inerte, o sea de conejo no inmune.

Cuando se utilizó en esta medición el sistema antigama globulina humana-gama globulina humana, siempre con anticuerpos purificados de conejo, los valores de la prueba fueron menos elocuentes. Lo observado fue una escasa capacidad de coprecipitar para el anticuerpo intacto, lo cual indicaría una cierta inactivación de la molécula o una deficiente síntesis de anticuerpos.

Utilizando el sistema de precipitación antisuero albúmina bovina- suero albúmina bovina, fue medida la actividad biológica del anticuerpo frag-

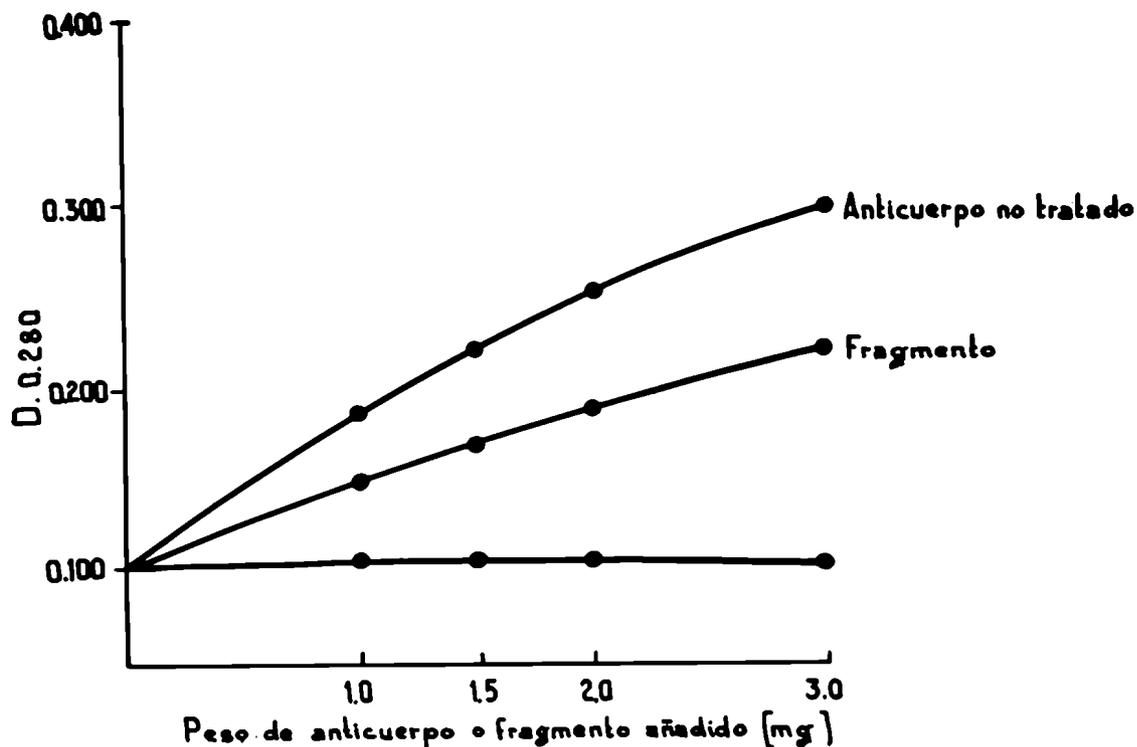


Figura 12: Co-precipitación en el sistema inmunoglobulina de conejo anti(sueroalbumina de bovino)-sueroalbumina de bovino.

Anticuerpo no tratado es la adición de inmunoglobulina de conejo purificada conteniendo anticuerpos contra sueroalbumina de bovino.

Fragmento es la adición de la misma proteína reducida y carboximetilada.

La curva inferior representa los valores obtenidos por el agregado de gama globulina de conejo inerte o inmunoglobulina de conejo anti - gama globulina humana, ambas reducidas y carboximetiladas.

El gráfico incluye los valores promedios de 5 determinaciones, cada una de ellas con anticuerpos provenientes de distintos conejos.

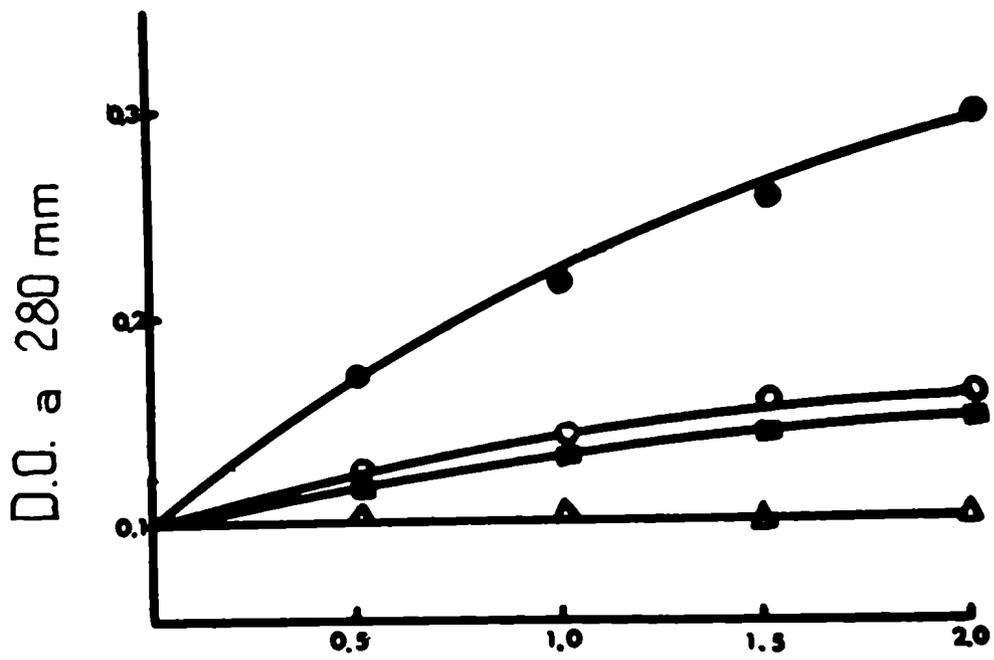
mentado y fraccionado en la columna de DEAE.

