

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



TESIS DOCTORAL

**Estudios sobre la estructura primaria de la inmunoglobulina
D(IgD) del suero humano**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

María de los Ángeles García Pardo

DIRECTOR:

Fernando Ortiz

Madrid, 2015



5318220072

est

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS

ESTUDIOS SOBRE LA ESTRUCTURA PRIMARIA
DE LA INMUNOGLOBULINA D (IgD) DEL
SUERO HUMANO.

Memoria que para optar al grado de



DOCTOR EN CIENCIAS QUIMICAS

BIBLIOTECA presenta

DE LOS ANGELES GARCIA PARDO

R 36,287

MADRID, 1976

A mi abuelo Joaquín,
su larga vida dedicada a la ciencia
y sus grandes cualidades humanas,
son un ejemplo para todos.

El presente trabajo fue comenzado en el Departamento de Inmunología de la Fundación Jiménez Díaz de Madrid, bajo la dirección del Dr. Fernando Ortiz, jefe del Dpto, terminándose después en el "Irvington House Institute" del New York University Medical Center, en New York.

Quiero dar las gracias en primer lugar, al Dr. Ortiz por sus enseñanzas y consejos y por su constante dedicación y estímulo hacia la investigación. A él le debo mi primera formación inmunológica.

En segundo lugar, agradezco al Prof. Dr. Angel M. Municio, el aceptar la ponencia de esta Tesis. Gracias a sus consejos entré en contacto con la Inmunología.

Quiero agradecer muy especialmente al Prof. Dr. Blas Frangione, del NYU Medical Center, sus constantes consejos y críticas y su gran ayuda durante la realización de este trabajo. Gracias a él, fue posible terminarlo.

Agradezco también al Dr. Edward C. Franklin, director del Instituto, el haberme permitido utilizar todas las dependencias del laboratorio. Su dedicación a la investigación y sus enseñanzas en el campo de la Inmunología, han sido muy provechosas para mí durante este tiempo.

Finalmente, quiero agradecer a todos mis compañeros de trabajo, de Madrid y de New York, su ayuda y consejos en muchas partes de esta tesis.

ABREVIATURAS

Aa	-----	Aminoácido
B-BOT-fluor	--	2,5,bis(5-terc)-butilbenzoxazolil tiofeno
BSA	-----	Albúmina bovina
CC	-----	Citocromo C
Cadena δ	-----	Cadena pesada de la IgD, clase δ
Cadena H	-----	Cadena pesada
Cadena L	-----	Cadena ligera
Cadena λ	-----	Cadena ligera de la IgD, tipo λ
CHO	-----	Carbohidrato
^{14}C -IAA	-----	Ac. ^{14}C -Iodoacético
CmCys	-----	Carboximetil cisteína
CR-A*	-----	Reducción total y alquilación radioactiva
Cysa	-----	Ac. cisteico
DNS-aa	-----	Dansil-aminoácido
DNS-Cl	-----	Cloruro de dansilo (1-dimetil amino naftalen-5-sulfonilo)
DTT	-----	Ditiotreitol

ϵ ACA	-----	Ac. ϵ -amino caproico
EDTA	-----	Ac. Etilen-diamino-tetraacético
ϵ -DNP-Lys	-----	ϵ -dinitrofenil-lisina
EF	-----	Electroforesis
ID	-----	Inmunodifusión
IEF	-----	Inmunolectroforesis
IgA	-----	Inmunoglobulina A
IgD	-----	Inmunoglobulina D
IgE	-----	Inmunoglobulina E
IgG	-----	Inmunoglobulina G
IgM	-----	Inmunoglobulina M
Igs	-----	Inmunoglobulinas
Oval	-----	Ovalbúmina
PAGE	-----	Electroforesis en geles de poliacrilamida
PCA	-----	Ac. 2-pirrolidón 5-carboxílico
PITC	-----	Isotiocianato de fenilo
PM	-----	Peso molecular
PR-A ⁺	-----	Reducción parcial y alquilación radioactiva

PTH-aa ----- Fenil-tio-idantoil-aa
SC ----- Componente secretorio de la IgA
SDS ----- Dodecil sulfato sódico
sIgA ----- IgA secretoria
TPCK ----- 1-tosilamido-2-fenil-etil, clorometil cetona

I N D I C E

	<u>Página</u>
1.- <u>INTRODUCCION</u>	1-59
1.1.- Estructura de las Inmunoglobulinas	1
1.2.- Actividades biológicas de las Inmu- noglobulinas	26
1.3.- Inmunoglobulina D	35
2.- <u>OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO</u>	60-67
3.- <u>MATERIALES Y METODOS</u>	68-102
3.1.- Inmunoglobulina D humana	68
3.2.- Preparación del antisuero	69
3.3.- Inmunoelectroforesis e inmunodifusión	70
3.4.- Filtración por geles	71
3.5.- Reducción y alquilación de la IgD	73
3.5.1.- Preparación de Ac. ¹⁴ C-Iodoacético	73
3.5.2.- Reducción parcial y alquilación de la IgD	74

3.5.3.- Reducción total y alquilación de la IgD	74
3.6.- Cromatografía en DEAE-Sephadex	75
3.7.- Electroforesis en geles de SDS-polia- crilamida	76
3.8.- Digestión enzimática de la IgD	80
3.8.1.- Digestión con tripsina	80
3.8.2.- Digestión con pepsina	81
3.9.- Oxidación con ác. perbórmico	81
3.9.1.- Preparación del ác. perbórmico	82
3.9.2.- Oxidación de la proteína	82
3.9.3.- Oxidación de péptidos en papel	82
3.10.- Electroforesis de alto voltaje	83
3.10.1.- Movilidades de los péptidos a 6.5	85
3.11.- Cromatografía en papel	85
3.12.- Detección de péptidos en papel	87
3.12.1.- Detección de los péptidos radioactivos	87
3.12.2.- Tinción con Ninhidrina	87

	<u>Página</u>
3.12.3.- Detección de Triptófano	88
3.13.- "Chemical typing"	88
3.14.- Mapa diagonal de la IgD	89
3.15.- "Fingerprinting" o mapa peptídico	90
3.16.- Análisis de aminoácidos	92
3.17.- Determinación de grupos terminales	94
3.17.1.- Método del cloruro de dansilo	94
3.17.2.- Digestión con pronasa	97
3.18.- Degradación secuencial de péptidos	98
3.18.1.- Secuenciación manual. Método de "dansyl-Edman"	98
3.18.2.- Secuenciación automática	99
3.18.2.1.- Cromatografía de gases	100
3.18.2.2.- Cromatografía en capa fina	101
3.18.2.3.- Hidrólisis del PTH-aminoácido	102
4.- <u>RESULTADOS</u>	103-182
4.1.- Aislamiento y purificación de la IgD	103
4.1.1.- Electroforesis en bloques de almidón	105

	<u>Página</u>
4.1.2.- Filtración a través de Sephadex G-200	108
4.2.- "Chemical typing" de la IgD	113
4.3.- Mapa diagonal de la IgD	117
4.4.- Obtención de las cadenas H y L de la IgD	119
4.5.- Caracterización química de la cadena δ	126
4.5.1.- Peso molecular	126
4.5.2.- Análisis de aminoácidos	128
4.5.3.- Determinación del amino terminal	131
4.5.3.1.- Método del cloruro de dansilo	131
4.5.3.2.- Digestión con pronasa	131
4.6.- Digestión enzimática de la cadena δ	137
4.6.1.- Elección de la enzima	137
4.6.2.- Digestión de la cadena δ con pepsina	139
4.7.- Péptidos radioactivos obtenidos en la cadena δ	140
4.8.- Digestión enzimática de la cadena λ	144
4.9.- Obtención del fragmento Fc de la IgD	146
4.9.1.- Digestión de la IgD con tripsina	146

	<u>Página</u>
4.9.2.- Análisis del digerido de IgD	149
4.9.2.1.- Inmunoelectroforesis	149
4.9.2.2.- Electroforesis en geles de SDS- poliacrilamida	152
4.9.2.3.- Determinación del amino terminal	157
4.10.- Caracterización de los picos V,VI y VII de la cromatografía en DEAE-Sephadex	160
4.10.1.- Caracterización del pico V	160
4.10.1.1.- Análisis de aminoácidos	160
4.10.1.2.- Determinación del amino terminal	160
4.10.1.3.- Secuencia del extremo N-terminal del fragmento Fc	162
4.10.2.- Caracterización del pico VI	163
4.10.2.1.- Análisis de aminoácidos	167
4.10.2.2.- Determinación de la secuencia	167
4.10.3.- Caracterización del pico VII	169
4.10.3.1.- Análisis de aminoácidos	171
4.10.3.2.- Determinación de la secuencia	171

	<u>Página</u>
4.11.- Digestión enzimática del fragmento Fc	173
4.11.1.- Digestión con tripsina	173
4.11.2.- Digestión con pepsina	174
4.12.- Obtención de los péptidos radioac- tivos del Fc	176
5.- <u>DISCUSION</u>	183-208
5.1.- Cadena pesada δ de la IgD	185
5.2.- Péptidos que contienen las cisteínas en la IgD.....	192
5.3.- Degradación enzimática de la IgD	201
6.- <u>CONCLUSIONES</u>	209-211
7.- <u>RESUMEN</u>	212-214
8.- <u>BIBLIOGRAFIA</u>	215-233

1.- INTRODUCCION

1.1.- ESTRUCTURA DE LAS INMUNOGLOBULINAS. -

Las inmunoglobulinas constituyen una gran familia de proteínas relacionadas filogenéticamente. Dentro de esta familia están los anticuerpos. Las inmunoglobulinas están presentes en el suero y otros líquidos orgánicos de todos los vertebrados, pero hasta ahora no está suficientemente aclarada su presencia en los invertebrados.

Biológicamente, las inmunoglobulinas se caracterizan por su capacidad de unirse específicamente a antígenos dando lugar a una respuesta inmunológica que contribuye a la supervivencia del organismo. Ya que cada molécula de anticuerpo posee una especificidad dirigida contra un restringido número de antígenos, se explica la tremenda heterogeneidad que tiene que existir dentro de estas proteínas, a fin de que el mecanismo de defensa del organismo sea completo.

Esta diversidad ha llevado a establecer una clasificación en un pequeño número de diferentes clases y sub-

clases de inmunoglobulinas, sobre la base de diferencias estructurales o antigénicas. El número de clases y subclases varía de unas especies a otras.

1.1.1.- Clases y subclases de inmunoglobulinas.-

En general todas las inmunoglobulinas están formadas por cuatro cadenas polipeptídicas iguales dos a dos, que se mantienen unidas por puentes disulfuro e interacciones no covalentes. La cadena más larga se conoce como cadena pesada H y tiene un peso molecular que varía desde 50.000 a 70.000 daltons. La cadena corta o cadena ligera L, tiene un peso molecular de 23.000 daltons.

En el hombre existen cinco clases diferentes de moléculas de inmunoglobulina que se denominan IgG, IgA, IgM, IgD e IgE y se diferencian entre si en la estructura química de la cadena pesada. La tabla I muestra un resumen de las principales propiedades de las diferentes clases de inmunoglobulinas.

TABLA I.- CLASES DE INMUNOGLOBULINAS HUMANAS.

	<u>IgG</u>	<u>IgA</u>	<u>IgM</u>	<u>IgD</u>	<u>IgE</u>
Fórmula Mol.	$(\gamma_2\kappa_2)_0$ $(\gamma_2\lambda_2)$	$(\alpha_2\kappa_2)_0$ $(\alpha_2\lambda_2)$ -SC-J	$(\mu_2\kappa_2)_5$ -J $(\mu_2\lambda_2)_5$ -J	$(\delta_2\kappa_2)_0$ $(\delta_2\lambda_2)$	$(\epsilon_2\kappa_2)_0$ $(\epsilon_2\lambda_2)$
Peso Mol. ($\times 10^{-3}$)	143-149	158-162	800-950	165-180	185-190
Coef. de sedim. (S)	6.17	6.18-11.4	19.0	6.6	8.0
Contenido en Carbohidrato (%)	2.5	5-10	5-10	10	12
Nivel en suero (mg/ml)	12	2	1	0.03	0.0003
Vida media (días)	25	6	5	3	2

Para designar las diferentes clases de cadena pesada, se utiliza la letra griega correspondiente, es decir, cadena gamma (γ), mu (μ), alpha (α), delta (δ) y epsilon (ϵ) para las respectivas moléculas.

Asimismo existen dos tipos diferentes de cadena ligera, que se conocen como lambda (λ) y kappa (κ). Cada cadena pesada se puede combinar con cualquiera de las dos cadenas ligeras; habrá por tanto moléculas $\gamma_2\kappa_2$ y $\gamma_2\lambda_2$.

La clase predominante en el hombre es la IgG, que constituye aproximadamente el 80% de las Igs totales del suero. La IgA es la inmunoglobulina que predomina en las secreciones y puede estar presente en el suero como monómero o como polímero. En las secreciones, la molécula de IgA (IgA secretoria), contiene una proteína adicional conocida como Componente o Pieza Secretoria (1).

La IgM se presenta generalmente en el suero en forma de pentámeros, de un peso molecular de 900.000 daltons, aunque se han observado también los monómeros 7S (2). Tanto los polímeros de IgA como los de IgM, contienen una cadena

extra llamada cadena J (joining) (3), cuyo peso molecular es 15.000 daltons y que se encuentra unida a las cadenas pesadas α o μ a través de enlaces disulfuro (4).

Las clases IgD e IgE se presentan en el suero como monómeros (5).

Cada clase de Inmunoglobulina a su vez, se puede subdividir en subclases. Las diferencias entre una subclase y otra, consisten en determinadas características antigénicas de la región constante de la cadena pesada. Las subclases se designan con números a continuación de la letra que designa la clase. Se conocen hasta ahora cuatro subclases para la IgG, denominadas $\gamma 1$, $\gamma 2$, $\gamma 3$ y $\gamma 4$; dos subclases para la IgA, $\alpha 1$ y $\alpha 2$ y dos para la IgM, $\mu 1$ y $\mu 2$.

1.1.2.- Regiones y fragmentos de las Inmunoglobulinas.-

Cada cadena polipeptídica de las inmunoglobulinas consiste en dos regiones bien definidas que se conocen como Región Variable (V) y Región Constante (C). La región constante es la porción carboxi-terminal de la cadena y tiene la misma estructura primaria que las otras cadenas de la misma clase,

subclase y tipo. La región variable, es la porción amino-terminal y comprende una gran heterogeneidad de secuencias de aminoácidos, incluso dentro de una misma subclase o tipo. Para designar estas regiones, se utilizan los símbolos: V_{κ} , C_{λ} , V_H , $C_{\alpha 2}$, etc. La Tabla II muestra las diferentes cadenas polipeptídicas existentes en las inmunoglobulinas y las regiones correspondientes. De los "Alotipos" hablaremos más adelante.

En las cadenas ligeras, la región constante C_L es del mismo tamaño que la variable V_L . Los estudios de secuencia de la región constante de la cadena $\gamma 1$, han demostrado que consiste en tres regiones definidas con una gran homología entre ellas, así como con la región constante de la cadena ligera y con regiones similares de cadenas pesadas de otras clases y especies. Estas regiones de homología, se designan por números arábigos contando a partir del extremo amino-terminal de la cadena, es decir: C_{H1} , C_{H2} , C_{H3} . La región constante de la cadena pesada es por tanto tres veces mayor que la región variable V_H . En las cadenas ϵ y μ existe una cuarta región de homología que se denomina $C_{\epsilon 4}$ y $C_{\mu 4}$ respectivamente (6) (7).

TABLA II. - CADENAS DE INMUNOGLOBULINAS HUMANAS

Aparición	Cad. Ligeras		Cadenas Pesadas					Otras	
	κ	λ	γ	α	μ	δ	ϵ		cad J
Todas las Igs			IgG	IgA	IgM	IgD	IgE	IgA y IgM	SigA
Peso Mol. ($\times 10^{-3}$)	22.5	22.5	53 ;	52- 58	65- 70	60- 65	70- 73	15	74- 80
Subclases	--	Oz ⁺ Oz ⁻ Kern ⁺ Kern ⁻	4	2	2	-	-	-	-
Alotipos	Inv 1, 2,3	-	Gm	Am	-	-	-	-	-
R. Variable	V κ	V λ	V _H	V _H	V _H	V _H	V _H	-	-
Nº Dominios en la R. Cons- tante	1	1	3	3	4	3	4	-	-

Cada región de homología comprende un total de 100-115 residuos de aminoácido. La teoría de los dominios propuesta por Edelman (8), supone que los residuos de cada región de homología están colocados en una conformación similar, formando un dominio globular compacto. Los residuos dentro de los diferentes dominios de una cadena de inmunoglobulina, no parecen interactuar entre si, pero pueden y de hecho lo hacen, interactuar con dominios homólogos de otras cadenas de la misma molécula. Se ha sugerido que la combinación $V_L V_H$ se llamara "Subunidad estructural V"; la $C_L C_{\gamma 1}$, "Subunidad estructural C1", etc. (9).

Cada uno de los dominios está conectado con los adyacentes por medio de regiones no globulares de la cadena polipeptídica y actúan por tanto independientemente. Se explica así la gran especialización funcional que existe dentro de las moléculas de Igs, en las que una determinada región participa en una función biológica con independencia del resto. Así, la región variable V, es la implicada en la unión al antígeno; la región $C_H 2$ es probablemente la que interacciona con el sistema del complemento; la región $C_H 3$, parece ser la responsa -

ble de la unión de las inmunoglobulinas a las células.

En la cadena pesada existe además otra región denominada "hinge", situada hacia el centro de la molécula, que no presenta homología con ninguna otra parte de la cadena polipeptídica. Sirve de unión entre el C_{H1} y el C_{H2} y se caracteriza por contener los puentes disulfuro intercadena pesada y por presentar una conformación particular, mucho más extendida que el resto de la molécula. Esta región es la responsable de la flexibilidad de la molécula de anticuerpo en su unión al antígeno y de ahí le viene su nombre. Se caracteriza además por contener un elevado número de residuos de Prolina, cuya función en esta región de la molécula, no está suficientemente aclarada todavía. Otra característica de esta región, es su extremada sensibilidad al ataque por enzimas proteolíticos.

El tratamiento de las moléculas de Inmunoglobulinas o de sus fragmentos, con agentes que rompen enlaces peptídicos, conduce a la formación de Fragmentos moleculares. En general se utilizan enzimas proteolíticos para la obtención de estos fragmentos, pero en ciertos casos, se ha utilizado Bromuro de Cianogeno ($BrCN$) (10) o ácido diluido (11) para la ruptura de enlaces entre residuos específicos.

Las enzimas que más se utilizan son la papaina, pepsina y tripsina. La papaina rompe la molécula de IgG (que es la mejor estudiada) en dos fragmentos denominados Fab y Fc, cuyo peso molecular es de 25-30.000 daltons. (12). La pepsina da lugar a un fragmento de mayor tamaño molecular que contiene los puentes disulfuro inter cadena pesada, llamado $F(ab')_2$, a un fragmento que contiene la porción carboxi-terminal de la cadena, denominado pFc' y a una serie de péptidos dializables (13) (14). Los fragmentos que se obtienen con tripsina son muy parecidos a los que se obtienen con papaina. La figura 1 muestra la estructura de una molécula de IgG con los sitios de ataque enzimático y los fragmentos resultantes. En la Tabla III, se expresan todos los fragmentos obtenidos hasta ahora en la IgG, y los métodos utilizados para su obtención.

Fragmentos análogos se pueden obtener en otras clases diferentes a la IgG, que se designan con los mismos símbolos pero con la letra apropiada de la cadena pesada de que se trate, es decir: Fc_{μ} , $Fab_{\alpha 2}$. A veces se puede obtener el mismo fragmento utilizando dos enzimas diferentes; en este caso se indica el

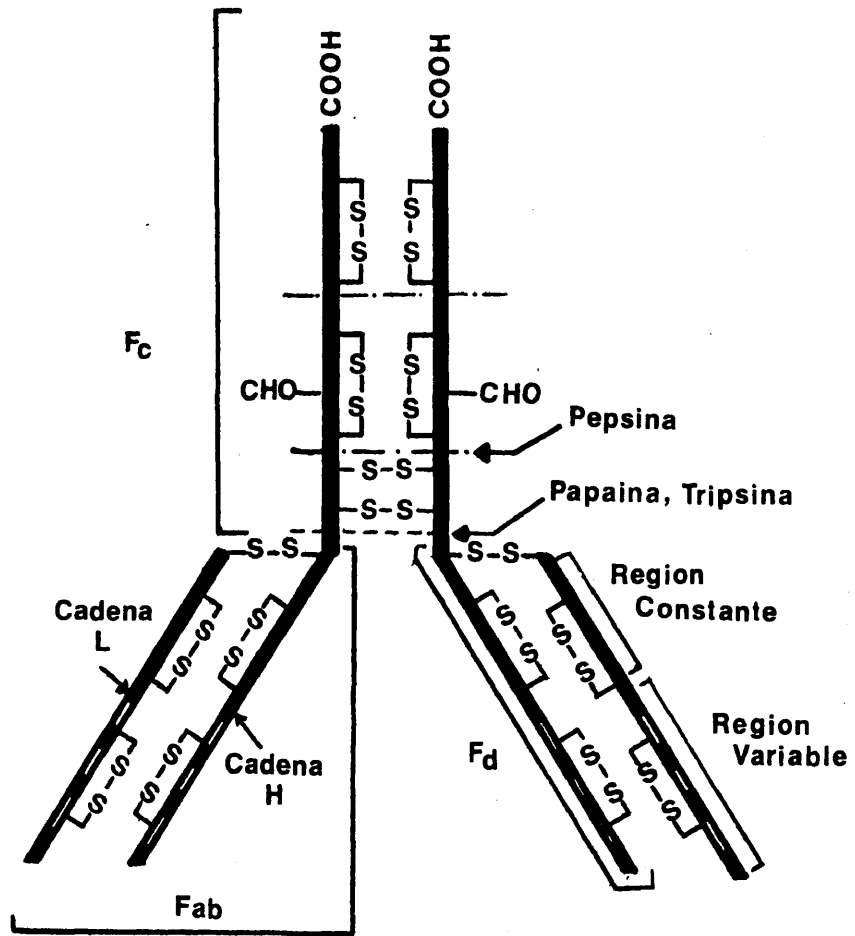


Fig. 1. - Estructura de la molécula de IgG. Sitios de ataque por enzimas.

TABLA III. - FRAGMENTOS DE LA INMUNOGLOBULINA G

<u>Fragmento</u>	<u>Dominio</u>	<u>Enzima</u>
Fab	$V_L C_L V_H C_H1$	Papaina, Tripsina
Fc	$(C_H2 C_H3)_2$	Papaina, Tripsina
Fd	$V_H C_H1$	Papaina
Fab'	$V_L C_L V_H C_H1$	Pepsina
Fab''	$V_L C_L V_H C_H1$	Bromuro de Cianógeno
Fc'	C_H3	Papaina, Pepsina, Tripsina, Subtilisina
Facb	$(V_L C_L V_H C_H1 C_H2)_2$	Plasmina
Fb(s)	$C_H1 C_L$	Subtilisina
Fv	$V_H V_L$	Pepsina
	$V_L C_L$	Pepsina, Tripsina, Papaina
	V_H	Papaina
	C_H2	Bromuro de Cianógeno Tripsina

nombre de la enzima por medio de un paréntesis con la letra inicial correspondiente a la enzima, es decir: Fab(t) significa el fragmento Fab obtenido por digestión con tripsina.

1.1.3.- Estructura primaria de las cadenas polipeptídicas.-

1.1.3.1.- Cadenas Ligeras.-

Existe actualmente un gran número de cadenas ligeras cuya secuencia es conocida. Los primeros datos se obtuvieron a partir de proteínas de Bence-Jones, pertenecientes a los dos tipos κ y λ , que se convirtieron en los prototipos de secuencia de subsiguientes estudios. (15) (16).

A lo largo de la cadena ligera se puede considerar que existe una simetría que proviene de la disposición de los cinco residuos de cisteína a lo largo de la misma. Las dos primeras cisteínas (residuos 23 y 88 en κ , 21 y 86 en λ) están unidas covalentemente formando un puente disulfuro intracatenario (17). Las dos cisteínas siguientes (134 y 194 en κ , 135 y 195 en λ), forman igualmente un enlace disulfuro y la última Cys, (C-terminal en κ , penúltimo residuo en λ), está implicada en el puente intercatenario con la cadena pesada.

En general, si se comparan diferentes secuencias de cadenas ligeras, se puede decir que en los primeros 118 residuos, existe un 24% de homología y en los restantes 106, un 98%. El hecho de existir esta tremenda heterogeneidad en la región variable, ha llevado a establecer una clasificación en subgrupos. Esta clasificación se basa en estudios de secuencia de los primeros residuos de aminoácidos del extremo N-terminal de la cadena. Se han definido así tres subgrupos de región variable en las cadenas κ , que se denominan $V_{\kappa I}$, $V_{\kappa II}$ y $V_{\kappa III}$; para las cadenas λ existen cinco subgrupos denominados $V_{\lambda I} \dots V_{\lambda V}$. En general, se puede decir que la homología entre cadenas pertenecientes al mismo subgrupo, es de un 75%, mientras que entre cadenas de diferentes subgrupos, es menor de un 50%.

Es interesante considerar los diferentes grados de variabilidad de algunos residuos dentro de la región variable. Los estudios estadísticos aplicados a las secuencias conocidas (18) demuestran que existen 29 posiciones en las que el mismo residuo está presente en la mayoría de los casos; a estos residuos se les conoce como invariantes y probable-

mente juegan un papel fundamental en el mantenimiento de la estructura terciaria de la región variable.

Existen otras cinco posiciones en las que el mismo aminoácido está presente en todos excepto uno de los subgrupos, y cuyo papel debe ser el mismo que el de los residuos invariantes .

Otras posiciones presentan una variabilidad mayor y están asociadas con los subgrupos de las cadenas κ o λ . Su función en la estructura total de la cadena no está muy clara.

Son extraordinariamente importantes ciertas posiciones que presentan un elevado grado de variabilidad y se conocen como posiciones hipervariables (19). Estas regiones se encuentran muy próximas en su disposición espacial y a su vez, están muy próximas a los residuos de cisteína que participan en el enlace intracatenario de la región variable. Los residuos hipervariables están directamente implicados en la unión al antígeno y las regiones hipervariables determinan la conformación espacial del sitio combinante.

182200 2

Respecto al tipo de residuos implicados en estas posiciones, es interesante destacar que 7 de las posiciones invariantes de V_L , están ocupadas por residuos de Glicina. El hecho de que este aminoácido carezca de cadena lateral, permite una gran movilidad a la región de la cadena polipeptídica a la que está unido, proporcionando así una gran libertad de rotación alrededor del determinante antigénico. En algunas de estas posiciones, como los residuos 99 y 100, existen también dos glicinas en posición análoga en la cadena pesada (20) (21), lo cual parece apoyar la teoría expuesta anteriormente.

1.1.3.2.- Cadenas Pesadas.-

De los estudios de secuencia de la región variable de doce proteínas de mieloma carentes de actividad de anticuerpo, (22) (23) (24), se llegó al establecimiento de tres subgrupos de región variable en la cadena pesada. Estos subgrupos se denominan: V_H^I ; V_H^{II} y V_H^{III} ; se ha sugerido la existencia de un cuarto subgrupo V_H^{IV} , aunque todavía no existen datos suficientes que lo confirmen.

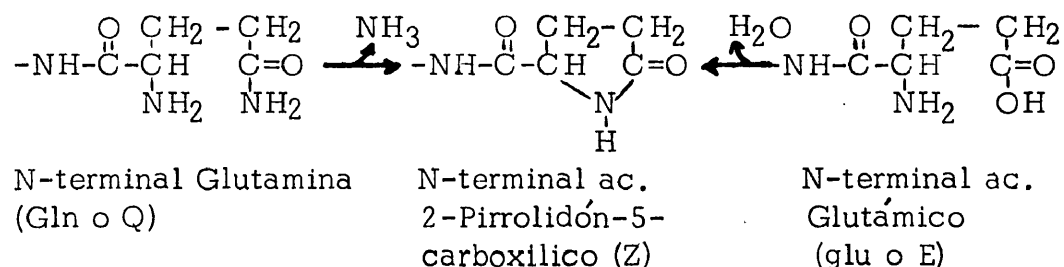
A diferencia de las cadenas ligeras, un mismo subgrupo V_H puede ser compartido por las cinco clases de

cadenas pesadas (25). Como en el caso de las cadenas L, existen dentro de la región V_H ciertas posiciones que son comunes a la mayoría de las clases de inmunoglobulinas. El 65% de la región V_H , muestra una variabilidad muy pequeña; existen 25 posiciones, el 20% de la región V, que son absolutamente invariantes en las doce secuencias conocidas, independientemente del subgrupo al que pertenezcan (26). Algunas posiciones son específicas de subgrupo; si se comparan las proteínas del subgrupo V_{HII} con las del V_{HIII} , existen 16 posiciones que parecen ser específicas de subgrupo; no se ha identificado ninguna de estas posiciones en el tercio carboxi-terminal de la región V (27).

Existen también cuatro amplias regiones hipervariables, que comprenden los residuos 31-37, 51-68, 84-91 y 101-110. El grado de variabilidad de estas regiones, difiere de unos subgrupos a otros.

Es interesante el hecho de que todas las cadenas pesadas pertenecientes a los subgrupos de homología de re-

gión variable I y II, tienen su aminoácido N-terminal bloqueado, formando el derivado : ac. 2-pirrolidón-5-carboxílico, (PCA) , que resulta de la ciclación de un residuo de ac. Glutámico o de Glutamina, con pérdida en este caso de amoníaco:



Esta característica es común también a las cadenas λ pertenecientes a los tres primeros subgrupos de homología.

Una región interesante de la cadena pesada y no suficientemente estudiada, es la unión de las regiones V y C en la cadena polipeptídica. El hecho de no tener datos suficientes de todas las clases de Igs, hace muy difícil su estudio en el momento presente. De la comparación de las proteínas conocidas (Fig. 2), se deduce que hay un residuo de Glicina

PUENTE V/C EN CADENAS PESADAS HUMANAS

Eu (IgG1)	Gly	Gly-Leu	Val	Thr	Val-Ser	Ser	Ala-Ser-Thr-Lys
Daw (IgG1)	Gly	Ile-Leu	Val	Thr	Val-Ser	Ser	Ala-Ser-Thr-Lys
Cor (IgG1)	Gly	Thr-Pro	Val	Thr	Val-Ser	Ser	Ala-Ser-Thr-Lys
He (IgG1)	Gly	Thr-Lys	Val	Ala	Val-Ser	Ser	Ala-Ser-Thr-Lys
Nie (IgG1)	Gly	Thr-Leu	Val	Thr	Val-Ser	Ser	Ala-Ser-Thr-Lys
Jon (IgG3)	Gly	Thr-Pro	Val	Thr	Val-Ser	Ser	Ala-Ser-Thr-Lys
Ou (IgM)	Gly	Thr-Thr	Val	Thr	Val-Ser	Ser	Gly-Ser-Ala-Ser
Gal (IgM)	Gly	Thr-Leu	Val	Thr	Val-Ser	Thr	Gly-Ser-Ala-Ser

120

125

Fig. 2.- Secuencia de aminoácidos en la unión de las regiones cons-
tante y variable en las cadenas pesadas.

invariante en posición 117, seguido por dos residuos variables en posiciones 120 y 121, que son Val-Thr en algunos casos y Val-Ala, en otros. Parece ser que la primera posición que es absolutamente distinta entre IgG e IgM, es la 125, que en IgG es Ala, y en IgM, Gly. A partir de esta posición, las dos proteínas son bastante diferentes, siguiendo Ala-Ser-Thr-Lys en IgG y Gly-Ser-Ala-Ser en IgM. La secuencia Thr-Val-Ser-Ser (121-124) que parece constante en todas las proteínas estudiadas (con las excepciones expuestas anteriormente), se conserva también en animales como el ratón(28) y el conejo (29).

1.1.4.- Marcadores genéticos de las inmunoglobulinas. -

Dentro de la región constante de las inmunoglobulinas, existe un polimorfismo de tipo genético, definido por la aparición de ciertos factores que están presentes en determinadas clases y subclases de inmunoglobulinas. Algunos de estos factores son de naturaleza alélica y se transmiten obedeciendo las leyes de Mendel. A estos factores se les conoce como Alotipos.

Existen otro tipo de factores no alélicos, que son el resultado de la existencia de múltiples genes que codifican las

cadenas de inmunoglobulinas; se les denomina Isotipos y se sintetizan en diferentes loci, ya que el mismo individuo tiene los dos tipos de cadena ligera y por lo menos diez clases y subclases diferentes de cadena pesada.

En las cadenas κ , se han descrito tres alotipos diferentes que se conocen como Inv(1), Inv(2) y Inv(3) (30) (31). Los Inv(1) y (2), se encuentran normalmente en la misma cadena κ . Los estudios de secuencia han demostrado que las proteínas Inv(1,2), tienen un residuo de Leucina en posición 191, mientras que las Inv(3) tienen Valina en esa posición.(32).

En las cadenas λ no se ha detectado hasta el momento ningún marcador alotípico; se han detectado algunas variantes serológicas, que son más consistentes con la idea de varias subclases de cadenas λ , codificadas por genes estructurales diferentes (33) (34). Estas variaciones se localizan en posiciones 154, en la que puede haber Serina o Glicina, y 191, con Arginina o Lisina, de manera que la variante $\lambda 1$ es Ser, Arg; la $\lambda 2$ es Ser, Lys, y la $\lambda 3$ es Gly, Arg. La glicina en posición 154, está asociada con la especificidad serológica conocida como Kern⁺ (35) y la lisina en 191, con la especificidad Oz⁺(36).

En las cadenas γ , se han descrito factores alotípicos semejantes a los Inv, que se conocen como Gm (37); se conocen más de 25 factores en este locus y están repartidos entre las diferentes subclases de la IgG (38). Estos factores controlan residuos específicos en la secuencia. La tabla IV, muestra los residuos de aminoácido relacionados con estos factores.

Asimismo se conocen marcadores genéticos para las cadenas α , que se denominan Am. Hasta el momento, sólo se ha descrito un marcador Am₂ para la subclase IgA₂ (39). No se ha descrito todavía ningún marcador alotípico en la región variable de ninguna inmunoglobulina humana.

1.1.5. - Naturaleza del sitio combinante. -

La porción de un anticuerpo que participa en la unión con el antígeno, es sólo una pequeña parte de la molécula localizada en la región variable y que comprende ambas cadenas H y L. La interacción específica entre un antígeno y un anticuerpo, depende de la complementareidad entre la conformación del determinante antigénico y el sitio combinante del anticuerpo. Esta unión es de naturaleza no covalente.

TABLA IV. - AMINOACIDOS RELACIONADOS CON VARIANTES ANTIGENICAS DE LAS

CADENAS DE INMUNOGLOBULINAS.

<u>Cadena</u>	<u>Posición</u>	<u>Aminoácido</u>	<u>Nombre</u>	<u>Alotipo o Isotipo</u>
κ	191	Leu Val	Inv (1,2,-3) Inv (-1,-2,3)	Alotipo
λ	190	Lys Arg	Oz ⁺ Oz ₋	Isotipo
λ	154	Gly Ser	Kern ⁺ Kern ₋	Isotipo
γ1	356-358	Asp-Glu-Leu Glu-Glu-Met	Gm (1) Gm (-1)	Alotipo
γ1	214	Arg Lys	Gm (4) Gm (-4)	Alotipo
γ3	436	Phe Tyr	Gm (5) Gm (21)	Alotipo

Los estudios realizados en orden a estimar el tamaño del sitio combinante, han llegado a la conclusión de que un pentasacárido puede acoplarse perfectamente en la región combinante (40); asimismo, estudios con anti-poli-aminoácidos, demostraron que el mínimo tamaño que se requería para el antígeno, era el de un tetrapéptido (41).

En cuanto a los residuos de la molécula de anticuerpo directamente implicados en la unión al antígeno, los estudios de modificación específica de Arginina, Lisina y Triptófano, han demostrado que la modificación de Lisina, tiene un pequeño efecto sobre la combinación con el antígeno, mientras que la de Arginina, tiene un efecto drástico. (42) (43) (44). La modificación de los residuos de Triptófano, conduce a la pérdida de la actividad de anticuerpo (45).

Como se ha comentado en otro apartado de esta Introducción, existen 21 residuos invariantes en la región variable de la cadena pesada; en este sentido, es interesante la existencia de un residuo de Arginina invariante en posición 40 (dos residuos después de la primera región hipervariable) y otro en posición 100 (residuo anterior a la cuarta región hipervariable).

Existe un Triptófano invariante en dos posiciones: 38 (primer residuo despues de la primera región hipervariable) y 50 (un residuo antes de la segunda región hipervariable). No hay residuos de Lisina invariantes en la cadena pesada.

Los experimentos de marcaje de afinidad han permitido estudiar con detalle la naturaleza y localización precisa del sitio combinante. Estos estudios consisten en introducir un grupo reactivo en el hapteno o antígeno, que sea capaz de combinarse covalentemente con un residuo situado cerca o en el sitio combinante. Por degradación posterior del anticuerpo y aislamiento de los péptidos marcados, se pueden localizar los residuos reactivos en la secuencia. De esta manera, se ha visto que estos residuos están dentro o muy cerca de las regiones hipervariables: Tyr 33 y 93 en la cadena ligera (46); posteriores estudios, han demostrado que aparecen marcados simultáneamente, una Tyr en la cadena L (posición 34) y una Lys en la cadena H (posición 54) (47) (48). Se puede concluir por tanto, que al menos los residuos de Lys, Arg, Tyr y Trp, juegan un papel importante en la unión al antígeno, estando localizados muy próximos o dentro

de las regiones hipervariables. Estas regiones a su vez, ocupan posiciones muy proximas en el espacio, como consecuencia del plegamiento de las cadenas. No se puede descartar sin embargo, la participación de otros residuos de los que no existen todavia suficientes estudios de modificación.

1.2.- ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DE LAS INMUNOGLOBULINAS. -

Las actividades biológicas de las Inmunoglobulinas se pueden dividir en dos categorías:

- 1.- La reacción específica con el antígeno
- 2.- Otras

La unión de las Igs con el antígeno, se considera como la principal función de estas y se realiza a través del fragmento Fab de la molécula, estando especificada por la región variable. A esta propiedad se le ha llamado Función Primaria de las inmunoglobulinas.

En la segunda categoría, se incluyen una serie de actividades que dependen de la porción Fc de la molécula y que se conocen como Funciones Secundarias de las inmunoglobulinas.

Por la importancia que van adquiriendo estas funciones en la comprensión del comportamiento de las inmunoglobulinas, consideraremos en detalle algunas de ellas.

1.2.1. - Concentración de Igs en diferentes líquidos orgánicos. -

1.2.1.1. - Suero. -

La concentración en el suero de una determinada clase de inmunoglobulina, depende del número de células plasmáticas que la sintetizan, de la velocidad con que se cataboliza la inmunoglobulina y de la velocidad de intercambio entre los espacios intra y extravascular. Esta última, depende fundamentalmente del coeficiente de difusión de la proteína, de manera que hay una relación inversa entre el coeficiente de difusión de una inmunoglobulina y su concentración en el suero.

La concentración de las Igs en suero, está expresada en la tabla I. La clase que se encuentra en mayor concentración es la IgG1, seguida por IgG2, IgA1, IgM, IgG3, IgA2, IgD e IgE. Las concentraciones varían considerablemente de unos individuos a otros, especialmente entre las clases y subclases más raras como la IgG4 (49).

1.2.1.2. - Secreciones. -

La IgA es la clase predominante en las secreciones del organismo, siendo la relación IgA / IgG 1:5 en el suero y 20:1 en saliva y otras secreciones. Esta relación es probablemente mayor para la IgA₂ (50). Hay dos factores que parecen ser responsables de la elevada concentración de IgA en las secreciones, uno, el que la IgA se combina con una cadena polipeptídica, llamada Componente Secretorio que se forma en las células epiteliales de las glándulas; otro, el que los datos de inmunofluorescencia muestran que la IgA es producida localmente en el tejido linfoide que rodea las glándulas. En este sentido, se podría pensar con la misma lógica para otra inmunoglobulina, la IgE, ya que las células plasmáticas productoras de IgE, se encuentran más frecuentemente en el tejido linfoide que rodea a las glándulas secretorias, que en los ganglios linfáticos y bazo (51). No se ha demostrado hasta ahora, que la IgE se combine con el componente secretorio, pero podría ocurrir que la concentración de IgE en secreciones fuera también mayor que en el suero; no ha sido posible hasta el momento, probar esta hipótesis.

1.2.1.3. - Fluido cerebroespinal. -

Las inmunoglobulinas probablemente entran al fluido

cerebroespinal, por difusión pasiva a través de la barrera sanguínea del cerebro. Algunas, sin embargo, pueden entrar directamente después de la síntesis por células plasmáticas en el tejido nervioso central

La IgG en este fluido, representa el 12% de las proteínas totales (52) y su concentración es de 2.5 - 7.5 $\mu\text{g/ml}$. Las concentraciones de IgA e IgM, son también mucho menores que en el suero, por debajo del nivel de detección (53). No se ha detectado IgD o IgE en este fluido.

