ELSA MARIA RIBEIRO BRONZE DA ROCHA

CARACTERIZAÇÃO DE AUTOANTICORPOS PRODUZIDOS POR RATINHOS PORTADORES DE LUPUS ERITEMATOSO SISTÉMICO:

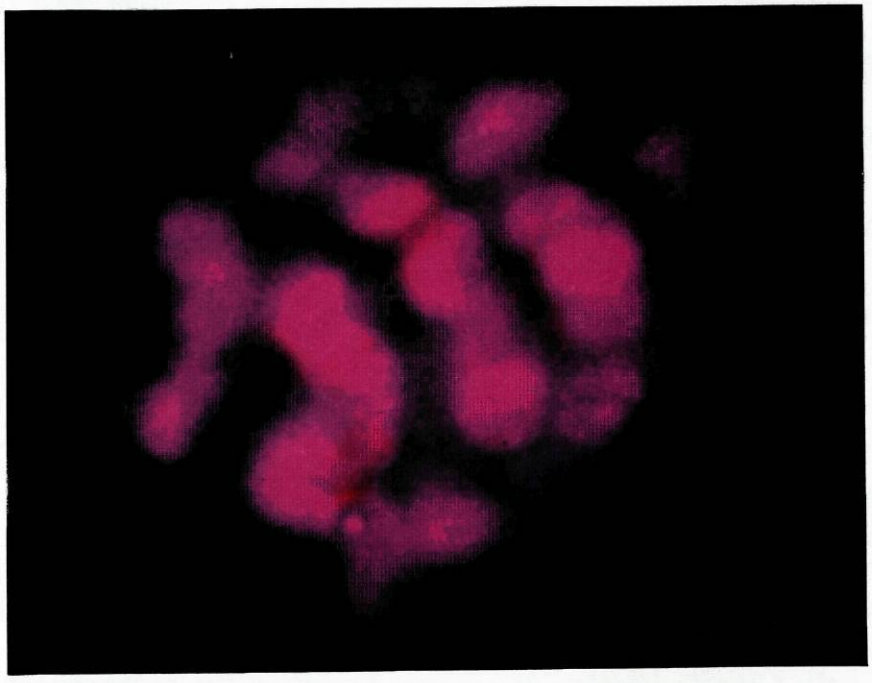
ANÁLISE CITOLÓGICA E MOLECULAR DOS RESPECTIVOS ANTIGÉNIOS

PORTO - 1995

ELSA MARIA RIBEIRO BRONZE DA ROCHA

CARACTERIZAÇÃO DE AUTOANTICORPOS PRODUZIDOS POR RATINHOS PORTADORES DE LUPUS ERITEMATOSO SISTÉMICO:

ANÁLISE CITOLÓGICA E MOLECULAR DOS RESPECTIVOS ANTIGÉNIOS



(Cromossomas condensados de fibroblastos de ratinho sincronizados com colquicina)

PORTO - 1995

ELSA MARIA RIBEIRO BRONZE DA ROCHA

Assistente da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto

CARACTERIZAÇÃO DE AUTOANTICORPOS PRODUZIDOS POR RATINHOS PORTADORES DE LUPUS ERITEMATOSO SISTÉMICO:

ANÁLISE CITOLÓGICA E MOLECULAR DOS RESPECTIVOS ANTIGÉNIOS

PORTO - 1995

DISSERTAÇÃO DE CANDIDATURA AO GRAU DE DOUTOR
APRESENTADA À FACULDADE DE FARMÁCIA
DA UNIVERSIDADE DO PORTO

ORIENTADOR: Professor Doutor CLAUDIO E. SUNKEL

CO-ORIENTADOR: Professor Doutor FRANCISCO CARVALHO GUERRA

Este trabalho foi realizado com o apoio financeiro do Centro de Citologia Experimental, da Reitoria e da Fundação Gomes Teixeira da Universidade do Porto e da Junta Nacional de Investigação Científica e Tecnológica (JNICT).

Declaração

De acordo com o disposto no nº 2 do Artigo 8º do Decreto Lei nº 388/70, nesta dissertação foram utilizados resultados das publicações abaixo indicadas. No cumprimento do disposto no referido Decreto-Lei, a autora desta dissertação declara que interveio na concepção e na execução do trabalho experimental, na interpretação dos resultados e na redacção dos manuscritos publicados e enviado para publicação, sob o nome de Elsa Bronze-da-Rocha.