Cada una de las fracciones obtenidas en la columna, así como las posibles combinaciones entre ellas fueron testadas. En todos los casos la cantidad total de proteína añadida al sistema era idéntica al patrón usado de globulina intacta.

Las fracciones individuales eran todas biológicamente inactivas, no observándose ningún aumento en la proteína del precipitado (Fig. 13).

Cuando se utilizaban las cuatro fracciones juntas, el valor por coprecipitación alcanzaba un 50% de la molécula reducida y carboximetilada.

De las posibles combinaciones de estas fracciones -de dos en dos o de tres en tres- únicamente el complejo fracción III- fracción IV mostraba un aumento en el precipitado proteico y éste era de un 50 % del logrado con el anticuerpo reducido y carboximetilado.



ANTICUERPO O SEGMENTO AÑADIDO (después de D.E.A.E.)

Figura 13: Co-precipitación en el sistema inmunoglobulina de conejo anti(sueroalbumina de bovino)- sueroalbumina de bovino.

- agregado de inmunoglobulina de conejo antisueroalbumina purificada.
- adición de una combinación de las cuatro fracciones eluidas de DEAE-celulosa.
- adición de la combinación dada por fracciones III y IV eluidas de DEAE.
- △ adición de fracciones individuales obtenidas de la columna de DEAE, o adición de las combinaciones posibles entre las cuatro fracciones eluidas, distintas de la combinación III-IV.

Todas estas fracciones fueron obtenidas por cromatografía en DEAE-celulosa de inmunoglobulina de conejo antisueroalbumina de bovino, reducida y carboximetilada.

CAPITULO IV

DISCUSION

Estructura y actividad biológica del inmunoglobulinas mediante el estudio de sus fragmentos.

El tamaño y la heterogeneidad de este tipo de macromoléculas ha dificultado la interpretación de los resultados que correlacionan estructura y actividad en el total de la proteína.

Como se ha expuesto en el capítulo de introducción, el problema ha sido encarado mediante el fraccionamiento de la proteína y en análisis de los componentes obtenidos.

Los resultados presentados en este trabajo encuadran dentro de este tipo de enfoque.

Por acción del borohidruro de sodio y úrea 8 M la molécula de gama globulina es fragmentada en varios componentes aparentemente similares en su tamaño.

El análisis en ultracentrífuga analítica del material dializado y soluble, en una celda standard, al no revelar ningún componente que sedimentara hizo suponer una hidrólisis total con destrucción de la molécula y formación de pequeños péptidos, no detectables por el análisis de sedimentación, o bien la formación de componentes inferiores a 30.000 en peso

molecular, que representa el límite inferior aproximado del material revelado por la celda standard.

La obtención de un solo pico regularmente simétrico, cuando se usó una celda de límite sintético, reveló estar en presencia de uno o varios fragmentos, inferiores a 30.000 en peso molecular, pero a su vez con el suficiente tamaño, como para ser retenido por el saco de diálisis standard.

La recuperación de la proteína reducida y carboximetilada, medida como material no difusible, mostró que la mayoría del material de partida, en el tratamiento con borohidruro quedaba en el saco de diálisis y por lo tanto la formación de pequeños péptidos era reducida.

El peso molecular de estos fragmentos determinado por el equilibrio de sedimentación e por el procedimiento de sedimentación-difusión, en el caso de fragmentos obtenidos a partir de gama globulina humana, dio valores que estaban dentro de los esperados.

Los componentes obtenidos a partir de gama globulina de conejo (18.000) o de gama globulina humana (18.200), son similares en peso molecular y representa cada uno, aproximadamente un octavo del total de la molécula.

Agregación de estos péptidos con fracciones más pequeñas, son frecuentes dando valores de peso anormalmente altos. Esto quedó aparentemente descartado por experiencias de equilibrio de sedimentación en columnas cortas, y el análisis de los resultados según el procedimiento propuesto por Van Holde y Balwin.

Este tipo de test confirmó, junto con la recuperación de la casi totalidad de la proteína inicial, la probable ruptura de la molécula en fragmentos similares en tamaño con la producción escasa de pequeños péptidos.