1.2.2.- Metabolismo de las inmunoglobulinas.-

Así como la cantidad de una inmunoglobulina sintetizada por día, depende del número de células plasmáticas que la formen, la proporción en que se cataboliza, depende en parte de la estructura de la región constante de la cadena pesada. Los fragmentos Fc de la IgG, se catabolizan relativamente despacio, igual que la IgG intacta, mientras que los Fab y las cadenas ligeras, son eliminadas rápidamente de la circulación y catabolizadas (54). La vida media de las inmunoglobulinas difiere de unas subclases a otras, siendo la IgG, la de más larga

vida media. En la tabla I, se han representado las vidas medias (en dias) de las diferentes clases de Igs; mientras la IgG1, 2 y 4, tienen un catabolismo parecido, la IgG3 se cataboliza más rápidamente (55) (56). La vida media de la IgM es similar a la de la IgA, pero la IgD e IgE, son más rápidamente catabolizadas.

1.2.3.- Paso a través de la placenta. -

Las inmunoglobulinas se pueden transferir de madres a hijos en los periodos pre y postnatal; en el hombre, la transferencia prenatal al feto, parece ser la ruta más importante (57) y solo se transfiere la IgG. Es probable que todas las subclases de IgG, atraviesen la placenta. En este paso, el fragmento Fc parece jugar un papel importante, ya que el Fc aislado es capaz de atravesar la placenta, pero el Fab, no. (58).

Aunque el calostro humano es rico en IgA, esta IgA no es transferida, sino que probablemente cumple una función dentro del conducto gastrointestinal.

1.2.4.- Activación del sistema del Complemento. -

Las inmunoglobulinas pueden activar el complemento tanto por la vía clásica, como por la vía alternativa. Las IgG1,

2 y 3 y la IgM , lo activan por la via clásica, existiendo diferencias en cuanto a la eficiencia en la activación, dependiendo de las subclases, aunque no se conoce la causa de estas diferencias. Los fragmentos Fc de la IgM, fijan el complemento más eficientemente que la IgM entera. Los agregados de IgA, IgD e IgE, no fijan el complemento por la via clásica.

Todas las inmunoglobulinas que activan el complemento por la via clásica, son capaces de convertir el C3PA (C3 pro-activador) en C3A (C3 activador), e iniciar así la via alternativa de activación del complemento. Las IgA1 e IgA2, lo activan también por esta via. La IgD parece activarlo débilmente y la IgE, no lo activa; los fragmentos Fc de estas dos inmunoglobulinas, parecen ser sin embargo, más activos que las moléculas completas (59).

1.2.5.- Unión de las Igs a células. -

Una de las propiedades más importantes de las Igs, es su capacidad de unirse a determinados tipos de células, por medio de ciertas estructuras que existen en la superficie celular que se conocen con el nombre de receptores. De este modo, en

el hombre, se ha demostrado que los monocitos, tienen receptores para la IgG1 e IgG3, pero no para las otras subclases (60). La IgM se une a los monocitos, sólo si el complemento esta presente en el sistema (61). El fragmento Fc de la inmunoglobulina, es el que está directamente implicado en esta unión, siendo por tanto el responsable de las propiedades citofílicas de las Igs. Los fragmentos $F(ab')_2$, no se unen a macrófagos.

Ciertas inmunoglobulinas son capaces de unirse también a basófilos y mastocitos sobre la superficie de la piel; se les conoce como anticuerpos homocitotrópicos y se ha demostrado que pertenecen a la clase IgE(62). Esta inmunoglobulina es por tanto, responsable de las reacciones de anafilaxis cutánea pasiva en la piel de animales de especies homólogas a los donantes. El sitio de la IgE implicado en esta reacción, es el fragmento Fc. Se han descrito también anticuerpos homocitotrópicos de la clase IgG, pero su detección no parece ser muy frecuente (63).

Se ha descrito que todas las subclases de IgG, así como las de IgA, son capaces de unirse a neutrófilos, sin embar-

go la especificidad de esta unión, no está suficientemente aclarada. Asimismo, las plaquetas de diferentes especies de mamíferos, son capaces de reaccionar con complejos Antígeno-Anticuerpo o Antígeno-Anticuerpo-Complemento, liberando parte de su contenido en aminas vasoactivas, tales como la serotonina (64).

Finalmente, las Igs son capaces de unirse a través del fragmento Fc, a receptores específicos que existen sobre la superficie de los linfocitos. Esta propiedad se ha demostrado con sistemas de complejos antígeno-anticuerpo, en ausencia de complemento, así como con inmunoglobulinas agregadas (65) (66). En un estudio reciente, (67), se encontró que la IgG1 e IgG3 no agregadas, eran capaces de unirse a los linfocitos; después de la agregación, las cuatro subclases se unían; no es seguro sin embargo, en este momento, que existan receptores para moléculas aisladas (no agregadas) de inmunoglobulina.

1.2.6.- Factor Reumatoide. -

El factor reumatoide se define como un anticuerpo dirigido frente al fragmento Fc de una clase o subclase particu-

lar de inmunoglobulina. Las inmunoglobulinas se comportan por tanto en esta reacción, como antígenos y como anticuerpos (68). Se ha demostrado actividad de factor reumatoide (como anticuerpo) en las tres clases principales de inmunoglobulinas, aunque parece ser que la IgM, es la que aparece con mas frecuencia y la que se ha estudiado con mas detalle. En la mayoría de los casos, la IgG es el antígeno para el factor reumatoide.

De lo expuesto anteriormente, se puede deducir que el fragmento Fc de la inmunoglobulina, es el responsable de una gran parte de las actividades biológicas de las inmunoglobulinas, siendo su efecto el mismo que el de la molécula entera. No se ha demostrado ninguna actividad en fragmentos de menor tamaño que el Fc, aunque no se sabe si esto es debido a que es necesario un cierto tamaño para constituir un sitio activo, o a que los métodos utilizados para la obtención de estos fragmentos, (digestión enzimática, ruptura con Bromuro de cianógeno), contribuyen a la destrucción de estos sitios en la molécula.

1.3.- INMUNOGLOBULINA D. -

La Inmunoglobulina D fué descubierta en 1964 en el suero de un paciente con mieloma múltiple (69); posteriormente, se encontró que esta proteína era un componente normal del suero, existente en todos los individuos de la especie humana (70). Su concentración en sueros normales es muy baja (0.03 mg/ml) y no se ha demostrado su presencia en ningún otro líquido orgánico como saliva, secreciones intestinales, calostro, etc. (71). Como el resto de las inmunoglobulinas, es sintetizada por las células plasmáticas, desde donde pasa al suero. Su vida media es de 2.8 días (72), mucho menor que la del resto de las inmunoglobulinas. La velocidad con que se cataboliza la IgD, es sin embargo similar a la de la IgA, siendo más lenta en el caso de IgM e IgG. A su vez, la velocidad de catabolismo de la IgD, está influenciada por su concentración en el suero, en el sentido de que niveles elevados en suero, producen una velocidad catabólica más lenta (73). Este tipo de regulación es opuesto al que se observa en el caso de la IgG.

La IgD se encuentra en mucha mayor proporción en el espacio intravascular que en el extravascular (73%) (72), contras-

tando con el caso de la IgG e IgA, en que la proporción es de un 40%. Este comportamiento es similar al de las moléculas de elevado peso molecular, como la IgM y fibrinógeno. Aunque el peso molecular de la IgD es sólo ligeramente mayor que el de la IgG, podría ocurrir que su diferente conformación o alguna otra característica especial de la IgD, impidiera su difusión a través de las paredes vasculares; otra posibilidad, es que pudiera ser retenida selectivamente en el espacio intravascular o devuelta a él rápidamente desde el extravascular, por medio de algún proceso no conocido hasta el momento.

Es característico de esta inmunoglobulina, el presentarse con cadenas ligeras tipo λ con mucha más frecuencia que con κ ; de hecho, en un 80% de los mielomas IgD descritos, la cadena δ está unida a una cadena λ . Este hecho sugiere que la proporción κ/λ en los casos de mieloma IgD, es opuesta a la de otras clases de Igs, en las que predominan las cadenas κ . En sueros normales se ha comprobado, que la proporción de $IgD\lambda$, es cinco veces mayor que la de $IgD\kappa$.

Asimismo, cuando se estudia la proporción de cadenas κ y λ en células plasmáticas productoras de IgD, en bazo normales, (74) (75), se encuentra una gran mayoría de células con cadenas ligeras λ . En los casos de mieloma estudiados, también se encuentra cadena ligera λ en la línea celular que produce la inmunoglobulina, tanto in vivo (76), como in vitro (77). La posible significación de este hecho y su posible relación con una determinada especificidad de la IgD como anticuerpo, está todavía sin resolver.

No se ha demostrado hasta el momento la existencia de diferentes subclases dentro de la IgD, aunque existe evidencia de una heterogeneidad antigénica dentro de esta clase de inmunoglobulina (78). Esta heterogeneidad podría reflejar también la presencia de dos variantes alotípicas.

1.3.1.- Propiedades Físico-químicas de la IgD.-

1.3.1.1.- Aislamiento.-

El método general que se ha venido utilizando para el aislamiento de la IgD de sueros de mieloma, comprende fun-

damentalmente dos etapas: la primera es una cromatografía de cambio iónico en DEAE-celulosa o DEAE- Sephadex y la segunda, una filtración a través de Sephadex G-200. En algunos casos, se han utilizado después inmunoabsorbentes para eliminar las restantes impurezas (79).

El aislamiento de esta inmunoglobulina a partir de sueros normales, ofrece una mayor dificultad, debido a su escasa concentración en ellos. Se ha descrito sin embargo, un método que permite obtener IgD a partir de un suero de disgamaglobulinemia, en el cual la concentración de IgD es muy similar a la de sueros normales, pero tiene la ventaja de que el nivel del resto de las Igs está muy rebajado, con lo cual es más fácil el aislamiento de la IgD (80).

En cualquier caso, el problema principal que presenta el aislamiento de esta inmunoglobulina, consiste en su extrema sensibilidad al ataque por enzimas proteolíticas presentes en el suero, que tienden a romper la IgD en fragmentos, dando lugar a un bajo rendimiento cuando se trata de obtener esta proteína.

Esta dificultad se ha venido subsanando en gran parte, aunque no totalmente, mediante la adición de inhibidores de estas enzimas, tales como el ácido ϵ -Aminocaproico, en el momento de la extracción del suero y a lo largo de todo el proceso de aislamiento.

1.3.1.2.- Parámetros moleculares. -

Las determinaciones del peso molecular de la IgD llevadas a cabo por sedimentación al equilibrio (81) (82) (83) (84) y por filtración en geles (83) (84), dieron como resultado valores comprendidos entre 170.000 y 200.000 daltons. A su vez, los valores obtenidos para la cadena pesada δ , varían entre 60.000 y 71.000 (85). En la tabla V se resumen los datos conocidos hasta el momento.

El coeficiente de sedimentación de esta inmunoglobulina, está comprendido entre 6.15 S (81) y 7 S (84) (83), es decir, es del mismo orden que el de la IgG. La diferencia en peso molecular de ambas proteínas, ha de explicarse por tanto, por una diferente conformación en el caso de la IgD; existen datos a favor de una asimetría en la molécula de IgD, como su ele-

TABLA V. - PESO MOLECULAR DE LA IgD Y SU CADENA PESADA. -

<u>Ref.</u>	<u>Sed. al equil.</u>	<u>Filtración en geles</u> <u>Mol.comp.</u>	<u>Presión osmótica</u>	<u>SDS-PAGE</u> <u>δ</u>
(80)	178.000		183.000	
(81)	183.500			
(82)	200.000			
(83)	176.000			
(84)	172.000	60.000		
(85)		184-200.000		
(90)				70.000

vada viscosidad intrínseca (0.094), su alta relación axial (9.74) y coeficiente de fricción (1.39). El volumen específico parcial de la IgD (0.717), es más pequeño que el de la IgG (0.738), lo cual indica una mayor densidad en su molécula. Ya que el peso molecular de la IgD, cuando se asume el modelo de elipsoide elongado, es menor que el obtenido por otros métodos, se puede suponer que esta proteína está considerablemente hidratada así como elongada. Esto explicaría su peculiar comportamiento en Sephadex G-200, en el que la IgD eluye de la columna en segunda posición, a continuación de la IgM y delante de la IgE, a pesar de que su peso molecular es menor; en este sentido se ha sugerido una mayor compacidad en la molécula de IgE, que la haría más resistente al ataque por enzimas (87), siendo la IgD sin embargo, una de las Igs más sensibles al ataque enzimático; esta susceptibilidad podría considerarse como una evidencia adicional de una estructura elongada y flexible para la IgD. En la tabla VI se resumen los principales parámetros físicos determinados para esta inmunoglobulina.

TABLA VI. - PARAMETROS FISICOS EN LA IgD. -

Velocidad de sedimentación:

$$S_{20} = 6.92 - 0.71c \quad , \quad \sigma_s = 0.07 \quad , \quad \sigma_1 = 0.06 \quad , \quad r = 0.971$$

10 concentraciones (0.20 - 1.11 g/100ml)

Presión osmótica:

$$\Pi/c = 0.14 \quad , \quad \text{Peso Mol : 180.000}$$

$$\Pi/c = 0.135 \quad , \quad \text{Peso Mol: 186.000}$$

6 concentraciones cada una de 2 - 10 gr/l.

Viscosidad y Volumen específico parcial:

$$1/\eta = 1 - 0.094 c \quad \sigma_s = 0.002 \quad , \quad r = 0.996 \quad . \quad V = 0.717$$

Peso Molecular:

$$PM = 128.500 \quad , \quad 175.700 \quad , \quad 178.800.$$

$\sigma_s \rightarrow$ pendiente de la recta obtenida de la representación de s_{20} frente a concentración de proteína.

$r \rightarrow$ coeficiente de correlación

$\Pi \rightarrow$ Presión osmótica

$c \rightarrow$ Concentración de proteína en g/l

1.3.1.3. - Efecto de agentes físicos sobre la IgD. -

Cuando se estudia el efecto del calor sobre la IgD (88), se observa que a 56° , hay una rápida y casi total agregación de la proteína; la molécula calentada, tiene una reactividad diferente con el suero anti-cadenas ligeras, que la nativa; este comportamiento es distinto al de las otras clases de inmunoglobulinas y parece sugerir una diferencia en la naturaleza de las fuerzas estabilizantes implicadas en la disposición intramolecular de la IgD. Asimismo, se ha observado una rápida fragmentación de la IgD, cuando se efectúan repetidos congelamientos y descongelamientos del suero. (89).

1.3.2. - Estructura química de la inmunoglobulina D. -

Como el resto de las inmunoglobulinas, la IgD se compone de dos cadenas pesadas llamadas δ y dos cadenas ligeras, que pueden ser λ o κ . Ya se ha mencionado en otro apartado, la gran proporción de moléculas IgD que tienen λ como cadena ligera (80%). No se conoce todavía el posible significado de este hecho.

La composición de aminoácidos de la molécula completa de IgD y de la cadena pesada δ , ha sido estudiada por

TABLA VII. - CONTENIDO EN CARBOHIDRATO DE LA IgD Y SUS FRAGMENTOS. -

IgD	Hexosas 47 (35.4)	Glucosam. 23 (18)	Galactosam. 13 (11.1)	A. Siálico 15 (19)	Fucosa 0.5 (0.95)
Cadena δ	18	8.1	4.8	8.0	0.40
Cadena λ	0	0	0	0	0
Fab (Pap + Red)	0	0	0	0	N.D.
Fc (Pap- Red)	51	+	+	+	N.D.
Fc (Pap + Red)	32	+	-	+	N.D.
Fab (Tryp)	15	-	+	+	N.D.
Fc (Tryp)	28	+	-	+	N.D.

+ \rightarrow Reacción positiva

- \rightarrow Reacción negativa

N.D. -- No determinado

Los valores expresan moles de azúcar / mol de proteína, asumiendo un PM de 166.000 para la IgD y 55.000 para los Fab y Fc. Los paréntesis indican determinaciones diferentes.

varios autores (82) (84) en diferentes paraproteínas. En esta tesis, se hizo también el análisis de la composición de aminoácidos de la IgD (proteína Men), y en la Discusión de esta tesis, se comparan los resultados obtenidos con los conocidos previamente.

Una de las características de esta proteína, es su alto contenido en carbohidrato (10-14%); la fracción carbohidrato se compone de hexosas, glucosamina, galactosamina, ác. siálico y fucosa. En la tabla VII se puede ver la relación del contenido en carbohidrato de la IgD completa y de los fragmentos enzimáticos obtenidos por papaina, en presencia y ausencia de agente reductor, y con tripsina. Como se observa, existen por lo menos dos sitios diferentes en la molécula a los que se une el carbohidrato, uno en el Fab(t) y otro en el Fc(t) (84) (90). Parece ser que todos los residuos de manosa y glucosamina, se encuentran en el fragmento Fc, mientras que sólo 3 de las 15 galactosas y ninguna galactosamina, se encuentran en este fragmento.

El tratamiento enzimático de la IgD con papaina o tripsina, conduce a la formación de los fragmentos Fab y Fc, como sucede con el resto de la inmunoglobulinas. El sitio de ataque de estas dos enzimas, parece ser diferente; en contraste con lo que ocurre en la IgG, la IgD se rompe de diferente manera con ambas enzimas, como lo prueba la presencia o ausencia de carbohidrato en los respectivos fragmentos Fab que se obtienen. La comparación de los mapas peptídicos de los fragmentos Fd obtenidos por digestión trípica y de los fragmentos Fc, producidos por digestión con papaina, sugiere que los sitios de ataque de una y otra enzima, están separados al menos por 15 residuos de aminoácidos.

A diferencia del fragmento Fab que parece ser susceptible de posterior degradación, el Fc obtenido por digestión con tripsina, es un producto estable y homogéneo (90). El posterior tratamiento del fragmento Fab con tripsina (91), conduce a la formación de un subfragmento que tiene un peso molecular de 26.000 daltons y que una vez reducido, se convierte en 13.000, indicando la presencia de dos cadenas polipeptídicas unidas por

un puente disulfuro. Este subfragmento, no comparte ningun determinante antigénico del Fc y esta compuesto probablemente por la region variable de la cadena pesada δ y la constante de la cadena ligera λ .

Es un hecho característico de la IgD, el ser extremadamente sensible a la digestión por enzimas del suero, tales como la plasmina, dando lugar a la aparición de fragmentos parecidos a los Fab y Fc. A este hecho se le conoce como "degradación espontánea" de la IgD y hace necesario el uso de inhibidores de plasmina (ac. ϵ -aminocaproico), en los estudios tanto estructurales como biológicos de esta inmunoglobulina.

Los intentos de obtener fragmentos de IgD, utilizando algún agente químico, como el bromuro de cianógeno, no han tenido éxito, siendo el conocimiento de la estructura de la IgD, muy limitado hasta el momento.

1.3.3. - Actividades biológicas de la IgD. -

No se ha definido todavía cual es la verdadera función biológica de la IgD; la mayoría de los intentos de demostrar una

actividad de anticuerpo en esta clase de inmunoglobulina, no han tenido éxito, aunque ha sido posible detectar esta actividad frente al determinante antigénico bencilpeniciloil en sueros de pacientes alérgicos a la penicilina (92). Asimismo, la IgD se encuentra presente en eritrocitos de pacientes con anemias hemolíticas causadas por penicilina G (93).

Por radioinmunodifusión, se han demostrado anticuerpos de la clase IgD dirigidos contra diferentes antígenos, tales como gammaglobulina y albumina bovinas, componentes de la leche bovina y contra el toxoide del tétanos y de la difteria (94) (95), en individuos clínicamente sensibles a la leche de vaca o que habían sido inmunizados recientemente con toxoide de tétanos o de difteria. Asimismo, parece haberse encontrado una actividad de anticuerpo en la IgD dirigida contra insulina bovina, en una serie de sujetos diabéticos (96) (97).

Una de las actividades más reconocidas dentro de la clase IgD, es su comportamiento como anticuerpo antinuclear. Por inmunofluorescencia se ha demostrado la presencia de estos anticuerpos de clase IgD, en células de pacientes con de-

sórdenes reumáticos (98) y con enfermedades de tipo lupus erythematosus (99) o nefritis (100).

Los intentos de demostrar en la IgD una capacidad fijadora del complemento por la vía clásica, han dado resultados negativos. Tanto la proteína en estado nativo, como agregada por benzidina bis-diazotizada (BDB), son incapaces de activar el complemento (101) (102). Parece ser sin embargo, que tanto la molécula de IgD completa, como el fragmento Fc, ambos agregados, son capaces de activar la vía alternativa del complemento (103), siendo la activación por el Fc agregado, mucho mayor que la producida por fragmentos pépticos de la proteína, o por la propia proteína completa agregada.

De la misma manera, no parece haberse encontrado una capacidad de sensibilizar la piel dentro de la clase IgD (102) (104) (105), como sucede en el caso de IgE e IgG, ni de producir reacciones de anafilaxia cutánea invertida (RPCA).

Hasta el momento presente, todos los datos parecen apuntar a que la verdadera función biológica de la IgD, reside en ser uno de los componentes de la membrana de los lin-

focitos, actuando probablemente como primer receptor del antígeno (106).

En individuos normales, se ha podido demostrar la presencia de IgD en la superficie de los linfocitos : en recién nacidos, esta proteína es el principal componente de la membrana, encontrándose un 25% de células positivas, frente a un 3-4% en adultos (107). En relación con otras clases de Igs en los linfocitos periféricos de recién nacidos, se encuentra un 8.5% de células con IgM, un 2.9% con IgG y un 0.8% con IgA. La IgD es por tanto la inmunoglobulina que más frecuentemente se detecta. Este hecho contrasta con la incapacidad de detectar en muchos casos, IgD en el suero de recién nacidos (108) (109) y con la baja frecuencia (4.5%), con que se detecta IgD en el suero de cordón umbilical (110) (111). El origen y significado de esta IgD en el suero de cordón, no están claros, aunque todos los datos parecen apoyar una síntesis por el propio feto, excluyendo la posibilidad de paso a través de la placenta o de contaminación por suero materno.

En linfocitos de sangre periférica de individuos adultos normales, la IgD se encuentra presente en la membrana de aproximadamente un 18% del total de linfocitos con Igs en su superficie (112). Es un hecho interesante el que la IgD se encuentra normalmente asociada a la IgM sobre la membrana de los linfocitos, siendo el porcentaje de células que contienen ambas inmunoglobulinas, de un 80% (106). Este porcentaje es igualmente elevado en recién nacidos. Por medio de técnicas de inmunofluorescencia con dobles tinciones, se ha podido demostrar que ambas proteínas se mueven independientemente sobre la membrana del linfocito (113) y que ambas comparten el mismo tipo de cadena ligera κ o λ , no encontrándose en ningún caso, ambas cadenas en la misma célula.

Respecto al origen de esta IgD sobre la superficie de los linfocitos, todos los datos parecen indicar que es sintetizada por la propia célula y no absorbida pasivamente en virtud de alguna propiedad citofílica. Esta síntesis parece estar demostrada por el hecho de que células desprovistas de IgD por exposición al antisuero correspondiente, muestran reaparición de la misma en su membrana, después de incubarlas en un medio carente de

IgD. Otro hecho que apoya esta hipótesis, es que sólo se observa un tipo de cadena ligera en cada célula y si la IgD fuese absorbida pasivamente, no estaría restringida a un solo tipo de cadena L, que además es la misma que la de la IgM presente en la misma célula.

La presencia de IgD e IgM simultáneamente sobre la misma célula, contrasta con otras clases de Igs, en que sólo aparece una determinada clase por célula. Las implicaciones de esta doble presencia son varias; en primer lugar, los sitios de combinación de los receptores IgD e IgM tienen que ser iguales, ya que de otra manera se requeriría que la misma célula expresara dos genes diferentes para la región variable V_H y que se unieran a dos genes diferentes de región constante. Esta posibilidad es muy poco probable. El hecho de compartir el mismo tipo de cadena ligera, apoya también esta teoría. De hecho, se ha comprobado que la IgM e IgD presentes sobre la misma célula en linfocitos de pacientes con leucemia crónica, tienen la misma especificidad idiotípica (114) (115), demostrada por el hecho de que ambas proteínas reaccionan con un antisuero anti-idiotipo, preparado específicamente frente al fragmento Fab de una de ellas.

En segundo lugar, se puede pensar que bien la IgD o la IgM, son el primer receptor del antígeno, dando lugar después a una diferenciación y a la aparición de las otras clases de Igs. No es seguro todavía si la transición es $\delta \rightarrow \mu \rightarrow \gamma$, o $\mu \rightarrow \mu\delta \rightarrow \gamma$. Cualquiera que sea la verdadera explicación, la presencia de dos receptores sobre la misma célula, es un hecho muy destacable y desde el punto de vista genético, de fundamental importancia para la respuesta inmune.

Es de gran interés también el hecho de que la IgD es, junto con la IgM, la clase predominante en la superficie de linfocitos patológicos. Se ha demostrado su presencia en linfocitos de pacientes con leucemia linfoide crónica (116), encontrándose en la mayoría de los casos, IgM sobre la misma célula e incluso cadenas ligeras libres (117). Se ha detectado IgD también, en linfocitos de leucemia linfoblástica aguda (118).

En otra serie de estudios con ganglios linfáticos cancerosos, se encuentra en un alto porcentaje, células plasmáticas productoras de IgD, así como del resto de las Igs. En estos casos, la IgD se encuentra asociada a la IgA en la su-

perficie de las células cancerosas (119). Se ha detectado también esta inmunoglobulina, en células de granulomas sarcoides (120), linfosarcomas (121) (122) y en injertos tolerados. En casos de inmunodeficiencias primarias, la IgD se ha detectado asociada casi siempre a IgM, en linfocitos de sangre periférica (123).

En cuanto a la forma en que tanto la IgM como la IgD, se encuentran sobre la membrana de los linfocitos, hay datos que parecen indicar que el Fc está situado hacia el interior de la membrana incluso parcialmente "enterrado", como lo demuestra la incapacidad de reaccionar ciertos linfocitos, con antisueros dirigidos contra el Fc de estas inmunoglobulinas (124). No existen datos hasta el momento, que impliquen una diferencia estructural entre la IgD asociada a la membrana y la IgD que se encuentra en el suero.

Existen algunos casos, en que el nivel de IgD en el suero está elevado. Aunque todavía no se conoce la causa ni las posibles implicaciones de este hecho, puede ser interesante en cuanto que ayudaría a comprender la posible función de esta inmunoglobulina. Algunos de estos casos se describen a con-

tinuación.

En primer lugar, la IgD se encuentra altamente elevada en el suero de mujeres embarazadas (125), sin conocerse hasta el momento una posible explicación. Se podría pensar que la IgD actuara como anticuerpo frente a algún antígeno de origen fetal, aunque no existe ninguna prueba de esto; otra posibilidad sería que el metabolismo de la IgD se altera con el embarazo. Este hecho contrasta con el bajo nivel en que la IgD se encuentra en el suero fetal o en el de recién nacidos (126). Cuando se estudian los niveles de IgD en suero de niños normales en edades comprendidas entre los 10 meses y los 15 años (127) (128), se observa que existe una correlación con la edad, en el sentido de un aumento progresivo de esta inmunoglobulina con la edad, alcanzando el mismo nivel que en adultos, a los 15 años. Parece existir también una correlación con el sexo, tanto en niños como en adultos, siendo el nivel más elevado en mujeres que en varones (129).

En otra serie de estudios encaminados a observar la posible correlación entre la concentración de IgD en suero y los

diferentes alotipos, se midieron los niveles de IgD en suero de individuos caucasianos normales de los grupos Gm(a), Gm(g) o Gm(f) Gm(b). Los resultados indican que personas homocigóticas para el grupo Gm(f) Gm(b), tienen niveles de IgD significativamente más bajos que las homocigóticas para el otro grupo. Aunque no se conocen hasta el momento marcadores genéticos en la IgD, la correlación observada con los alotipos de la clase IgG, parece indicar una estrecha relación entre los genes de la región constante de las cadenas pesadas δ y γ . (130).

Entre los estados patológicos en que la IgD se encuentra elevada en el suero, se ha estudiado la artritis reumatoide juvenil, en la que se observa un gran aumento de esta inmunoglobulina que no está relacionado con la edad, ni con ninguno de los parámetros clínicos estudiados, aunque si se observa correlación entre los niveles de IgD e IgA (131). Este hecho es contrario a lo que sucede en la artritis reumatoide en adultos (132) así como en el lupus, en los que los niveles de IgD son similares a los normales (133).

Cuando se estudian casos de enfermedades atópicas, se encuentra que en niños, el nivel de IgD es relativamente bajo, muy parecido al normal (134), mientras que en adultos parece estar

elevado hasta unos 5.5 mg/100ml (135). La IgD sin embargo, parece no estar implicada en la respuesta inmune de personas atópicas. Existen estudios que indican que la IgD no participa en reacciones de hipersensibilidad tipo anafilaxia (136), por tanto nada se puede decir todavía sobre la relación entre esta enfermedad y los niveles de IgD.

La IgD está particularmente elevada en el suero de enfermos con inmunodeficiencias, al igual que la IgE (137), lo cual está de acuerdo con el elevado nivel de esta inmunoglobulina en casos de infecciones crónicas (71), así como en tuberculosis (138) y lepra (139).

No hemos considerado hasta ahora, los aumentos monoclonales de IgD que constituyen los casos de mieloma. Se ha descrito un considerable número de casos de mieloma IgD (140) (141) (142). En todos ellos, la característica esencial es el alto porcentaje de cadenas ligeras λ y el estar casi siempre asociados con la presencia de proteínas de Bence-Jones. La concentración en que la proteína monoclonal aparece en el suero, varía entre 1 y 30 mg/ml, estando la concentración del resto de las Igs disminuida en un 50% respecto a los valores normales. Parece ser

que la manifestación del mieloma IgD, es más frecuente en hombres que en mujeres, y que la edad media de los pacientes es 59 años.

1.3.4.- Presencia de IgD en otras especies.-

Los intentos de encontrar una inmunoglobulina equiparable a la IgD en diferentes especies animales, no han llegado todavía a ninguna conclusión definitiva. En linfocitos de bazo de ratón, se ha caracterizado una macromolécula, cuyo peso molecular es intermedio entre la IgM y la IgG (143) (144). El hecho de que el comportamiento de esta nueva cadena pesada en geles de SDS-poliacrilamida, es similar al de la cadena δ , ha llevado a suponer que esta proteína puede estar relacionada con la IgD humana. Otras características, como el alto contenido en carbohidrato, facilidad a la degradación posterior a la lisis celular, el no ser segregada por esplenocitos de ratón en cantidad detectable y el no reaccionar con ninguno de los antisueros específicos anti- κ , anti- μ , anti- γ y anti- α (145), la hacen un buen candidato a ser una molécula similar a la IgD humana.

Es interesante apuntar que esta nueva proteína no aparece en los linfocitos de hígado fetal, ni en bazo e hígado de recién

nacido; sin embargo, los linfocitos de bazo de ratones de entre 6 semanas y 6 meses de edad, contienen cantidades similares de δ siendo la proporción $\mu:\delta$ de 3:2. En un estudio paralelo, (146) se encontró que mientras que la IgM se detecta en ratones de 4 días de edad, la "IgD" aparece en los esplenocitos en ratones de 9-15 días de edad, aumentando hasta los tres meses. Entre los tres meses y los 2 años, la "IgD" constituye el 50-60% del material radioactivo de la superficie del linfocito.

Estos estudios parecen sugerir un cambio de células productoras de IgM a IgD, que tendría lugar durante el proceso de diferenciación de los linfocitos B en el bazo. Esta suposición es contraria a lo que parece suceder en humanos y que se ha comentado anteriormente.

En otras especies diferentes al ratón, como primates, se ha descrito una macromolécula que reacciona cruzadamente con un antisuero anti-IgD humana (147). Estudios fisico-químicos han demostrado que esta macromolécula tiene un peso molecular similar al de la IgD y que posee características antigénicas de la cadena δ . Esta proteína, al igual que la de ratón, podría ser por tanto comparable a la IgD, pero no existen datos hasta el momento que lo demuestren.

Resumiendo lo expuesto anteriormente, se puede decir que la Inmunoglobulina D sigue siendo hasta el momento, la menos conocida de las Igs humanas. Los datos referentes a su estructura química son muy limitados, en particular aquellos relativos a la estructura primaria de esta proteína. Los pocos estudios llevados a cabo, apuntan hacia una particular conformación o a alguna característica especial en esta inmunoglobulina, que la hacen distinta del resto.

Recientes estudios han demostrado que la IgD se encuentra presente en la superficie de los linfocitos humanos, donde probablemente está cumpliendo una función fundamental, que no ha sido posible describir todavía, pero que hace el estudio de esta inmunoglobulina, mucho más importante.

Es un problema fundamental por tanto, el abordar el estudio, sobre todo estructural, de esta proteína, con el fin de aportar nuevos datos que permitan aclarar o explicar en parte, el peculiar comportamiento de la IgD y quizá, su verdadera función biológica. En este punto se sitúa el planteamiento de esta Tesis.

2.-OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

Como se ha expuesto en la Introducción, el conocimiento de la estructura primaria de la IgD, es hasta el momento muy limitado. El problema principal que ha retrasado el estudio de esta inmunoglobulina con respecto al resto, es la tremenda facilidad con que la IgD se rompe debido a la acción de ciertas enzimas existentes en el suero, fundamentalmente la plasmina. A este fenómeno, se le conoce como "degradación espontánea" de la IgD.

El punto exacto de ataque por la plasmina y la naturaleza de los fragmentos que resultan de la degradación, no están tampoco suficientemente estudiados, aunque datos obtenidos muy recientemente, parecen indicar que los sitios de ataque de plasmina y tripsina están muy próximos en la secuencia, lo cual indicaría que los fragmentos que resultan de la degradación espontánea de la IgD, son también parecidos a los Fab y Fc que se obtienen con enzimas como papaína y tripsina.

Es por tanto interesante definir hasta que punto el fragmento obtenido por degradación espontánea y el fragmento obtenido por digestión con tripsina (Fc(t)), están relacionados. Una de las

maneras de llevar a cabo esta comparación, es tratar de obtener los péptidos que contienen los residuos de cisteína en ámbos fragmentos y ver si algunos son comunes. Si esta extremada sensibilidad al ataque por enzimas séricas, es consecuencia de una diferente estructura (ya sea primaria o terciaria) en la IgD, es algo todavía no conocido.

Uno de los puntos más interesantes en la estructura de las inmunoglobulinas, es el conocimiento del número de enlaces disulfuro tanto inter como intra catenarios, así como de la naturaleza de los péptidos que contienen los residuos de cisteína implicados en estos enlaces.

Como se ha expuesto anteriormente, la disposición de los residuos de cisteína a lo largo de las cadenas polipeptídicas de las Igs, es una constante común a todas las clases y subclases hasta ahora conocidas. El hecho de que estas cisteínas estén siempre implicadas en la formación de enlaces disulfuro, confiere a las inmunoglobulinas una conformación característica que es precisamente la necesaria para el desarrollo de su función biológica.

Debido a su papel fundamental en la estructura, es de esperar por tanto, que el entorno de aminoácidos en que se encuentran situados los residuos de cisteína, sean bastante conservativos a lo largo de la evolución y de la diferenciación en clases y subclases.

Hasta el momento presente, se conocen los péptidos que contienen las cisteínas de la mayoría de las Igs; los estudios de secuencia han permitido establecer comparaciones, así como establecer relaciones con inmunoglobulinas no humanas.

Nada se sabe sin embargo de la naturaleza y disposición de estos péptidos en la IgD. Los únicos estudios que se han llevado a cabo se refieren a los enlaces intercatenarios, habiéndose definido la naturaleza y secuencia de los enlaces H-H y H-L, hecho que también se confirma en esta tesis. El hecho de que la IgD tenga un peso molecular mayor que el de la IgG, ha llevado a pensar que podría contener un dominio "extra" como sucede en el caso de la IgE e IgM. No existe sin embargo ninguna evidencia experimental que pruebe esto y este es otro de los motivos por los que

el estudio de los péptidos con cisteína en la IgD, es interesante.

El escaso conocimiento de la estructura de la IgD, hace por tanto imposible establecer ningún tipo de comparación entre esta proteína y el resto de las inmunoglobulinas. No existe ningún estudio de homología entre la IgD y las otras clases de Igs que permita elaborar alguna posible teoría referente a la evolución de esta inmunoglobulina. El conocimiento de estos datos es sobre todo importante, debido al hecho encontrado recientemente de que la IgD se encuentra en la superficie de los linfocitos tanto normales como patológicos, como principal componente en muchos casos, lo que ha llevado a pensar en una posible función biológica como receptor de membrana, que no ha sido posible demostrar satisfactoriamente todavía. Si esto fuera cierto, se podría pensar que la IgD es la primera inmunoglobulina que sintetiza la célula como respuesta a la estimulación antigénica o en todo caso, una de las primeras (existe controversia entre la IgM y la IgD a éste respecto), y después existiría una diferenciación dando lugar a la síntesis del resto de las inmunoglobulinas.

Es por tanto un problema fundamental en este momento, el poseer un estudio comparativo de la estructura de esta proteína fundamentalmente de su cadena pesada δ y del resto de las Igs (o sus respectivas cadenas pesadas), con el fin de poder explicar una función biológica específica de la IgD, encontrada ya en otras inmunoglobulinas.

Tampoco se conoce ningún dato referente a la porción variable de esta inmunoglobulina, por lo que no se ha podido clasificar en ninguno de los subgrupos de región variable existentes para las cadenas pesadas.

A la vista de estos datos, parecen importantes los siguientes puntos:

- 1.- Aportar nuevos datos al conocimiento de la estructura primaria de la IgD, así como confirmar los ya existentes.
- 2.- Obtener y caracterizar los péptidos que contienen los residuos de cisteína en la IgD en las cadenas pesada y ligera. Esto permitiría determinar el número exacto de enlaces disulfuro intracatenarios todavía desconocido y determinar la existencia o ausencia de ese

posible dominio "extra" encontrado en otras inmunoglobulinas.

3.- Definir mas concretamente el fenómeno de degradación espontánea de la IgD, así como tratar de caracterizar los fragmentos que se obtienen de esta degradación y compararlos con los que se obtienen normalmente por digestión enzimática de Igs.

4.- Establecer si es posible una homología entre la IgD y el resto de las Igs que ayude a comprender su posible función biológica y la posible relación evolutiva.

PLAN DE TRABAJO. -

En primer lugar se procedió al aislamiento y caracterización de la IgD del suero y al estudio de algunos parámetros moleculares de la proteína. Esto implicó determinaciones de peso molecular, análisis de aminoácidos y amino terminal, así como "chemical typing", mapas diagonales de la molécula intacta y reducida y "fingerprintings".

En segundo lugar se procedió a la obtención de los péptidos que contenían los residuos de cisteína. Esto se hizo por me-

dio de dos aproximaciones diferentes:

1.- Por medio de la separación de las cadenas pesada y ligera y digestión enzimática de ambas, procediéndose después a la siguiente purificación de los péptidos.

2.- Por medio de la obtención del fragmento Fc de la IgD y posterior degradación enzimática y aislamiento de los péptidos radioactivos.

De esta manera, se pudieron establecer qué péptidos estaban situados en la región constante y cuáles en la variable.

En tercer lugar y aprovechando el fragmento obtenido por degradación espontánea de la IgD, se procedió a la caracterización de los péptidos que contenían cisteína en este fragmento, con el fin de poder establecer en qué parte de la molécula estaba situado.

El trabajo experimental del apartado 1, incluye la reducción de la IgD con el fin de obtener las cadenas pesada y ligera. Las dos se digirieron enzimáticamente, procediéndose a desarrollar un método de aislamiento de los péptidos con cisteína y al siguiente análisis de éstos.

En el apartado 2, se procedió a la digestión enzimática de la IgD y a la caracterización de todos los fragmentos obtenidos en ella, con el fin de localizar el fragmento Fc.

A continuación, se procedió a la digestión enzimática del fragmento Fc y al desarrollo de un método, como en el caso anterior, de aislamiento y purificación de los péptidos que contienen los residuos de cisteína.

Para el estudio del fragmento obtenido por degradación espontánea, se llevó a cabo una digestión enzimática de este fragmento, así como de la cadena ligera λ que aparecía junto con él, y se procedió al aislamiento y caracterización de los péptidos que contienen cisteína en ambos.

3.- MATERIALES Y METODOS

3.1.- INMUNOGLOBULINA D HUMANA.-

La proteína utilizada en este estudio (Men), fue aislada a partir de un suero de mieloma IgD, por medio de una electroforesis preparativa en bloques de almidón o Pevicón, de 18"x13"x1/2", en tampón Barbital 0.05 M, pH 8.6, seguida por una filtración a través de una columna de Sephadex G-200.

El suero de partida (20-25 ml cada vez), se aplicó en un canal cortado en el almidón a 7" del extremo izquierdo (polo negativo) en proporción de 1" de longitud por 1.5 ml de muestra. La electroforesis se llevó a cabo a 4°C, con un voltaje de 400-450 v (60-100 mA) durante 24 hr. Terminada ésta, se cortaron cuadrados de 0.5"x0.5" en el centro y a todo lo largo del bloque y una vez colocados en tubos, se añadieron 2 ml de NaCl 0.15 M, con el fin de extraer las proteínas, y se centrifugó.