Bronze-da-Rocha, E., Machado, C., Staines, N.A. and Sunkel, C.E. (1992). Systemic Lupus Erythematosus Murine Monoclonal DNA-binding Antibodies Recognize Cytoplasmic and Nuclear Phosphorylated Antigens that Display Cell Cycle Redistribution in HEp-2 Cells. Immunology **77**, 582-591.

Bronze-da-Rocha, E., Catita, J. A. and Sunkel, C.E. (1994). Molecular Cloning of a Novel Human Chromosomal Antigen which Is Cell Cycle-Dependent and Recognized by Murine Systemic Lupus Erythematosus Monoclonal Antibodies. Clinical and Experimental Rheumatol. **12**, S-99 (B92).

Bronze-da-Rocha, E., Catita, J. A. and Sunkel, C.E. (1995). Molecular Cloning of a Novel Autoantigen that Associates with Condensed Chromosomes During Mitosis. (para publicação).

Ao Zé Ireneu

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor Francisco Carvalho Guerra, por quem tenho grande estima e admiração, todo o apoio, estímulo e orientação prestados no desenvolvimento da minha actividade docente, assim como o incentivo e ajuda que permitiram a realização deste trabalho.

Ao Professor Doutor Claudio Sunkel, a oportunidade da realização deste estudo e o contributo ímpar para a consecução dos meus objectivos profissionais. Para ele a minha profunda gratidão pela orientação, disponibilidade e estímulo que sempre demonstrou.

Ao Professor Norman Staines, do King's College da Universidade de Londres, a oportunidade de aprendizagem das técnicas de produção de anticorpos monoclonais e a cedência de alguns autoanticorpos de ratinhos portadores de Lupus Eritematoso Sistémico.

Ao Professor Doutor Fernando Sena Esteves e às Professoras Doutoras Natércia Teixeira e Elisabeth Castro, o apoio prestado em termos de docência e a amizade sempre demonstrada.

Ao Professor Doutor Castro e Melo, do serviço de Imunologia do Hospital Geral de Santo António, a cedência de soros de doentes com Lupus Eritematoso Sistémico.

Ao Professor Doutor Manuel Teixeira da Silva, os conhecimentos transmitidos, nomeadamente a nível da microscopia electrónica, a disponibilidade pessoal e a cedência dos meios técnicos do seu departamento.

Aos Professores Doutores Roberto Salema e Pedro Moradas Ferreira, a amabilidade e os meios técnicos postos à disposição.

Ao Professor Doutor Artur Águas, o cuidado com que reviu parte deste trabalho.

À Drª Isabel Alves, do Centro de Estudos de Paramiloidose, a realização da focagem isoeléctrica.

À Dª Paula Macedo e à Dª Irene Barros, toda a disponibilidade cedida na preparação das amostras para microscopia electrónica.

Ao Jorge Pedrosa, a amizade e a colaboração na obtenção de anticorpos policlonais.

À Alice Santos Silva e à Anabela Cordeiro da Silva, da Faculdade de Farmácia, e ao João Almeida Santos, ao José António Catita, à Paula Almeida Coelho e à Paula Sampaio, do Centro de Citologia Experimental, meus amigos e companheiros de trabalho, uma consideração muito especial pelo apoio e disponibilidade sempre presentes.

Aos meus colegas de trabalho Álvaro Tavares, Cristina Machado, Elsa Logarinho, Isabel Amorim, Hassan Bousbaa, Helena Carvalho, Joana Perdigão, Carmo Avides Moreira, Orlando Morais, Susana Pereira, Tatiana Santos, do Centro de Citologia Experimental, a colaboração e amizade.

À Dª Andreia Costa e ao Eng. Rui Pinto, responsáveis pelo serviço de Iconografia do Centro de Citologia Experimental e da Faculdade de Farmácia, o valioso contributo na execução do material gráfico.

Uma palavra ainda para todos os que trabalham no Laboratório de Bioquímica da Faculdade de Farmácia e no Centro de Citologia Experimental, em particular no Laboratório de Genética Molecular, pela ajuda e a cordialidade prestadas.