Por otra parte la reproducibilidad de los valores de peso molecular por equilibrio de sedimentación, así como la buena correlación existente entre estos valores y los obtenidos por el método de sedimentación-difusión, en el caso de componentes provenientes de proteína humana, permiten aceptar como probables estos valores.

Resumiendo los resultados del peso molecular de estos fragmentos puede concluirse lo siguiente:

- 1) Ausencia de material que sedimente en la celda standard, por lo tanto superior a 30.000 en peso molecular.
- 2) Retención en el saco de diálisis de la mayor parte del material, indicando que los fragmentos poseen un peso molecular suficiente como para no atravesar la membrana.
- 3) En concordancia con estos hechos, la obtención de una constante de sedimentación de 1.5 y un peso molecular por equilibrio de sedimentación de 18.000 - 19.000.
- 4) Un solo pico regularmente simétrico, en la sedimentación con celda de límite sintético y ausencia de curvatura en el análisis por el método de Van Holde y Baldwin, que hace suponer que los distintos componentes en que se ha resuelto la molécula sean similares en tamaño.

Estabilidad y reducción de uniones disulfuro

Por titulación amperométrica, en soluciones de úrea 12 molar, con mercapto-etanol en concentración 0.54 molar y 40° C durante 45 minutos se ha detectado hasta 43.7 grupos sulfidrilos en la molécula intacta proveniente de suero de conejo (33).

Estos grupos sulfidrilos corresponden a 21 o 22 uniones disulfuro. El mismo autor informó haber encontrado 2.2 grupos sulfidrilos libres en la molécula intacta.

Acerca de la distribución de estas uniones disulfuro de la molécula de gama globulina en uniones intercadenas y uniones intracadenas no existe acuerdo unánime.

El número de uniones disulfuro que conecta cadenas, distintas en la molécula, oscila entre 3 y 7 según distintos autores (26-33 y 34). Más aún si el modelo propuesto de cuatro cadenas, aún requiere información confirmatoria, la clasificación de uniones disulfuro como inter e intracadenas se complica un tanto.

Acerca de la posibilidad de que existan grupos sulfidrilos libres en la molécula, los resultados obtenidos por diferentes autores revelan un valor mucho menor al informado por Utsumi y Karush (33). Cecil y colaboradores, (33) que no han detectado grupos sulfidrilos libres en la molécula, opinan que el método de titulación con plata da valores excesivamente altos.

El análisis de S - carboximetilcisteína en la molécula de origen humano o de conejo, reducida y carboximetilada con borohidruro de sodio en úrea 8 M y ácido iodoacético, ha dado valores por encima de los correspondientes

a una ruptura de uniones disulfuro exclusivamente intercadena.

Es evidente que la desnaturalización lograda por la úrea 8 M expone a un considerable número de uniones disulfuro al efecto del borohidrudo y este número incluye uniones intracadena.

En primera aproximación podría concluirse que todas las uniones disulfuro intercadena han sido reducidas y junto con ellas un cierto número de uniones intracadena.

Aquí la interpretación de resultados enfrenta ciertos hechos no del todo aclarados. Por una parte ha sido postulado que la unión intracadena es más resistente a los reductores que la intercadena, y esto se ha supuesto, no sólo para gama globulina, sino para diferentes proteínas (32).

Sin embargo, a menos que se utilicen condiciones de reducción muy suaves (0.01 M mercapto etanol a pH 8.2) la reducción de puentes disulfuro intercadena en gama globulina, casi siempre se acompaña de algún grado de reducción de las uniones intracadena (34).

Otro hecho a tener en cuenta es el referido a una probable estabilidad de las uniones disulfuro intercadena conferida por uniones no covalentes de vecindad (85).

Finalmente el desplegamiento de la molécula de gama globulina por efecto de la úrea 8 M no es total (66), quedando una cierta zona no desenrollada a partir de la cual se lograría la renaturalización de la molécula con recuperación de su actividad biológica al eliminarse la úrea. Existe por lo tanto la posibilidad de que en esta zona no desplegada pueda quedar alguna

unión disulfuro intercadena "protegida" y no reducible en las condiciones experimentales usadas aquí.

En vista de estas consideraciones, la conclusión extraíble de los datos presentados en la tabla 5, solo permite afirmar una considerable reducción de las uniones disulfuro (aproximadamente un 50 % del total) que incluye uniones inter e intracadenas.

Residuos N terminales en la molécula reducida y carboximetilada

La aparición de nuevos aminoácidos N terminales en la hidrólisis proteica permite informar acerca del número de uniones peptídicas hidrolizadas.

En la interpretación de resultados es indispensable conocer previamente, el número de aminoácidos N terminales en la molécula intacta, que a su vez informa conjuntamente con el número de aminoácidos C-terminales sobre el número de cadena de la molécula.

En gama globulina de conejo se ha encontrado un residuo N terminal (Alanina) y dos en globulina humana (un ácido aspártico y un ácido glutámico), conjuntamente con residuos de otros aminoácidos N-terminales en pequeña proporción en ambas proteínas.

El modelo de estructura propuesto por Porter incluye cuatro o quizás seis cadenas en la molécula. La contradicción entre estos datos ha sido resuelta suponiendo que algunos residuos N-terminales no son reactivos para el método de medición o están complejados con otros compuestos.