A 0.1 ml de sobrenadante de cada uno de los tubos, se añadieron 2 ml de una solución que contenía : 1 ml de Tartrato Sódico al 2%, 1 ml de SO_4Cu al 1% y 98 ml de Na_2CO_3

al 2% en NaOH 0.1 M, y a continuación, se añadieron 0.2 ml del reactivo de fenol diluído 1:1. (Método de Folin- Ciocalteau para determinación de proteínas). Después de agitar, los tubos se dejaron durante 30 min. a temperatura ambiente y se leyeron en un espectrofotómetro Coleman (modelo 6 A) a 700 nm, utilizando como blanco la solución de NaCl 0.15 M.

Los valores obtenidos, se representaron en una gráfica frente al número de tubo y se hicieron diferentes fracciones. Una vez extraída la proteína con NaCl 0.15 M, las diferentes fracciones se dializaron frente a H₂O destilada durante 48 hr. y se liofilizaron.

Tanto el suero como todos los tampones utilizados en este proceso, contenían ac.ε -Aminocaproico 0.01 M para evitar la fragmentación espontánea de la IgD; igualmente se añadió al H₂O de la diálisis.

3.2.- PREPARACION DEL ANTISUERO. -

El antisuero anti- IgD utilizado en este estudio, fue preparado inyectando en conejos una preparación purificada de

proteína Men. Las tres primeras inyecciones se realizaron intramuscularmente y a partir de la cuarta, por vía intravenosa, inyectando de 50 a 100 μ g de proteína cada vez, en intervalos de 15 a 20 días y sangrando después de cada tres inyecciones.

El antisuero así obtenido, se hizo específico para la IgD, absorbiéndolo con suero humano normal, que contiene una cantidad muy pequeña de IgD. Este antisuero no reaccionaba por tanto con la cadena ligera λ .

3.3.- INMUNOELECTROFORESIS E INMUNODIFUSION.-

La inmunoelectroforesis se llevó a cabo en placas de gel de agar (75 x 25 mm), preparadas de la siguiente forma: 3.5 ml de una solución de agar al 1% en tampón barbital (5,5-dietilbarbiturato sódico / HCl 3 N) de fuerza iónica 0.03 y pH 8.6, se vertieron sobre los moldes y se dejaron solidificar por aproximadamente 15 min. Los orificios se hicieron a 4.5 cm del polo negativo y una vez aplicada la muestra, la electroforesis se llevó a cabo en el mismo tampón barbital, con una in-

tensidad de 4 mA por placa (100 v) durante 3 hr. El aparato utilizado fue un modelo para electroforesis en papel (Durrum type) (Beckman). Terminada la electroforesis, se aplicó al canal central el antisuero correspondiente y las placas se dejaron durante 24 hr. en una cámara húmeda antes de proceder a su lectura.

La Inmunodifusión se llevó a cabo de la siguiente manera: El gel de agar (1%) disuelto en NaCl 0.15 M, se vertió sobre placas Petri de 9 cm de diámetro, a razón de 15 ml por placa y se dejó solidificar por espacio de 1 o 2 hr. A continuación, se practicaron orificios por medio de un molde especial, del diámetro deseado y a distancias variables dependiendo de las muestras. Una vez aplicados el antígeno y el antisuero correspondientes, las placas se dejaron a 37°C durante 16-20 hr y se leyeron.

3.4. - FILTRACION POR GELES. -

La filtración a través de Sephadex G-200 se llevó a cabo en una columna K 26/100 (Pharmacia Fine Chem) de di-

mensiones 2.6 x 100 cm, equipada con un adaptador de flujo tipo A-25. La cromatografía se llevó a cabo por flujo invertido, a una velocidad constante de 10 ml/hr. mantenida por medio de una bomba.

Para la preparación del gel, 17 gr de Sephadex G-200, se dejaron hinchar en 0.3 M NaCl / EACA 0.01 M / 0.02 % Azida Sódica, durante tres días. A continuación, el gel se vertió en la columna, eluyéndose durante 10 hr. con la misma solución salina.

La muestra se introdujo en esta columna en volúmenes no mayores de 5 ml. Antes de aplicarla, se añadió siempre una alícuota de ϵ -DNP-Lys, cuyo color amarillo se utilizó como marcador visual para reconocer el final de la columna. Las fracciones, de 3 ml cada una, se recogieron en un colector LKB (7000 Ultrorac) y se leyeron a 280 nm en un espectrofotómetro (Gilford 250).

La filtración a través de Sephadex G-100, se llevó a cabo, para fines preparativos, en una columna Pyrex 40/50

SGA de 4 x 150 cm. de dimensiones. 120 gr de Sephadex G-100 se dejaron hinchar durante 2 días a T^a ambiente, en una solución de ac. Acético 1 N, vertiéndose después en la columna, una vez deaireado, y lavándose con la misma solución ácida.

La muestra se introdujo en volúmenes de 5-10 ml añadiéndole previamente ϵ - DNP-Lys, como en el caso anterior. Las fracciones de 6 ml, se leyeron igualmente a 280 nm. El flujo de esta columna fue de 30 ml / hr.

Para fines analíticos, se utilizó una columna Pharmacia K 15/90, de 1.5 x 90 cm. 10 gr de Sephadex G- 100 se dejaron hinchar en ac. Fórmico al 5%, rellenaándose después la columna como en el caso anterior. El volumen de muestra que se aplicó en este caso, fue de 0.5 a 1 ml.

3.5. - REDUCCION Y ALQUILACION DE LA IgD. -

3.5.1. - Preparación de Ac. ¹⁴C-Iodoacético. -

En primer lugar, se preparó una solución de ac. iodoacético que contenía 22 mg/ml (120 mM), en tampón Tris/HCl

0.27 M, pH 8.2. Esta solución se añadió a los viales de ac. iodoacético radioactivo (250 mCi) a razón de 3 ml / vial ; una vez disuelto, el ac. ^{14}C -Iodoacético (^{14}C -IAA), se guardó en el congelador hasta posterior uso.

3.5.2.- Reducción parcial y alquilación de la IgD. -

A una disolución de proteína (20 mg/ml) en tampón Tris/HCl 0.27 M pH 8.2, se añadió Ditioneitol 0.01 M y después de burbujear N_2 , la solución se dejó a temperatura ambiente durante 1 hr. A continuación se añadió ac. Iodoacético o ^{14}C -IAA 0.02 M y se dejó otra hora a T^a ambiente. Transcurrida ésta, la solución se dializó frente a H_2O destilada durante 24 hr. a 4° y se liofilizó.

3.5.3.- Reducción total y alquilación de la IgD. -

La única variante con respecto al método anterior es que la proteína se disolvió en un tampón de Guanidina/Tris que contenía 100 gr de Guanidina HCl, 1.3 gr de Tris y 2 ml de EDTA 0.1 M por 100 ml de H_2O . El pH final era 8.0 y la concentración de proteína utilizada, 20 mg/ml. Una vez

completada la reducción y alquilación, la solución se dializó frente a H₂O destilada durante 2-3 días, con el fin de eliminar toda la guanidina, o bien se pasó a través de una columna de Sephadex G-25 en Ac.Acético 0.1 N, para el mismo fin.

3.6.- CROMATOGRAFIA EN DEAE-SEPHADEX.-

20 gr de DEAE-Sephadex (Pharmacia Fine Chem.) se lavaron repetidamente con volúmenes de 300 ml de un tampón Tris/HCl 0.05 M pH 8.0, aspirando el sobrenadante cada vez después de haber dejado sedimentar la suspensión por aproximadamente 3 hr. Una vez comprobado que el pH del DEAE-Sephadex, era el deseado, la suspensión se introdujo en una columna Pyrex ASTM 40/60 C de dimensiones 40 x 2.4 cm. Una vez empaquetada la columna, se pasaron 100 ml del mismo tampón anterior a su través, para equilibrarla completamente.

La preparación de IgD, previamente digerida con tripsina y dializada frente al tampón inicial, se aplicó a esta columna, en un volumen de aproximadamente 20 ml. Después de eluir 70 fracciones de 6 ml cada una con el tampón inicial

Tris/HCl 0.05 M pH 8.0, se aplicó un gradiente lineal en el que el primer tampón era el anterior y el final era este mismo tampón al que se le había añadido NaCl 0.7 M. El pH se mantuvo constante. Para la formación del gradiente se utilizaron dos recipientes situados al mismo nivel y conectados entre sí. Cada uno de ellos contenía 250 ml de los tampones inicial y final respectivamente. El recipiente que contenía el tampón de molaridad mas baja, estaba conectado a la columna y se mantuvo en constante agitación durante toda la cromatografía. El flujo se mantuvo constante a 20 ml/hr. Las fracciones, de 6 ml, se recogieron en un colector (LKB 7000 Ultrorad) y se leyeron a 280 nm en un espectrofotómetro.

3.7.- ELECTROFORESIS EN GELES DE SDS-POLIACRILAMIDA.-

Se llevó a cabo según el método descrito por Maizel y col. (148) con la modificación de Weber y Osborn (149) y se utilizó en la determinación de los pesos moleculares de las cadenas H y L y de los fragmentos enzimáticos de la IgD.

La concentración de acrilamida utilizada fue del 10% en todos los casos; los geles se prepararon de la siguiente manera: 15 ml de tampón Fosfato $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 0.1 M, pH 7.0, conteniendo 2 gr de SDS por litro, se deaeraron y se mezclaron con 13.5 ml de una solución que contenía 22.2 gr de acrilamida y 0.6 gr de metilén-bis-acrilamida (Bio-Rad Lab.) por 100 ml de H_2O . Después de deaerarse de nuevo, se añadieron 1.5 ml de una solución reciente de persulfato amónico (15 mg/ml) y 0.045 ml de una solución de N, N, N', N'-tetrametiletilendiamina (TEMED). Se añadieron 2 ml de la solución final a cada uno de los tubos (100 x 6 mm) haciendo todos los geles de la misma longitud: 7 cm. Sobre la superficie del gel y antes que comenzara la polimerización, se añadieron unas gotas de H_2O con el fin de que la superficie fuera lisa. Los geles se dejaron polimerizar a T^a ambiente durante 30-40 min. transcurridos los cuales, se succionó el H_2O de la superficie y los tubos se colocaron en el aparato de electroforesis (Savant Inst.). Ambas cámaras, superior e inferior contenían el mismo tampón fosfato, diluído 1:1 con H_2O .

Las muestras a analizar y los standars, se prepararon haciendo soluciones de 1 mg/ml en ac. Fórmico al 5%; entre 50 y 100 μ l de estas soluciones, se secaron y se disolvieron en 60 μ l de una solución que contenía : 0.5 ml de tampón fosfato, 50 μ l de una solución de SDS al 10%, 2 ml de urea 10 M y 2.4 ml de H₂O. En los casos en que se quería reducir la muestra, se añadió a la solución anterior, 50 μ l de 2-Mercaptoetanol (12.5 M) y las muestras se disolvieron en 60 μ l de la solución final; los tubos que se iban a reducir se introdujeron entonces en un baño de agua hirviendo durante 5 min. con el fin de que la reducción fuera completa.

Antes de proceder a la electroforesis, se añadió a cada tubo 10 μ l de una solución de azul de bromofenol como marcador visual. La electroforesis se llevó a cabo durante 4-5 horas o hasta que la banda azul de bromofenol alcanzara el final del tubo.

Para la tinción y la decoloración, los geles se introdujeron en una solución que contenía 0.5% de Connasie Blue

(Schwarz/Mann), 10% de ac. acético y 25% de isopropanol.

Después de 16 hr, los tubos se colocaron en una cámara que contenía una solución acuosa de ac. acético al 10% e isopropanol al 25%, y se dejaron en agitación constante hasta que la decoloración fue completa (24 hr.).

Para la lectura de las bandas de proteína, se midió la longitud total del gel antes y después de la tinción y la distancia recorrida por el azul de bromofenol. La fórmula que se aplicó para medir las movilidades fue la siguiente:

$$\text{Movilidad} = \frac{D_1}{L_1} \times \frac{L_2}{D_2}$$

siendo:

D_1 : distancia migrada por la proteína

L_1 : longitud del gel después de la decoloración

D_2 : distancia recorrida por el marcador

L_2 : longitud del gel antes de la tinción

Los pesos moleculares se obtuvieron por interpolación en una gráfica en la que se representaron las movili-

des frente a los pesos moleculares de las proteínas conocidas.

Los standars que se utilizaron fueron :

Albúmina Bovina : P M : 66.000 daltons

Ovalbúmina : P.M : 46.000

Cadena ligera : P.M: 23.000

Citocromo C : P.M : 12.600

3.8.- DIGESTION ENZIMATICA DE LA IgD. -

3.8.1.- Digestión con tripsina. -

Con el fin de obtener el fragmento Fc de la IgD, la proteína fue digerida con tripsina en proporción 4:100, según el método descrito por Wolcott y col. (86). La IgD se disolvió en un tampón de Tris/HCl 0.05 M, pH 8.0, al que se le había añadido previamente CaCl_2 0.005 M, de manera que la concentración final de proteína era de 20 mg/ml. La solución de tripsina (TPCK-Trypsin. Worthington Bloch. Co), se preparó por separado en el mismo tampón y ambas soluciones se equilibraron en un baño a 56°C antes de mezclarlas. Una vez añadida la tripsina, la solución se incubó a 56° durante 4 min. transcur-

ridos los cuales, se vertió sobre un tubo que contenía el inhibidor de tripsina soy-bean (sigma Chem. Co.) colocado en un baño de hielo. La proporción de inhibidor era de 1.5 veces en exceso a la cantidad de enzima (w/w).

3.8.2. - Digestión con pepsina. -

La cadena pesada δ de la IgD o el fragmento Fc purificados, fueron reducidos completamente y alquilados con ac. ^{14}C - Iodoacético. Después de dializar la solución durante dos días (o pasarla a través de Sephadex G-25), se liofilizó. El liofilizado se disolvió en ac. fórmico al 5% (20 mg proteína/ml) y a esta solución se añadió la pepsina (Worthington B.Co.) en proporción de 1:50 (w/w). La mezcla se incubó a 37°C durante 6 o 3 hr. y la reacción se paró, congelando y liofilizando la solución.

3.9. - OXIDACION CON AC. PERFORMICO. -

La oxidación de la IgD completa o de sus fragmentos previa al análisis de aminoácidos, se llevó a cabo por el si-

guiente método:

3.9.1. - Preparación del ácido per fórmico. -

9.5 ml de ac. fórmico al 90% (Fisher) se mezclaron con 0.5 ml de H_2O_2 (30%) y se dejaron en un tubo cerrado durante 2 horas a T^a ambiente.

3.9.2. - Oxidación de la proteína. -

0.5 mg de proteína se disolvieron en una gota de ac. fórmico (90%) y se dejaron en un baño de hielo durante 15 min. El tubo que contenía el ac. per fórmico ya preparado, se dejó en el mismo baño por el mismo periodo de tiempo. A continuación se añadieron 2 gotas de ac. per fórmico a la solución de proteína y se dejó ésta a $0^{\circ}C$ durante 3 hr. Completada la oxidación, la solución de proteína se diluyó 1:160 veces con H_2O , con el fin de diluir el ac. per fórmico y se liofilizó.

3.9.3. - Oxidación de péptidos en papel. -

La oxidación de los péptidos procedentes de la IgD, previamente aplicados a papel Whatman 3 MM, se llevó a cabo

cortando la tira de papel donde se encontraba el péptido y colocándola en una espiral de cristal que se introdujo en un desecador. El ac. perfórmico preparado previamente, mezclando 50 ml de ac. fórmico y 2.5 ml de H_2O_2 , se colocó en un recipiente en el fondo del desecador. La oxidación se llevó a cabo por espacio de 3 hr a T^a ambiente; terminada ésta, se sacó la espiral que contenía los péptidos y se dejó evaporar el exceso de ácido en una vitrina convenientemente ventilada.

3.10.- ELECTROFORESIS DE ALTO VOLTAJE. -

Se utilizó para la separación y purificación de los péptidos procedentes de la IgD, de la cadena pesada δ y del fragmento Fc, obtenidos por digestión enzimática.

El digerido se disolvió en un volumen de 20-30 μ l de una solución de NH_4OH 0.1 M y se aplicó a papel Whatman 3 MM (46 x 57 cm) (Fisher), en la proporción de 1 mg de muestra por cm de papel. Las distancias de los polos positivo y negativo a las que se aplicó la muestra, fueron diferentes según el péptido y el pH del tampón correspondiente. En general se usaron tres tampones diferentes cuya composición era:

pH 6.5 : 10% Piridina, 0.3% Ac. Acético (v/v) en H₂O

pH 3.5 : 0.5% Piridina, 5% Ac. Acético (v/v) en H₂O

pH 2.1 : 8% Ac. Acético, 2% Ac. Fórmico (v/v) en H₂O

Las electroforesis se llevaron a cabo con un voltaje constante de 3000 voltios, en tanques apropiados, con varsol y agua recirculante para evitar el calentamiento (Savant Inst.).

En general se utilizaron los tres diferentes pH para la mejor purificación de los péptidos. Una vez corridos éstos a un determinado pH, la zona del papel donde se encontraba el péptido, se cortó y se cosió por medio de una costura zig-zag a otro papel, en el que se corrió a un segundo pH. En algunos casos fue conveniente doblar la concentración por cm de papel, lo que se hizo cosiendo las dos tiras de papel en paralelo previamente y después a la hoja de papel correspondiente.

En todos los casos se utilizaron marcadores; la mezcla utilizada contenía: 5 μ mol/ml de cada uno de los siguientes aminoácidos (en HCl 0.05 M) : Lisina, Arginina, Histidina, Glicina-alanina, Glicina, Valina, Ac. Glutámico, Ac. Aspártico,

ϵ -DNP-Lisina (amarillo) y Cianol F.F. (Xylene Cyanole FF. Eastman Org. Chem.) (azul). En el caso del pH 6.5, se utilizó como marcador visual, un lápiz de rojo Pentel que corre hacia el extremo positivo con una movilidad parecida a la del Ac. Glutámico y es por tanto muy útil para determinar la extensión de la electroforesis.

3.10.1.- Movilidades de los péptidos a pH 6.5.-

La movilidad de los péptidos se midió a pH 6.5 tomando como referencia los marcadores. A este pH, la mancha amarilla de ϵ -DNP-Lys, es neutra y la mancha azul de cianol se mueve con un 38% la movilidad del ac. aspártico. Para los cálculos, se tomo como movilidad 0.4, la distancia comprendida entre la mancha azul y la ϵ -DNP-Lys y se midió la distancia relativa de cada péptido a la mancha amarilla de ϵ -DNP-Lys. Los signos se consideraron positivos hacia el lado del polo (+) y negativos en sentido contrario (150).

3.11.- CROMATOGRAFIA EN PAPEL.-

Se utilizó para ella el mismo papel Whatman 3 MM que para la electroforesis. La muestra se aplicó a una distancia de 3" de uno de los extremos del papel; en el mismo extremo y a 2"

de distancia, se dobló el papel de manera que quedara sujeto por medio de una varilla en el recipiente que contenía el solvente. El sistema utilizado fue n-Butanol/ Ac. Acético/ H₂O en proporciones 4:1:5 (v/v). Para la preparación del solvente, se utilizó un embudo de decantación en el que después de añadir los tres componentes y agitar vigorosamente, la mezcla se dejó en reposo durante 10 min. ; de las dos fases que se formaron, se tomó la superior, despreciándose el resto.

En algunos casos se utilizó un solvente diferente consistente en: n-Butanol/ Ac. Acético/ H₂O/ Piridina , en proporciones 30:6:24:20. (151), preparado de la misma manera que el anterior, excepto que en este caso, no se forman dos fases y por tanto se utiliza la mezcla total como solvente.

Como marcadores para la cromatografía, se utilizó la misma mezcla anterior de aminoácidos, con excepción del cianol y la cromatografía se desarrolló hasta que la mancha visible amarilla llegó a una distancia de 14" del extremo superior del papel (aprox. 20 hr.).

3.12.- DETECCION DE PEPTIDOS EN PAPEL. -

3.12.1.- Detección de los péptidos radioactivos. -

Se llevó a cabo por medio de una autoradiografía, exponiendo el papel que contenía los péptidos, una vez corrida la electroforesis y secado, a un film de rayos X (Kodak RP/S 54, 35 x 43 cm) y dejándolo desarrollar por 24 o 48 hr. Por superposición posterior del film una vez revelado, al papel, se marcó la posición de los péptidos radioactivos.

3.12.2.- Tinción con Ninhidrina. -

Para el revelado de los péptidos se utilizó una mezcla de Ninhidrina/ Cadmio preparada de la siguiente manera: 1 gr de Acetato de Cadmio dehidratado se disolvió en 100 ml de H₂O destilada y 50 ml de Ac. Acético glacial. Esta solución se añadió a la de ninhidrina (1% en acetona) en proporción de 15 :100 (v/v). Para proceder a la tinción del papel, la solución de ninhidrina se puso en un recipiente apropiado en forma de bandeja y el papel se introdujo en él, sujetando ambos extremos y procurando que la tinción fuera lo más homogénea posible.

3.12.3.- Detección de Triptófano. -

El reactivo que se utilizó para la detección de los péptidos con triptófano, fue el p-dimetil-amino-benzaldehído, que se preparó de la siguiente forma: 1 gr de reactivo se disolvió en 90 ml de acetona y a la solución se añadieron 10 ml de ác, HCl conc. En esta solución se introdujo el papel y una vez seco, se observó la aparición de un color púrpura, indicativo de una reacción + con triptófano. El color tarda en desarrollarse unos 10 min. Es conveniente que la solución de p-dimetilamino-benzaldehído sea reciente.

3.13.- "CHEMICAL TYPING". -

Este método permite diferenciar las diferentes clases y subclases de Igs, basándose en las diferentes movilidades de los péptidos que contienen los enlaces disulfuro intercatenarios (152).

De 3 a 8 mg de IgD fueron reducidos parcialmente y alquilados radioactivamente por el método ya descrito. Después de dializar frente a H₂O destilada, la proteína se liofilizó y se disolvió en 0.3 ml de ác. fórmico al 5%. A continuación se añadió pepsina, en proporción 1:50 (w/w) y se digirió a 37⁰, 16 hr. La reacción

se paró liofilizando la solución; la proteína fue entonces redisuelta en 0.3 ml de una solución de NH_4HCO_3 0.2 M y digerida con tripsina en proporción de 1:50 (w/w) a 37°C durante 6 hr. Una vez liofilizada la proteína, se redisolvió en 10-20 μl de NH_4OH 0.1 M y se aplicó a papel Whatman 3 MM. La electroforesis se llevó a cabo a pH 3.5 durante 1 hr. Una vez seco el papel, se hizo una autoradiografía, revelándose el film de rayos X a las 24 hr y observando las posiciones de los péptidos radioactivos.

3.14. - MAPA DIAGONAL DE LA IgD. -

Este es un método que se aplica para la caracterización de los péptidos que contienen los enlaces disulfuro. En esencia consiste en una primera electroforesis de la proteína a pH 3,5 por el método descrito para el "chemical typing". Una vez desarrollada la electroforesis, se corta la tira de papel en que está la muestra y se oxida con ac. perbórmico por el método explicado anteriormente. Después de dejar evaporar el exceso de ac. perbórmico, la tira de papel se cose a un segundo papel (polo (+) a la izquierda) y se corre de nuevo una electroforesis a pH 3.5 durante 1 hr. Al revelar el papel con ninhidrina,

todos los péptidos aparecerán ahora en una diagonal, excepto aquellos que han modificado su carga por efecto de la oxidación : El ac. perfórmico rompe los enlaces disulfuro dando lugar a dos péptidos, cada uno de los cuales contiene un residuo de ac. cisteico, de forma que el péptido que en la primera dimensión corrió como uno solo, al correr la segunda dimensión, después de la oxidación, se desdoblará en dos péptidos que aparecerán alineados en la misma vertical y que estarán además fuera de la diagonal ya que su carga se ha modificado teniendo ahora un exceso de carga negativa que los hace moverse más lentamente hacia el polo (-) que el resto de los péptidos. Este método se puede utilizar tanto con fines analíticos como preparativos; para el caso de la IgD se utilizó únicamente para visualizar la posición de los péptidos, de manera analítica.

3.15.- "FINGERPRINTING" O MAPA PEPTIDICO.-

Se utilizó en el aislamiento de los péptidos radioactivos procedentes del fragmento Fc de la IgD. Esencialmente,

es un método combinado de cromatografía (en el mismo solvente ya descrito) y de electroforesis a pH 3.5.

La proteína o fragmento de partida (2-4 mg por papel), completamente reducida y alquilada radioactivamente con ^{14}C -Iodoacético, se aplicó en una esquina del papel a 1.5" del extremo lateral y a 3" del extremo superior del papel (el que va en el solvente). A 2" se hizo un doblez en el papel, de forma que éste quedara sujeto. La cromatografía se corrió de la manera usual, hasta que el marcador alcanzó 14" desde el extremo superior del papel.

Terminada ésta y una vez seco el papel, se cortaron 2" del extremo superior del papel y 1" del extremo inferior y el papel se cosió a una nueva hoja de papel Whatman 3 MM de la que se habían cortado previamente 3" en uno de los extremos, de forma que los dos papeles quedaran del mismo tamaño. Una vez cosidos, se aplicó el marcador para la electroforesis en el extremo lateral opuesto al que se encontraba la muestra y se corrió la electroforesis a pH 3.5 durante 1 hr 30 min.

La tinción de los papeles se llevó a cabo con una solución de ninhidrina como se ha explicado en otro apartado, dejando el papel secarse en la oscuridad y observando la aparición de los péptidos.

Para la detección de los péptidos radioactivos, se expuso el papel a un film de rayos X, como en los casos de electroforesis, revelándose a las 24 hr.

3.16.- ANALISIS DE AMINOACIDOS.-

Los péptidos a proteínas a analizar, fueron oxidados previamente con ac. perfórmico por el método ya descrito; una vez liofilizados, se disolvieron en 0.2 ml de ac. HCl 6 N en tubos previamente lavados con ácido. Después de añadir 40 μ l de fenol, para evitar la destrucción de la Tirosina, los tubos se estiraron a la llama dejando un canal capilar a través del cual, se hizo vacío durante 5 min, cerrándose después a la llama. Los tubos se dejaron en una estufa a 110°C durante 24 o 48 hr. Terminada la hidrólisis, los tubos se abrieron y colocaron en un desecador con el fin de evaporar el ácido. Una vez secos, el residuo hidrolizado, se redisolvió en

0.7 ml de ác. HCl 0.02 N, que contenía Taurina y ác. α -amino- β -guanidin-propiónico (GPN) (0.5 ml de cada uno/ 100 ml de ácido HCl), con el fin de utilizarlos como standards en el análisis. La muestra se aplicó al analizador de aminoácidos (Beckman modelo 120 C) en dos fracciones separadas, una para cada columna. Los tampones utilizados fueron: Citrato sódico 0.35 N, pH 5.26 para la columna corta y Citrato sódico 0.2 N, pH 3.25 y 0.2 N, pH 4.25 para la larga. Terminado el análisis, los aminoácidos se identificaron por comparación con standards conocidos corridos en las mismas condiciones, que consistían en concentraciones definidas de aminoácidos conocidos.

La concentración de cada aminoácido en estas condiciones, es dependiente del área del pico que aparece en el registro y se puede calcular por medio de la ecuación:

$$\mu\text{moles de aa} = \frac{H \times W}{C}$$

siendo: H : altura del pico

W : anchura a mitad de la altura

C : constante de calibración

La constante se define como el área del pico por μmol de aminoácido y se determina a partir de análisis de cantidades conocidas de aminoácidos.

En algunos análisis, se utilizó un diferente analizador (Durrum D-500), con el programa de "aceleración rápida". Las muestras una vez secas, fueron disueltas en 50-100 μl de tampón citrato 0.2 N, pH 2.20. Se utilizaron sensibilidades diferentes de 2.5, 5, o 10 nmoles, dependiendo de la muestra.

3.17.- DETERMINACION DE GRUPOS TERMINALES. -

3.17.1.- Método del cloruro de dansilo. -

Para la determinación del amino terminal se utilizó como reactivo el cloruro de dansilo (1-dimetil-amino-naftaleno-5-sulfonilo). (153). Para el caso de la IgD completa o del fragmento Fc, 2 mg de proteína se disolvieron en 0.2 ml de una solución que contenía NaHCO_3 0.1 M / Urea 6 M, y se añadieron 0.2 ml de cloruro de dansilo (DNS-Cl) (10 mg/ml en acetona). De una a dos gotas de NaCO_3 al 15%, se añadieron para que el pH fuera entre 8 y 8.5. La proteína se dejó a 37°C

durante 16 hr; a continuación, se añadieron 8 gotas de ác. acético al 10% y se dejó el tubo en reposo a T^a ambiente, durante 2 hr. Después de centrifugar, el precipitado se redisolvió en 8 gotas de ác. HAc concentrado y se reprecipitó con 20 gotas de acetona, centrifugándose de nuevo. Esto se repitió dos veces más. A continuación, se secó el precipitado y se disolvió en 0.2 ml de ác. HCl 6 N cerrándose el tubo y dejándolo a 110°C durante 16 hr. En algunos casos, se sustituyó la precipitación, por una simple diálisis frente a H₂O durante 48 hr. con el fin de eliminar la urea.

En el caso de péptidos, de 1 a 3 nanomoles de péptido se pasaron a microtubos (30 x 4 mm) y se secaron ; se disolvieron después en 10 µl de NaHCO₃ 0.2 M y se añadieron 10 µl de H₂O destilada-desionizada y 10 µl del reactivo DNS-Cl (2.5 mg/ml en acetona). El tubo se dejó a 37°C durante 1 hr, transcurrida la cual, se secó en un desecador y el residuo se disolvió en 20 µl de ác. HCl 6 N para proceder a la hidrólisis. Esta se realizó como siempre, a 110^o durante 16 hr.

Los derivados de dansilo fueron identificados por cromatografía en capa fina en placas de poliamida (Cheng Chin trading Co. Taiwan) de 15 x 15 cm, por el método descrito por Woods y Wang (154). La muestra seca, se disolvió en piridina al 50% (2 μ l para el caso de péptidos; 10 μ l para proteínas) y se aplicó a la placa de poliamida, la mitad del volumen a cada lado en una mancha de unos 2 mm de diámetro y en una esquina de la placa a 2 cm de ambos lados. Se aplicó después en uno de los lados de la placa, 1/3 μ l de una solución que contenía los standards de aminoácidos dansilados siguientes: DNS-Pro; DNS-Phe; DNS-Ile; DNS-Ser; DNS-Gly; DNS-Arg; DNS-Glu (Mann. Res. Lab.). Las placas se colocaron en una gradilla apropiada y se introdujeron en cámaras cerradas que contenían tres diferentes solventes:

1^o Solvente : 1.5% ác. Fórmico en H₂O (v/v)

2^o Solvente : Benceno / Ac. Acético 9:1 (v/v)

3^o Solvente : Acetato de Etilo / Metanol / Ac. Acético 22:1:1 (v/v)

Una vez corrida la primera dimensión, las placas se secaron y se introdujeron en la segunda cámara en dirección per-

pendicular a la primera. El tercer solvente se corrió en la misma dirección que el segundo. En este último se separan los DNS-Glu y DNS-Asp y los DNS-Thr y DNS-Ser (155). Las placas se leyeron después de la 2^a y 3^a dimensión bajo luz ultravioleta, lavándose después en una mezcla que contenía NH₄OH / Acetona 1 M 1:1 (v/v).

3.17.2.- Digestión con Pronasa. -

Se utilizó para determinar el aminoterminal en el caso de la cadena δ en que por estar bloqueado formando PCA, no reacciona con el cloruro de dansilo.

20 mg de IgD fueron reducidos completamente y alquilados con ác. ¹⁴C-Iodoacético. Después de dializar extensivamente, se liofilizó y redisolvió en 2 ml de NH₄HCO₃ 0.2 M. Se añadieron entonces 0.4 ml de una solución de pronasa (Protease Type VI. Sigma) que contenía 5 mg/ml en H₂O y la digestión se llevó a cabo a 37°C durante 2 hr. 30 min. El digerido se aplicó entonces a una columna de Dowex-Ag-50W-X2 (Bio-Rad) de 1 x 30 cm, previamente lavada con H₂O y se eluyó con H₂O en

fracciones de 2 ml, recogién dose 25 tubos. La aparición de material peptídico se detectó por densidad óptica a 215 nm.

3.18.- DEGRADACION SECUENCIAL DE PEPTIDOS.-

3.18.1.- Secuenciación manual.- Método de "Dansyl-Edman".-

Los péptidos a secuenciar se disolvieron en 0.15 ml de H₂O destilada-desionizada y se añadieron 0.15 ml de reactivo Isotiocianato de Fenilo (PITC) al 5% en piridina. Se burbujeó N₂ y la solución se incubó a 45°C durante 90 min. Después de secar, el péptido se incubó con 0.2 ml de ác. trifluoroacético (TFA) a 45°C durante 30 min. Una vez evaporado éste en un desecador, sobre NaOH, los péptidos se disolvieron en 0.2 ml de H₂O destilada y se añadieron 1.5 ml de acetato de n-butilo. Después de agitar vigorosamente, los tubos se centrifugaron y se separó la fase orgánica, guardándose para posterior hidrólisis del derivado PTH del aminoácido, previamente seca por medio del burbujeo de N₂. Después de repetir tres veces la extracción, la fase acuosa se secó y redisolvió en 0.1 ml de H₂O destilada-desionizada, tomando una alícuota para la determinación del nuevo amino terminal por el método del Dansilo, ya explicado.

En los casos en que el péptido era insoluble en H_2O , se disolvió en una mezcla de piridina al 50% en H_2O , tomándose la alícuota correspondiente, que una vez seca, se resuspendió en H_2O destilada. Antes de proceder a la reacción, con el cloruro de dansilo, se comprobó cuidadosamente que el pH era el adecuado (8-9) añadiendo alícuotas de NaOH 0.1 M hasta conseguir el pH deseado.

Una vez determinado el aminoácido correspondiente, se procedió otra vez desde el principio con el resto de la muestra.

3.18.2.- Secuenciación automática.-

Se llevó a cabo en un secuenciador Beckman, modelo 890 C, con el programa DMAA 102974, para péptidos.

Los tubos que contenían las tiazolinonas de los correspondientes aminoácidos, fueron secados por medio de N_2 y a cada uno de ellos, se añadieron 0.2 ml de ac. HCl 1 N, con el fin de convertir las tiazolinonas en los correspondientes fenil-tio-
idantoil-aminoácidos (PTH-aa). La reacción se llevó a cabo a 80° durante 10 min. Terminada ésta, los tubos se enfriaron y el de-

rivado PTH se extrajo con acetato de etilo (tres extracciones repetidas de las que se tomó la fase superior). La fase acuosa se guardó. La fase orgánica se secó entonces bajo N_2 , el residuo se redisolvió en 50 μ l de acetato de etilo y se procedió a su identificación. Esta se realizó por 3 métodos diferentes:

- 1.- Cromatografía de gases
- 2.- Cromatografía en capa fina en placas de poliamida
- 3.- Hidrólisis del PTH-Aminoácido

3.18.2.1.- Cromatografía de gases. -

Se llevó a cabo en un cromatógrafo de gases (Hewlett-Packard, modelo 7620 A). El análisis se llevó a cabo por medio de dos programas diferentes: Isotermo o con T^a programada. El 1^o se realizó a T^a constante de 210^oC y los aminoácidos que se identifican en estas condiciones son: Ala, Gly, Pro/Thr, Leu/Ile. El 2^o se realizó con una T^a inicial de 210^oC y una final de 280^o. Con este programa, los aminoácidos anteriores salen en la primera fase del cromatograma (peor resueltos que en el caso anterior) y el resto, Asp, Phe, Met, Glu, y Tyr, salen después. Para este segundo programa, la muestra fue disuelta en una solu-

ción de N,O-Bis-(trimetilsilil)-acetamida (BSA) (New England Nuclear), en la proporción de BSA : Ac. Etilo : BSA de 1:2:1. Los diferentes aminoácidos se identificaron por su posición en el cromatograma relativa a la de los standards utilizados.

3.18.2.2.- Cromatografía en capa fina. -

Se llevó a cabo en placas de poliamida (5 x5 cm) (Chen-Chin, trading Co. Taiwan). La muestra disuelta en acetato de etilo, se aplicó en una esquina de la placa a 10 mm de ámbos lados. La solución conteniendo los PTH-aa standards, se aplicó en uno de los lados de la placa. La cromatografía se llevó a cabo en dos dimensiones, utilizando dos solventes diferentes cuya composición era:

1^a Dimensión : Tolueno / n-Pentano / ac. acético glacial
60:30:35 (v/v)

B-BOT Fluor : 93 mg / 100 ml solvente

2^a Dimensión : 35% ac. acético acuoso

y los PTH-aa se identificaron por su posición en la placa relativa a la de los standards. Las placas se leyeron bajo luz Ul-

travioleta, ya que el compuesto B-BOT es fluorescente.

3.18.2.3.- Hidrólisis del PTH-aminoácido.-

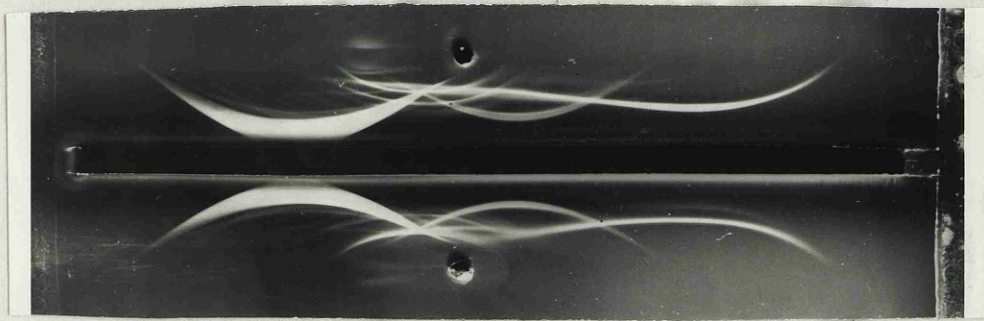
El residuo del PTH-aa una vez seco, fue disuelto en 20 μ l de acetato de etilo y transferido a un microtubo (30 x 4 mm) para proceder a su hidrólisis. Una vez seco, el microtubo se introdujo en un tubo de hidrólisis normal, en cuyo fondo se habían colocado bolas de vidrio y unas gotas de ác. Iodídrico. El tubo, con el microtubo en su interior, se estiró a la llama, dejando un canal capilar por el que se hizo el vacío durante 5-10 min. Una vez cerrado el tubo al vacío, la hidrólisis se llevó a cabo durante 20 hr. Terminada ésta, los tubos se abrieron y evaporaron y el residuo fue disuelto en el tampón de citrato sódico para ser aplicado al analizador. En estas condiciones, la Treonina y la Metionina, aparecen como ác. α -NH₂-butirico (ABA) en el análisis de aminoácidos, en la posición anterior a la valina. La Serina y Cisteina, aparecen como Alanina. El trip-tófano se destruye.

4.- RESULTADOS

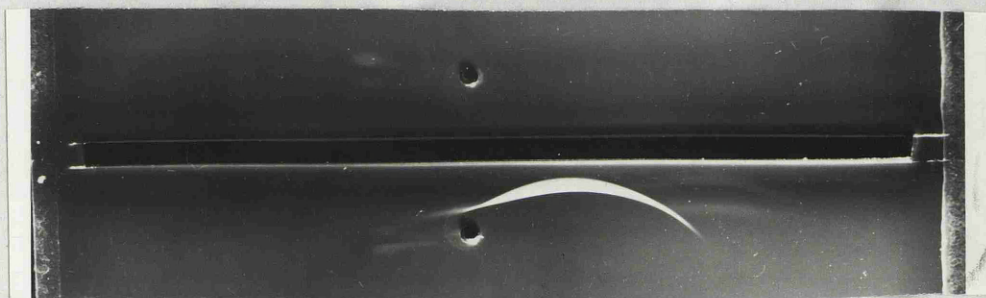
4.1.- AISLAMIENTO Y PURIFICACION DE LA IgD. -

La Inmunoglobulina D utilizada en este estudio, se aisló a partir del suero de un paciente con mieloma IgD (Men). La paraproteína o proteína de mieloma, presentaba una movilidad electroforética en la zona β_2 y daba una fuerte reacción de precipitación con el antisuero anti-IgD obtenido en conejos. En la figura 3 se puede ver la inmunolectroforesis del suero de este paciente, revelada con suero anti-humano (Fig. 3,a), con anti-IgD (Fig. 3,b) y con anti- λ (Fig.3,c). En la parte superior de las fotos se ha representado un suero humano normal. La parte inferior es la correspondiente al suero Men. Como se observa en la inmunolectroforesis revelada con suero anti-humano, las restantes proteínas del suero de este paciente, permanecen normales; se observa también una línea correspondiente a proteínas de Bence-Jones, cuya aparición en los casos de mieloma IgD, es muy frecuente.