ÍNDICE

Página

- **ABREVIATURAS** 1

- **RESUMO** 7

INTRODUÇÃO TEÓRICA 13

- **Introdução** 14

- **Lupus eritematoso sistémico** 18
  - 1 - Factores de risco no LES humano 19
    - 1.1 - Idade 19
    - 1.2 . Sexo 19
    - 1.3 - Raça 20
    - 1.4 - Tipo de autoanticorpos 20
    - 1.5 - Factores genéticos 21
    - 1.6 - Agentes ambientais 21
  - 2 - Autoantigénios e autoanticorpos 22
  - 3 - Factores associados à etiologia do lupus 26
    - 3.1 - Factores genéticos 26
    - 3.2 - Apoptose 27
    - 3.3 - Células B 28
    - 3.4 - Células T 29
    - 3.5 - Interleuquinas 30
    - 3.6 - Mímica molecular 30

- **Funções dos autoantigénios** 33
  - Processamento de ARNs 33
  - Nucléolo 34
  - Mitose e centro organizador de microtúbulos 35
  - Síntese de ácidos nucleicos 37
  - Outras funções 38

- **Ciclo celular** 41
  - Características das várias fases do ciclo celular 42
    - Interfase 42
    - Mitose 43

Página

- Pontos de controlo no ciclo celular 47
- Regulação na transição G1/S 48
- Regulação na transição G2/M 52
- Ciclo celular e transformação celular 56

- **Objectivos** 59

PARTE EXPERIMENTAL 61

I - PREPARAÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS 62

- **Introdução** 63

- **Material biológico** 67
- Animais 67
- Células: - SP2/O 67
- "Feeder cells" 67
- Linfócitos híbridos 67
- Células HEp-2 67

- **Métodos** 67
- Fusão de células de mieloma (SP2/O) com células de baço de ratinho 67
- 1º Rastreio 68
- 1ª Clonagem 68
- 2º Rastreio 68
- 2ª Clonagem 69
- Preparações de ADN 69
- Preparações de extractos proteicos totais, nucleares e citoplasmáticos 69
- ELISA 69
- Tratamento com DNase 70
- Imunofluorescência indirecta 70
- Electroforese 70
- "Immunoblotting" 71

- **Resultados** 72
- ELISA dos mAbs isolados 72
- Reactividade dos mAbs por imunofluorescência 77
- Reactividade dos mAbs por "immunoblotting" 80

Página

- **Discussão** 82

II - CARACTERIZAÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS E ANÁLISE BIOQUÍMICA DOS AUTOANTIGÉNIOS ASSOCIADOS 86

- **Introdução** 87

- **Material biológico** 88
  - Animais 88
  - Células Hep-2 88

- **Métodos** 88
  - Preparação de extractos proteicos totais 88
  - Preparação de extractos proteicos nucleares 88
  - Preparação de extractos proteicos citoplasmáticos 88
  - Imunofluorescência indirecta 89
  - Electroforese 89
  - "Immunoblotting" 89
  - Tratamento com DNase 89
  - Tratamento com fosfatase alcalina 90
  - Imunoprecipitação com [^{32}P]ortofosfato e [^{35}S]Met 90

- **Resultados** 91
  - Padrões de imunofluorescência dos mAbs em células HEp-2 91
  - Polipeptídeos reconhecidos pelos mAbs por "immunoblotting" 97
  - Efeito do tratamento com DNase 100
  - Imunoprecipitação dos extractos marcados com [^{35}S]Met 102
  - Imunoprecipitação dos extractos marcados com [^{32}P]ortofosfato 103
  - Reconhecimento de epítopes fosforilados pelos mAbs 104

- **Discussão** 107

III - ISOLAMENTO DE GENES QUE CODIFICAM PARA ANTIGÉNIOS RECONHECIDOS POR SOROS AUTOIMUNES 113

- **Introdução** 114

Página

- **Material biológico** 117
  - Estirpes bacterianas 117
  - Vectores 117
  - Linhas celulares 117