Datos recientes (68) indican que el residuo N terminal en la cadena pesada o cadena A de globulina de conejo sería el ácido pirrolidincarboxílico.

Datos a confirmar (67) han revelado cuatro aminoácidos C.-terminales en la molécula intacta.

Los datos presentados en la Tabla 6 permiten inferir que la reducción de la molécula por el borohidruro de sodio en presencia de úrea 8 M, se acompaña de un cierto efecto proteolítico. Los valores encontrados en la molécula intacta, sea de conejo o humana, están de acuerdo con lo informado por diferentes autores.

El número de residuos N terminales dosados en la molécula reducida y carboximetilada, es varias veces mayor al número encontrado en la molécula intacta. Pese a esto el tipo de aminoácidos N -terminales encontrados es similar a los residuos de la molécula no tratada, presentes en cantidades mínimas.

Esto permite suponer la posibilidad de que algún residuo N terminal de la molécula intacta no detectable por tener bloqueado su grupo amino, haya sido liberado por úrea y borohidruro y sea entonces revelable.

El número total de residuos encontrados, es por otra parte, superior al que podría esperarse para un modelo de cuatro cadenas y esto hace pensar en la posibilidad de hidrólisis peptídica de la molécula.

Reducción y ruptura de γ globulina por efecto del borohidruro de sodio en presencia de úrea 8 M.

Con los datos obtenidos por medida de peso molecular de los componentes de la molécula reducida y carboximetilada, el número de uniones disulfuro reducidas, así como el dosaje de los residuos N-terminales es posible intentar una explicación sobre el ataque de la molécula por parte

del agente reductor.

Para esta interpretación se supone como válido el modelo de cuatro cadenas propuesto por Porter.

Fragmentos de un peso aproximado de 10,000 -como los obtenidos- indicarían que las llamadas cadenas livianas o cadenas B no son rotas, por cuanto su peso se ha calculado aproximadamente en 20,000. La hidrólisis, por lo tanto, debe concentrarse sobre las cadenas pesadas. El peso de estas cadenas se ha supuesto en 55,000. Si la producción de pequeños péptidos no es significativa, lo inmediatamente probable es una escisión de cada cadena A en componentes similares.

Esta interpretación exige que todas las uniones disulfuro que conectan distintas cadenas sean reducidas y los fragmentos pertenecientes a cadenas diferentes sean separados.

En vista de la mayor labilidad de la unión disulfuro intercadena a la reducción, con respecto a la intracadena, lo supuesto anteriormente es lo probable.

La posibilidad de que la ruptura de la molécula implique la formación de fragmentos que contengan uniones disulfuro intercadena y por lo tanto con péptidos pertenecientes a diferentes cadenas, exige un mecanismo de ruptura en múltiples zonas. Esto implicaría una hidrólisis de numerosas uniones peptídicas, con la aparición de un número mayor de residuos N terminales al encontrado.

Finalmente si se tiene en cuenta el modelo de estructura propuesto por Tanford (Fig. 2) la zona desenrollada de la proteína se localiza en cada

una de las cadenas A, y sobre esta zona actúan en su efecto proteolítico papaína y pepsina aunque en sitios diferentes (21).

La existencia de esta zona menos "globular" que el resto de la molécula, sensible al efecto proteolítico de enzimas, ofrece la posibilidad de localizar en la misma el efecto hidrolítico del borohidruro en presencia de úrea 5 M.

La conclusión final probable, por lo tanto, es que la úrea lleva a un desplegamiento casi total de la proteína permitiendo al reductor químico la ruptura de las uniones disulfuro que unen cadenas diferentes. Un efecto de hidrólisis de uniones peptídicas sobre las cadenas pesadas, con formación de componentes similares en peso, completaría el efecto de reducción inicial.

Separación de los componentes obtenidos por reducción y carboximetilación de la gama globulina

Entre los diferentes métodos utilizados para separar los fragmentos muy pocos dieron resultados efectivos.

Uno de ellos, la electroforesis libre en búffer de borate, indicó estar en presencia de varios componentes heterogéneos e indujo a un intento de separación de los mismos.

El uso de resinas de intercambio iónico dio resultado favorable únicamente con dietilaminoetilcelulosa en las condiciones ya explicadas.

La recuperación de la proteína alcanzaba solo alrededor de un 80%. Esta pérdida es significativa en este tipo de macromoléculas, sobre todo en la recuperación de su actividad biológica. En general, éste es el prin-

principal inconveniente en el fraccionamiento por resinas de este tipo de material, originado en proteínas inmunes, reducidas en presencia de úrea. A la escasa solubilidad de los componentes se le añade la pérdida en su fraccionamiento (30).

En nuestro caso, si bien el material era lo suficientemente soluble como para ser analizado, la pérdida era importante. Pese a esto el método era reproducible con diferentes tipos de gama globulina, de la misma o diferente especie, lo que permitió una comparación de los distintos péptidos obtenidos.

Actividad biológica de inmunoglobulinas fragmentadas

La molécula de inmunoglobulina de conejo reducida y fragmentada, si bien es incapaz de precipitar con su antígeno específico, es biológicamente activa cuando participa en un sistema de coprecipitación.