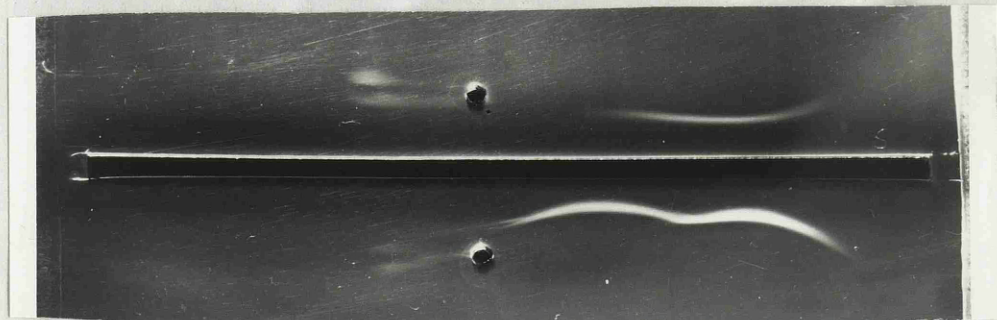
Como se puede ver, la paraproteína tenía la cadena ligera tipo λ , como la mayoría de los mielomas IgD descritos.



3 a.



3 b.



3 c.

Fig. 3.- Inmunoelectroforesis del suero de mieloma Men,
revelada con: Suero anti-humano (a), anti-IgD (b)
y suero anti- λ (c). Polo + a la izquierda.

Como precaución y para evitar la fragmentación espontánea de la IgD, se añadió al suero en el momento de descongelarlo, ac. ϵ -aminocaproico 0.02 M, que inhibe la conversión de plasminógeno en plasmina, enzima responsable de la fragmentación de la IgD en el suero.

4.1.1.- Electroforesis en bloques de almidón. -

De 20 a 25 ml de suero previamente centrifugados, fueron aplicados cada vez al bloque de almidón (o Pevicón en algunos casos) y la electroforesis se llevó a cabo a 450 voltios durante 24 hr. Terminada ésta, se tomaron alicuotas a lo largo del bloque de almidón, y en ellas se determinó la aparición de proteínas por el método del Folin, representando después las lecturas a 700 nm de cada tubo, frente al n^o de tubo. (Fig. 4).

El perfil obtenido es por tanto el correspondiente a la distribución de las proteínas del suero. El polo positivo estaba situado a la derecha (según se observa la gráfica), por tanto, el último pico que es además el de más concentración, corresponde a la albúmina y siguiendo hacia la izquierda de la gráfica, están las α -proteínas, β y por último la fracción γ . En

MEN 25 cc suero
EF Almidon

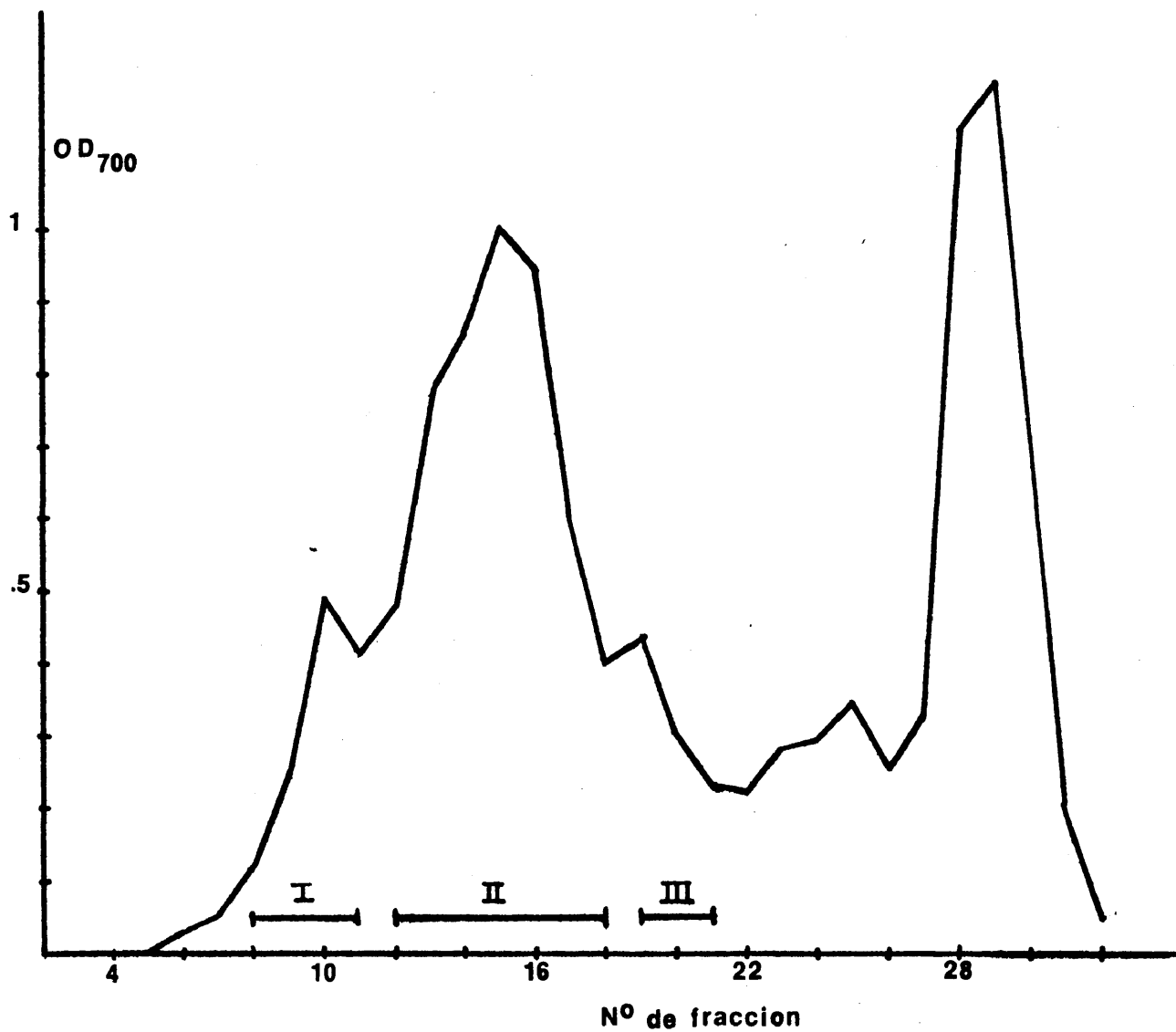


Fig. 4.- Electroforesis en bloque de almidón del suero de mieloma Men. El polo positivo está situado a la derecha.

esta fracción se encuentran las inmunoglobulinas; la IgD sin embargo, tiene una movilidad electroforética tipo β_2 y ésta es la razón por la que aparece un gran pico en esta zona de la electroforesis (fracción II en la gráfica).

Se hicieron siempre de 3 a 4 fracciones diferentes que una vez dializadas frente a H_2O destilada, y liofilizadas, se analizaron por inmunolectroforesis frente al antisuero anti-IgD y frente a suero anti-humano total. La IgD estaba siempre presente en las fracciones I y II de la electroforesis, apareciendo contaminada en algunos casos con otras proteínas del suero, fundamentalmente IgG en la fracción I y alguna β -proteína en la fracción II. En la fracción I, lo que aparece es probablemente un fragmento de IgD, de movilidad electroforética parecida a la IgG. Por esta razón y debido a que la cantidad de IgD es mucho mayor en la fracción II, se tomo ésta para posterior purificación a través de Sephadex G-200.

Durante el transcurso de la electroforesis, todos los tampones llevaban ac. ξ -aminocaproico 0.01 M, con el fin de

evitar la ulterior fragmentación de la IgD. Asimismo se añadió la misma concentración de inhibidor al agua de la diálisis.

4.1.2.- Filtración a través de Sephadex G-200. -

La columna utilizada para la purificación de la IgD (2.6 x 100 cm), fue previamente calibrada con una mezcla que contenía de 1 a 2 ml de suero humano normal, citocromo C (en cantidad suficiente para apreciar el color naranja), y ϵ -DNP-Lisina, que marcaba el final de la columna. La separación entre los colores naranja y amarillo, fue uno de los criterios que se utilizó para comprobar si la columna era eficiente. La gráfica correspondiente a esta calibración se puede ver en la Figura 5.

El primer pico que sale con el volumen excluido de la columna, corresponde a la fracción 19S del suero; el segundo a la fracción 7S y el tercero a la Albúmina. El cuarto pico representa el citocromo C y el quinto corresponde a la ϵ -DNP-Lys, que marca el final de la columna.

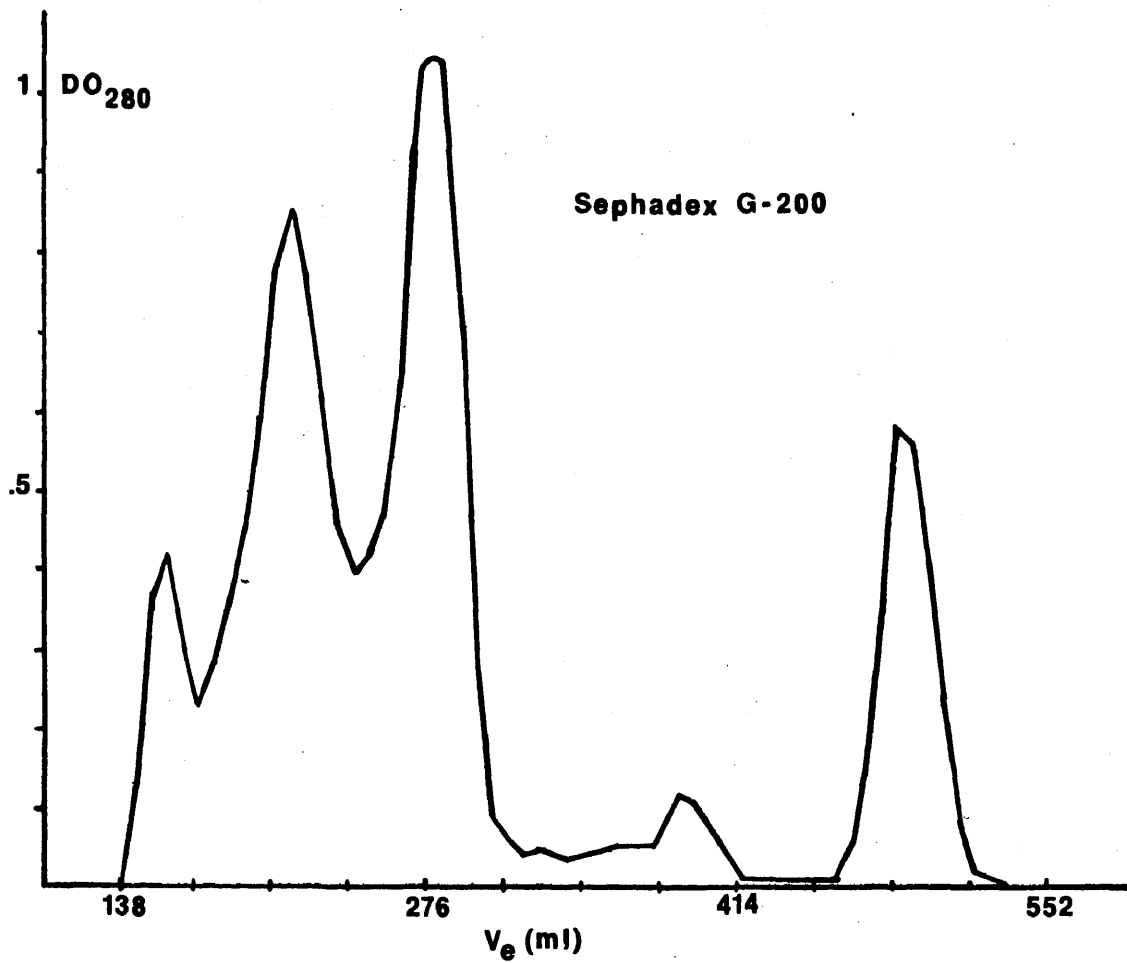


Fig. 5.- Calibración de la columna de Sephadex G-200 en NaCl 0.3 M, EACA 0.01 M. La mezcla de calibración contenía: Suero Humano Normal, Citocromo C y ϵ -DNP-Lisina.

Sistemáticamente, las fracciones procedentes de la electroforesis en almidón, que contenían algún contaminante por inmunolectroforesis, fueron disueltas en NaCl 0.3 M, conteniendo ac. ϵ -aminocaproico 0.01 M, a una concentración de 20 mg/ml y aplicadas a la columna de Sephadex G-200. La columna se corrió en flujo invertido, a una velocidad constante de 16 ml/hr. regulada por medio de una bomba. De 200 a 250 mg de proteína fueron aplicados cada vez, recogién dose fracciones de 3.5 ml que se leyeron en un espectrofotómetro a 280 nm. La figura 6 muestra uno de los perfiles obtenidos de una preparación de IgD; normalmente se hicieron tres fracciones, que se denominaron I, II y III. El análisis de estas fracciones por inmunolectroforesis frente a suero anti-humano y frente a anti-IgD (Fig. 7), mostró que la fracción I contenía IgD pura probablemente en estado agregado por lo que no reacciona con el antisuero. La fracción II, se componía también de IgD libre de contaminaciones y la fracción III, correspondía a algunas proteínas del suero contaminantes, así como a fragmentos procedentes de la degradación espontánea de la IgD (demostrado por la aparición de varias líneas de pre-

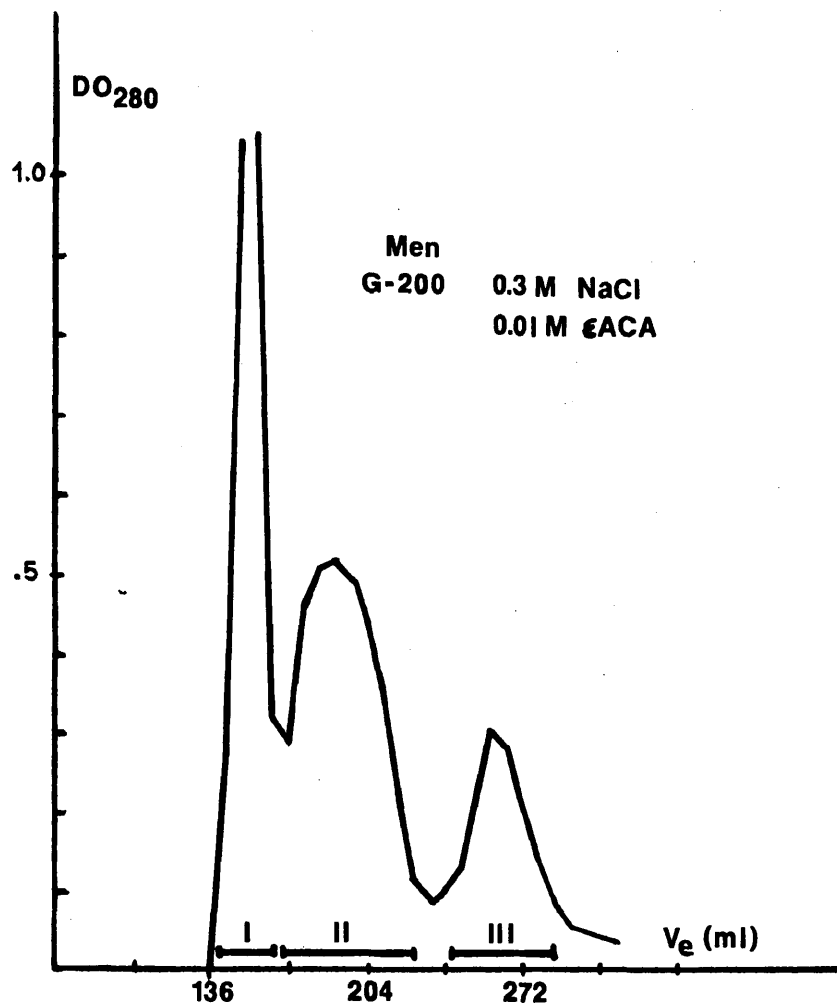


Fig. 6.- Filtración a través de Sephadex G-200 de la fracción II procedente del bloque de almidón.



Fig. 7.- Inmunoelectroforesis de las fracciones I, II y III procedentes de la columna de Sephadex G-200. Los antisueros utilizados fueron: D → anti-IgD, ξ → anti-suero humano completo.

cipitación en una inmunodifusión frente a suero anti-IgD).

En los casos en que la IgD procedente del bloque de almidón estaba pura, se procedió a subsiguientes estudios con ella, sin pasarla a través de Sephadex G-200.

4.2.- "CHEMICAL TYPING" DE LA INMUNOGLOBULINA D.-

Como se ha expuesto en la sección 3, el "Chemical Typing" es un método que permite diferenciar entre las distintas clases y subclases de inmunoglobulinas, basándose en la diferente movilidad en electroforesis en papel, de los péptidos que contienen los enlaces disulfuro intercatenarios en cada una de las clases. Para estudiar estos péptidos en la IgD y compararlos con los del resto de las inmunoglobulinas, 8 mg de IgD pura, fueron reducidos parcialmente, en condiciones en que sólo se alteraban los puentes disulfuro intercatenarios, y alquilados después con ac. ^{14}C -Iodoacético. La proteína se digirió entonces con pepsina y a continuación con tripsina (Ver Mat. y Met.) y el digerido se aplicó a papel Whatman 3 MM para correr la electroforesis. Esta se llevó a cabo a 3000 voltios durante 1 hr. en

el tampón de pH 3.5.

El revelado de los péptidos radioactivos se llevó a cabo por autoradiografía. La figura 8 muestra el resultado obtenido después de la electroforesis. Los cuatro péptidos de mayor intensidad se denominaron δ_1 y δ_2 (correspondientes a la cadena pesada δ) y λ_1 y λ_2 , procedentes de la cadena ligera. Estos péptidos fueron purificados después por EF de alto voltaje a pH 6.5 y a continuación a pH 2.1, eluyéndose entonces del papel e hidrolizándose con ac. HCl 6 N para proceder a su análisis y posteriormente a su secuencia.

La tabla VIII muestra la secuencia de estos cuatro péptidos que coincide con los datos previamente publicados (156) para otra IgD y confirman los resultados previos obtenidos con esta proteína Men (157).

El péptido δ_1 corresponde por tanto a la cisteína implicada en el enlace disulfuro inter cadenas-pesada-ligera; el δ_2 es el correspondiente al enlace disulfuro inter cadenas pesadas. Los péptidos pertenecientes a la cadena ligera λ_1 y λ_2 , corres-

Chemical Typing" de IgD

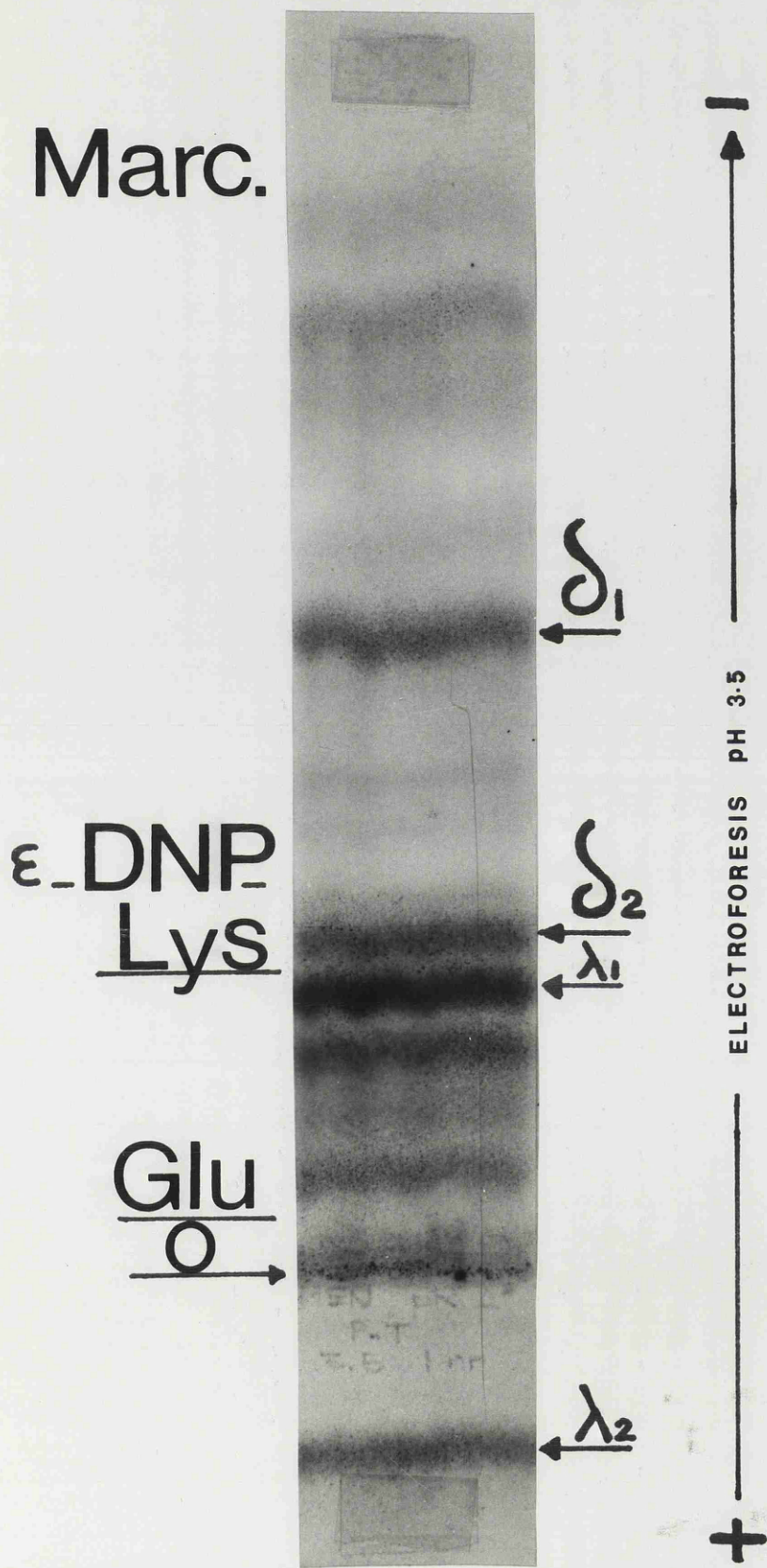


Fig. 8.- "Chemical typing" de la Inmunoglobulina D.

TABLA VIII. - PEPTIDOS OBTENIDOS POR PR -A DE LA IgD. -

<u>Péptido</u>	<u>Mov. a 6.5</u>	<u>Secuencia</u>	<u>Función</u>
δ_1	N	Pro-Ile-Ile-Ser-Gly-Cys-Arg	H-L
δ_2	0.37	Thr-Pro-Glu-Cys-Pro-Ser-His-Thr- Gln-Pro-Leu-Gly-Val	H-H
λ_1	0.8	Pro-Thr-Glu-Cys-Ser	L-H
λ_2	0.72	Cys-Ser	L-H

ponden al extremo carboxi-terminal de la cadena, siendo uno derivado del otro. Contienen la cisteína implicada en el enlace disulfuro con la cadena pesada.

4.3.- MAPA DIAGONAL DE LA INMUNOGLOBULINA D. -

Con el fin de llevar a cabo el mapa diagonal de la IgD, 8 mg de proteína fueron digeridos con pepsina y a continuación con tripsina, en las mismas condiciones que para el "chemical typing" y aplicados a papel Whatman 3 MM para proceder a la EF de alto voltaje. Se llevó a cabo esta a 3000 v. durante 1 hr a pH 3.5. Después de oxidar la tira de papel que contenía los péptidos, se cosió a un segundo papel para correr la segunda EF en dirección perpendicular a la 1ª. El papel se tiñó entonces con una solución de ninhidrina/cadmio y se marcaron los péptidos que aparecían fuera de la diagonal. La figura 9 muestra el mapa diagonal obtenido de esta manera para la IgD. Los péptidos que aparecen fuera de la diagonal, son los que contienen enlaces disulfuro. En este estudio, no se aislaron estos péptidos de la diagonal, debido a

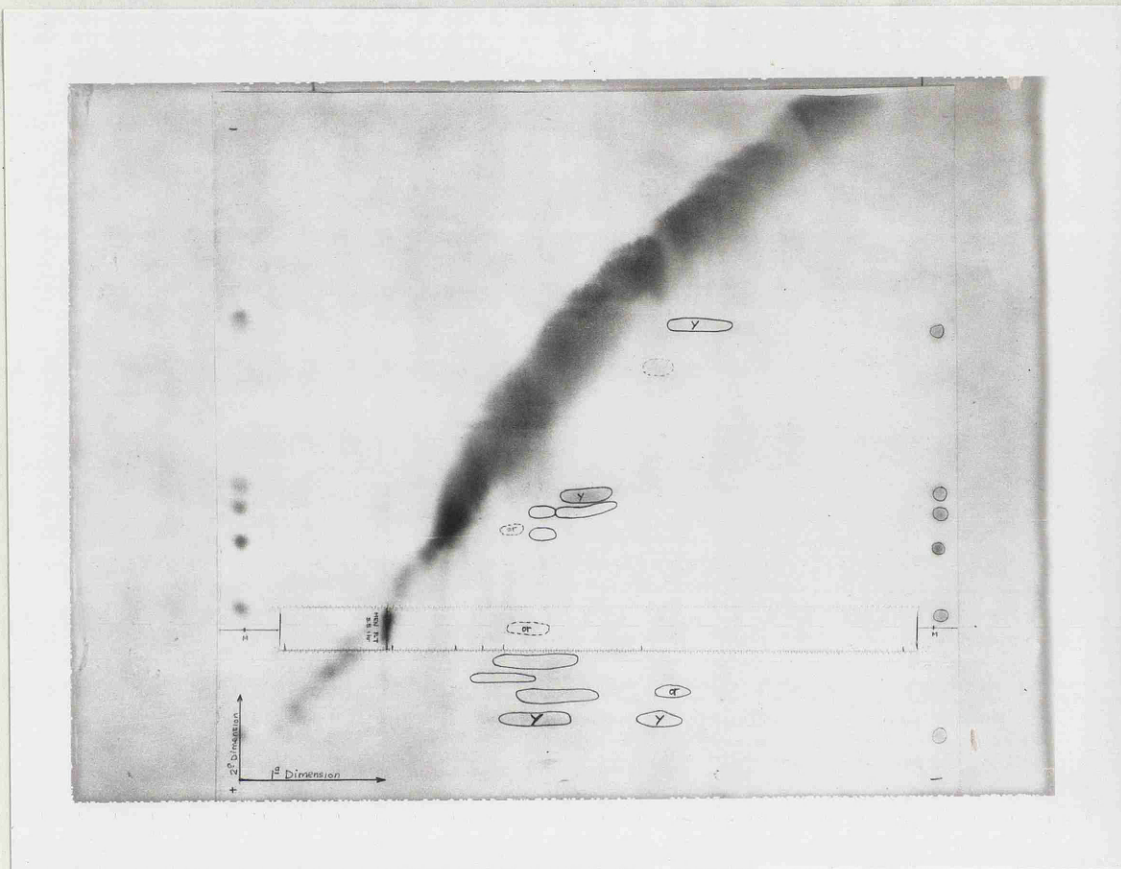


Fig. 9.- Mapa diagonal de la IgD. La electroforesis se realizó a pH 3.5 , durante 1 hr. en ámbas dimensiones.

la gran cantidad de material que es necesario para ello. No fue posible por tanto, asignar los enlaces disulfuro a los respectivos dominios en la molécula, ni comparar su movilidad electroforética con la de los péptidos correspondientes en otras clases de inmunoglobulinas.

Cuando se llevó a cabo el mapa diagonal de la IgD previamente reducida, los péptidos que aparecían fuera de la diagonal eran muy débiles (en la tinción con ninhidrina y el revelado por autoradiografía) y la mayoría de ellos, inapreciables, no pudiéndose sacar por tanto ninguna conclusión de este mapa. Lo mismo sucedió cuando se llevó a cabo el mapa diagonal de la cadena pesada δ , aislada.

4.4.- OBTENCION DE LAS CADENAS H Y L DE LA IgD.-

Para la obtención de las cadena δ y λ procedentes de la IgD, esta proteína se redujo en condiciones en que sólo se afectaban los puentes disulfuro intercatenarios, (tam-

pón Tris/HCl 0.27 M, pH 8.0), separándose después las cadenas por filtración a través de Sephadex G-100.

De 200 a 250 mg de IgD se utilizaron cada vez; después de reducirlos con DTT 0.01 M y alquilarlos con IAA*, la solución de proteína se dializó frente a ác. HAc 1 N o ác. Fórmico al 5%, dependiendo de la columna que se fuera a utilizar. Normalmente para cantidades preparativas, se utilizó la columna de G-100 en ác. acético 1 N cuyas dimensiones (4 x 150 cm) eran mucho mayores que las de la columna de ác. Fórmico.

En la figura 11, se puede ver el patrón de elución de estas columnas; no había diferencia entre las columnas de ác. acético y ác. fórmico, sin embargo, se puede observar una gran diferencia en la proporción de los picos II y III en las fig. 11a y 11b. Esta diferencia se explica de la manera siguiente: en los primeros experimentos, se omitió el añadir ác. EACA en el momento de la reducción de la proteína, con lo cual estaba ocurriendo probablemente una degradación enzimática de la misma, que se refleja por la aparición de un fragmento de un tamaño molecu-

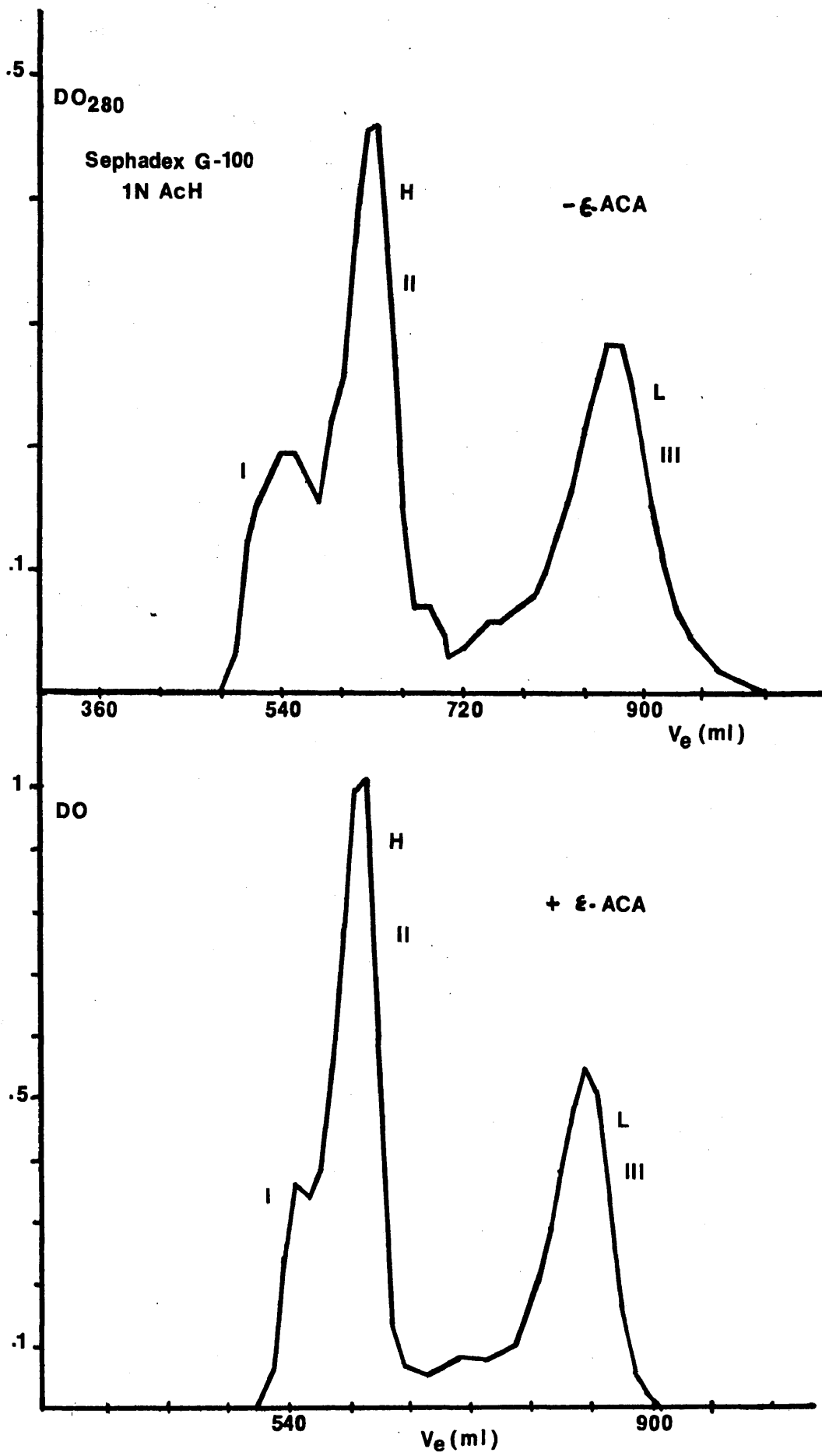


Fig. 11.- Separación de las cadenas H y L de la IgD.

lar parecido al de la cadena ligera y que eluye de la columna junto con ella, incrementando el tamaño del pico III. Este es el caso que se observa en la parte a de la figura; a este tercer pico se le llamó fracción $\delta + \lambda$ y se guardó para posteriores estudios.

En subsiguientes experimentos, se añadió ác. EACA 0.01 M al tampón en que se efectuaba la reducción, con lo que se evitó en gran parte la degradación espontánea de la IgD. Este es el caso que se observa en la parte b de la figura, en que las proporciones de los picos correspondientes a las cadenas pesada y ligera, son las esperadas. Una pequeña proporción de fragmentos de IgD aparecía también en este caso, que se revelaba por inmunodifusión frente al antisuero anti-IgD.

El análisis del contenido de estos picos, se llevó a cabo por medio de un "chemical typing". 2 mg de cada una de las fracciones de la columna, se digirieron con pepsina y tripsina, aplicándose después a papel Whatman 3 MM y cor-

riendo una electroforesis a pH 3.5 durante 1 hr. En la figura 12 se puede ver el resultado obtenido una vez revelada la autoradiografía. Se han representado las fracciones I, II y III de la columna de Sephadex G-100, así como la cadena ligera λ , sometida al mismo tratamiento, que se utilizó como control.

Asimismo y en un experimento posterior, se tomaron otros 2 mg de cada fracción y se redujeron completamente con DTT, alquilándose después con IAA* y repitiendo la digestión con pepsina y tripsina y la electroforesis a pH 3.5. La autoradiografía en este caso (Figura 13), mostraba todos los péptidos radioactivos (tanto los inter como los intra); de esta manera, se juntaron aquellas fracciones que aparecían semejantes en este análisis (contenían la misma distribución de péptidos radioactivos). En este experimento se utilizó también como control, una cadena ligera λ . Se tomaron entonces las fracciones I y II como cadena pesada δ (la fracción I es probablemente cadena pesada agregada) y la fracción III como fracción $\delta + \lambda$.

"Chemical Typing" de la IgD

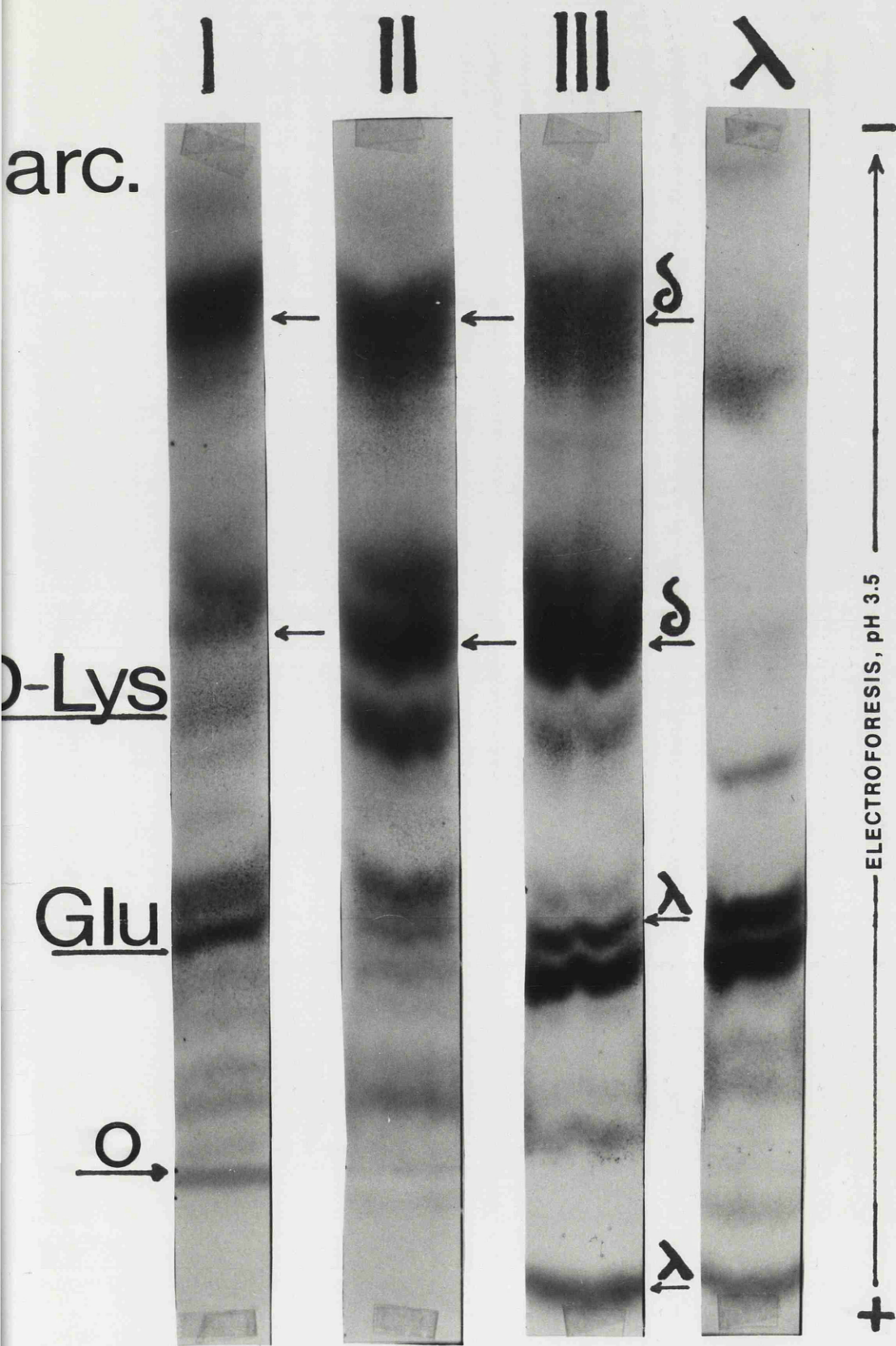


Fig. 12.- EF a pH 3.5 de las fracciones I, II y III, pR-A de la columna de Sephadex G-100

"Chemical Typing" de la IgD

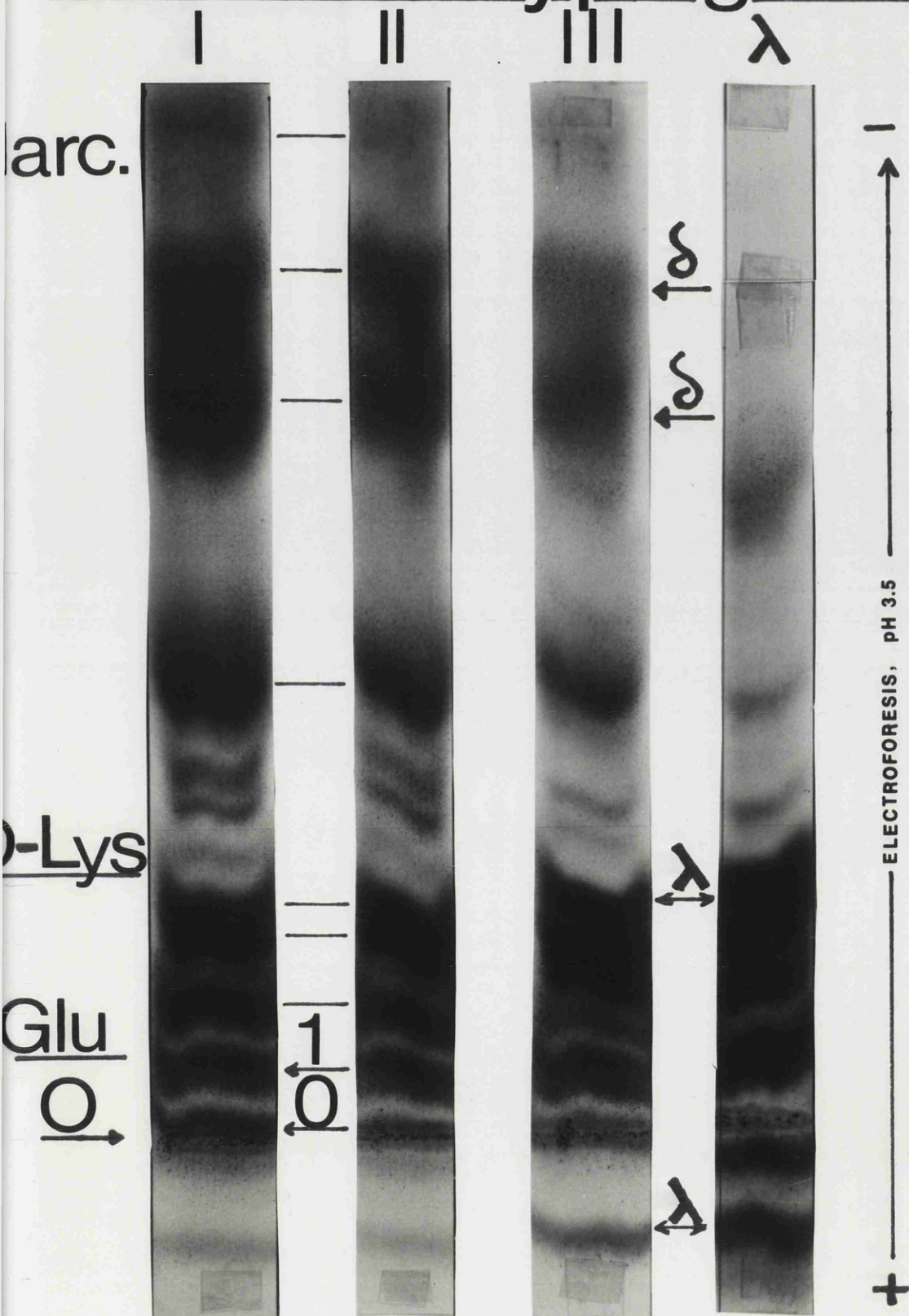


Fig. 13.- EF a pH 3.5 de las fracciones I, II y III, CR-A* de la columna de Sephadex G-100

4.5.- CARACTERIZACION QUIMICA DE LA CADENA PESADA δ .-

4.5.1.- Peso molecular.-

Se llevó a cabo por electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida. 100 μ g de IgD purificada fueron divididos en dos partes, una de las cuales se redujo con 2-Mercaptoetanol y la otra se dejó intacta. La electroforesis se llevó a cabo durante 6 horas y los geles se tiñeron durante 16 hr con una solución de "Connassie blue" al 0.5% , destiñéndose después durante 24-30 hr. La figura 14 muestra la distribución de las proteínas a lo largo del gel; los tubos n^o 1 y 4, corresponden a las proteínas utilizadas como marcadores: Albúmina bovina y Citocromo C en el n^o 1 y Ovalbúmina y Cadena ligera en el 4. El tubo n^o 2 corresponde a la molécula de IgD intacta, que aparece en la parte superior del gel por ser demasiado grande para penetrar en él. El tubo n^o 3 corresponde a la molécula de IgD reducida en presencia de urea. Las dos bandas de mayor intensidad corresponden a las cadenas pesada (δ) y ligera (λ). La banda intermedia corresponde probablemente a algún producto intermedio de la reducción o de la digestión.