El grado de actividad biológica -un 70 a 80% de la molécula intacta- indica una recuperación de la actividad de la proteína después de reducida, carboximetilada y dializada.

Por otra parte, la especificidad de este efecto quedó demostrada cuando participaban fragmentos provenientes de globulina inerte o de anticuerpos inespecíficos.

Merece cierta consideración el hecho de que si bien la valoración se hizo en la zona de equivalencia de antígeno y anticuerpo, el precipitado se acrecienta por el añadido de anticuerpo antes de disminuir, por lo menos por el agregado de pequeñas cantidades. Este parece ser el compor-

tamiento general en sistemas de precipitación antígeno-anticuerpo con inmunoglobulinas generadas en conejos. El hecho indicaría una amplia zona de equivalencia, lográndose la inhibición recién con anticuerpo en gran exceso (36).

Porter ha valorado la actividad biológica de las cadenas de su modelo con este sistema, habiendo encontrado que si bien por medicas de fluorescencia la cadena A es inmunológicamente muy activa, en la prueba de coprecipitación obtenía valores de solo un 15 a 20% del control (36). Cuando utilizó cadenas A obtenidas a partir de anticuerpos de suero de caballo, generados contra globulina de conejo, los valores de actividad alcanzaron un 70% del total de la molécula intacta. Cuando el antígeno usado era toxoide diftérico en caballo, la actividad se manifestaba por una inhibición de la precipitación.

Esto es índice de un comportamiento muy particular del sistema, y este comportamiento depende no sólo del animal inmunizado sino del tipo de antígeno.

En el caso de inmunoglobulina de conejo tratada con borohidruro y úrea la molécula permanecía activa cuando el antígeno usado era albúmina de bovino. Cuando el antígeno utilizado era gama globulina humana los valores de coprecipitación eran menos significativos y la síntesis misma del anticuerpo era menos eficaz. Factores expuestos en las consideraciones precedentes pueden estar implicados en este comportamiento.

El fraccionamiento total o parcial de los distintos componentes mediante dietilaminoetilcelulosa hace descender los valores de actividad de estos

fragmentos a un 50 % del inicial. El pasaje por la resina implica una pérdida o cierto grado de destrucción de aminoácidos vinculados al centro activo de la proteína.

Por otro lado, el hecho de que solo una parte del material eluido de la columna revele actividad inmunológica sugiere una probable vinculación al sitio de combinación del anticuerpo.

Especificidad biológica y heterogeneidad de péptidos de inmunoglobulinas

Los modelos obtenidos por electroforesis en alto voltaje permiten concluir acerca de analogías y diferencias cuando el material analizado pertenece a anticuerpos de distinta especificidad.

Las diferencias en los mapas de péptidos, cuando se comparó fracciones III y IV con sus análogas de otro anticuerpo se mantuvieron regularmente. Este tipo de diferencias, junto con el hecho de que estas dos fracciones juntas eran las únicas que mostraban actividad inmunológica, refuerzan la hipótesis de su conexión con el centro activo de la molécula.

La heterogeneidad biológica, física y química de inmunoglobulinas ha sido repetidas veces enunciada. La separación en los tres tipos de globulinas inmunes si bien ha atemperado la confusión, no ha aclarado la complejidad de estructura de estas proteínas (30).

Heterogeneidad en cadenas A y en cadenas B ha sido demostrada por diferentes métodos. Así, por ejemplo, cadenas B analizadas electroforéticamente en gel de almidón, úrea 6 M a pH 7-8 (36), muestran alrededor de 10 componentes bien separados, independientes de la movilidad total

de la molécula. Estos mismos componentes se observan en individuos de una misma especie, no detectándose diferencias entre los distintos componentes; no estando por lo tanto estas diferencias relacionadas con variaciones genéticas individuales.

El hecho de que cadenas B de globulinas γ del mieloma humano, que se consideran idénticas a las cadenas B de inmunoglobulinas normales, fueran analizadas por el mismo procedimiento y no mostraran tal heterogeneidad, descartó la posibilidad de un artefacto de técnica (24-69).

Una probable explicación de estos hechos se ha intentado al suponer una síntesis de cadenas B de proteínas del mieloma por un grupo relativamente homogéneo de células derivadas de un simple clon, aunque resultados que lo confirmen no han sido comunicados (31).

Hechos similares a éstos se han observado con cadenas A, exigiendo el análisis de los datos que pretenden correlacionar estructura con actividad biológica una extremada cautela.

En el análisis de péptidos por ionoforesis, la heterogeneidad en los modelos obtenidos por la comparación de fracciones originadas en distintos anticuerpos, reducidos con borohidruro en presencia de úrea 6 M, no necesariamente puede vincularse a especificidad biológica.

En este sentido, un primer factor a considerar es la posibilidad de diferencias atribuibles a variaciones genéticas individuales, en la medida en que los distintos anticuerpos fueron sintetizados por diferentes grupos de animales.

Dos hechos pueden, sin embargo, reforzar la hipótesis de su vincula-

ción al centro activo de la molécula. Uno de ellos es la reproducibilidad de los mapas peptídicos mostrando idénticos modelos cuando se utilizaba el mismo antígeno, aunque diferentes animales dentro de una misma especie. Esto podría descartar diferencias alotípicas.

Otro punto a tener en cuenta es la actividad biológica medida por co-precipitación, presente únicamente en aquellas fracciones que muestran diferencias por el análisis electroforético de sus péptidos.

O sea, en resumen, diferencias en los ionogramas de las fracciones III o IV, cuando cada una de ellas se compara con sus análogas provenientes de otro anticuerpo, pueden no tener significado fisiológico y estar solo vinculadas a la heterogeneidad o diferencias alotípicas de distintas globulinas inmunes.

Pero si estas diferencias, se observan exclusivamente en aquellas fracciones (III y IV) que muestran actividad biológica su probable vinculación al sitio de combinación del anticuerpo puede sugerirse.

Actividad biológica en inmunoglobulinas y estructura proteica

Como ya ha quedado expresado, la posibilidad de asignar a la estructura terciaria de las inmunoglobulinas la responsabilidad de su especificidad biológica, ha sido descartada mediante experiencias de desnaturalización y renaturalización de la molécula con úrea.

La eventualidad de que distintas combinaciones de las moléculas de cisteína participen en la formación de los enlaces disulfuro, y mediante estas múltiples combinaciones se exprese la especificidad biológica no ha podido ser demostrada, manteniéndose como único argumento de esta hi-

pótesis, la pérdida de actividad por la destrucción de dichas uniones disulfuro (66). Más aún el dato encontrado por Fleishman y colaboradores (36), acerca de que en los fragmentos papáinicos biológicamente activos solo una unión disulfuro entre los componentes de las dos cadenas se encuentra aun cuando el fragmento total encierra seis uniones disulfuro, minimiza el número de las posibles combinaciones a un valor de tres (66).

Los datos presentados en este trabajo informan acerca de una ruptura y carboximetilación de uniones disulfuro de alrededor de un 80% del total. Dada la diferente labilidad de la unión disulfuro, lo probable es que esta reducción incluya a la casi totalidad de las uniones disulfuro intercadena.

La molécula así tratada, o el conjunto de sus componentes resultantes, es incuestionablemente activa, pese al grado de destrucción de sus estructuras secundaria y terciaria.

Esta serie de consideraciones conducen a suponer que la especificidad biológica de una inmunoglobulina debe localizarse en el tipo y secuencia de sus aminoácidos, que definen fundamentalmente su estructura primaria.

CAPITULO V

R E S U M E N

Gama inmunoglobulina 7 S de conejo y gama globulina humana 7 S fueron reducidas y carboximetiladas con borohidruro de sodio en presencia de urea 8 M, y posterior tratamiento con ácido iodoacético.

El análisis por ultracentrifugación analítica reveló que ambas proteínas habían sido resueltas en fragmentos que poseen una constante de sedimentación de 1.5 y un peso molecular de 18.000 para los componentes de proteína de conejo y 18.200 en el caso de fragmentos de la globulina humana.

La presencia de un solo pico regularmente simétrico en el análisis por ultracentrifugación analítica de estos fragmentos, y los resultados del análisis de homogeneidad según el procedimiento propuesto por Van Holde y Baldwin, sugieren que los distintos componentes son probablemente similares en tamaño. El número de uniones disulfuro reducidas y carboximetiladas, medido por la cantidad de S-carboximetilcisteína formada indicó una considerable reducción de estas uniones.

El número de residuos N- terminales encontrados en la proteína reducida y carboximetilada, varias veces superior al total detectado en la proteína intacta, sugiere un cierto efecto proteolítico por parte del agente reductor. El hecho de que los residuos N- terminales de la molécula reducida y carboximetilada sean similares a los encontrados en la proteína intacta en pequeña dosis, puede interpretarse como que ciertos residuos N- terminales no detectados en el análisis de la molécula no tratada sean ahora revelables como consecuencia del tratamiento a que fue sometida la globulina.

Dada la existencia de una zona menos "globular" que el resto de la molécula, sensible al efecto proteolítico de papaína y pepsina, los valores de peso molecular de los fragmentos obtenidos y el análisis de sus residuos N- terminales ofrecen la posibilidad de localizar en esta zona "lábil" el efecto hidrolítico del borohidruro de sodio.

Por otra parte, el análisis comparativo de los pesos moleculares, y de los residuos N- terminales de los fragmentos originados en la proteína humana y en la de conejo, dada la similitud general de estructura de la molécula en distintas especies, sugieren un ataque similar en ambas proteínas por parte del borohidruro.

Inmunoglobulina 7 S de conejo reducida y carboximetilada, según el procedimiento informado en este trabajo, es incapaz de precipitar con su antígeno específico, pero es un 60 - 70 % tan activa como la molécula intacta, cuando participa en un sistema de coprecipitación. La separación de estos fragmentos en cuatro fracciones mediante cromatografía en dietila

minoetilcelulosa, reduce su actividad biológica, cuando se usan las cuatro fracciones combinadas en la medición, a un 50 % de la actividad inicial. De estas cuatro fracciones, únicamente la combinación de dos de ellas revela un cierto grado de actividad; cuando se las mide a cada una por separado son totalmente inactivas.