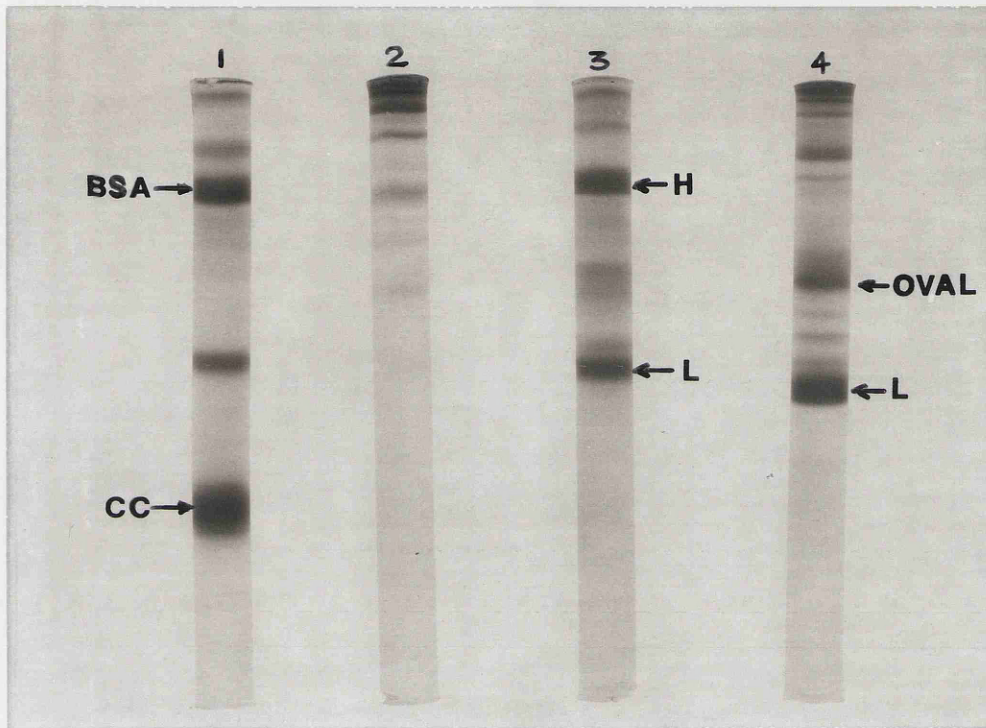


Fig. 14.- Electroforesis en geles de SDS-Poliacrilamida de la IgD intacta (tubo n^o 2) y reducida (tubo n^o 3). Los tubos 1 y 4 contienen los marcadores.

El peso molecular se calculó de acuerdo a la recta de calibración con los marcadores (Fig. 15); se obtuvo un valor de 65.000 daltons para la cadena δ y de 24.000 para la λ . De los estudios de la porción carbohidrato realizados en la IgD (84), se deduce que existe entre un 10 y un 15% de carbohidrato en la molécula completa; si se tiene en cuenta esta contribución al peso molecular, se obtiene un valor de 58.000 daltons para la porción peptídica de la cadena δ .

4.5.2.- Análisis de aminoácidos.-

Fue llevado a cabo en una muestra de 0.5 mg que después de oxidados con ác. per fórmico durante 3 hr, fueron hidrolizados con ác. HCl 6 N durante 24 hr. La tabla IX muestra la composición de aminoácidos obtenida para la cadena pesada δ así como para la molécula completa de IgD, también oxidada. Los valores expresados son la media aritmética de tres muestras por separado. En la tabla se alistan también los resultados obtenidos por otros autores en otras inmunoglobulinas D. Como se observa en la tabla, los valores son bastante parecidos para las diferentes proteínas.



Fig. 15.- Recta de calibración en la Electroforesis en geles de SDS-Poliacrilamida.

TABLA IX. - COMPOSICION DE AMINOACIDOS DE LA IgD
Y DE LA CADENA PESADA δ .-

Aa	IgD			Cadena δ		
	Men	R. 84	R. 79		Men	R. 84
Lys	56.0	72	48	44	22.1	21
His	21.5	30	15	23	8.7	11
Arg	74.6	58	55	53	28.8	23
Asp	92.3	92	123	170	34.0	32
Thr	121.4	118	146	142	44.4	41
Ser	174.7	146	186	166	57.8	46
Glu	175.0	170	205	162	62.3	61
Pro	135.0	122	55	62	50.6	42
Gly	106.5	106	125	144	33.0	32
Ala	132.7	112	125	144	41.7	38
Val ⁺	105.3	102	123	133	36.5	33
Met	15.4	16	20	20	6.5	8
Ile	28.8	32	38	28	10.6	8
Leu	132.7	110	169	162	54.6	40
Tyr ⁺⁺	52.0	50	67	75	10.2	13
Phe	45.1	40	73	65	15.8	11
Trp	-	16	22	22	-	-
Cysa	29.8	-	24	24	4.5	10
P.M.	162x10 ³	155x10 ³	200x10 ³		58x10 ³	50x10 ³

Los valores se expresan en moles de aa/ mol de proteina.

+ Valor determinado en una muestra hidrolizada durante 72 hr.

++ Valor determinado en muestras no oxidadas.

4.5.3.- Determinación del Amino terminal. -

4.5.3.1.- Método del cloruro de dansilo. -

2 mg de cadena pesada δ se hicieron reaccionar con cloruro de dansilo, detectándose después los dansil derivados, por su distribución en cromatografía de capa fina en dos dimensiones. El resultado fue negativo, es decir no se obtuvo ningún aminoácido dansilado, lo cual indicaba que el amino terminal de la cadena δ estaba bloqueado en forma de PCA, como la mayoría de las cadenas pesadas de inmunoglobulinas y las cadenas ligeras λ .

4.5.3.2.- Digestión con Pronasa. -

Con el fin de obtener el aminoácido amino terminal, 20 mg de IgD fueron reducidos completamente y alquilados con ^{14}C -Iodoacético. La digestión con pronasa se llevó a cabo durante 2.5 hr a 37°C y en la proporción 1:10 (w/w). Cuando el digerido se aplicó a la columna de AG-50W-X2, se obtuvo el perfil que se puede apreciar en la figura 16, a. Los tubos n $^{\circ}$ 3, 8 y 13 de esta columna, se liofilizaron e hidrolizaron con ac.HCl 6 N, pa-

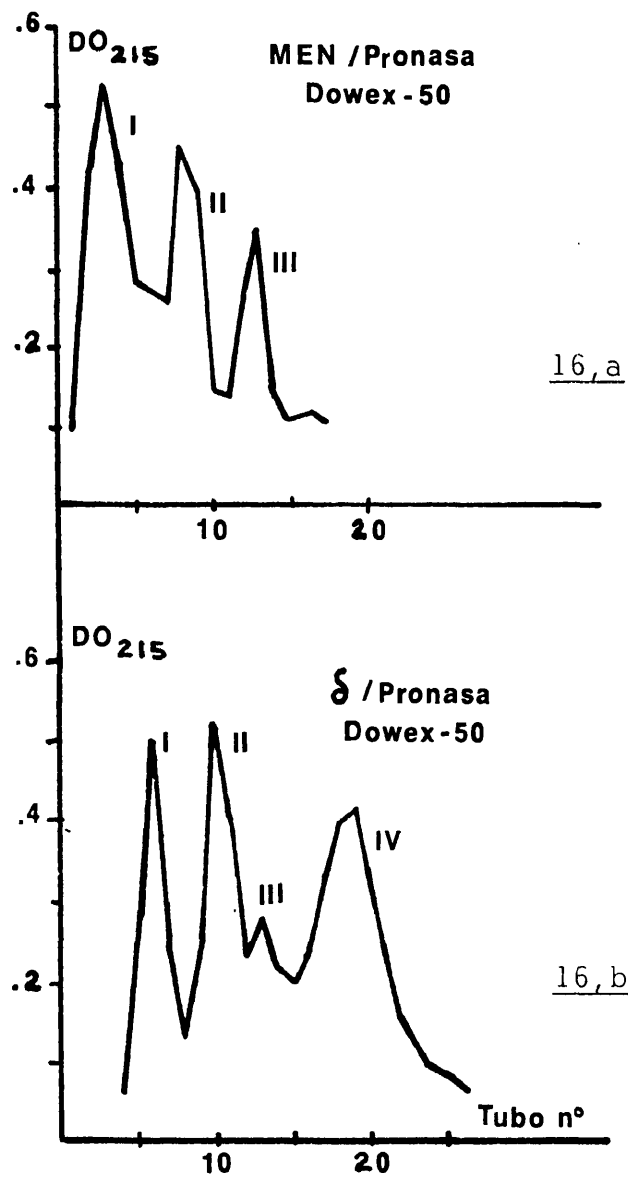


Fig. 16.- Patrón de elución de la columna de AG-50W-X2 de los digeridos con pronasa de la IgD (16,a) y de la cadena δ (16,b).

ra proceder a su análisis. El resultado de éste está expresado en la tabla X. Como se puede observar, el primer pico de la columna contenía el péptido con PCA y el o los péptidos con carbohidrato; el segundo pico contenía el PCA - Val y el tercero, el PCA, ya que el único aminoácido que aparece en el análisis es Glutámico.

Ya que la cadena ligera λ se presenta generalmente con el amino terminal bloqueado, fue necesario confirmar el resultado obtenido de la digestión con pronasa de la molécula completa, repitiendo el experimento con la cadena pesada aislada. 20 mg de cadena δ fueron tratados en las mismas condiciones expuestas para la molécula completa. El patrón de elución de la columna de AG-50W-X2 para este caso, se puede observar en la figura 16, b. Es esencialmente el mismo que el obtenido para la molécula completa de IgD. Como en el caso anterior, se tomaron alícuotas de los tubos n^o 6, 10, 13, y 19 y se analizaron. La tabla XI muestra el resultado de este análisis. Los dos primeros picos corresponden por tanto a la suma del péptido que contiene el PCA y al que contiene

TABLA X. - PEPTIDOS OBTENIDOS POR DIGESTION CON PRONASA DE LA IgD. -

<u>Aminoácido</u>	<u>Dowex # 3</u>	<u>Dowex # 8</u>	<u>Dowex # 13</u>
Asp	0.8		
Thr	1.9		
Ser	2.0		
Glu	2.3	1.1	1.0
Pro	0.7		
Gly	(0.4)		
Ala	1.1		
Val	0.5	0.7	
CHO	+		

Los valores indican moles de aminoácido / mol de péptido.

CHO → Carbohidrato

TABLA XI. - PEPTIDOS OBTENIDOS POR DIGESTION CON
PRONASA DE LA CADENA PESADA δ .-

<u>Aminoácido</u>	<u>Dowex # 6</u>	<u>Dowex # 10</u>	<u>Dowex #13</u>	<u>Dowex #19</u>
Asp	0.8			
Thr	0.9	1.0	1.0	
Ser	2.0	1.0	1.2	
Glu	1.8	2.1		1.0
Pro	1.0	1.5		
Gly	1.0			
Ala	1.6	1.1		
Val	0.7	0.8	0.5	0.6
CHO	+	++	+	

Los valores expresan moles de aminoácido / mol de péptido.

el carbohidrato. El tercero es fundamentalmente el péptido con carbohidrato y el cuarto corresponde al péptido que contiene el PCA, que como en el caso de la IgD, es PCA-Val. Este es por tanto el amino terminal de la cadena δ , siendo ésta la secuencia correspondiente a los subgrupos I y II de región variable. La IgD podría corresponder por tanto a uno de estos subgrupos.

Con el fin de estudiar en más detalle los péptidos que contenían el CHO, los picos procedentes de la columna de Dowex fueron aplicados a papel, para llevar a cabo una EF a pH 3.5. Esta mostró que las movilidades de los péptidos eran muy pequeñas, como sucede siempre en los péptidos que contienen CHO.

El péptido que hemos llamado Dowex #3 (pg.134) correspondiente al 1^o pico de la columna, se desdobló en dos, que llamamos I_a y I_b. El llamado Dowex #8, correspondiente al pico II de la columna, se desdobló también en II_a y II_b.

Respecto a los péptidos procedentes de la cadena δ , el Dowex #6 (pico I de la columna) dió un solo péptido: δ_I ; lo mismo sucedió con el dowex #10 (pico II de la columna), que dió lugar al δ_{II} .

Los peptidos δ_I , δ_{II} y I_a parecían idénticos en el papel. El péptido Dow #13 dió lugar a δ_{13a} y δ_{13b} , que resultaron ser idénticos.

La composición de aa era muy similar en todos ellos y se expresa en la tabla XI; hay sin embargo diferencias en la porción CHO; mientras que los péptidos I_b , δ_I y δ_{II} parecen tener Glucosamina como componente principal, el I_a tiene Glucosamina y Galactosamina, estando ésta en mayor proporción.

Los péptidos II_a y II_b resultaron idénticos en el análisis de aa y no contenían CHO. Los péptidos 13_a y 13_b tenían también la misma composición de aa y contenían glucosamina.

4.6.- DIGESTION ENZIMATICA DE LA CADENA δ .

4.6.1.- Elección de la enzima.

2 mg de cadena δ fueron digeridos paralelamente con pepsina y tripsina, en experimentos separados. El digerido se aplicó a papel Whatman 3MM y se corrió una EF a pH 3.5 durante 1 hr. La figura 17 muestra el resultado obtenido con ámbas enzimas; la pepsina daba lugar a péptidos que corrían bien en el papel, mientras que la tripsina producía péptidos demasiado grandes para poder moverse. Se eligió por tanto la pepsina para la digestión de la cadena δ .

Cadena δ

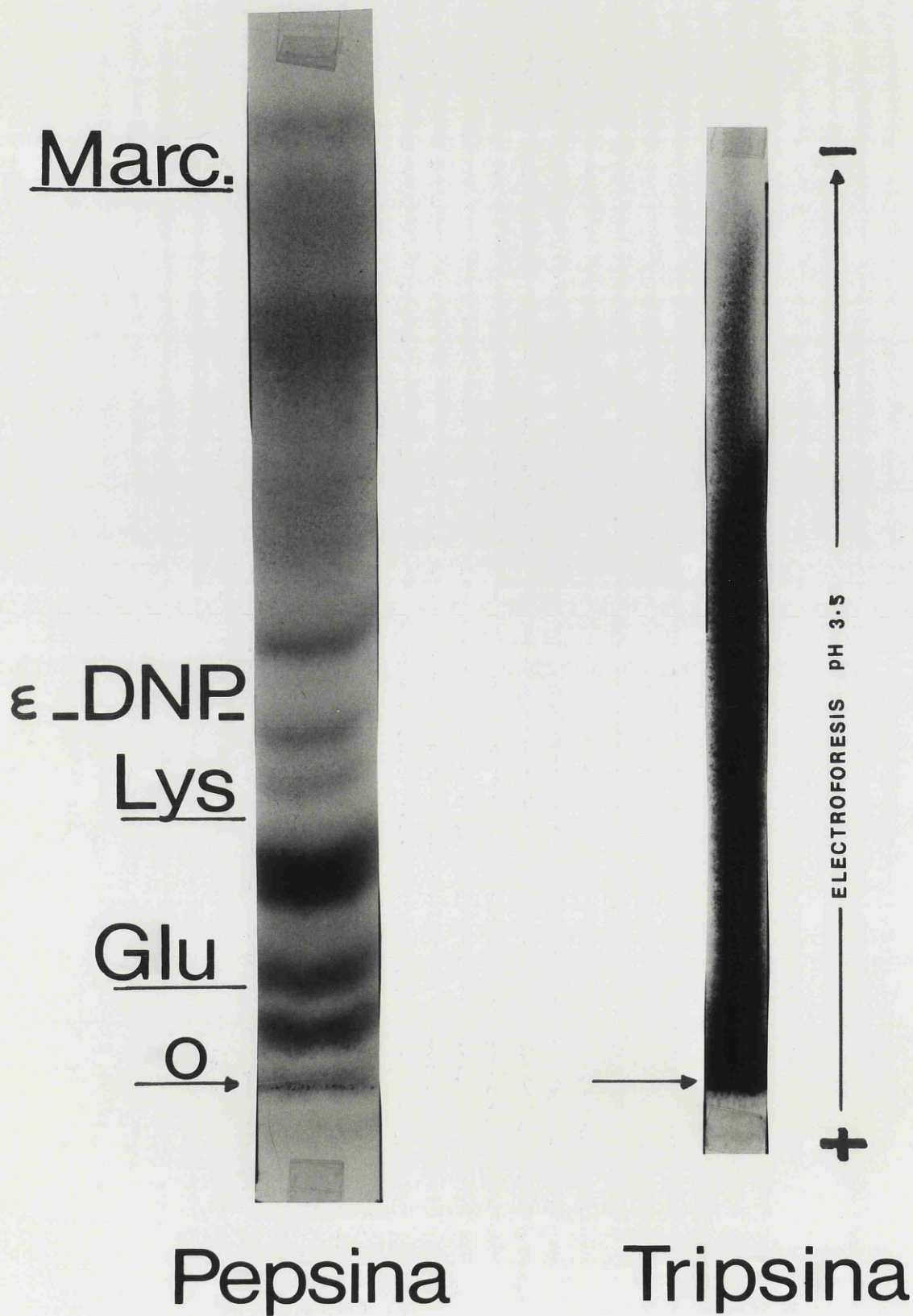


Fig. 17.- EF a pH 3.5 de la cadena δ previamente digerida con tripsina y con pepsina.

TABLA XI' .- PEPTIDOS QUE CONTIENEN CHO EN LA
IgD Y EN LA CADENA PESADA δ .-

<u>Aminoácido</u>	<u>I_a</u>	<u>I_b</u>	<u>II_a</u>	<u>II_b</u>	<u>δ_I</u>	<u>δ_{II}</u>	<u>13_a</u>	<u>13_b</u>
Asp		0.6			0.7			
Thr	0.7	0.6						
Ser	1.2	1.1	1.1	1.2	2.2	2.1	1.0	1.0
Glu	1.1				0.9	0.8		
Pro	0.9	0.7	+*	+*	0.7	+*	+*	+*
Gly			0.9	0.9	0.9	0.6	0.8	0.8
Ala	0.8				0.8			
Val	0.7	+*	+*	+*	+*			
CHO	++	+	-	-	+	+	+	+

+* → Valor no determinado cuantitativamente por ser muy pequeño, pero detectado en el análisis.

4.6.2.- Digestión de la cadena δ con Pepsina.-

178 mg de cadena δ pura, fueron reducidos completamente y alquilados con ac. ^{14}C -Iodoacético. Después de dializar, la muestra se liofilizó y digirió con pepsina (1:50) (w/w) a 37° durante 6 hr. El digerido se aplicó a papel Whatman 3MM (en 4 papeles) y se llevó a cabo una electroforesis a pH 3.5 durante 1 hr 15 min. Los péptidos radioactivos se revelaron por autoradiografía (24 hr). Se marcaron entonces sobre el papel para proceder a su purificación. El procedimiento que se utilizó fue el siguiente:

- 1.- Electroforesis a pH 6.5
- 2.- Oxidación y Electroforesis a pH 3.5 de nuevo
- 3.- Reoxidación y electroforesis a pH 2.1

Los peptidos se volvieron a oxidar antes de la electroforesis a pH 2.1, debido a la reducción espontánea que ocurre siempre con los residuos de cisteína (reacciones de oxidación-reducción de los grupos SH o sus diferentes estados de oxidación).

4.7. - PEPTIDOS RADIOACTIVOS OBTENIDOS DE LA CADENA δ -

Después de correr las electroforesis a los diferentes pH, los péptidos se eluyeron del papel y se tomaron diferentes alicuotas (dependiendo de la intensidad de la autoradiografía) para proceder a su análisis y determinación del aminoterminal y secuencia en aquellos casos en que el péptido se obtuvo en cantidad suficiente. Los péptidos que se obtuvieron en este experimento, fueron los siguientes:

Péptido P-0-a₂

Este péptido procedía del P-0 de la electroforesis a pH 3.5 (los péptidos radioactivos se numeraron de polo + a - del 1 al 8 en la primera electroforesis). A pH 6.5, este péptido se desdobló en dos : P-0-b y P-0-a ; después de oxidar y correr la EF a pH 3.5, el P-0-a se desdobló en P-0-a₁ y P-0-a₂ , sin embargo, cuando estos péptidos se reoxidaron y corrieron a pH 2.1, sus movilidades eran idénticas, indicando que probablemente es un solo péptido en dos diferentes estados de oxidación. La com-

posición de aminoácidos de este péptido era : CMCys_{0.6} Asp_{1.9}
Thr_{0.7} Ser_{2.0} Val_{0.9} y el amino terminal era Val.

Péptido P-0-b.-

Este péptido se separó del P-0-a en la electroforesis a pH 6.5. Su composición era: CMCys_{0.6} Glu_{1.2} Leu ; el amino terminal dió Leu y la secuencia era: Leu-Cys-Glu.

Péptido P-1-b.-

Este péptido procedía del P-1, que después de la oxidación se desdobló en P-1-a y P-1-b. Sin embargo estos dos péptidos presentaban la misma movilidad cuando se corrieron a pH 2.1 después de reoxidados, indicando como en el caso anterior que se trataba de un solo péptido. Su composición era: CMCys_{.6} Thr Phe_{1.1} ; el amino terminal era Thr y la secuencia: Thr-Cys-Phe.

Péptido P-2.-

Este péptido fue purificado por el mismo método que el resto, no desdoblándose a ningún pH. Comparado con los demás,

este péptido presentaba una radioactividad (a juzgar por la intensidad de la autoradiografía) mucho mayor que el resto. El análisis de aminoácidos mostró la composición: CMCys_{.7} Ala_{.8} Leu ; cuando se hizo la determinación del amino terminal, se encontraron Ala y Leu como aminoácidos dansilados, siendo la intensidad de Ala doble de la de Leu. La secuencia de este péptido era: Ala-Cys-Leu, pero en el tercer paso de la degradación de Edman, aparecían de nuevo los dos aminoácidos Ala y Leu, aunque ahora en proporción inversa, siendo más intensa la mancha correspondiente a Leu. Esto parecía indicar que se trataba en realidad de dos péptidos de idéntica composición pero de diferente secuencia que en un caso sería Ala-Cys-Leu y en el otro: Leu-Cys-Ala.

Péptido P-7-a.-

Este péptido procedente del P-7 daba como composición de aminoácidos: Lys CMCys_{.7} Tyr_{.8} y el amino terminal mostró Tyr. No se pudo determinar la secuencia debido a la escasa cantidad en que se obtuvo.

Péptido P-7-b.-

Este peptido procedia tambien del P-7 de la EF a pH 3.5; se separo del P-7-a , despues de la oxidación y EF de nuevo a pH 3.5. Su composición era: His_{.9} CmCys_{.3} Thr_{1.7} Ser_{1.1} Glu₂ Pro_{2.2} Gly Val_{.8} Leu ; el amino terminal era Thr; no se determinó la secuencia en este péptido porque era el mismo que el peptido δ_2 obtenido y caracterizado en el "chemical typing" de la IgD; éste es por tanto, el péptido correspondiente al enlace inter cadenas pesadas.

Péptido P-8.-

El análisis de aminoácidos de este péptido, mostró la composición: Arg_{.6} CmCys_{.5} Ser Gly_{1.2} Ile_{.8} ; fue obtenido en muy pequeña cantidad por lo que hubo que utilizar todo para el análisis de aminoácidos, sin embargo , por composición y movilidad, parece corresponder al péptido δ_1 del "chemical typing", siendo por tanto, el enlace inter cadenas pesada-ligera.

El péptido denominado P-6 en la primera electroforesis, resultó ser igual al P-7; los péptidos P-3, P-4 y P-5, se obtuvieron en muy pequeña cantidad y los análisis de aminoácidos aparecían contaminados, no siendo posible por tanto sacar ninguna conclusión definitiva sobre su composición. Una explicación de su bajo rendimiento podría ser el que son productos derivados de otros péptidos. (El mismo péptido se rompe por diferente sitio).

En la tabla XII se expresan los péptidos obtenidos de la digestión enzimática de la cadena pesada δ . La posible localización de estos péptidos en la cadena polipeptídica, se comenta en la Discusión.

4.8.- DIGESTION ENZIMATICA DE LA CADENA LIGERA λ . -

84 mg de cadena λ de la proteína IgD (pico III de la columna de Sephadex G-100), que contenían un fragmento derivado de la cadena pesada, fueron reducidos completamente y digeridos con pepsina en las mismas condiciones que las descritas

TABLA XII. - PEPTIDOS CARBOXIMETILADOS PROCEDENTES DEL
DIGERIDO PEPTICO DE LA CADENA PESADA δ .-

<u>Aa</u>	<u>P-0a₂</u>	<u>P-0b</u>	<u>P-1b</u>	<u>P-2</u>	<u>P-7a</u>	<u>P-7b</u>	<u>P-8</u>
Lys					1.0		
His						0.9	
Arg							0.6
CmCys	0.6	0.6	0.6	0.7	0.7	0.3	0.5
Asp	1.9						
Thr	0.7		1.0			1.7	
Ser	2.0					1.1	1.0
Glu		1.2				2.0	
Pro						2.2	
Gly						1.0	1.2
Ala				0.8			
Val	0.9					0.8	
Ile							0.8
Leu		1.0		1.0		1.0	
Tyr					0.8		
Phe			1.1				
Mov. (6.5)	0.62	0.81	0.52	0.55	N	0.20	N

Las movilidades de los péptidos se midieron a pH 6.5.

N→ neutro a ese pH.

Los valores expresan moles de aa/ mol de péptido

para la cadena δ . El digerido fue aplicado a papel Whatman 3MM y se procedió como en el caso anterior, a correr diferentes EF con el fin de purificar los péptidos radioactivos. En este caso se incluyó también la cromatografía en papel, en el solvente n-Butanol/Ac.Acético/H₂O. Los péptidos se eluyeron del papel y se analizaron. Su composición se puede ver en la tabla XIII; no se procedió a su secuencia por ser posible localizarlos por composición, en la cadena λ . En la tabla XIV se expone esta secuencia, tomada de otras cadenas λ , y la localización de los péptidos en la cadena.

4.9.- OBTENCION DEL FRAGMENTO Fc DE LA IgD.-

4.9.1.- Digestión de la IgD con Tripsina.-

360 mg de IgD procedentes de la fracción II de la electroforesis en bloque de almidón, puros por inmunodifusión, fueron disueltos en 18 ml de tampon Tris/HCl 0.05 M pH 8.0 y digeridos con tripsina durante 4 min. a 56°C. La reacción se paró añadiendo el inhibidor de tripsina "soy bean" y la solución

TABLA XIII. - PEPTIDOS CARBOXIMETILADOS PROCEDENTES DEL
DIGERIDO PEPTICO DE LA CADENA LIGERA λ . -

<u>Aa</u>	<u>A-12</u>	<u>A-43</u>	<u>A-51</u>	<u>A-52</u>	<u>A-61</u>
CmCys	0.4	0.8	0.4	0.4	0.5
Asp					0.8
Thr					0.7
Ser	1.0		1.7		2.9
Glu			1.2	1.0	
Gly					2.0
Ala				0.9	
Val		0.7			
Ile					0.8
Leu		2.0			
Tyr			0.9	1.0	
Mov. (6.5)	0.65	0.46	0.49	0.49	-0.19

Como en el caso de la cadena pesada, las movilidades de los péptidos se midieron a pH 6.5.

Los valores expresan moles de aa/ mol de péptido

TABLA XIV. - PEPTIDOS CARBOXIMETILADOS PROCEDENTES DEL DIGERIDO PEPTICO
DE LA CADENA LIGERA A. -

<u>Péptido</u>	<u>Secuencia</u>	<u>Función</u>
A-12	²¹⁰ Cys-Ser	Enlace H-L
A-43	¹³³ Leu- Val-Cys-Leu	1 ^a Cys en la región constante
A-51	¹⁹² Ser-Tyr-Ser-Cys-Gln	2 ^a Cys en la región constante
A-52	⁸⁶ Tyr-Cys-Gln-Ala	2 ^a Cys en la región variable
A-61	²² Ile-Ser-Cys-Ser-Gly-Gly-Ser-Thr-Asn	1 ^a Cys en la región variable

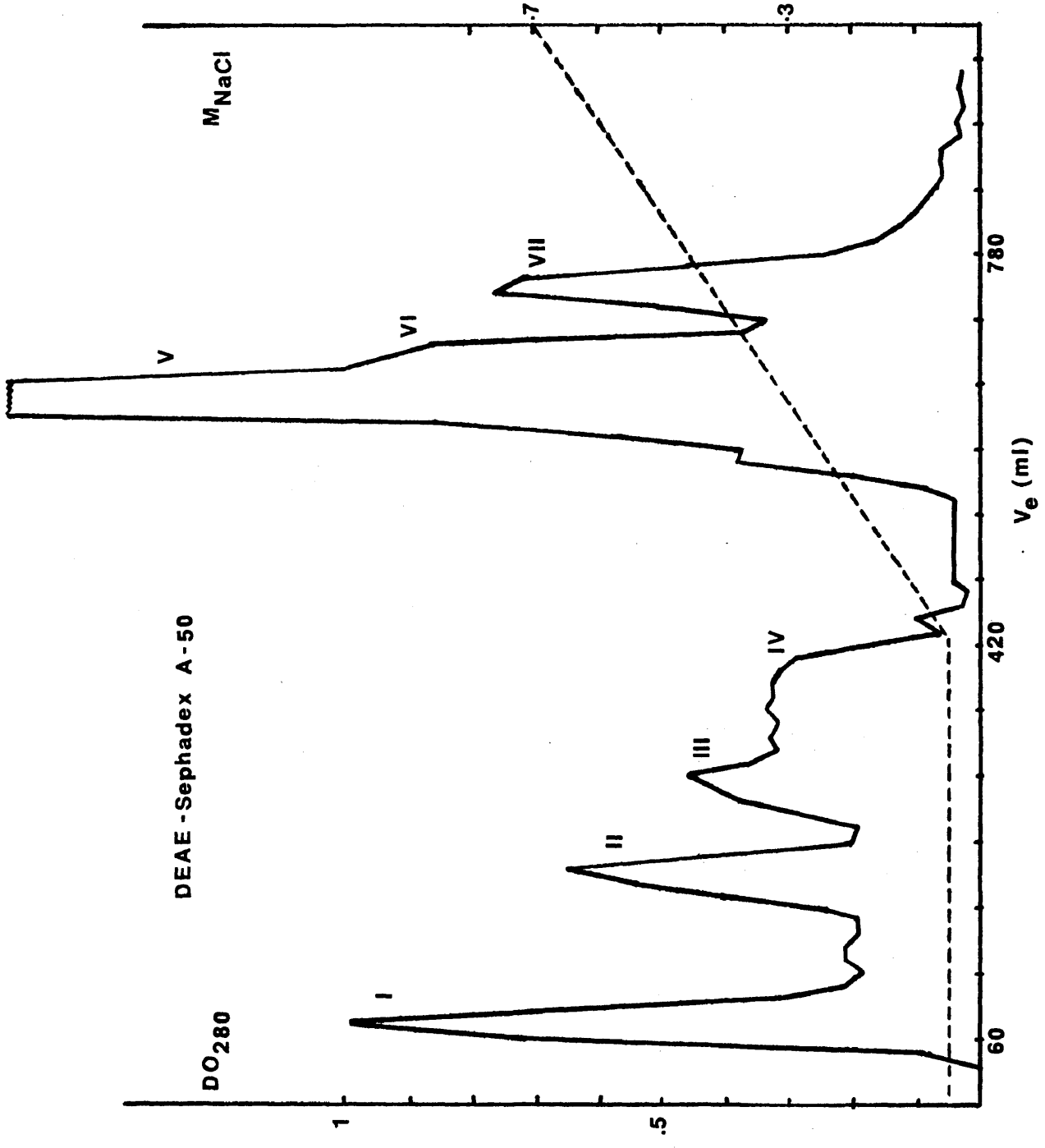
se aplicó a una columna de DEAE-Sephadex (2.4 x 40 cm), equilibrada con el mismo tampón Tris/HCl. Después de eluir 420 ml de este tampón, se aplicó un gradiente de molaridad en el que el tampón inicial, era este mismo tampon Tris/HCl 0.05 M pH 8.0 y el final era, este mismo tampón al que se había añadido NaCl 0.7 M. Se eluyeron 500 ml de este gradiente, recogiendo fracciones de 6 ml que se leyeron en un espectrofotómetro a 280 nm. La figura 18 muestra el perfil obtenido en esta columna.

4.9.2.- Análisis del digerido de IgD.-

4.9.2.1.- Inmunoelectroforesis.-

Todas las fracciones procedentes de la columna de DEAE-Sephadex, fueron analizadas por inmunoelectroforesis frente al antisuero anti-IgD y el anti- λ . La figura 19 muestra el resultado de este análisis. Como se puede observar, los picos I y II de la columna, reaccionan con ámbos antisueros, indicando que probablemente corresponden a fragmentos parecidos al Fab, ya que la movilidad electroforética, es parecida también a la de este fragmento. El pico III, da igualmente reacción con ámbos an-

Fig. 18.- Cromatografía DEAE-Seph. d digerido tripti de la IgD.



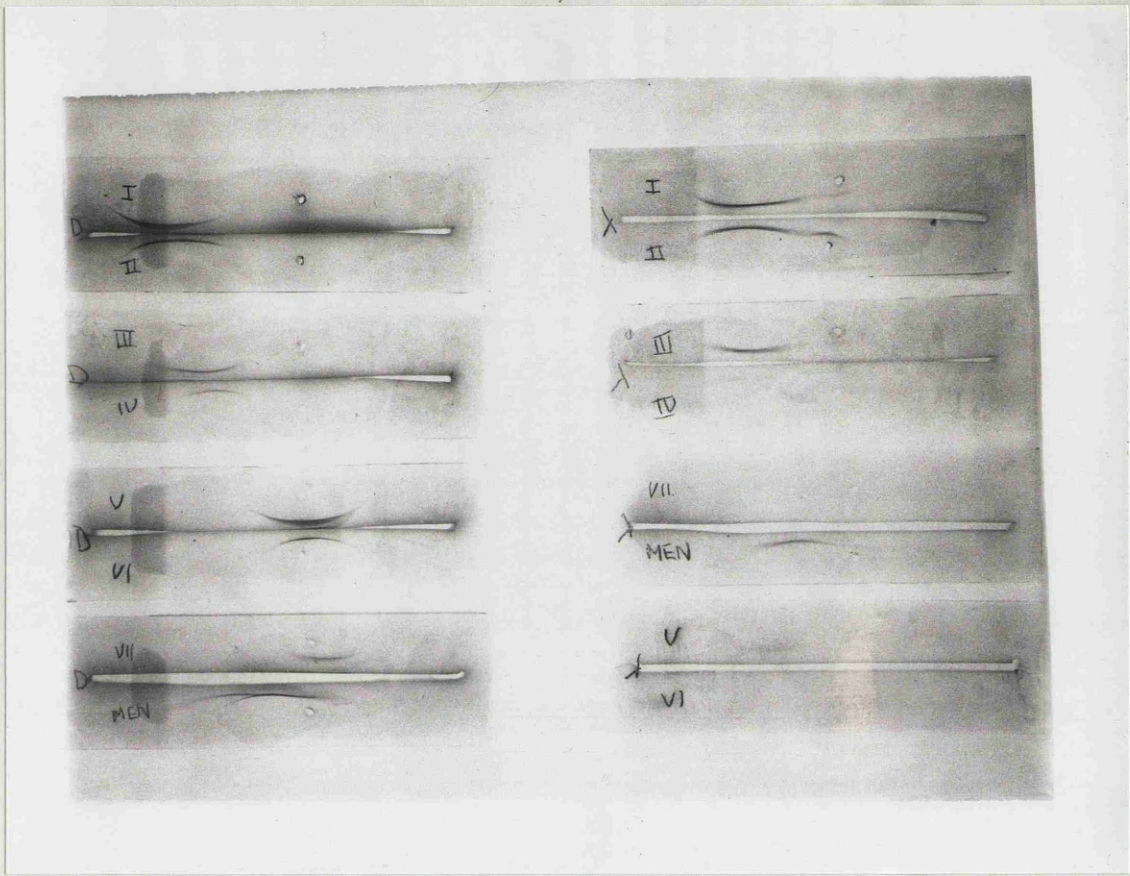


Fig. 19.- Inmunoelectroforesis de las fracciones obtenidas de la columna de DEAE-Sephadex. Los antisueros utilizados son: D → anti-IgD; λ → Anti-λ; MEN corresponde a la proteína IgD sin previo tratamiento enzimático.

tisueros, aunque su movilidad es mas anódica y podría ser un fragmento derivado del Fab. El pico IV no mostraba reacción con el antisuero anti- λ y por la movilidad, podría corresponder al Fd. Los picos V y VI reaccionaban sólo con el anti-IgD, indicando que debían corresponder al fragmento Fc; la movilidad electroforética era también la propia de este fragmento. El pico VII es probablemente algún fragmento relacionado con el Fc, ya que tampoco reacciona con el anti- λ .

4.9.2.2.- Electroforesis en geles de SDS-Poliacrilamida. -

Cuando estas fracciones se corrieron en geles de SDS-poliacrilamida, se observó lo siguiente: La fracción I sin reducir, daba como principal banda, una correspondiente a un peso molecular de 44.000 daltons y que probablemente corresponde al fragmento Fab. Cuando se reducía, esta banda se doblaba en dos de pesos moleculares 28.000 y 23.000 respectivamente, que deben corresponder al Fd y a la cadena ligera λ .

Las fracciones II y III aparecían semejantes en el gel, con algunas bandas en común con la fracción I. Al igual que ésta

contenían una banda de PM de 40.000, que se convertía en 28.000 después de la reducción, y a una serie de bandas de PM mas pequeño. La fracción IV, contenía fundamentalmente una banda de PM alto: 65.000 que daba lugar por reducción a una de 27.000 y otra de 18.000, perdiéndose probablemente el resto de los fragmentos por ser mas pequeños. Los geles correspondientes a estas fracciones, están representados en la Figura 20. El peso molecular se calculó de acuerdo a la recta de calibración (Fig. 21) utilizando como marcadores: Albúmina bovina, Citocromo C, Ovalbúmina y cadena ligera.