Un análisis comparativo de los mapas peptídicos obtenidos de cada una de estas cuatro fracciones por electroforesis en alto voltaje, con los análogos correspondientes a las mismas fracciones provenientes de otro anticuerpo específico, fué realizado.

Pequeñas diferencias pudieron observarse en los mapas correspondientes a dos de estas fracciones e idénticos mapas en las restantes. El hecho de que estas diferencias sean observables exclusivamente en las fracciones que poseen un cierto grado de actividad biológica hace suponer una vinculación de las mismas al sitio de combinación del anticuerpo.

Finalmente la considerable destrucción de las estructuras secundaria y terciaria de la globulina inmune por acción del borohidruro en urea 8 M, pese a lo cual la molécula retiene su actividad biológica, sugiere una localización del sitio de combinación del anticuerpo en el tipo y secuencia de aminoácidos que forman la cadena primaria de la molécula.



BIBLIOGRAFIA

1. Grabar, P., y Williams, G.A., Arch. Microb. Acta 10-122 (1953).
2. Heremans, J.R. y Vaerman, J.P., Nature 192, 1001 (1962); Fireman, P., Vannier, W.E., y Goodman, H.G., J. Exptl. Med. 117, 603 (1963); Vagi, Y., Maier, P., Pressman, D., Arbesman, G.E. y Reisman, R.E., J. Immunol. 91 - 83 (1963).
3. Neurath, H., J. Am. Chem. Soc. 81 - 1941 (1959).
4. Almeida, J., Ciszander, B., y Hewatson, A., J. Exptl. Med. 116 - 287 (1963).
5. Porter, R.E., en "The Fibrous Proteins" (F.W. Johnson, ed.), Vol. 1, p. 261, Academic Press, N. Y.; Pain, R.H., Arch. J. 82 - 234 (1963); Small, P.A., Kohn, J.E., y Lamm, M.E., Science 142 - 333 (1963).
6. Jirgenson, B., Arch. Microb. Acta 11-57 (1953).

7. Winkler, M., y Doty, P., Bioch. Biophys. Acta 54-66 (1961)
8. Edel hech, H., Lippoldt, R. H., y Steiner, R. F., J. Am. Chem. Soc. 81 - 2133 (1959).
9. Steiner, R. F., y Edelhech, H., J. Am. Chem. Soc. 81 - 2130 (1959).
10. Karush, F. on "Immunological and Biochemical Comparisons of Proteins" (W. H. Cole ed.) p. 48, Rutgers University Press, New Brunswick, New Jersey; Nisencoff, A., y Pressman, D., Arch. Bioch. Biophys. 82 - 464 (1959).
11. Winkler, M., y Doty, P., Bioch. Biophys. Acta 54-66 (1961).
12. Smith, E. L., Mc Fadden, M. L., Stockell, A., y Dact-
tner - Jarnusch, V., J. Biol. Chem. 214 - 187 (1955); Flaisher,
S., Hardin, R. L., HKrowitz, J., Zimmerman, M.,
Gresham, E., Turner, J. B., Barnett, J. P., Stary, E.,
y Naurewitz, F., Arch. Bioch. Biophys. 82 - 280 (1961); Ashenau,
B. A., Farthing, C. P., y Humphrey, J. R., Immunology 2-336
(1960); Crumpton, M. J., y Wilkinson, J. M., Bioch. J. 81 -
226 (1963).
13. Karush, F., Advan. Immunol. 2 - 1 (1963).

14. Koshland, M. E., y Englberger, F. M., Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 50 - 61 (1963).
15. Ingram, V. M., Nature 171 - 702 (1953).
16. Gitlin, D., y Merier, R., J. Exptl. Med. 114 - 217 (1961);
Gourvitch, A. E., Guberniova, L. M., Miasoedova, E. N., Biochimica 22 - 443 (1961).
17. Porter, R. R., y Press, E. M., Ann. N.Y. Acad. Sci. 21 - 623 (1962).
18. Edelman, G. M., Heremans, J. F., Heremans, M. T., y Kunkel, R. G., J. Exptl. Med. 112 - 203 (1963).
19. Franklin, E. G., J. Clin. Invest. 22 - 1000 (1953).
20. Nisonoff, A., Wissler, F. G., Lipman, L. N., y Woernley, D. L., Ann. N.Y. Acad. Sci. 22 - 630 (1962).
21. Utsumy, S., y Karush, F., Biochemistry 1 - 1763 (1962).
22. Schroeder, R. E., Arch. Biochem. Biophys. 101 - 456 (1963).
23. Edelman, G. M., J. Am. Chem. Soc. 81 - 2155 (1959).
24. Edelman, G. M., y Peulik, M. D., J. Exptl. Med. 112 - 601 (1961).
25. Putnam, F. W., J. Am. Chem. Soc. 75 - 5700 (1953).
26. Fleishman, J. E., Pain, R., y Porter, R. R., Ann. N.Y. Acad. Sci. 21, 174 (1962).