La fraccion V mostraba una banda de un PM de 64.000 que se convertía en 34.000 despues de la reducción; este fragmento por tanto correspondía al Fc intacto, es decir, la tripsina rompe a la izquierda del puente disulfuro intercatenario. En el gel correspondiente al Fc reducido, se pueden observar dos bandas muy próximas (Figura 22) y de intensidad muy parecida, lo que indica que la digestión con tripsina ha sido heterogénea o que existía un fragmento anterior a la digestión, relacionado con el Fc, pero de un peso molecular ligeramente diferente; esta hipótesis se confirmó después por determinación del amino ter-

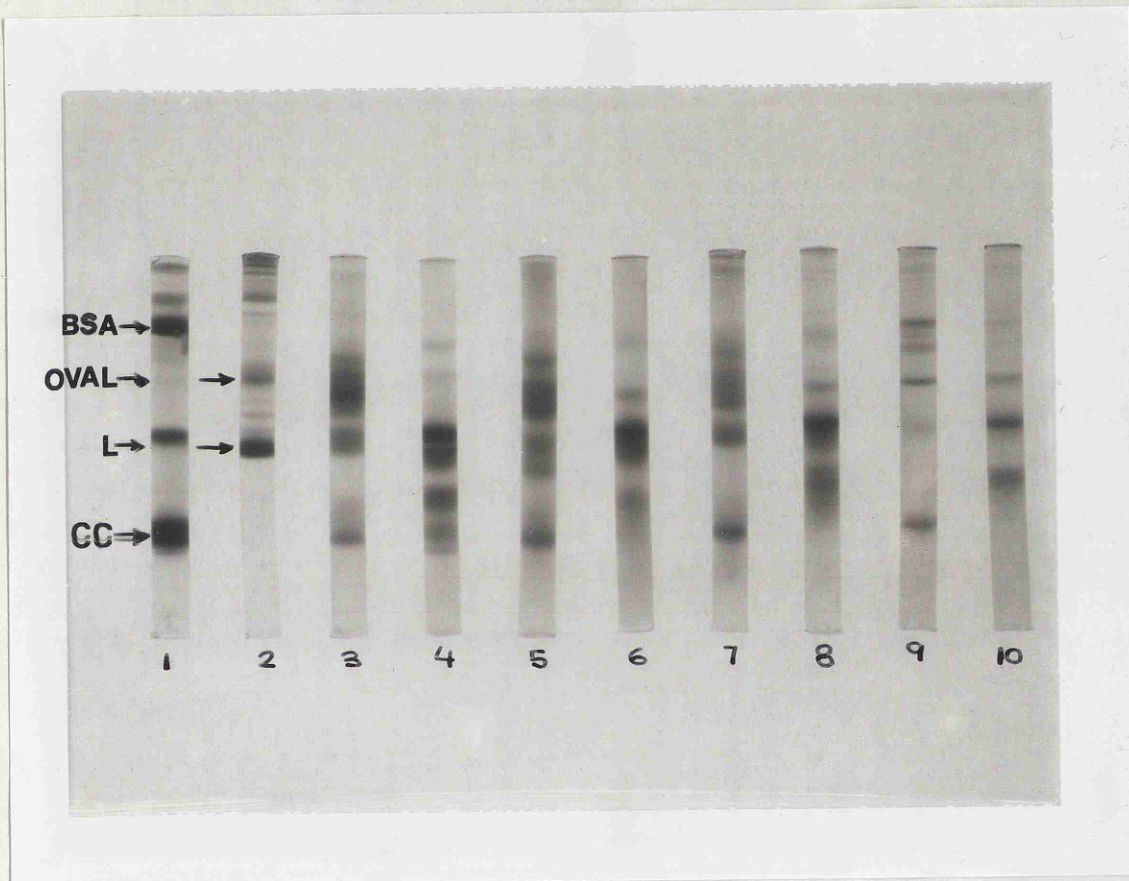


Fig.20.- Electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida de las fracciones procedentes de la columna de DEAE-Sephadex. Los tubos 1 y 2 corresponden a los marcadores: BSA y Cit.C en el 1, Oval y cadena L en el 2. Tubos 3 y 4: Fracción I intacta y reducida; 5 y 6, Fracción II; 7 y 8, Fracción III; 9 y 10, Fracción IV.

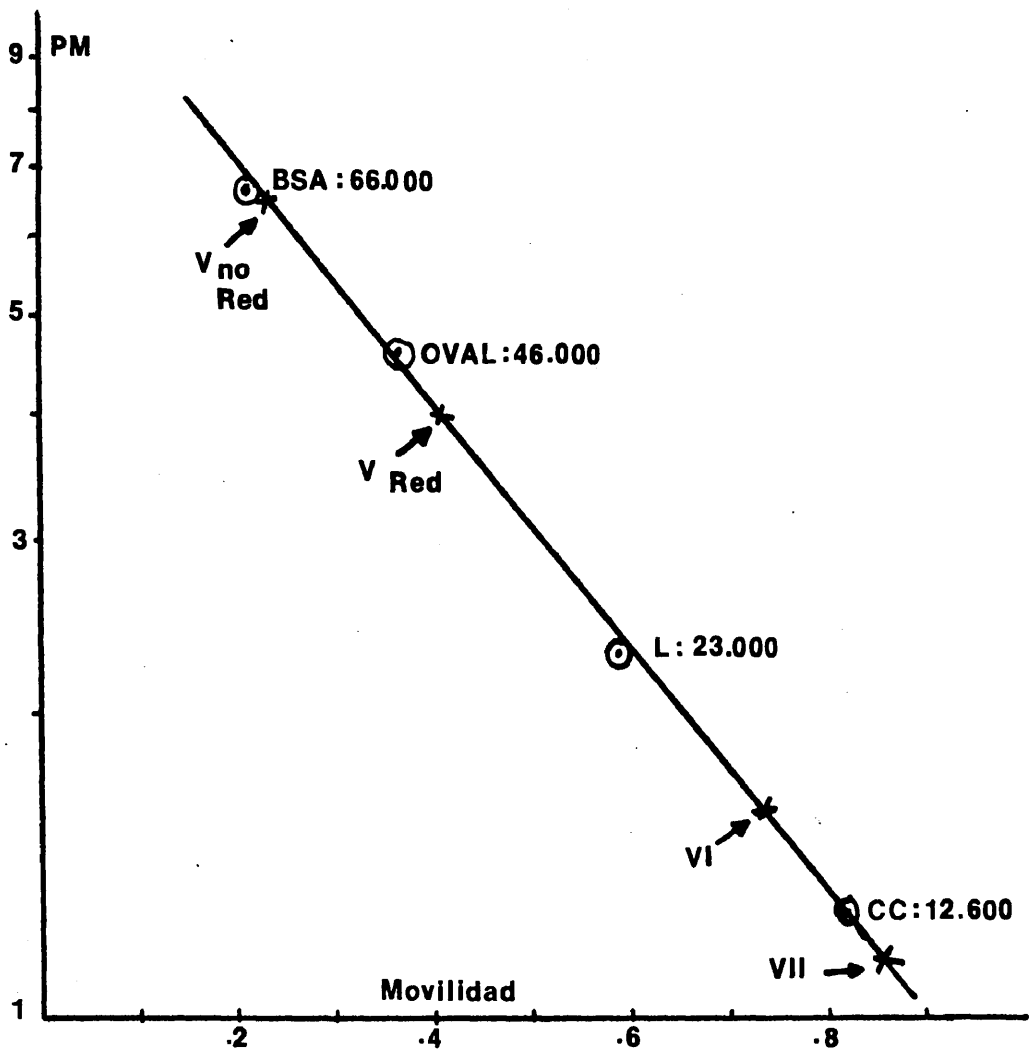


Fig. 21.- Recta de calibración en la Electroforesis en geles de SDS-Poliacrilamida.

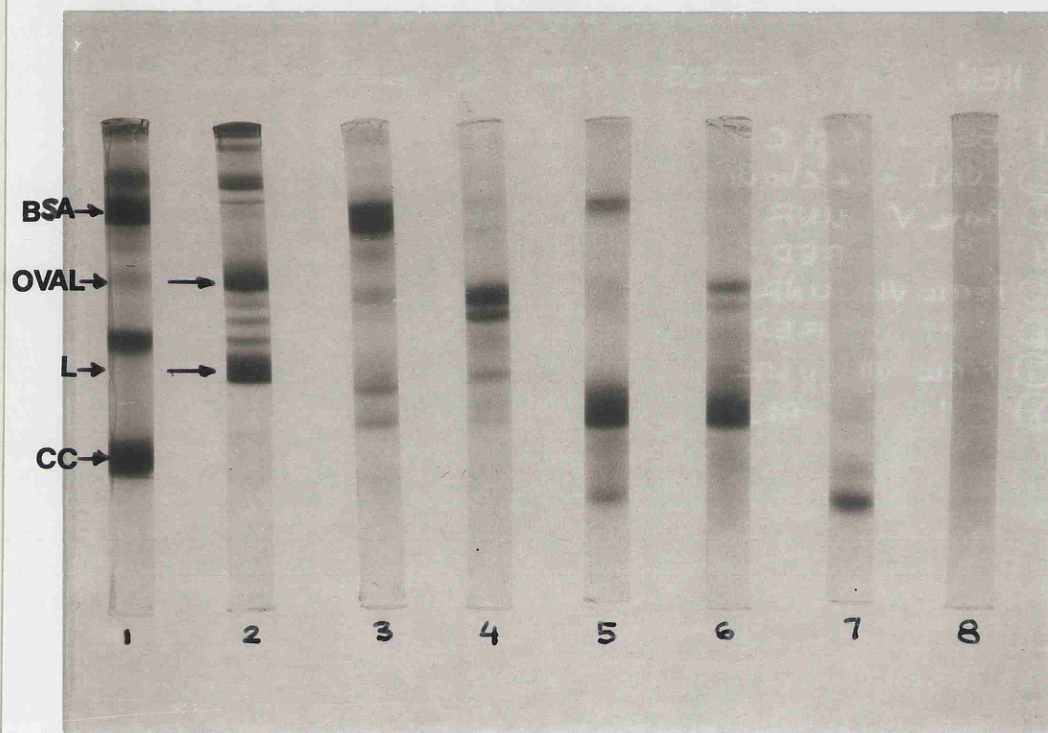


Fig. 22.- Electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida de las fracciones procedentes de la columna de DEAE-Sephadex (cont.). Tubos 1 y 2, marcadores; 3 y 4, Fracción V, intacta y reducida; 5 y 6, Fracción VI; 7 y 8, Fracción VII.

minal del fragmento Fc.

Las fracciones VI y VII aparecían como subfragmentos derivados del Fc. En el gel correspondiente al pico VI, se puede apreciar la misma banda del Fc y además otra muy intensa correspondiente a un peso molecular de 13.000, que no se afecta por la reducción. La fracción VII correspondía a una única banda de pequeño peso molecular (< 10.000) que desaparecía del gel después de la reducción. En la Fig. 22 se pueden apreciar los geles correspondientes a estas fracciones.

4.9.2.3.- Determinación del Amino terminal. -

El análisis del amino terminal por el método del cloruro de dansilo de las fracciones procedentes de la cromatografía en DEAE-Sephadex, mostró los siguientes resultados:

El pico I daba un amino terminal negativo, con una mancha muy débil de Alanina, que probablemente correspondía a alguna pequeña contaminación; este fragmento parecía corresponder por tanto al Fab, cuyo N-terminal está bloqueado formando PCA. Los picos II y IV daban Alanina como amino terminal; el pi-

co III daba Alanina como principal amino terminal, pero aparecía también Ac. Aspártico como aa dansilado.

El pico V mostraba dos amino terminales: Thr y Ala, siendo las dos manchas de una intensidad parecida. Este fragmento parecía corresponder por tanto al Fc (cuyo N-terminal es Thr) (158) y a algún otro fragmento procedente del Fc y de peso molecular más pequeño, demostrado por su comportamiento en geles de SDS-poliacrilamida.

El pico VI dió un amino terminal heterogéneo, con Thr y Val, como principales aminoácidos dansilados, que deben corresponder a contaminaciones procedentes de los picos adyacentes de la cromatografía. El pico VII daba como principal N-terminal, Valina, apareciendo también ligeras contaminaciones.

En la tabla XV se resumen los aminoácidos dansilados obtenidos en este análisis. Las intensidades de las manchas se expresan en n^o de cruces (+).

TABLA XV. - AMINO TERMINAL DE LAS FRACCIONES PROCEDENTES DE LA
CROMATOGRAFIA EN DEAE-SEPHADEX. -

<u>Fracción</u>	<u>Amino terminal</u>
I	Negativo (o Ala +)
II	Ala ++
III	Ala +++ Asp ++
IV	Ala ++
V	Thr +++ Ala ++++
VI	Thr + Val +
VII	Val +++

4.10.- CARACTERIZACION DE LOS PICOS V, VI Y VII DE LA CROMATOGRAFIA EN DEAE-SEPHADEX. -

Por ser estos tres picos los relacionados con el fragmento Fc de la IgD, se procedió a una mayor caracterización de ellos, por medio de diferentes análisis.

4.10.1.- Caracterización del pico V. -

4.10.1.1.- Análisis de Aminoácidos. -

El pico V (Fragmento Fc de la IgD), se sometió a un análisis de aminoácidos; para ello se oxidó primero con ac. per-
fórmico, hidrolizándose después con ac. HCl 6 N. Se tomaron dos
alícuotas por separado de 0.5 mg cada una, hidrolizándose du-
rante 24 y 72 hr. respectivamente, con el fin de obtener un valor
más exacto para la Valina. Los cálculos se hicieron por triplicado
en tres diferentes análisis y la media de ellos, está expresada en
la tabla XVI.

4.10.1.2.- Determinación del amino terminal. -

Se ha explicado ya que el N-terminal de esta fracción

TABLA XVI. - COMPOSICION DE AMINOACIDOS DEL FRAGMENTO
Fc DE LA IgD. -

<u>Aa</u>	<u># 1</u>	<u># 2</u>	<u># 3</u>	<u>Media</u>
Lys	7.51	8.1	7.30	7.63
His	5.61	5.3	5.55	5.48
Arg	11.01	10.3	10.64	10.65
Cysa	6.56	6.6	6.37	6.51
Asp	19.34	19.7	19.42	19.48
Thr	21.64	21.9	21.81	21.78
Ser	27.14	28.5	26.77	27.47
Glu	29.40	30.5	29.69	29.86
Pro	26.21	26.6	21.63	24.81
Gly	16.95	16.9	17.00	16.95
Ala	23.77	24.79	24.17	24.24
Val ⁺	-	-	-	21.2
Met	2.87	2.1	2.82	2.59
Ile	4.98	3.8	4.8	4.52
Leu	27.15	27.6	26.84	27.19
Tyr	5.14	4.1	5.51	4.91
Phe	6.98	9.1	6.82	7.63

Los valores expresan moles de aa/ mol de proteína

+ La valina se determinó en una muestra hidrolizada 72 hr.

Peso molecular tomado para el Fc : 29.000 (32.000 - 7% de CHO)

aparecía heterogéneo, con Thr y Ala como aminoácidos dansilados, lo cual indicaba la presencia de al menos dos cadenas polipeptídicas de diferente tamaño. Se utilizaron 2 mg de muestra para este análisis.

4.10.1.3.- Secuencia del extremo N-terminal del fragmento Fc.-

6 mg de fragmento Fc fueron reducidos completamente en presencia de guanidina y alquilados con ^{14}C -Iodoacético. Después de pasarlos por una columna de Sephadex G-25 en ác. Acético 0.1 M, con el fin de eliminar las sales y la guanidina, se introdujeron en el secuenciador para proceder a la determinación de su secuencia.

Todos los residuos obtenidos del secuenciador, fueron hidrolizados con ác. HI y aplicados al analizador de aminoácidos. La secuencia aparecía heterogénea y sólo se procedió a la hidrólisis de los primeros 12 residuos. La secuencia principal que se encontró fue:

Thr-Pro-Glu-Cys-Pro-Ser-His-Thr-Glx-Pro-Leu-Gly

que coincide con la publicada para el extremo N-terminal de este fragmento (158); hay una secuencia secundaria que parece ser:

Ala-Glx-Ala-Ser-Ser-Glu-Pro-Ala-Ala-Glx-Pro-Gln

sin embargo, debido a la presencia de heterogeneidad, esta secuencia tiene que ser confirmada en una preparación pura; para nuestros propósitos, que eran estudiar la secuencia del Fc, no interesó profundizar más en este otro fragmento.

4.10.2.- Caracterización del pico VI.-

Esta fracción parecía contaminada por análisis del amino terminal, por lo que se aplicó a una columna de Sephadex G-100 en ac. Fórmico al 5%, para mayor purificación. Esta columna fue previamente calibrada con una mezcla que contenía: Aldolasa (PM 160.000), Ovalbúmina (PM 45.000), Cadena L (PM 23.000), Citocromo C (PM 12.600) y ϵ -DNP-Lys. La gráfica correspondiente a esta calibración, se expresa en la Figura 23. El pico I de esta gráfica, debe corresponder a la aldolasa; el II, a la ovalbúmina; el III a la cadena ligera; el IV, al citocromo C y el último a la ϵ -DNP-Lys, que marca el final de la columna.

15 mg del pico VI de la columna de DEAE-Sephadex,

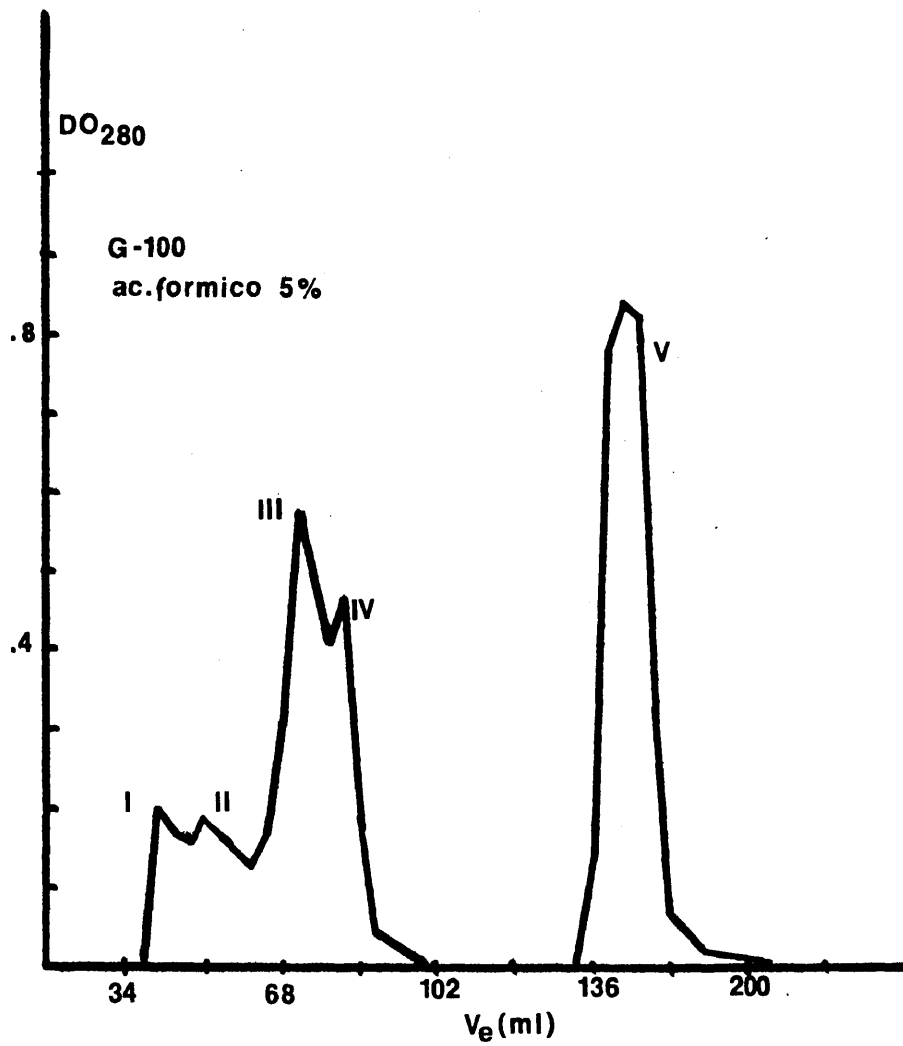


Fig. 23.- Calibración de la columna de Sephadex G-100 en ac. fórmico al 5%.

fueron aplicados a esta columna de Sephadex G-100 (1.5 x 90 cm), eluyéndose a un flujo constante de 10 ml/hr; las fracciones, de 2 ml, se leyeron en un espectrofotómetro a 280 nm. La figura 24, a muestra el perfil obtenido de esta columna, donde se puede apreciar la heterogeneidad de esta fracción. Por su posición en la gráfica, el pico I debía corresponder al fragmento Fc, que aparecía aquí como contaminante, y el pico III, que es el de mayor cantidad, al propio pico VI, de peso molecular 13,600 en geles. Para confirmar estas hipótesis, se llevó a cabo la determinación del amino terminal de cada uno de los picos de esta columna. El resultado de éste fue: El pico I, dió un N-terminal de Thr; el II aparecía bastante contaminado; el III era negativo y el IV estaba contaminado también, con Ala y Ser como N-terminal. El pico III parecía puro por tanto, pero para confirmación, se aplicó a una nueva columna, de Sephadex G-50 en ac. fórmico al 10%, obteniéndose el perfil que se observa en la figura 24, b. Aunque se hicieron dos fracciones, el análisis por EF en geles de SDS-poliacrilamida, mostró que ámbas eran idénticas. Una nueva determinación del amino terminal en estas fracciones, dió el mismo resultado negativo.

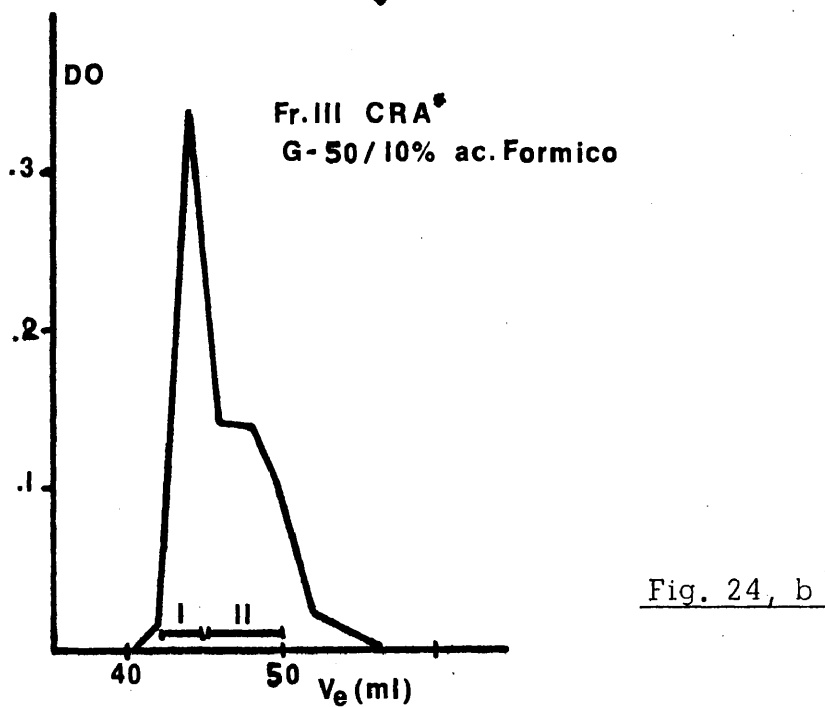
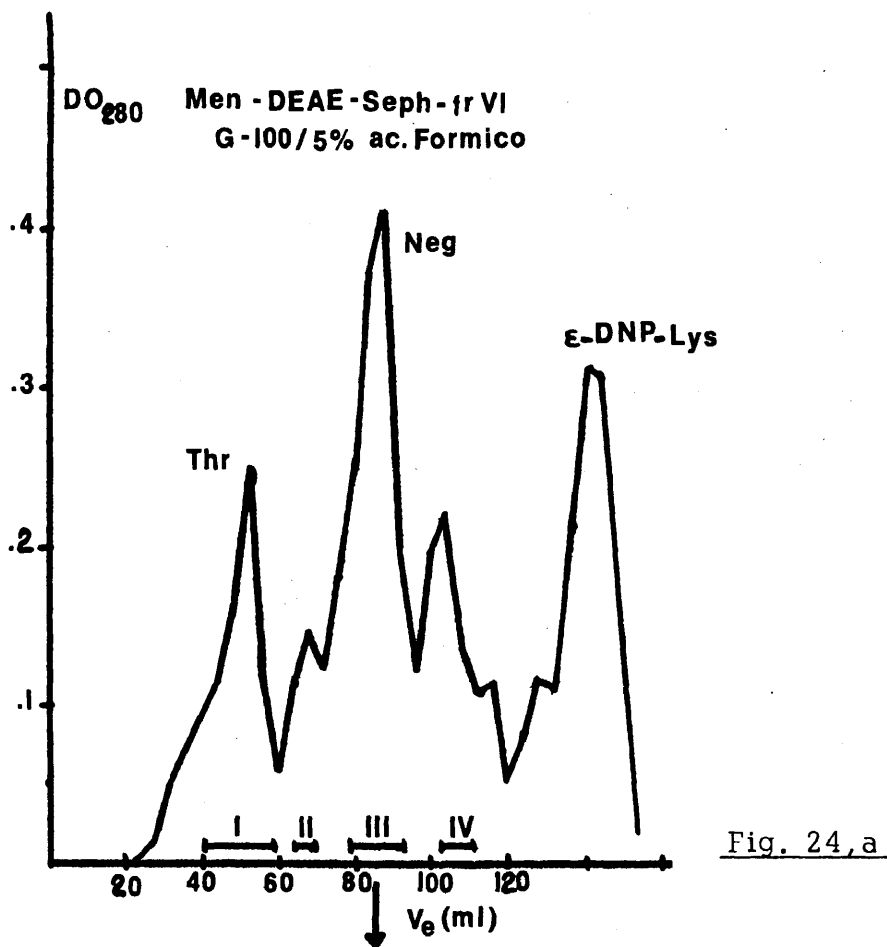


Fig. 24.- Filtración del pico VI a través de una columna de Sephadex G-100 (24, a). La fracción III de esta columna fue aplicada a una columna de Sephadex G-50 (24, b)

4.10.2.1.- Análisis de Aminoácidos. -

0.1 mg de la fracción I de la columna de Sephadex G-50, fueron hidrolizados con ácido HCl 6 N para proceder a su análisis. La tabla XVII muestra el resultado de éste; este fragmento no contenía carbohidrato y tenía al menos dos residuos de cisteína.

4.10.2.2.- Determinación de la secuencia de este fragmento. -

2 mg de la fracción I de la columna de Sephadex G-50 previamente CR-A*, fueron aplicados al secuenciador para la determinación de la secuencia. Esta mostró:

Leu
Asp-Phe-Val- -Asp-Asn-Glu-Gly-Asp-(Pro)-Leu-Glu
Ile

En la posición 4 no se pudo discernir entre Leu y Ile, debido a la pérdida de vacío en el tubo durante la hidrólisis con ácido HI, con la consecuente destrucción del PTH-aa. La prolina en posición 10, fue detectada en GC y TLC, aunque no aparecía en el análisis, probablemente por razones técnicas.

TABLA XVII. - COMPOSICION DE AMINOACIDOS DE LA FRACCION VI, CR-A*, DE LA COLUMNA DE DEAE-SEPHADEX. -

<u>Aminoácido</u>	<u>N^o residuos</u>
Lys	7.07
His	0.78
Arg	5.34
CmCys	2.03
Asp	21.37
Thr	4.67
Ser	8.97
Glu	9.74
Pro	8.01
Gly	12.09
Ala	6.46
Val	4.57
Met	1.17
Ile	6.53
Leu	10.35
Tyr	3.31
Phe	6.25
CHO	-

Valores expresados en moles de aa/ mol de péptido.

El Peso molecular que se tomó para este cálculo, fue de 13.600 daltons.

4.10.3.- Caracterización del pico VII. -

Debido a su pequeño peso molecular, parecía interesante estudiar esta fracción en más detalle. Para ello, se introdujo primero en una columna de Sephadex G-50 en ac. fórmico al 10% para comprobar que era homogénea. La figura 25, a, muestra el perfil obtenido. La determinación del amino terminal en las fracciones I y II de esta columna, mostró Val para la fracción I, estando la II contaminada (más de un N-terminal). La fracción I se aplicó entonces a geles de SDS-Poliacrilamida, para una determinación más exacta del peso molecular. Los marcadores que se utilizaron en este caso fueron: Cadena L (PM 23,000); Citocromo C (PM 12.600); Ribonucleasa (PM 13.700); Insulina (PM 5.700) y Glucagón (PM 3.500). El peso molecular que se obtuvo para este fragmento, fue 5.300. La figura 25, b, muestra un esquema de la posición en el gel de este fragmento. El tubo n^o3 corresponde a la fracción I de la columna de G-50 y el n^o 4, a la fracción II; los tubos 1 y 2 contienen los marcadores.

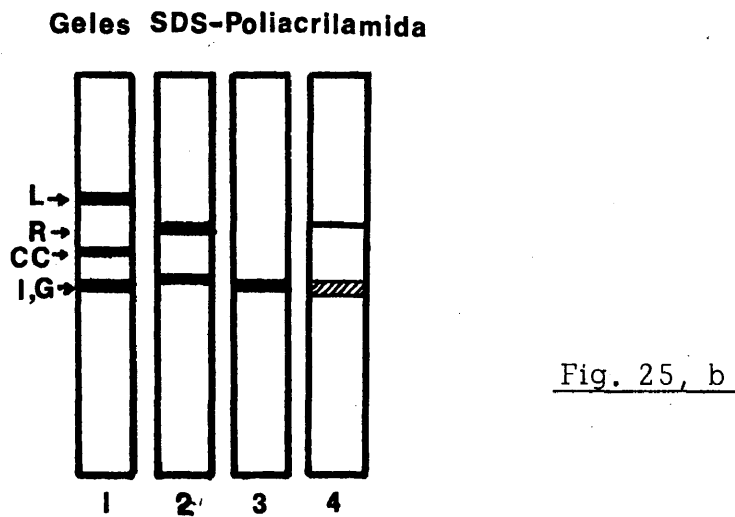
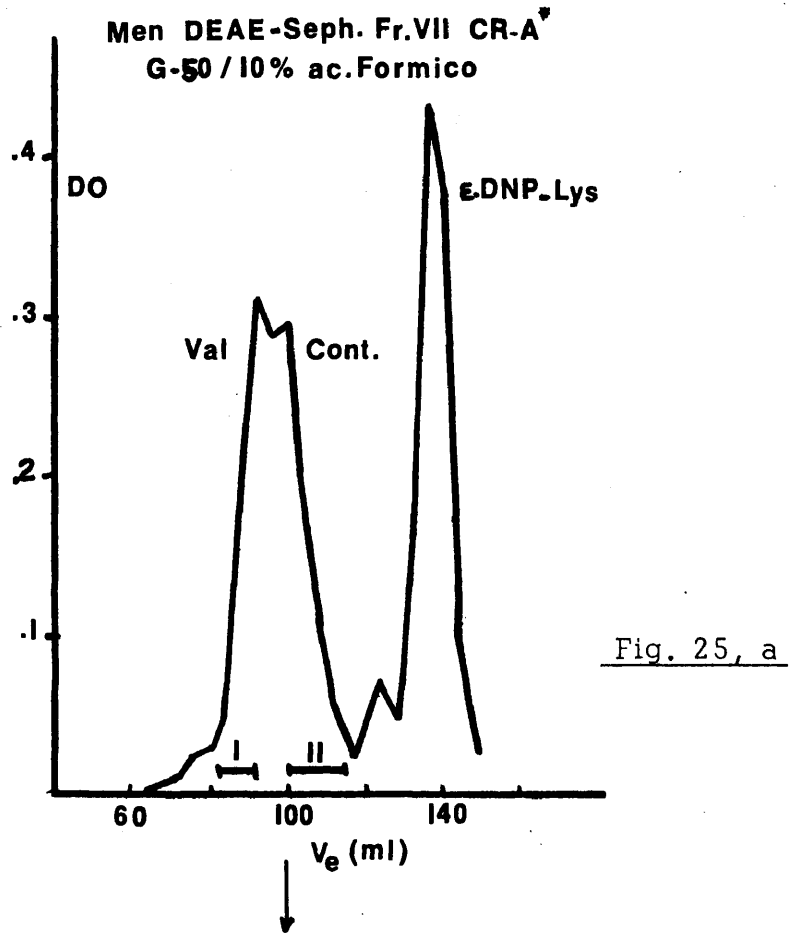


Fig. 25.- Filtración a través de Sep. G-50 de la fracción VII de la columna de DEAE-Sep. (a). SDS-geles de la fracción I y II de esta columna (B)

4.10.3.1.- Análisis de aminoácidos. -

50 μ g de la fracción I de la columna de Sephadex G-50 fueron hidrolizados y aplicados al analizador de aminoácidos, para determinar la composición de este fragmento. La tabla XVIII muestra el resultado de este análisis. Como se puede observar, esta fracción no contenía carbohidrato.

4.10.3.2.- Determinación de la secuencia. -

1 mg de la fracción I de la columna de Sephadex G-50 CR-A*, fue aplicado al secuenciador. La secuencia encontrada fue:

Val-Thr-Ile-Ser-Cys-Thr-Gly-()-Gly-Ala-Asn-Ile-Gly-Ala-Gly-Tyr-Asp-Val-His-(His)-()-Glx-His-Leu

La serina y cisteína se recuperaron como alanina en el análisis. La cisteína se detectó además por conteo de ^{14}C . La treonina se recuperó como ac. α -amino-butírico y fue detectada en cromatografía de gases.

TABLA XVIII. - COMPOSICION DE AMINOACIDOS DE LA FRACCION VII, CR-A*, DE LA COLUMNA DE DEAE-SEPHADEX. -

<u>Aminoácido</u>	<u>N^o residuos</u>
Lys	1.4
His	2.0
Arg	-
CmCys	1.7
Asp	3.7
Thr	4.4
Ser	5.0
Glu	4.2
Pro	3.3
Gly	5.7
Ala	3.8
Val	2.5
Met	0.2
Ile	2.7
Leu	2.4
Tyr	3.5
Phe	0.4

Valores expresados en moles de aa/ mol de péptido

Peso molecular tomado : 5.300 daltons.

4.11.- DIGESTION ENZIMATICA DEL FRAGMENTO Fc.-

4.11.1.- Digestión con tripsina.-

12 mg de fragmento Fc (Fraccion V de la columna de DEAE-Sephadex), fueron reducidos completamente, con el fin de que tanto los enlaces inter como los intracatenarios, fueran afectados, y alquilados con ac. ^{14}C -Iodoacético. Después de filtrar a través de una columna de Sephadex G-25 en ac. acético 0.1M, para quitar las sales y la guanidina, se procedió a la digestión con tripsina (1:50, w/w) a 37° durante 6 hr. Una vez terminada ésta, una alicuota de 3 mg se aplico a papel Whatman 3MM, corriéndose una cromatografía en primer lugar y a continuación una electroforesis a pH 3.5. Los péptidos se revelaron por tinción con ninhidrina y se hizo autoradiografía para la localización de los radioactivos.

El resultado fue que la mayoría de la proteína permanece en el origen, no moviéndose ni en cromatografía ni en electroforesis. La tripsina no es por tanto una enzima válida en este caso, ya que los péptidos que se obtienen son probablemente

demasiado grandes para correr en el papel, o bien son insolubles en los solventes utilizados.

4.11.2.- Digestión con pepsina. -

3.5 mg de fragmento Fc, CR-A*, fueron digeridos con pepsina (1:50) durante 6 hr a 37°C. La muestra se aplicó como en el caso anterior a papel Whatman 3MM, procediéndose a la cromatografía y electroforesis ("Fingerprinting"). Los péptidos se revelaron con una solución de ninhidrina/cadmio y la figura 26 muestra el resultado de este mapa peptídico. En este caso, toda la proteína parecía haberse digerido, ya que no había nada en el origen. La autoradiografía mostró la localización de los péptidos radioactivos, algunos de los cuales aparecían bien separados. Como en el caso de la cadena δ se eligió la pepsina como vía de obtención de los péptidos radioactivos, a pesar de ser ésta, una enzima muy inespecífica en cuanto al sitio de ataque a proteínas, siendo los péptidos que se obtienen de un digerido péptico, heterogéneos y bastante pequeños.

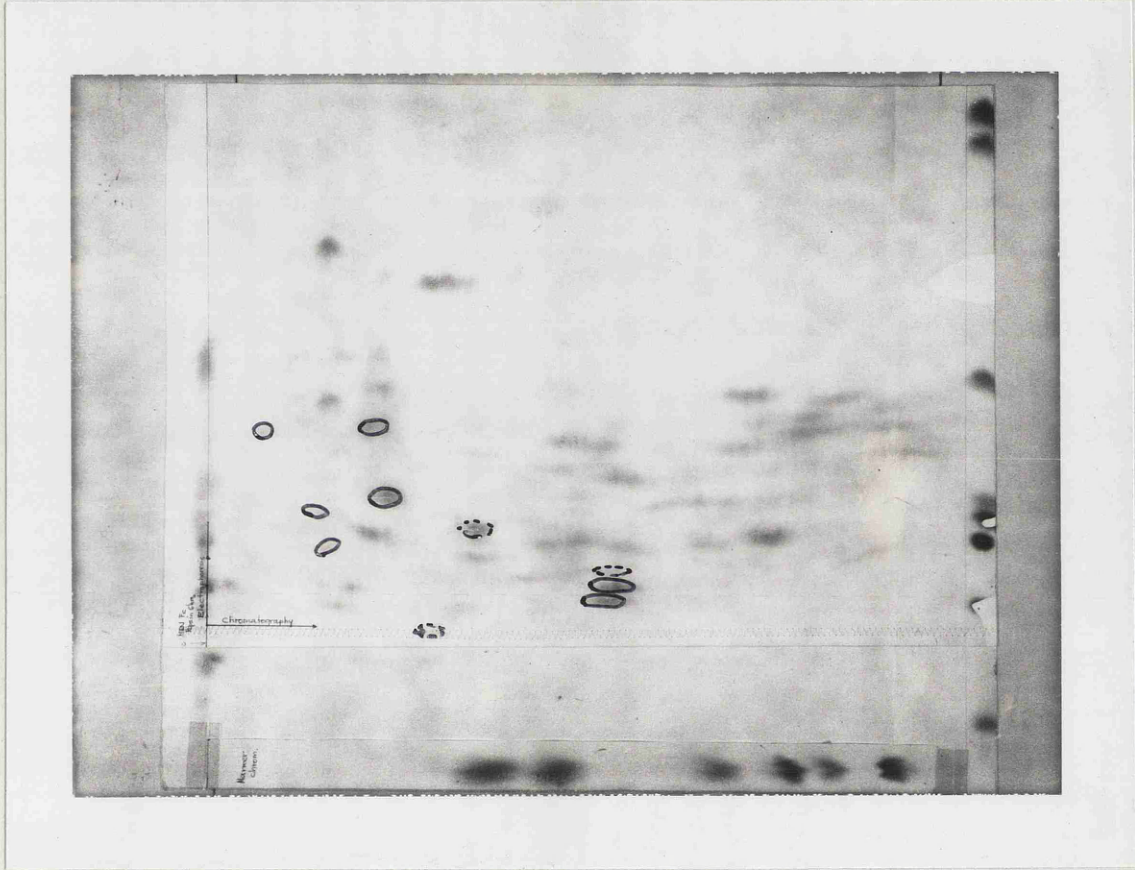


Fig. 26.- Mapa peptídico (péptico) del fragmento Fc de la IgD. Los péptidos marcados son los radioactivos.

4.12. - OBTENCION DE LOS PEPTIDOS RADIOACTIVOS DEL Fc. -

30 mg de fragmento Fc, CR-A⁺ y digeridos con pepsina durante 6 hr a 37^o, fueron aplicados a papel Whatman 3MM, para proceder a la cromatografía en el solvente HAc / Butanol / H₂O. Se utilizaron 4 mg de muestra por papel, es decir, se aplicaron 7 papeles, que se corrieron paralelamente en cromatografía durante 24 hr. Terminada ésta, se procedió a la EF a pH 3.5 de todos los papeles; ésta se llevó a cabo durante 2 hr. haciendo autoradiografía después, y revelándose a las 24 hr. Los péptidos radioactivos se marcaron sobre el papel. La figura 27 muestra el esquema de la distribución de estos péptidos después de la cromatografía y electroforesis. Los péptidos se numeraron del 1 al 6 por orden de intensidad en la película de rayos X. El prefijo P, indica que procedían de una digestión con pepsina. Los péptidos obtenidos en este experimento se numeran a continuación.

Péptido P-1. -

Este péptido aparecía puro en el mapa peptídico que se tiñó con ninhidrina (experimento piloto); daba además un color ama-

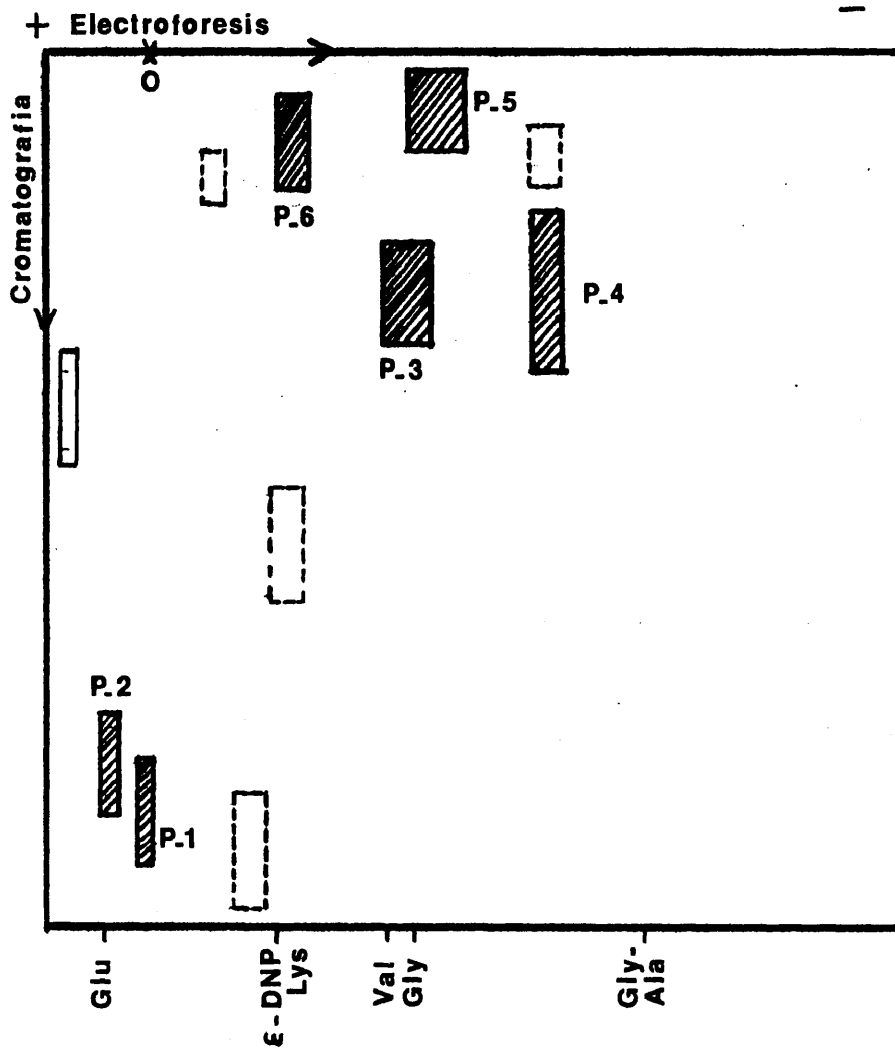


Fig. 27.- Localización de los peptidos radioactivos en el mapa peptidico del fragmento Fc(t) de la IgD. Las manchas mas intensas se han representado mediante un rayado.

170

rillo despues de la tinción, lo que indicaba que el amino terminal era Thr. El péptido se sacó del papel directamente sin ninguna otra purificación. El análisis de aminoácidos mostró la composición: CmCys_{.3} Thr Phe_{1.1} ; el amino terminal era Thr y la secuencia: Thr-Cys-Phe. Este péptido es por tanto el P-1b de la cadena δ .

Péptido P-2.-

Como en el caso del P-1, este péptido aparecia puro en el mapa y se procedió a su análisis una vez sacado del papel. La composición de aminoácidos resultó ser: CmCys_{.1} Glx_{.6} Leu; el N-terminal era Leu y su secuencia: Leu-Cys-Glx.

Péptido P-3.-

Este péptido daba color amarillo también al teñirlo con ninhidrina; como en el caso de los anteriores, se procedió a su elución directamente sin mas purificación. El análisis de aminoácidos mostró la composición: His_{.9} CmCys_{.3} Thr_{1.8} Ser_{1.2} Glx_{1.9} Pro_{3.1} Gly Val_{.9} Leu ; el N-terminal dió Thr y la secuencia era: Thr-Pro-Glu-Cys-Pro-Ser-His-Thr-Gln-Pro-Leu-Gly-Val es decir este péptido es idéntico al péptido δ_2 del "chemical typing" y al péptido P-7b obtenido en la digestión enzimática de

la cadena pesada δ , siendo por tanto el correspondiente al enlace inter cadenas pesadas.

Péptidos P-4, P-5 y P-6.-

Estos péptidos estaban contaminados en el mapa peptídico y por tanto se procedió a su purificación. Una vez cortados de los diferentes papeles, se cosieron a otros nuevos para ser corridos en EF a diferentes pH.

En primer lugar se corrieron a pH 6.5. La figura 28 muestra el esquema de la distribución de los péptidos a este pH; en ella aparece también el péptido P-3, que se corrió con el fin de comprobar su movilidad. Asimismo se corrió también a pH 2.1 junto con los otros péptidos.

Las movilidades de los péptidos a este pH están expresadas en la tabla XIX. Todos se movían hacia el polo +, excepto el P-4, lo cual indica un exceso de carga positiva en este péptido.

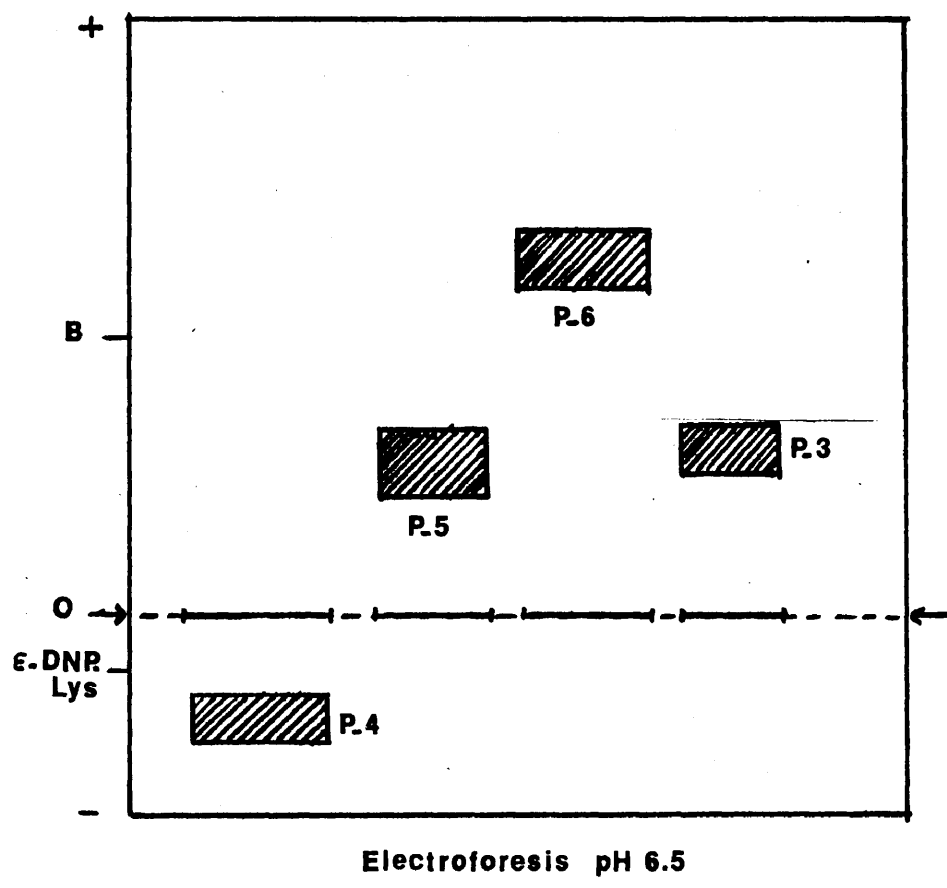


Fig. 28.- Distribucion de los peptidos P-3, P-4, P-5 y P-6 en la EF a pH 6.5.

Los péptidos se corrieron entonces a pH 2.1, previamente oxidados con ac. perfoómico, revelándose por autoradiografía como en casos anteriores. La figura 29 muestra el esquema de la distribución de los péptidos a este pH. Estos se sacaron del papel y se eluyeron con ac. HCl 6N, procediendo después a su hidrólisis y análisis. La tabla XIX muestra la composición de todos los péptidos radioactivos obtenidos a partir del fragmento Fc de la IgD. En algunos de ellos no fue posible determinar el amino terminal, debido a la escasa cantidad en que se obtuvieron.

Ninguno de estos péptidos radioactivos contenía Triptófano, como lo demostró la tinción con el reactivo apropiado del mapa peptídico del fragmento Fc.

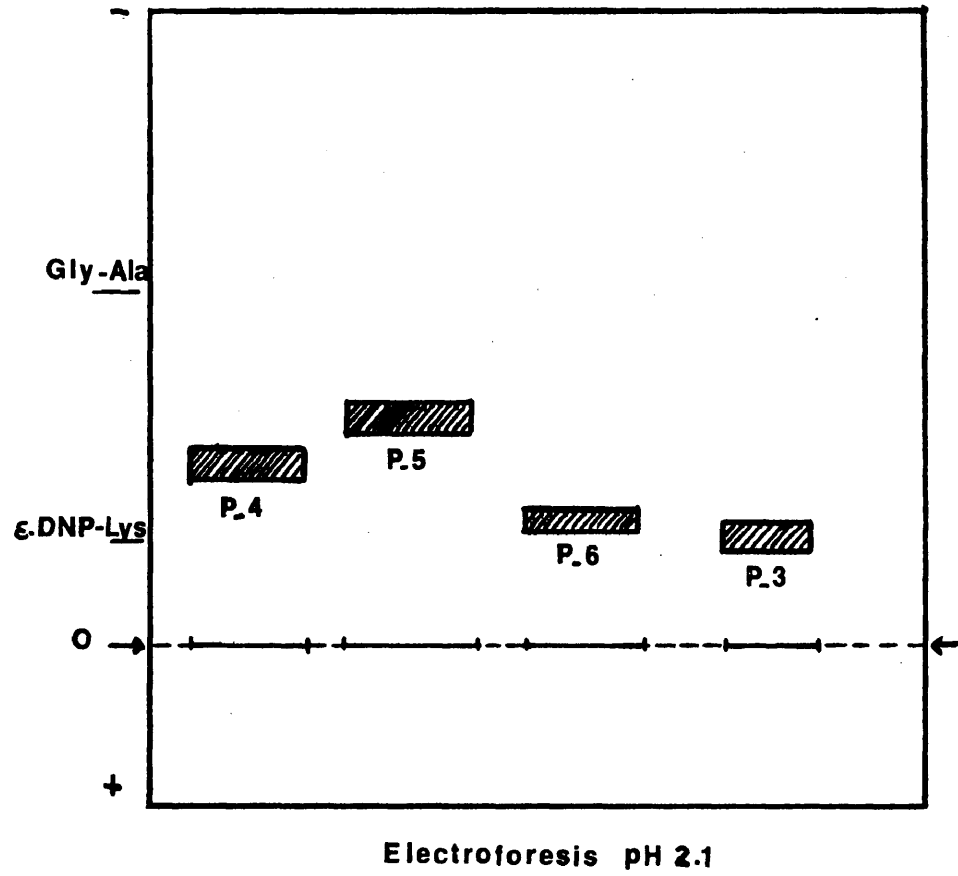


Fig. 29.- Distribucion de los peptidos P-3, P-4, P-5 y P-6 en la electroforesis a pH 2.1.

TABLA XIX. - PEPTIDOS CARBOXIMETILADOS PROCEDENTES DEL
DIGERIDO PEPTICO DEL FRAGMENTO Fc DE LA IgD. -

<u>Aa</u>	<u>P-1</u>	<u>P-2</u>	<u>P-3</u>	<u>P-4</u>	<u>P-5</u>	<u>P-6</u>
Lys						
His			0.9	0.9	(0.4)	0.6
Arg				0.9	(0.4)	
CmCys	0.3	0.1	0.3	0.3	0.4	0.6
Asp				1.0	0.8	0.9
Thr	1.0		1.8	1.0	1.1	0.8
Ser			1.2	1.0	1.3	1.7
Glu		0.6	1.9	0.9	1.0	1.0
Pro			3.1	0.6		
Gly			1.0			(0.4)
Ala						
Val			0.9		+	(0.4)
Leu		1.0	1.0	2.7		
Phe	1.1					
Mov (6.5)	0.52	0.81	0.31	-0.04	0.25	0.53

Los valores expresan moles de aa/ mol de péptido.

+ → La valina estaba presente en el análisis, pero no fue integrada.

5.-DISCUSSION

La Inmunoglobulina D es una de las cinco inmunoglobulinas del suero humano. Fue descubierta en 1964 por Rowe y col. (70) y desde entonces, pocos han sido los avances en el estudio tanto de la estructura química de esta inmunoglobulina, como de su posible función biológica. Las razones principales que han retrasado su estudio con respecto al de las otras Igs, son fundamentalmente dos:

1.- Su aparición en el suero como paraproteína (mieloma IgD) con el consiguiente aumento de su concentración en él, no es muy frecuente.

2.- La IgD es extremadamente sensible a la degradación por enzimas séricas del tipo de la plasmina, lo cual hace difícil su manejo y contribuye a que su rendimiento sea siempre más bajo que el esperado.

El aislamiento de la IgD del suero, entraña por tanto dificultades. La primera de ellas es que su concentración, aún en los casos de mieloma, no es muy elevada, por lo que es difícil su purificación. La segunda, ya comentada, es su susceptibilidad

a la digestión enzimática (degradación espontánea de la IgD), lo que implica el uso de inhibidores (tipo ac. ϵ -ACA) en todos los pasos desde la extracción del suero y el trabajar a 4° cuando sea posible.

El hecho de que esta extremada sensibilidad al ataque por enzimas proteolíticos sea única para la IgD, ha llevado a pensar en una posible estructura diferente a la del resto de las inmunoglobulinas, en el sentido de presentar una conformación más extendida que facilitaría la exposición de ciertos enlaces al ataque enzimático. De hecho los parámetros físicos determinados para la IgD (80), parecen estar de acuerdo con esta conformación particular.

La primera diferencia entre esta proteína y el resto de las Igs, es el hecho de poseer un solo enlace disulfuro entre las cadenas pesadas (156). En efecto, cuando se llevó a cabo el "chemical typing" de esta inmunoglobulina (pg. 113), se obtuvieron dos péptidos radioactivos, que hemos llamado δ_1 y δ_2 ; el primero corresponde al enlace inter cadenas pesada-ligera, y el segundo, al inter pesada-pesada. Este hecho, podría conferir a la región "hinge" de esta inmunoglobulina, una menor rigidez, permitiendo así el

ataque enzimático.

En las páginas siguientes, consideraremos en detalle los datos obtenidos en el estudio de la cadena pesada δ , los péptidos que contienen los residuos de cisteína, tanto en la cadena pesada completa como en el fragmento Fc y por último, la degradación enzimática de la IgD con tripsina y los fragmentos obtenidos en ella.

5.1.- CADENA PESADA δ DE LA INMUNOGLOBULINA D.

Cuando se estudia la cadena pesada de la IgD (cadena δ), lo primero que se observa es que su peso molecular es mayor que el correspondiente a una cadena polipeptídica compuesta por cuatro dominios globulares y una región "hinge" (modelo: $\gamma 1$). El peso molecular de una estructura tal, sería 50.000 daltons; sin embargo, cuando se llevó a cabo la electroforesis en geles de poliacrilamida, se obtuvo un valor de 58.000 daltons para la cadena δ (una vez descontada la contribución de la porción carbohidrato). Este elevado valor, podría ser indicativo de alguna región extra en la cadena; regiones tales existen

en algunas clases y subclases de Igs. La cadena γ_3 por ejemplo, cuyo peso molecular es similar al de la δ , tiene una región "hinge" mucho más extendida que la de la cadena γ_1 , comprendiendo 60 residuos en los que existe una cuadruplicación, es decir la misma secuencia de 15 residuos se repite 4 veces a lo largo de la cadena (159), dando lugar a un PM más elevado que el esperado y a una serie de características en la molécula de IgG3, que son únicas para esta subclase.

De la misma manera y como se ha comentado en la Introducción, la cadena pesada μ de la IgM y la ϵ de la IgE, poseen dos dominios extras, cada uno de los cuales contiene un enlace disulfuro. Los pesos moleculares de estas cadenas son 58.000 y 69.000 daltons respectivamente.

Es posible por tanto pensar que lo mismo pueda ocurrir en el caso de la cadena δ . La existencia de un quinto enlace disulfuro sin embargo, parece que queda descartada por varias razones:

1.- Cuando se llevó a cabo el análisis de aminoácidos de la molécula de IgD completa (pg.130), se obtuvo un número de residuos de cisteína de 29; si se descuentan los 10 pertenecientes a las dos cadenas ligeras, quedan 19, es decir 9.5 residuos para la cadena δ . Lo mismo sucede cuando se lleva a cabo el análisis de aa en la cadena pesada δ ; en este caso sin embargo, el número que se obtuvo en repetidos análisis, fue siempre bajo (4.5), es decir la mitad del esperado. Una posible razón para esto, es la falta de un buen vacío dentro del tubo durante la hidrólisis, lo que contribuye a la destrucción de la cisteína, especialmente cuando está carboximetilada o no oxidada.

2.- De igual manera, cuando se llevó a cabo el estudio de los péptidos con cisteína en la cadena pesada, que se comenta más adelante, no se obtuvieron más péptidos de los esperados, es decir los correspondientes a una estructura formada por cuatro dominios encerrados en enlaces disulfuro.

La explicación de este elevado peso molecular, hay que buscarla por tanto en otra causa; es posible que si existe un dominio extra, éste no contenga un puente disulfuro, o bien que tenga la mis-

ma composición y secuencia que alguno de los péptidos encontrados (que esté repetido). Esta posibilidad no está excluída. Otra posibilidad, es que la cadena δ tenga una región "hinge" más extendida (como la cadena $\gamma 3$), conteniendo o no regiones que se repiten, o al menos, que esta región tenga una conformación particular que hace comportarse a esta inmunoglobulina de manera diferente al resto. Una región "hinge" más extendida que la normal explicaría:

- 1.- Su excesiva susceptibilidad al ataque enzimático; la IgG3 es la más sensible dentro de las subclases de IgG.

- 2.- Quizá podría explicar alguna de las propiedades biológicas de la Inmunoglobulina D, como por ejemplo, el encontrarse muy frecuentemente y en muy alta proporción, sobre la superficie de los linfocitos. Quizá el poseer alguna región más extendida, facilita de alguna manera su estabilidad sobre las células.

Un punto que merece la pena considerar, es la digestión enzimática de la cadena δ y del fragmento Fc de la IgD. Cuando se llevó a cabo la digestión con tripsina y el digerido se aplicó a papel, se observaba una línea continua después de la autoradiografía (pg. 138), lo que indicaba que la proteína no estaba digerida o que los péptidos obtenidos eran demasiado grandes para moverse en una electroforesis en papel. Este hecho es común a otras inmunoglobulinas, siendo necesario en la mayoría de los casos, hacer una digestión con pepsina después de digerir con tripsina.

Por otra parte, la facilidad a la digestión con pepsina, como lo demuestra la autoradiografía del digerido péptico de la cadena pesada δ y del fragmento Fc, parece indicar un elevado número de residuos hidrofóbicos, como lo demuestra el análisis de aminoácidos de ámbos. Esta enzima tiene sin embargo muchas desventajas; la 1ª, es su inespecificidad, por lo que va a dar lugar a péptidos muy pequeños; la 2ª, consecuencia de la anterior, es que va a romper el mismo péptido por diferentes sitios, con la consiguiente disminución del rendimiento del mismo. Hay que tener

en cuenta estos hechos cuando se observan los péptidos obtenidos de un digerido péptico.

Nuestros estudios del amino terminal de la cadena δ llevaron a la conclusión de que el N-terminal está bloqueado, como lo demuestra el hecho de una reacción negativa con el cloruro de dansilo. Con el fin de obtener el peptido que contenía el PCA, se procedió a la digestión con pronasa. Los resultados fueron los mismos en la molécula de IgD completa y en la cadena pesada δ aislada. El péptido que contenía el PCA era Glu-Val; esta secuencia sitúa a la IgD en uno de los dos primeros subgrupos de homología de region variable. Sólo hay otro estudio sobre el amino terminal de otra IgD (160), que no estaba bloqueado en este caso y muestra la secuencia del comienzo de la región variable en esta proteína. Este hecho podría hacer pensar en la posible existencia de subclases en la IgD, de las que unas tienen el N-terminal bloqueado y otras no, o simplemente en que existen diferencias en el comienzo de la secuencia en las diferentes moléculas de IgD.

Respecto a los péptidos que contienen el carbohidrato en la IgD, es interesante el hecho de que la columna de Dowex-50, es capaz de separar al menos dos péptidos con CHO. Normalmente, cuando se hace la digestión con pronasa en otras inmunoglobulinas, y se aplica después el digerido a esta columna, se obtiene un sólo pico en el eluido que contiene el péptido con PCA y el o los péptidos con CHO y hay que proceder a posterior purificación de estos en papel.

Nuestros resultados en el caso de la IgD o de la cadena δ parecen indicar un particular comportamiento que se refleja en la aparición de 3 ó 4 picos en el eluido de la columna de Dowex-50. Es de destacar que el péptido que contiene el PCA, aparecía en el último pico, casi puro; los dos primeros picos contenían los péptidos con CHO. El análisis de aminoácidos (pg. 135) mostró que la composición de ámbos era muy similar, por lo tanto, la razón de que salgan separados de la columna, hay que buscarla en el CHO, que probablemente es diferente en ámbos. Se han descrito al menos dos sitios diferentes a los que se une el CHO en la cadena δ

uno situado en el Fab y otro en el Fc (90) y su composición es diferente en ámbos.

Cuando estos péptidos se aplicaron a papel para posterior purificación, se observó que tenían una movilidad muy pequeña a pH 3.5, debida probablemente al CHO. El análisis de aa de estos péptidos, una vez eluídos del papel, mostró que la composición era muy similar en todos ellos. Las diferencias deben estar por tanto, en la porción CHO; el hecho de poseer algunos de ellos, más de un aminoazucar y otros, sólo uno, podría explicar su comportamiento en la columna.

5.2.- PEPTIDOS QUE CONTIENEN LAS CISTEINAS EN LA IgD. -

El interés del estudio de los péptidos que contienen los residuos de cisteína en la IgD, está no sólo en que ayudan a conocer su estructura primaria, sino también, en que hacen posible una comparación con péptidos equivalentes en otras clases y subclases de Igs. Parece conveniente por tanto en este momento, comparar los péptidos obtenidos en nuestro estudio, con los ya conocidos en otras Igs; ésta es la razón, por la que en pági-

nas subsiguientes, se alistan todos los péptidos implicados en formación de puentes disulfuro, en las diferentes clases de Igs.

Como se ha comentado en la Introducción, los residuos de cisteína, están situados a lo largo de las cadenas polipeptídicas de las Igs, de forma característica, constituyendo enlaces disulfuro inter e intra catenarios. El número y disposición de los enlaces intercatenarios, es característico de cada clase y subclase, de manera que su determinación y análisis constituye uno de los métodos más utilizados para clasificar una inmunoglobulina desconocida. En la figura 30 se representa un esquema de la distribución electroforética de estos péptidos en las diferentes clases y subclases de Igs. La composición y secuencia de estos péptidos, varia mucho de unas subclases a otras.

La situación es completamente diferente con los enlaces intracatenarios. No sólo su disposición a lo largo de la cadena de Ig se conserva en todas las clases y subclases de todas las especies estudiadas, sino que las secuencias de aminoácidos de estos péptidos, presentan una gran homología entre si.

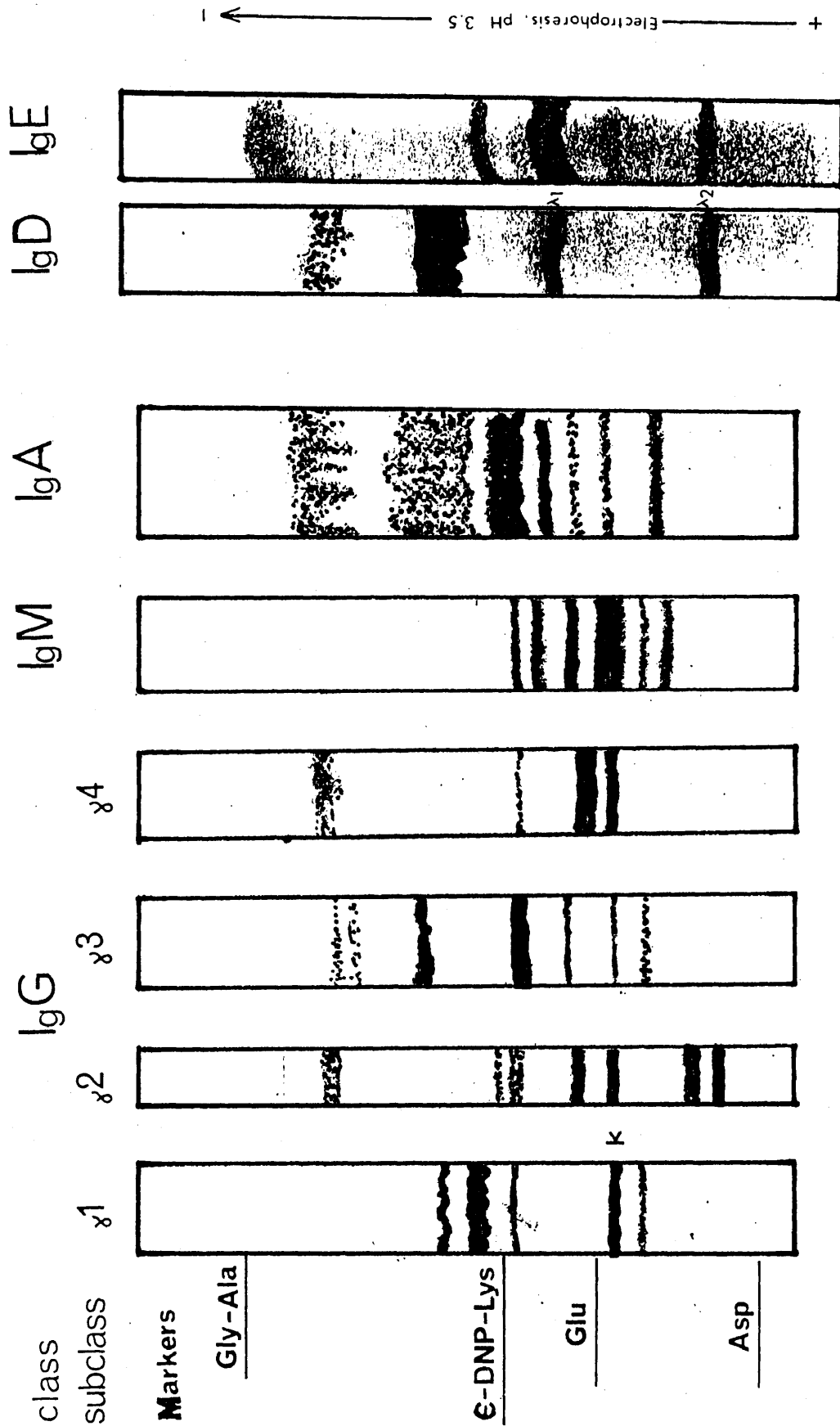


Fig. 30. - "Chemical typing" de las Inmunoglobulinas humanas

En la cadena pesada γ de la clase IgG, existen 4 enlaces disulfuro intracatenarios, situados, uno en la región variable y los otros 3 en la constante (22). Se conoce actualmente la composición y secuencia de los péptidos implicados en estos enlaces, así como los péptidos homólogos de las cadenas κ y λ (161).

Las cadena α , μ y ϵ , contienen también estos 4 enlaces disulfuro; sus secuencias, así como las de la cadena γ , están expresadas en las tablas XX y XXI.

En las cadena μ y ϵ existe un 5^o enlace intracatenario o "dominio extra", que en la cadena μ está situado antes de la región "hinge" y está formado por las cisteínas 259 y 320 (7). En la cadena ϵ este enlace se localiza entre los dos puentes intercatenarios con la cadena pesada homóloga, abarcando los residuos de cisteína 244 y 302 (6). Existe además en esta cadena, otro enlace intracatenario que no constituye dominio, formado por las cisteínas 129 y 215. La secuencia de estos dominios extra, está expresada en la tabla XXII.

TABLA XX. - ENLACES DISULFURO INTRACATENARIOS EN LA REGION VARIABLE
DE LAS CADENAS H Y L. -

$V_{H^I} (\gamma 1)$	Lys-Val-Ser-Cys-Lys-Ala-Ser	²² Phe-Tyr-Phe-Cys-Ala-Gly-Gly	⁹⁶
$V_{H^{II}} (\gamma 2)$	Thr-Leu-Thr-Cys-Thr-Phe-Ser	Thr-Tyr-Tyr-Cys-Ala-Arg-Ile	
$V_{H^{III}} (\gamma 4)$	Arg-Leu-Ser-Cys-Ala-Ala-Ser	Val-Tyr-Tyr-Cys-Ala-Arg	
V_{K^I}	Thr-Ile-Thr-Cys-Gln-Ala-Ser	Thr-Tyr-Tyr-Cys-Gln-Gln-Tyr	
$V_{K^{II}}$	Thr-Leu-Ser-Cys-Arg-Ala-Ser	Val-Tyr-Tyr-Cys-Gln-Gln-Tyr	
$V_{K^{III}}$	Ser-Ile-Ser-Cys-Arg-Ser-Ser	Val-Tyr-Tyr-Cys-Met-Gln-Ala	
V_{λ^I}	Thr-Ile-Ser-Cys-Ser-Gly-Gly	Asp-Tyr-Tyr-Cys-Ala-Thr-Trp	
$V_{\lambda^{II}}$	Thr-Ile-Ser-Cys-Thr-Gly-Thr	Asn-Tyr-Tyr-Cys-Ser-Ser-Tyr	
$V_{\lambda^{III}}$	Val-Ile-Thr-Cys-Ser-Gly-Asp	Asp-Tyr-Phe-Cys-Gln-Thr-Trp	
$V_{\lambda^{IV}}$	Thr-Ile-Ser-Cys-Thr-Gly-Thr	Asp-Tyr-Tyr-Cys-Ser-Ser-Tyr	
V_{λ^V}	Arg-Ile-Thr-Cys-Gln-Gly-Asp	Asp-Tyr-Tyr-Cys-Asn-Ser-Arg	

TABLA XXI. - ENLACES DISULFURO INTRACATENARIOS EN LA REGION
CONSTANTE CHI DE LAS CADENAS H Y L. -

	144	200	
γ_1	Ala-Leu-Gly-Cys-Leu-Val-Lys	Thr-Tyr-Ile-Cys-Asn-Val-Asn	
γ_2	Leu-Gly-Cys-Leu	Tyr (Thr, Cys)	
γ_3	(Leu)Gly-Cys-Leu	Tyr (Thr, Cys)	
γ_4	Ala-Leu-Gly-Cys-Leu	Tyr-Thr-Cys	
α_1	Val-Ile-Ala-Cys-Leu-Val-Gln	Ser-Val-Thr-Cys-His-Val-Lys	
μ	Ala-Val-Gly-Cys-Leu-Ala-Glx	Glu-His-Val-Cys-Lys-Trp-Val	
ϵ	Thr-Leu-Gly-Cys-Leu-Ala-Thr	Met-Phe-Thr-Cys-Arg-Val-Ala	
λ	Thr-Leu-Val-Cys-Leu-Ile-Ser	Ser-Tyr-Ser-Cys-Gln-Val-Thr	
κ	Ser-Val-Val-Cys-Leu-Leu-Asn	Val-Tyr-Ala-Cys-Glu-Val-Thr	

TABLA XXI cont. - ENLACES DISULFURO INTRACATENARIOS EN LA REGION
CONSTANTE CH2 DE LAS CADENAS H. -

$\gamma 1$	Glu-Val-Thr-Cys-Val-Val-Val	²⁶¹ Glu-Tyr-Lys-Cys-Lys-Val-Ser
$\gamma 2$	(Thr, Pro, Glu, Val, Thr, Cys, Val)	Thr-Lys-Cys-Lys-Val-Ser-Asn
$\gamma 3$	Glu-Val-Thr-Cys-Val	Thr-Lys-Cys-Lys-Val-Ser-Asn
$\gamma 4$	Val-Thr-Cys-Val-Val (val, Asp)	Tyr-Lys-Cys-Lys-Val-Ser-Asn
$\alpha 1$	Asx-Leu-Thr-Cys-Thr-Leu-Thr	Thr-Phe-Thr-Cys-Thr-Ala-Ala
μ	Lys-Leu-Thr-Cys-Leu-Val-Thr	Arg-Phe-Thr-Cys-Thr-Val-Thr
ϵ	Thr-Ile-Thr-Cys-Leu-Val-Val	Thr-Tyr-Glx-Cys-Arg-Val-Thr

TABLA XXI cont. - ENLACES DISULFURO INTRACATENARIOS EN LA REGION
CONSTANTE CH3 DE LAS CADENAS H. -

$\gamma 1$	Ser-Leu-Thr-Cys-Leu-Val-Lys	³⁶⁷ Val-Phe-Ser-Cys-Ser-Val-Met
$\gamma 2$	(Thr, Cys, Leu)	⁴²⁵ Phe-Ser (Cys, Ser, Val, Met)
$\gamma 3$	Leu-Thr-Cys-(Leu, Val)Lys	Phe-Ser-Cys-Ser-Val-Met
$\gamma 4$	Leu-Thr-Cys-Leu	Phe-Ser-Cys-Ser-Val-Met
$\alpha 1$	Thr-Leu-Thr-Cys-Leu-Ala-Arg	Thr-Phe-Ser-Cys-Met-Val-Gly
μ	Thr-Ile-Thr-Cys-Leu-Val-Thr	Thr-Tyr-Thr-Cys-Val-Val-Ala
ϵ	Thr-Leu-Ala-Cys-Leu-Ile-Gln	Glu-Phe-Ile-Cys-Arg-Ala-Val

TABLA XXII.- ENLACES DISULFURO INTRACATENARIOS "EXTRA"
EN LAS CADENAS μ , ϵ Y α .

μ	Lys-Leu-Ile-Cys-Gln-Ala-Thr	259	Met-Phe-Thr-Cys-Arg-Val-Asp	320
ϵ	Ile-Glx-Leu-Cys-Leu-Val-Ser	244	Thr-Tyr-Thr-Cys-Glu-Val-Thr	302
α (hinge)	Ala-Thr-Gln-Cys-Leu-Ala-Gly	196	Thr-Val-Pro-Cys-Pro-Val-Pro	220
	Pro-Ser-Cys-Cys-His-Pro-Arg	242	Arg-Asp-Leu-Cys-Gly-Cys-Tyr	299

En la cadena α existen los 4 enlaces intracatenarios correspondientes a la cadena γ , pero además hay dos enlaces extras situados en la región "hinge" y que comprenden las cisteínas 196 - 220 y 242 - 299 respectivamente (162). La secuencia de estos péptidos está representada en la tabla XXII.

Los péptidos encontrados en nuestro estudio correspondientes a los enlaces disulfuro en la cadena δ , se expresan en la tabla XXIII. En ella aparece también la posible función de estos péptidos, es decir su localización en la molécula; esta localización se ha llevado a cabo por homología con las otras cadenas de Igs.

5.3.- DEGRADACION ENZIMATICA DE LA IgD. -

Cuando se llevó a cabo la digestión con tripsina de la IgD, se observó un hecho interesante: bastan solo 4 min. a 56°C para que esta proteína se rompa, dando lugar a un fragmento Fc en gran rendimiento. De hecho, a los 2 min., ya se observa la aparición de este fragmento (86), pero los productos obtenidos a los

TABLA XXIII. - PEPTIDOS QUE CONTIENEN LOS RESIDUOS DE CmCys EN LA CADENA δ .-

<u>Péptido</u>	<u>Probable función</u>
Thr-Cys-Phe	1 ^a Cys en el C _H ²
Leu-Cys-Gln	1 ^a Cys en el C _H ³
Ala-Cys-Leu	1 ^a Cys en el C _H ¹
Leu-Cys-Ala	1 ^a Cys en la region V
<u>Tyr</u> (Cys, Lys)	2 ^a Cys en la region V
Val (Cys, Asp _{1.2} Thr Ser ₂)	2 ^a Cys en el C _H ¹
Arg, His, Cys, Asp, Thr, Ser, Glu, Pro, Leu _{2.7}	2 ^a Cys en el C _H ²
Arg, His, Cys, Asp, Thr, Ser, Glu, Val	2 ^a Cys en el C _H ³
His, Cys, Asp, Thr, Ser _{1.7} , Glu, Val	Probablemente el mismo anterior
Thr-Pro-Glu-Cys-Pro-Ser-His-Thr-Gln-Pro-Leu-Gly-Val	Enlace inter H-H
Ile-Ser-Gly-Cys-Arg	Enlace inter H-L

4 min. son más estables, aunque también más heterogéneos.

La posición exacta en que ataca la tripsina a la molécula de IgD, no se conoce. El residuo que aparece como amino terminal del fragmento Fc, es Thr; nuestros resultados indican que la ruptura ha sido heterogénea, pues a pesar de haber obtenido también el fragmento que comienza con Thr (158), encontramos otra secuencia, que en el secuenciador aparece como la principal, que comienza por Ala. La localización exacta de este segundo fragmento, es desconocida también; ámbos fragmentos son de un peso molecular parecido, cuando se corren en EF en geles de SDS-poliacrilamida (pg. 156).

Respecto a los otros dos fragmentos derivados del Fc (picos VI y VII de la columna de DEAE-Sephadex) (pg. 150), la composición de aminoácidos indica que contienen de 1 a 2 residuos de cisteína; ninguno de los dos fragmentos, contenía carbohidrato. Existen algunas diferencias en la composición de aa, así el pico VII (fragmento mas pequeño), no contiene ningún resi-

duo de Arginina ni Fenilalanina, ya que se obtiene un valor muy bajo (0.4) en el análisis. Lo mismo sucede en el caso de la Metionina, que parece estar ausente en el fragmento más pequeño.

Este fragmento contenía un residuo de cisteína en posición 5, cuando se llevó a cabo la degradación de Edman. Este residuo fue detectado por contaje de ^{14}C y recuperado después como Alanina en el análisis de aminoácidos. Cuando se intentó localizar este fragmento en la molécula, por comparación de secuencias conocidas, se observó que tenía un 47% de homología con la región variable de la cadena ligera λ y un 50% con la región variable de las cadenas pesadas. No correspondía por tanto a una parte del fragmento Fc como se pensó en un principio, ya que no correspondía a ninguno de los péptidos con cisteína encontrados en este fragmento. El hecho de que este fragmento reaccione con el antisuero específico para la cadena pesada δ , ha de explicarse por tanto, como un contaminante, en concentración demasiado pequeña para mostrarse en un gel de SDS-poliacrilamida, pero que es capaz de dar una reacción de precipitación con el antisuero.

El por qué este fragmento sale de la columna de DEAE-Sephadex junto o detrás del Fc, que se conoce es mucho más básico que el Fab, es difícil de explicar, y probablemente indica una gran concentración de carga negativa en esta región.

Respecto al fragmento de mayor tamaño (pico VI de la columna de DEAE-Sephadex), la determinación de la secuencia de los 12 primeros residuos a partir del N-terminal, mostró la ausencia de residuos de cisteína en la porción amino terminal de este fragmento. Por comparación con la secuencia establecida en nuestro estudio, con las secuencias de inmunoglobulinas descritas, parece ser, que este fragmento podría corresponder a la región C_H³ de la cadena pesada, que es donde la homología es mayor. Sin embargo, nada se sabe de la estructura primaria de la IgD (cadena δ) en esta región, y es por tanto difícil llegar a una conclusión definitiva.

Como se ha comentado ya en varias partes de esta tesis, una característica de la IgD, es su tendencia a degradarse "espontáneamente" por la acción de ciertos enzimas del suero. El principal fragmento que se obtiene de esta degradación, está relacionado con el Fc, ya que reacciona con el antisuero anti-IgD y no con el anti- λ y es heterogéneo, como lo demuestra la aparición de varios amino terminales cuando se hace la reacción con el cloruro de dansilo. Parece ser que el fragmento obtenido por degradación espontánea de la IgD, está localizado unos pocos residuos a la izquierda del Fc tríptico (163), es decir contendría todo el Fc(t) más varios residuos (no se han definido cuántos) en la región N-terminal de este fragmento.

Nuestros estudios sobre el fragmento obtenido por degradación espontánea, mostraron que tenía un peso molecular de 46.000 daltons. Cuando se llevó a cabo la digestión enzimática de la cadena λ y se procedió a la obtención de los péptidos radioactivos (pg. 144), en realidad se trabajó con el pico III de la columna de Sephadex G-100 (pg. 121), fracción que hemos llamado $\delta + \lambda$ porque contenía el fragmento procedente de la degradación espon-

tánea de la IgD; por tanto en este experimento, se obtuvieron también algunos péptidos radioactivos procedentes de la cadena δ . Su rendimiento era muy bajo, comparado con los obtenidos para la cadena λ y fue por tanto difícil caracterizarlos. El péptido que se obtuvo en mayor proporción, fue el que contiene el enlace disulfuro inter cadenas pesadas, lo cual demostraba la relación de este fragmento con el Fc triptico, que también contiene este péptido. De los enlaces intracatenarios, sólo se obtuvo un péptido en buen rendimiento, cuya composición era : CmCys_{.4} Ala_{.8} Leu_{1.2} y que también se encontró en el experimento realizado con la cadena δ . En la tabla XXIII, hemos colocado este péptido por homología, en las regiones C_H¹ y V; el encontrarlo ahora en este fragmento, parece indicar que la degradación rinde diferentes productos y puede haber por tanto alguna región correspondiente al dominio C_H¹ o incluso a la región variable que todos ellos aparecerían en el mismo pico de la columna de Sephadex G-100.