27. Cebra, J. J., J. Immunol. **52** - 277 (1944).
28. Feinstein, A., Gell, P. G. K., y Kelen, A. S., Nature **169** - 653 (1952).
29. Bray, S., Young, G. O., y Gerald, L., J. Immunol. **51** - 403 (1943).
30. Cohen, S., y Porter, R. R., Advances in Immunology, Vol. **4**, p. 297, (1954), Dixon y Humphrey, Ed. Acad. Press, N. Y.
31. Cahmann, H. J., Arnon, R., y Sela, M., J. Biol. Chem. **242** - 2702 (1965).
32. Cecil, R., y Wake, R. G., Biochem. J. **52** - 401 (1952).
33. Cecil, R., Biochem. J. **57** - 549 (1953).
34. Hong, R., y Nisenoff, A., J. Biol. Chem. **242** - 2663 (1965).
35. Hoelken, M., Nelson, C., Buckley, C., y Tanford, C., J. Biol. Chem. **240** - 219 (1965).
36. Fleischman, J. B., Porter, R. R., y Press, E. M., Biochem. J. **52** - 226 (1952).
37. Edelman, G. M., Benacerraf, B., Ovary, E., y Poulik, M. D., Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. **47** - 1761 (1951).
38. Cohen, S., y Porter, R. R., Biochem. J. **52** - 273 (1952).
39. Cebra, J. J., en "Conceptual Advances in Immunology and Oncology", p. 226, Harper y Row., N. Y.

40. Pressman, D., y Reholt, O., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.
47 - 1008 (1961).
41. Reholt, O., Radulinski, G., y Pressman, D., Science
141 - 726 (1963).
42. Metzger, H., y Singer, S. J., Science 142 - 676 (1963).
43. Givol, D., y Sela M., Biochemistry, 3 - 444 (1964).
44. Burnet, F. M., Australian J. Sci. 21 - 67 (1957). Lederberg,
 J., Science, 129 - 1649 (1959).
45. Pauling, L., J. Am. Chem. Soc. 81, 2043 (1959).
46. Epstein, C., Goldberger, R. F., y Anfinsen, C. B.,
Gold Spring Harbor Symposia Vol. 22 - 430 (1962).
47. Kekwick, B. A., Bioch. J. 51 - 1243 (1960)
48. Seber, H. A., y Petersen, H. A., J. Am. Chem. Soc. 78 - 75
756 (1956).
49. Freund, J. y Mc Dermott, H., Proc. Soc. Exp. Biol. N.Y.
42 - 548 (1962).
50. Moore, M., Cole, R. D., Gundlach, H. G., y Stein, W. H.
on Symposium on Proteins, IVth. International Congress of Biochemistry.
Vienna 1958, Pergamon Press, N. Y.
51. Schachman, H. K., on Methods in Enzymology, Vol. 1, p. 22,
Colowick y Kaplan (eds.), Academic Press, Inc. N. Y. (1957).
52. Kogoles, G., y Gutter, F. J., J. Am. Chem. Soc. 73 - 6770 (1951).

53. Svedberg, T., y Pedersen, K. O., The Ultracentrifuge, Oxford Univ. Press, London y New York, Johnson Reprint Corporation, New York, (1940).
54. Klainer, S. M., y Kegeles, J., J. Phys. Chem. 59-952 (1955).
55. Van Holde, K. E., y Baldwin, R. L., J. Phys. Chem. 62-734 (1958).
56. Bloek, R. J., Durrum, E. L., and Zweig, G., "Paper Chromatography and Paper electrophoresis" 2 ed. p. 110 (1958). Academic Press. Inc. N. Y.
57. Spackman, D. H., Stein, N. H., y Moore, S., Analyt. Chem. 30 - 1190 (1958).
58. Troll, W., y Keith Cannan, R. J. J. Biol. Chem. 200-803 (1953).
59. Michaelis, L., y Schubert, M. P., idem, 106- 331 (1934).
60. Porter, R. R., en Methods in Enzymology, Vol. 4., p. 221, Colowick, S. P. y Kaplan, V. O., (eds) Academic Press N. Y.
61. Ingram, V. M. idem, vol 6, p. 831.
62. Kabat, E. A., y Mayer, M. M. Experimental Immunochemistry, 2da. ed. p. 22, Springfield, Ill., C. C. Thomas.
63. Kabat, E. A., J. Exptl. Med. 59-103 (1939); Cammack, K. A., Nature 194 - 745 (1962).

64. Putnam, F. W., J. Am. Chem. Soc., 75, 2725 (1953); Porter, R. R., on "The Fibrin Protein", Vol. 1, p. 241, Academic Press, N. Y.; Pain, R. H., Bioch. J. 52 - 234 (1953); Small, P. A., Kohn, J. E., y Lamm. Science 142 - 658 (1963)
65. Cecil, R. on "The Fibrin", p. 275, 2nd. ed.; Neurath, H., ed. Academic Press, N. Y.
66. Buckley, C. E. Whitney, P. L., y Tanford, C., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 50 - 227 (1962).
67. Silman, H. I., Cebra, J. J., y Givol, D., J. Biol. Chem. 237 - 2193 (1962).
68. Porter, R. R., y Press, E. M. Biochem. J. 51 - 22 p. (1953)
69. Putnam, F. W. on "The Fibrin Protein" vol. 1, p. 242, Academic Press, N. Y.
70. Porter, R. R., on "Essential Problems of Neurologic Diseases" p. 177, Gellhorn, A., y Hirschberg, R., eds., Columbia University Press, N. Y.