En conclusión, aunque el estudio de la estructura de la IgD necesita más datos, sobre todo relacionados con la región "hinge" de la molécula, encaminados a determinar el verdadero tamaño de esta región, parece estar claro, basándose en los datos obtenidos en este estudio, que la cadena δ comprende cuatro dominios globulares encerrados en puentes disulfuro intracatenarios. La degradación espontánea de la IgD, da lugar a un fragmento relacionado con el Fc(t), pero de mayor tamaño, que es heterogéneo, así como a la formación de pequeños fragmentos derivados de otras partes de la molécula. En la figura 30, se ha esquematizado un modelo para la molécula de IgD, basado en los datos conocidos hasta el momento. Las siglas CHO, indican la localización de los residuos de carbohidrato.

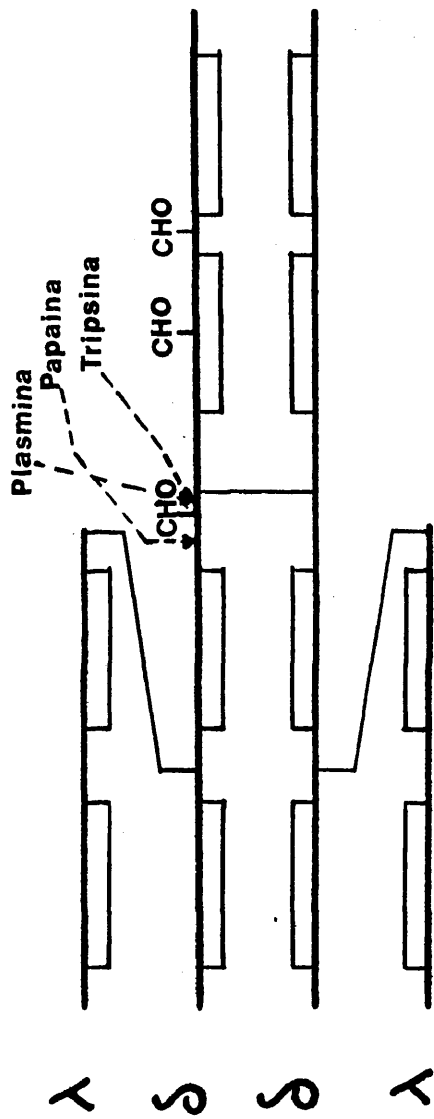


Fig. 30. - Modelo de la molécula de Inmunoglobulina D

6.- CONCLUSIONES

- 1.- La Inmunoglobulina D tiene un peso molecular de 162.000 daltons, es decir superior al de la IgG1, lo cual parece reflejar una estructura particular conteniendo probablemente alguna región extra en su molécula.
- 2.- La Inmunoglobulina D tiene un solo puente disulfuro inter cadenas pesadas, lo que probablemente le confiere una conformación muy accesible al ataque por enzimas séricas del tipo de la plasmina.
- 3.- Por la razón anterior, es necesario el uso de inhibidores de plasmina, tipo ac.εACA, en todo el manejo de esta inmunoglobulina.
- 4.- La IgD se rompe fácilmente por la acción de la tripsina, dando lugar a fragmentos de tipo Fab y Fc, obteniéndose este último en gran rendimiento.
- 5.- El fragmento Fc, una vez purificado, es estable y no es susceptible de posterior degradación espontánea.

6.- Los sitios de ataque de la plasmina y la tripsina parecen estar muy próximos en la secuencia, siendo los pesos moleculares de los fragmentos obtenidos con ambas enzimas, muy parecidos.

7.- El fragmento Fc obtenido por digestión con tripsina, es heterogéneo, como lo demuestra el hecho de poseer varios amino terminales en la reacción con el cloruro de dansilo. Lo mismo sucede con el fragmento obtenido por degradación espontánea de esta inmunoglobulina.

8.- Los péptidos que contienen los residuos de cisteína, se obtienen siempre en la IgD en muy bajo rendimiento. Una posible explicación de esto, es la poca especificidad de la pepsina, que rompería el mismo péptido por diferentes sitios.

9.- La cadena ligera λ de la IgD Men, contiene cinco residuos de cisteína, implicados en dos enlaces intracatenarios y uno intercatenario con la cadena pesada. Es por tanto similar a todas las cadenas ligeras λ descritas.

10.- La cadena δ de la IgD, tiene cuatro enlaces disulfuro intra catenarios, que abarcan a los correspondientes dominios. No se descarta la posibilidad de que la región "hinge" de esta cadena, sea más larga o de conformación diferente que la del resto de las Inmunoglobulinas.

7.- RESUMEN

La Inmunoglobulina D, una de las cinco inmunoglobulinas del suero humano, ha sido siempre la menos estudiada, debido a la escasa concentración en que se presenta en el suero , y a que sufre el fenómeno conocido como "degradación espontánea" de la IgD.

Por este motivo, en este trabajo se trató de estudiar esta proteína desde el punto de vista estructural con el fin de aportar nuevos datos que permitieran compararla con el resto de las inmunoglobulinas.

Para ello, la IgD fue aislada del suero y reducida parcialmente, con el fin de obtener las cadenas pesada y ligera. En ambas cadenas, se determinó el peso molecular; mientras la cadena ligera parecía normal, la cadena δ presentaba un peso molecular de 58.000 daltons, indicativo de alguna región diferente en su molécula.

Los estudios del amino terminal de esta cadena, mostraron que estaba bloqueado en forma de PCA, como sucede en la ma-

yoría de las cadenas pesadas. La digestión con pronasa, dio el péptido Glu-Val como amino terminal, lo que sitúa a esta cadena δ en uno de los dos primeros subgrupos de homología de región variable.

A continuación y con el fin de estudiar los péptidos que contenían los residuos de cisteína, ámbas cadenas fueron digeridas con pepsina, previamente reducidas, procediéndose al aislamiento y purificación de los péptidos radioactivos. La cadena λ contenía 5 péptidos radioactivos, que fue posible localizar en la secuencia por comparación con cadenas ligeras conocidas. La cadena δ contenía 10 péptidos con cisteína, de los que dos correspondían a los enlaces intercatenarios y el resto a los intra.

En una 2^a aproximación, la IgD fue digerida con tripsina con el fin de obtener el fragmento Fc, así como proceder a la caracterización de los fragmentos obtenidos en la digestión. El Fc fue sometido a una digestión con pepsina, aislándose a continuación los péptidos que contenían las cisteínas. De esta manera se pudieron asignar los péptidos correspondientes a la región constante de la

cadena pesada. Al mismo tiempo, en este experimento se procedió a la caracterización de fragmentos derivados del Fc, obtenidos en la digestión triptica como productos secundarios.

Asimismo se procedió al estudio de los fragmentos obtenidos por degradación espontánea de la IgD y a la comparación de estos con los obtenidos por digestión triptica, con el fin de poder proponer un modelo estructural para la molécula de IgD.

Nuestros resultados parecen apoyar el concepto de una estructura básica de la IgD, formada por 4 dominios globulares, encerrados por puentes disulfuro y una región "hinge", cuya extensión no está bien definida todavía.

8.- BIBLIOGRAFIA

- 1.- Tomasi, T.B., Grey, H.M. (1972).- Structure and Function of Immunoglobulin A.- Prog. Allergy 16, 81.
- 2.- Metzger, H. (1970).- Structure and Function of γ M macroglobulins.- Advan. Immunol. 12, 57.
- 3.- Halpern, M.S., Koshland, M.E. (1970).- Novel Subunit in Secretory IgA.- Nature 228, 1276.
- 4.- Mestecky, J., Zikan, J., Butter, W.T. (1971).- Immunoglobulin M and Secretory Immunoglobulin A : presence of a common polypeptide chain different from light chains.- Science 171, 1163.
- 5.- Bennich, H., Johansson, S.G.O. (1971).- Structure and Function of Human Immunoglobulin E.- Adv. Immunol. vol.13, 1.
- 6.- Bennich, H., von Bahr-Lindstrom, H. (1974).- Structure of Immunoglobulin E.- Progress in Immunology II vol. 1, pg. 49. Ed. L. Brent., J. Holborow., North- Holland.
- 7.- Putnam, F.W., Florent, G., Paul, C., Shinoda, T., Shimizu, A., (1973).- Complete Amino Acid Sequence of the Mu Heavy Chain of a Human IgM Immunoglobulin.- Science 182, 287.
- 8.- Cunningham, B.A., Gottlieb, P.d., Pflumm, M.N., Edelman, G.M. (1971).- Immunoglobulin Structure: Diversity, Gene Duplication and Domains.- Progress in Immunology I, pg. 292. Academic Press .
- 9.- Poljak, R.J., Amzel, L.M., Avey, H.P., Becka, L.N., Nisonoff, A.- (1972).- Structure of Fab' New at 6 A Resolution.- Nature New Biology 235, 137.
- 10.- Cahnmann, H.J., Arnon, R., Sela, M. (1966).- Isolation and Characterization of Active Fragments obtained by cleavage of Immunoglobulin G with Cyanogen Bromide.- J. Biol. Chem. 241, 3247.

- 11.- Poulse, K., Fraser, K.J., Haber, E. (1972). - An Active Derivative of Rabbit Antibody Light Chain composed of the Constant and the Variable Domains held together only by a native disulfide bridge. - Proc. Nat. Acad. Sci. 69, 2495.
- 12.- Porter, R.R., (1959). - The Hydrolysis of Rabbit γ -Globulin and Antibodies with crystalline Papain. - Biochem. J. 73, 119.
- 13.- Turner, M.W., Bennich, H.H., Natvig, J.B. (1970). - Pepsin digestion of human G-Myeloma Proteins of different Subclasses. I. - The characteristic features of pepsin cleavage as a function of time. - Clin. Exp. Immunol. 7, 603.
- 14.- Turner, M.w., Bennich, H.H., Natvig, J.B. (1970). - Pepsin digestion of human G-Myeloma proteins of different Subclasses. II. - Immunochemical investigations of the products of peptic digestion. - Clin. Exp. Immunol. 7, 627.
- 15.- Putnam, F.W., Titani, K., Whitley, E. (1966). - Chemical Structure of light chains: Amino Acid Sequence of type κ Bence-Jones proteins. - Proc. Roy. Soc. Lond. 166, 124.
- 16.- Wikler, M., Titani, K., Shinoda, T., Putnam, F.W. (1967). - The Complete Amino Acid Sequence of a λ -type Bence-Jones protein. - J. Biol. Chem. 242, 1668.
- 17.- Milstein, C. (1964). - Disulphide Bridges and Dimers of Bence-Jones protein. - J. Mol. Biol. 9, 835.
- 18.- Wu, T., Kabat, E.A. (1970). - An Analysis of the Sequences of the Variable Regions of Bence-Jones Proteins and Myeloma L chains and their implications for Antibody Complementarity. - J. Exp. Med. 132, 211.
- 19.- Kabat, E.A., Wu, T. (1972). - Construction of a Three-Dimensional model of the Variable Region of Kappa Immunoglobulin Light Chains. - Proc. Nat. Acad. Sci. 69, 960.

- 20.- Press, E. M., Hogg, N. M., (1969). - Comparative study of two Immunoglobulin G Fd-fragments. - Nature 223, 807.
- 21.- Cunningham, B. A., Pflumm, M. N., Rutishauser, V., Edelman, G. M. (1969). - Subgroups of Amino Acid Sequences in the Variable Regions of Immunoglobulin Heavy Chains. - Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 64, 997.
- 22.- Edelman, G. M., Cunningham, B. A., Gall, W. E., Gottlieb, P. D., Rutishauser, U., Waxdal, M. J. (1969). - The Covalent Structure of an entire IgG Immunoglobulin Molecule. - Proc. Nat. Acad. Sci. 63, 78.
- 23.- Press, E. M., Hogg, N. M. (1970). - The Amino Acid Sequence of the Fd Fragments of two Human $\gamma 1$ Heavy Chains. - Biochem. J. 117, 641.
- 24.- Capra, J. D., Kehoe, J. M. (1974). - Variable Region Sequences of Five Human Immunoglobulin Heavy Chains of the $V_H III$ Subgroup : Definitive Identification of Four Heavy Chain Hypervariable Regions. - Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 71, 845.
- 25.- Wang, A. C., Pink, J. R. L., Fudenberg, H. H., Ohms, J. (1970). - A Variable Region Subclass of Heavy Chains common to Immunoglobulins G and M and characterized by an unblocked amino terminal residue. - Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 66, 657.
- 26.- Capra, J. D., Kehoe, J. M. (1975). - Hypervariable Regions, Idiotypy and the Antibody-Combining Site. - Advan. Immunol. vol. 20. Academic Press.
- 27.- Kehoe, J. M., Capra, J. D. (1971). - Localization of two additional Hypervariable Regions in Immunoglobulin Heavy Chains. - Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 68, 2019.

- 28.- Francis, S.H., Leslie, R.G., Hood, L., Eisen, H.N. (1974).- Aminoacid Sequence of the Variable Region of the Heavy (α) Chain of a Mouse Myeloma Protein with anti-hapten activity.- Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 71, 1123.
- 29.- Strosberg, A.D., Jaton, J.C., Capra, J.D., Haber, E. (1972).- Variable Region Sequences from Homogeneous Rabbit Antibody Heavy Chains.- Fed. Proc. Fed. Amer. Soc. Exp. Biol. 31, 771.
- 30.- Ropartz, C., Lenoir, J., Rivat, L. (1961).- A new Inheritable Property of Human Sera: the Inv Factor.- Nature 189, 586.
- 31.- Steinberg, A.G., Wilson, J., Lanset, S. (1962).- A new human gammaglobulin factor determined by an allele at the Inv locus.- Vox Sang. 7, 151.
- 32.- Hilschmann, N., Craig, L.C. (1965).- Amino Acid Sequences studies with Bence-Jones Proteins.- Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 53, 1403.
- 33.- Ein, D. (1968).- Nonallelic behavior of the Oz groups in Human Lambda Immunoglobulin Chains.- Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 60, 982.
- 34.- Hess, M., Hilschmann, N., Rivat, L., Ropartz, C. (1971).- Isotypes in Human Immunoglobulin λ -Chains.- Nature New Biology 234, 58.
- 35.- Rivat, L., Rivat, C., Ropartz, C., Hess, M. (1971).- Subtypes in Human Immunoglobulin λ -Chains.- Rev. Eur. Etud. Clin. Biol. 16, 777.
- 36.- Gibson, D., Levanon, M., Smithies, O. (1971).- Heterogeneity of Normal Human Immunoglobulin Light Chains. Nonallelic variation in the constant region of λ chains.- Biochemistry 10, 3114.

37. - Grubb, R. (1970). - The Genetic Markers of Human Immunoglobulins. - Mol. Biol. Biochem. Biophys. vol. 9, pg. 168. Springer-Verlag, New York.
38. - Fudenberg, H. H., Warner, N. L. (1970). - Genetics of Immunoglobulins. - Adv. Hum. Genet. 1, 131, 209.
39. - Kunkel, H. G., Smith, W. K., Joslin, F. G., Natvig, J. B., Litwin, S. D. (1969). - Genetic Marker of the γ A2 subgroup of γ A Immunoglobulins. - Nature 223, 1247.
40. - Kabat, E. A. (1960). - The upper limit for the size of the human antidextran combining site. - J. Immunol. 84, 82.
41. - Schechter, B., Schechter, I., Sela, M. (1970). - Antibody combining sites to a series of peptide determinants of increasing size. - J. Biol. Chem. 245, 1438.
42. - Freedman, M. H., Grossberg, A. L. Pressman, D. (1968). - The effects of complete modification of amino groups on the antibody activity of anti-hapten antibodies. Reversible inactivation with maleic anhydride. - Biochemistry 7, 1941.
43. - Jonian, M., Grossberg, A. L., Pressman, D. (1970). - Arginyl residues in the active sites of antibody against the 3-nitro-4-hydroxy-5-iodophenylacetyl (NIP) groups. - Immunochemistry 7, 755.
44. - Mayers, G. L., Grossberg, A. L., Pressman, D. (1972). - Arginine and Lysine in binding sites of anti-5-azoisophthalate antibodies. - Immunochemistry 9, 169.
45. - Ohta, Y., Gill, T. J. (1970). - Evidence for the importance of Tryptophan residues in the Antibody-Antigen reactions of anti-DNP and anti-poly Glu⁵⁶ Lys³⁸ Tyr⁶ antibodies. - Immunochemistry 7, 727.

- 46.- Franek, F. (1971).- Affinity labeling by m-Nitrobenzene-diazonium fluoroborate of porcine anti-Dinitrophenyl antibodies. Position of labeled Tyrosine in the λ chains.- Eur. J. Biochem. 19, 176.
- 47.- Givol, D., Strausbauch, P.H., Hurwitz, E., Wilchek, M., Haimovich, J., Eisen, H.N. (1971).- Affinity labeling and cross-linking of the heavy and light chains of a myeloma protein with anti-2,4-dinitrophenyl activity.- Biochemistry 10, 3461.
- 48.- Haimovich, J., Eisen, H.N., Hurwitz, E., Givol, D. (1972).- Localization of affinity-labeled residues on the heavy and light chain of two myeloma proteins with anti-hapten activity.- Biochemistry 11, 2389.
- 49.- Kunkel, H.G., Joslin, F.G., Penn, G.M., Natvig, J.B. (1970).- Genetic Variants of γ G4 globulin. A unique relationship to other classes of γ G globulin.- J. Exp. Med. 132, 508.
- 50.- Grey, H.M., Abel, C.A., Yount, W.J., Kunkel, H.G. (1968).- Subclasses of human γ A-globulins (γ A2) which lacks the disulfide bonds linking heavy and light chains.- J. Exp. Med. 128, 1223.
- 51.- Ishizaka, T., Ishizaka, K., Bennich, H., Johansson, S.G.O. (1970).- Biological activities of aggregated Immunoglobulin E.- J. Immunol. 104, 854.
- 52.- Laffin, J.R. (1970).- A simple immunologic method for the quantitation of immunoglobulin G in Human Cerebrospinal Fluid.- J. Lab. Clin. Med. 76, 816.
- 53.- Riddoch, D., Thompson, R.A. (1970).- Immunoglobulin levels in the cerebrospinal fluid.- Brit. Med. J.- 1, 396.

- 54.- Spiegelberg, H.L., Weigle, W.O. (1965).- The catabolism of homologous and heterologous 7S Gammaglobulin fragments.- J. Exp. Med. 121, 323.
- 55.- Spiegelberg, H.L., Fishin, B.G., Grey, H.M. (1968).- Catabolism of Human γ G-Immunoglobulins of different heavy chain subclasses. I.- Catabolism of γ G-Myeloma proteins in man.- J. Clin. Invest. 47, 2323.
- 56.- Morell, A., Terry, W.D., Waldman, T.A. (1970).- Metabolic Properties of IgG Subclasses in Man.- J. Clin. Invest. 49, 673.
- 57.- Gitlin, D., Kumate, J., Urrusti, J., Morales, C. (1964).- The Selectivity of the Human Placenta in the transfer of Plasma Proteins from mother to fetus.- J. Clin. Invest. 10, 1938.
- 58.- Brambell, F.W.R., Hemmings, W.A., Oakley, C.L., Porter, R.R. (1960).- The relative transmission of the fractions of papain hydrolyzed homologous γ -globulin from the uterine cavity to the foetal circulation in the rabbit.- Proc. Roy. Soc. Ser. B.- 151, 478.
- 59.- Spiegelberg, H.L. (1974).- Biological Activities of Immunoglobulins of different classes and subclasses.- Adv. Immunol. vol. 19, 259. Academic Press.
- 60.- Huber, H., Fudenberg, H.H. (1968).- Receptor Sites of Human Monocytes for IgG.- Int. Arch. All. Appl. Immunol. 34, 18.
- 61.- Huber, H., Polly, M.J., Linscott, W.D., Fudenberg, H.H., Muller-Eberhard, H.J. (1968).- Human Monocytes: Distinct receptor sites for the third Component of Complement and for Immunoglobulin G.- Science 162, 1281.

62. - Ishizaka, K. (1970). - Human Reaginic Antibodies. - Ann. Rev. Med. 21, 187.
63. - Malley, A., Perlman, F. (1966). - Isolation of Reaginic Antibody Fraction with Properties of γ G-Globulin. - Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 122, 152.
64. - Henson, P. M. (1970). - Mechanisms of release of constituents from Rabbit Platelets by Antigen-Antibodies Complexes and Complement. - J. Immunol. 105, 476.
65. - Brown, J. C., De Jesus, D. G., Holborow, E. J., Harris, G. (1970). - Lymphocyte-mediated Transport of Aggregated Human γ -Globulin into germinal centre areas of normal mouse spleen. - Nature 228, 367. ..
66. - Basten, A., Miller, J. F. A. P., Sprent, J., Pye, J. (1972). - A Receptor for Antibody on B-Lymphocytes. I. - Method of detection and functional Significance. - J. Exp. Med. 135, 610.
67. - Lawrence, D. A., Spiegelberg, H. L., Weigle, W. O. (1974). - Immunoglobulins Cytophilic for Human Neutrophils, Lymphocytes and Monocytes. - Fed. Proc. Fed. Amer. Soc. Exp. Biol. vol. 33, 801.
68. - Franklin, E. C., Holman, H. Q., Muller-Eberhard, H. J., Kunkel, H. G. (1957). - An unusual protein component of high molecular weight in the Serum of certain patients with Rheumatoid Arthritis. - J. Exp. Med. 105, 425.

- 69.- Rowe, D.S., Fahey, J.L. (1965).- A new class of Human Immunoglobulin. I.- A Unique Myeloma Protein.- J. Exp. Med. 121, 171.
- 70.- Rowe, D.S., Fahey, J.L. (1965).- A new class of Human Immunoglobulin. II.- Normal Serum IgD.- J. Exp. Med. 121, 185.
- 71.- Rowe, D.S., Crabbe, P.A., Turner, M.W. (1968).- Immunoglobulin D in serum, body fluids and lymphoid tissues.- Clin. Exp. Immunol. 3, 477.
- 72.- Rogentine, G.N., Rowe, D.S., Bradley, J., Waldmann, T.A., Fahey, J.L. (1966).- Metabolism of Human Immunoglobulin D.- J. Clin. Invest. 45, 1467.
- 73.- Arnaud, P., Dechavanne, M., Creyssel, R. (1974).- Metabolism of Human Monoclonal Immunoglobulin D. A study in two Patients with Monoclonal IgD gammopathy.- Biomedicine 21, 77.
- 74.- Pernis, B., Governa, M., Rowe, D.S. (1969).- Light Chain Types in Plasma Cells that produce IgD.- Immunology 16, 685.
- 75.- Pernis, B., Chiappino, G., Rowe, D.S. (1966).- Cells producing IgD Immunoglobulins in Human Spleen.- Nature, 211, 424.
- 76.- Fahey, J.L., Carbone, P.P., Rowe, D.S., Bachmann, R. (1968).- Plasma Cell Myeloma with D-Myeloma Protein (IgD Myeloma).- Amer. J. Med. 45, 373.

77. - Jobin, M. E., Fahey, J. L., Price, Z. (1974). - Long-Term establishment of a Human Plasmacyte Cell Line derived from a patient with IgD Multiple Myeloma. I. - Requirement of a Plasmacyte-Stimulating Factor for the proliferation of Myeloma Cells in Tissue Culture. - J. Exp. Med. 140, 494.
78. - Rivat, C., Ropartz, C., Rowe, D. S. (1971). - Antigenic Heterogeneity of Human IgD Immunoglobulins. - Nature New Biology 231, 279.
79. - Saha, A., Chowdhury, P., Sambury, S., Behelak, Y., Heiner, D. C., Rose, B. (1970). - Studies on Human IgD. II. - Physicochemical Characterization of Human IgD. - J. Immunol. 105, 238.
80. - Bratcher, R. L., Ferguson, W. E., Goldman, A. S., Koenig, V. L. (1972). - The Isolation and Characterization of IgD from Dysgammaglobulinemic Serum. - Arch. Biochem. Biophys. 148, 588.
81. - Rowe, D. S., Dolder, F., Welscher, H. D. (1969). - Studies on Human IgD. I. - Molecular Weight and Sedimentation Coefficient. - Immunochemistry 6, 437.
82. - Saha, A., Chowdhury, P., Sambury, S., Behelak, Y., Heiner, D. C., Rose, B. (1970). - Studies on Human IgD. II. - Physicochemical Characterization of Human IgD. - J. Immunol. 105, 238.
83. - Griffiths, R. W., Gleich, G. J. (1972). - Proteolytic Degradation of IgD and its relation to Molecular Conformation. - J. Biol. Chem. 247, 4543.

- 84.- Spiegelberg, H.L., Prahl, J.W., Grey, H.M. (1970).- Structural Studies on Human γ D Myeloma Protein.- Biochemistry 9, 2115.
- 85.- Leslie, G.A., Clem, W., Rowe, D.S. (1971).- The Molecular Weight of Human IgD Heavy Chains.- Immunochemistry 8, 565.
- 86.- Wolcott, M., Freeman, D.G., Schrohenloher, R.E., Hammack, W., Bennett, J.C. (1975).- Tryptic Cleavage of IgD at elevated temperature and Isolation of a Fc-like Fragment in high yield.- Immunochemistry 12, 685.
- 87.- Bennich, H., Johnson, S.G.O. (1967).- Gamma Globulins.- Nobel Symp. 3. J. Killander, Ed, 193. Interscience Publ.
- 88.- Englis, M., Sindelar, J. (1972).- The Heat Aggregation of Human IgD.- Clin.Chim.Acta 41, 75.
- 89.- Skvaril, F., Radl, J. (1967).- The Fragmentation of Human IgD during storage.- Clin.Chim.Acta 15, 544.
- 90.- Wotcott, M., Freeman, D., Hammack, W., Niedelmeir, W. (1972).- Immunoglobulin D : Hot Trypsin Cleavage and Carbohydrate Composition.- Fed.Proc.Fed.Amer.Soc.Exp.Biol. 31, 772.
- 91.- Jefferis, R. (1975).- Isolation of a $V_H C_\lambda$ fragment on Tryptic digestion of Human IgD Myeloma Proteins.- Imm.Comm. 4(5), 477.
- 92.- Gleich, G.J., Bieger, R.C., Stankievic, R. (1969).- Antigen Combining Activity Associated with Immunoglobulin D.- Science 165, 606.
- 93.- Levine, B.B., Redmond, A. (1967).- Immunochemical Mechanisms of Penicillin Induced Coombs Positivity and Hemolytic Anemia in Man.- Int.Arch.Allergy Appl.Immunol. 31, 594.

- 94.- Heiner, D.C., Rose, B. (1970).- A Study of Antibody Responses by Radioimmunodiffusion with demonstration of γ D Antigen-binding activity in Four Sera.- J.Immunol. 104, 691.
- 95.- Heiner, D.C., Saha, A., Rose, B. (1969).- Antigen Binding Activity (ABA) and Physicochemical Characteristics of IgD.- Fed.Proc.F.A.S.E.B. 28, 766.
- 96.- Devey, M., Carter, D., Sanderson, C.J., Coombs, R.R.A. (1970).- IgD Antibody to Insulin.- Lancet II, 1280.
- 97.- Lertora, J.J.L., Gomez, F.J., Leslie, G.A. (1975).- Structure and Biological Functions of Human IgD. V.- Insulin Antibodies of the IgD class in sera from some diabetic patients.- Int.Arch.All.Appl.Immunol.
- 98.- Ritchie, R.F., Portland, M. (1968).- IgD Antinuclear Antibodies.- Arthritis and Rheum. 11, 506.
- 99.- Watson, I., Heiner, D., Rose, B., Bootello, A. (1969).- The Demonstration of IgD Antinuclear Antibody Activity in Systemic Lupus Erythematosus.- Clin.Res. 17, 362.
- 100.- Kantor, G.L., Van Herle, A.J., Barnett, E.V. (1970).- Auto-Antibodies of the IgD class.- Clin. Exp.Immunol. 6, 951.
- 101.- Hiramatsu, S., Tsuyuguchi, I., Inai, S. (1969).- Lack of Binding of Complement by IgD.- Biken's J. 12, 43.
- 102.- Henney, C.S., Welscher, H.D., Terry, W.D., Rowe, D.S. (1969) Studies on Human IgD. II.- The lack of Skin Sensitizing and Complement Fixing Activities of Immunoglobulin D.- Immunochemistry 6, 445..
- 103.- Konno, T., Hirai, H., Inai, S. (1975).- Studies on IgD.I.- Complement Fixing Activities of IgD myeloma Proteins.- Immunochemistry 12, 773.

- 104.- Ishizaka, K., Ishizaka, T.L. (1966).- Physicochemical Properties of Reaginic Antibodies. II.- Characteristic Properties of Reaginic Antibody Different from γ A Isohaemagglutinin and γ D Globulin.- J.Allergy 37, 336.
- 105.- Ovary, Z. (1969).- Lack of Skin-Sensitizing Property of γ D Myeloma Protein in Guinea-Pigs.- J.Immunol. 102, 790.
- 106.- Rowe, D.S., Hug, K., Forni, L., Pernis, B. (1973).- Immunoglobulin D as a Lymphocyte Receptor.- J.Exp.Med. 138, 965.
- 107.- Rowe, D.S., Hug, K., Page Faulk, W., McCormick, J.N., Gerber, H. (1973).- IgD on the Surface of Peripheral Blood Lymphocytes of the Human Newborn.- Nature New Biology 242, 155.
- 108.- Rowe, D.S., Crabbe, P., Turner, M.W. (1968).- Immunoglobulin D in serum, body fluids and lymphoid tissues.- Clin.Exp. Immunol. 3, 477.
- 109.- Toivanen, P., Rossi, T., Hirvonen, T. (1969).- Immunoglobulins in Human Fetal Sera at Different Stages of Gestation.- Experientia 25, 527.
- 110.- Leslie, G.A., Swate, T.E. (1972).- Structure and Biologic Functions of Human IgD. I.- The Presence of Immunoglobulin D in Human Cord Sera.- J.Immunol. 109, 47.
- 111.- Evans, H. E., Akpata, S.O., Glass, L., (1971).- Serum Immunoglobulin Levels in Premature and Full-Term Infants.- Am.J.Clin.Pathol. 56, 416.
- 112.- Van Boxel, J.A., Paul, W.A., Terry, W.D., Green, I. (1972).- IgD-Bearing Human Lymphocytes.- J.Immun. 109, 648.

- 113.- Knapp, W., Bolhuis, R.L.H., Radl, J., Hijmans, W. (1973).- Independent Movement of IgD and IgM Molecules on the Surface of Individual Lymphocytes.- J.Immun. 111, 1295.
- 114.- Fu, S.M., Winchester, R.J., Kunkel, H.G. (1975).- Similar Idiotypic Specificity for the Membrane IgD and IgM of Human B Lymphocytes.- J.Immun. 114, parte 1, 250.
- 115.- Salsano, F., Froland, S.S., Natvig, J.B., Michaelsen, T.E. (1974).- Same Idiotype of B-Lymphocyte Membrane IgD and IgM. Formal Evidence for Monoclonality of Chronic Lymphocytic Leukemia Cells.- Scand.J.Immun. 3, 841.
- 116.- Kubo, R.T., Grey, H.M., Pirofsky, B. (1974).- IgD: A Major Immunoglobulin on the Surface of Lymphocytes from Patients with Chronic Lymphatic Leukemia.- J.Immun. 112, 1952.
- 117.- Fu, S.M., Winchester, R.J., Kunkel, H.G. (1974).- Occurrence of Surface IgM, IgD and Free Light Chains on Human Lymphocytes.- J.Exp.Med. 139, 451.
- 118.- Fontaine, M., Perrimond, H. (1975).- Immunofluorescent Study of Acute Lymphoblastic Leukemia Cells.- Sub. for publication.
- 119.- Fontaine, M., Mercier, P., Mongin, M. (1974).- Report of IgA, IgD, IgG and IgM Secreting Plasma Cells in Cancerous Lymph Nodes.- Biomedicine 21, 168.
- 120.- Elling, P., Wanstrup, J. (1969).- Immunohistochemical demonstration of Immunoglobulin D in Sarcoid Lymph Nodes.- Acta Path. Microbiol.Scand. 77, 326.
- 121.- Piessens, W.F., Schur, P.H., Moloney, W.C., Churchill, W.H. (1973).- Lymphocyte Surface Immunoglobulins. Distribution and Frequency in Lymphoproliferative Diseases.- New England J.Med. 288, 176.

- 122.- Piessens, W. F. , Schur, P. H. , Moloney, W. C. , Churchill, W. H. (1972).- Lymphocyte Surface Immunoglobulins in Lymphoproliferative Diseases.- Clin. Res. 20, 517.
- 123.- Preud'homme, J. L. , Clauvel, J. P. , Seligmann, M. (1975).- Immunoglobulin D-Bearing Lymphocytes in Primary Immunodeficiencies.- J. Immun. 114, parte 2, 481.
- 124.- Fu, S. M. , Kunkel, H. G. (1974).- Membrane Immunoglobulins of B Lymphocytes. Inability to detect certain characteristic IgM and IgD Antigens.- J. Exp. Med. 140, 895.
- 125.- Klapper, D. G. , Mendenhall, H. W. (1971).- Immunoglobulin D Concentration in Pregnant Women.- J. Immun. 107, 912.
- 126.- Johansson, S. G. O. , Berg, T. (1967).- Immunoglobulin Levels in Healthy Children.- Acta Paediat. Scand. 56, 572.
- 127.- Geny, B. , Rodary, C. , Griscelli, C. , Mozziconacci, P. (1974) Immunoglobulin D (IgD) in Childhood. I.- Maturation of Serum IgD: study of a population of healthy children.- Biomedicine 20, 40.
- 128.- Berg, T. , Johansson, S. G. O. (1969).- Immunoglobulin Levels during Childhood with a special regard to IgE.- Acta Paediat. Scand. 58, 513.
- 129.- Leslie, G. A. , Lopez Correa, R. H. , Holmes, J. N. (1975).- Structure and Biological Functions of Human IgD. IV.- Ontogeny of Human Serum Immunoglobulin D (IgD) as Related to IgG, IgA, and IgM.- Int. Arch. All. Appl. Immun. 49, 350.
- 130.- Walzer, P. D. , Kunkel, H. G. (1974).- The Correlation of Serum IgD Concentration with Gm Allotype.- J. Immun. 113, 274.

- 131.- Geny, B., Griscelli, C., Mozziconacci, P. (1974).- Immunoglobulin D (IgD) in Childhood. II.- Serum Levels in Juvenile Rheumatoid Arthritis.- Biomedicine 20, 125.
- 132.- Kacaki, J., Budimir, M., Nikolic, J., Marinkovic, D. (1971).- Immunoglobulin D in Some Rheumatic Diseases.- VII Eur. Rheumatology Congress. Abs. 37, 8. Brighton.
- 133.- Onodera, S., Shihata, A., Miora, A. B., Suzuki, A., Sakamoto, S., Sozuki, C., Ita, C. (1966).- Quantitative Determination of Serum IgD in Gammopathy.- Tohoku J. Exp. Med. 95, 145.
- 134.- Brasher, G. W., Hall, F. F., Bouland, P. D. (1973).- Serum IgD Concentrations in Children with Atopic Diseases.- J. All. Clin. Immun. 52, 167.
- 135.- Kohler, P. F., Farr, R. S. (1967).- Quantitative Comparison of Immunoglobulins in Atopic (Reaginic) and Nonatopic (Non-reaginic) Individuals; Higher γ D Levels in Atopic Sera.- J. All. 39, 311.
- 136.- Perelmutter, L., Rose, B., Goodfriend, L. (1966).- The Relationship between Skin-Sensitizing Antibodies and gamma-D-Globulin in the Sera of Ragweed-Sensitive Individuals.- Int. Arch. All. Appl. Immun. 29, 364.
- 137.- Buckley, R. H., Fiscus, S. A. (1975).- Serum IgD and IgE concentrations in Immunodeficiency Diseases.- J. Clin. Invest. 55, 157.
- 138.- Buckley, R. H., Trayer, H. R. (1972).- Serum IgD Concentrations in Sarcoidosis and Tuberculosis.- Clin. Exp. Immun. 10, 257.
- 139.- Sirisinha, S., Charupatana, C., Ramasoota, T. (1972).- Serum Immunoglobulins in Leprosy Patients with Different Spectra of Clinical Manifestations.- Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 140, 1062.

- 140.- Hobbs, J. R., Slot, G. M. J., Campbell, C. H., Clein, G. P., Scott, J. T., Crowther, D., Swan, H. T. (1966). - Six Cases of Gamma-D Myelomatosis. - Lancet II, 614.
- 141.- Fine, J. M., (1969). - Deux Cas de myelome avec Immunoglobuline IgD a caractere monoclonal. - Rev. Franc, Etud. Clin. Biol. 14, 1018.
- 142.- Fine, J. M., Rivat, C., Lambin, P., Ropartz, C. (1974). - Monoclonal IgD. - A Comparative Study of 60 Sera with IgD "M" Component. - Biomedicine, 21, 119.
- 143.- Abney, E. R., Parkhouse, R. M. E. (1974). - Candidate for Immunoglobulin D present on Murine B Lymphocytes. - Nature 252, 600.
- 144.- Melcher, U., Uhr, J. W. (1976). - Cell Surface Immunoglobulin. XVI. - Polypeptide Chain Structure of Mouse IgM and IgD-like Molecule. - J. Immun. 116, 409.
- 145.- Melcher, U., Vitetta, E. S., McWilliams, M., Lamm, M. E., Phillips-Quagliata, J. M., Uhr, J. W. (1974). - Cell Surface Immunoglobulin. X. - Identification of an IgD-like Molecule on the Surface of Murine Splenocytes. - J. Exp. Med. 140, 1427.
- 146.- Vitetta, E. S., Melcher, U., McWilliams, M., Lamm, M. E., Phillips-Quagliata, J. M., Uhr, J. W. (1975). - Cell Surface Immunoglobulin. XI. - The Appearance of an IgD-like molecule on Murine Lymphoid Cells during Ontogeny. - J. Exp. Med. 141, 206.
- 147.- Leslie, G. A., Armen, R. C., (1974). - Structure and Biological Functions of Human IgD. III. - Phylogenetic Studies of IgD. - Int. Arch. All. Appl. Immun. 46, 191.

- 148.- Maizel, J.V. (1966).- Acrylamide Gel Electrophorograms by Mechanical Fractionation Radioactive Adenovirus Proteins.- Science, 151, 988.
- 149.- Weber, K., Osborn, M. (1969).- The Reliability of Molecular Weight Determination by Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis.- J. Biol. Chem. 244, 4406.
- 150.- Offord, R. E. (1966).- Electrophoretic Mobilities of Peptides on Paper and Their Use in the Determination of Amide Groups.- Nature 211, 591.
- 151.- Waley, S.G., Watson, J. (1953).- The Action of Trypsin on Polylysine.- Biochem. J. 55, 328.
- 152.- Frangione, B. (1968).- Structure of Immunoglobulins.- Thesis Doctoral.
- 153.- Grey, W.R., Hartley, B.S. (1963).- The Structure of a Chymotryptic Peptide from Pseudomonas Cytochrome C-551.- Biochem. J. 89, 379.
- 154.- Woods, K.R., Wang, K.T. (1967).- Separation of Dansyl-Amino acids by Polyamide Layer Chromatography.- Biochem. Biophys. Acta 133, 369.
- 155.- Crowshaw, K., Jessup, S.J., Ramwell, P.W. (1967).- Thin-layer Chromatography of DNS-derivatives of aminoacids present in superfusates of cat cerebral cortex.- Biochem. J. 103, 79.
- 156.- Perry, M.B., Milstein, C. (1970).- Interchain Bridges of Human IgD.- Nature 228, 934.

- 157.- Mendez, E., Frangione, B., Kochwa, S. (1973).- Chemical Typing of Human Immunoglobulins E and D.- FEBS Lett. 33, 1,4.
- 158.- Spiegelberg, H.L. (1975).- NH₂-terminal amino acid sequence of the Fc fragment of IgD resembles IgE and IgG sequences.- Nature 254, 723.
- 159.- Michaelsen, T.E., Frangione, B., Franklin, E.C. (1976).- Primary Structure of the "hinge" region of Human IgG3. Probable quadruplication of a 15 amino acid residues basic unit.- Sometido para publicacion.
- 160.- Milstein, C., Northrop, F. (1976).- N-terminal amino acid sequence of a Human delta-chain myeloma protein.- Eur. J. Immun. 6,222.
- 161.- Gally, J.A. (1973).- Structure of Immunoglobulins.- The Antigens vol. I, pg. 161. Ed. M.Sela. Academic Press.
- 162.- Wolfenstein-Todel, C., Prelli, F., Frangione, B., Franklin, E.C. (1973).- Immunoglobulin A. Arrangement of Disulfide Bridges in the Hinge Region of an Immunoglobulin A1 Human Myeloma Protein.- Biochemistry 12, 5195.
- 163.- Goyert, S.M., Hugli, T.E., Meinke, G.C., Spiegelberg, H.L. (1976).- Structural Studies of IgD.- Fed. Proc. FASEB, vol. 35, n^o 3, 596.