- **Métodos** 117
  - Determinação do título da biblioteca fágica ou do "stocks" de fago 117
  - Plaqueamento e expressão de bibliotecas 117
  - 1º Rastreio da biblioteca com anticorpos 118
  - 1º Rastreio da biblioteca com sonda marcada com ^{32}P-dCTP 118
  - 2º Rastreio 119
  - 3º Rastreio 119
  - Preparação de lisados de fagos 119
  - Preparação de ADN de fago 119
  - Digestão do ADN 120
  - Marcação de sondas com ^{32}P-dCTP 120
  - "Dot Blot" de lisados de fagos 120
  - Preparação de antigénios recombinantes a partir de lisogénio λgt11 em *E. coli* Y1089 121
  - Preparação de lisados proteicos dos lisogénios recombinantes 121
  - Isolamento ("mini-prep") de DNA de plasmídeo 122
  - Preparação de células competentes 122
  - Subclonagem do ADN isolado em plasmídeos 122
    - a) - Ligação de fragmentos de ADN 122
    - b) - Transformação de células competentes 123
    - c) - Isolamento e crescimento de recombinantes 123
  - Expressão da proteína de fusão 123
  - Purificação da proteína de fusão por cromatografia de afinidade 124
  - Preparação de anticorpo policlonal 124
  - Imunopurificação do anticorpo policlonal 124
  - "Immunoblotting" 124
  - Focagem isoeléctrica 125
  - Imunofluorescência indirecta 125
  - Extracção de ARN 125
  - Isolamento de ARN poli(A)$^+$ 126
  - Electroforese de ARN para Northern 126
  - Extracção de ADN genómico 127
  - Extracção de ADN genómico de células em cultura 127
  - Electroforese de ADN para Southern 128
  - Delecções unidireccionais do ADN com a Exonuclease III 128

Página

- Sequenciação do ADN de cadeia dupla 129
- P.C.R. ("polimerase chain reaction") 130
- Transcrição *in vitro* 131
- Tradução *in vitro* 131
- Microscopia electrónica 131

- **Resultados** 133
  - Isolamento de clones de cADN 133
  - Produção de lisogénios recombinantes 136
  - Produção do anticorpo policlonal 139
  - Padrões de imunofluorescência exibidos por mAb 402 e rb-7 139
  - Antigénios reconhecidos com anticorpos monoclonal e policlonal 150
  - Análise por "Northern blot" 151
  - Análise por "Southern blot" 152
  - Sequenciação do ADN do clone XT-2 154
  - Rastreio da biblioteca de cADN em λZAPII 159
  - Transcrição e tradução *in vitro* 161
  - Estudo preliminar da reactividade dos soros de doentes com lupus 162

- **Discussão** 165

CONSIDERAÇÕES FINAIS 170

- **BIBLIOGRAFIA** 174

- **APÊNDICE** 190

  1 - Estirpes bacterianas 190

  2 - Meios de cultura para o crescimento de bactérias e infecção por bacteriófagos 190
  - Meio de LB (Luria-Bertani) 190
  - Meio de LB contendo ampicilina 190
  - Meio de L-agar 190
  - Meio de L-agar contendo ampicilina 190
  - Meio de L-agar contendo ampicilina, IPTG e X-gal 194
  - Top-agarose 194

Página

- Ampicilina 50 μg/ml 194
- IPTG 194
- $MgSO_4$ 194
- Maltose 195
- X-gal 195

3 - Vectores 195
3.1 - Fagemídeo pBluescript II SK (+/-) 195
3.2 - Fagemídeo pBS (+/-) 195
3.3 - Vector λgt11 196
3.4 - Vector λZAPII 196
3.5 - Vector pMALcRI 197
3.6 - Vectores pSPT18 e pSPT19 197

4 - Determinação espectofotométrica da concentração de ácidos nucleicos 204

5 - Constantes físicas dos nucleótidos trifosfatados 204

6 - Marcadores de ácidos nucleicos e proteínas 205
6.1 - Marcadores de ácidos nucleicos 205
6.2 - Marcadores de peso molecular 205

7 - Oligonucleótidos 206

8 - Abreviaturas e pesos moleculares dos aminoácidos 207

9 - Código genético 208

10 - Tampões e soluções 208

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

A	absorvância
ADN	ácido desoxiribonucleico
ADNcd	ADN de cadeia dupla
ADNcs	ADN cadeia simples
AMP	adenosina 5'-monofosfato
AMPS	persulfato de amónio
APRT	adenina fosforibosil transferase
ARN	ácido ribonucleico
β	beta
B220	antigénio de superfície dos linfócitos pré-B, linfócitosB e de uma subpopulação dos linfócitos T citotóxicos
B220+	células que expressam o antigénio de B220
B220-	células que não expressam o antigénio B220
bp	par de bases
BPB	azul de bromofenol
BSA	albumina bovina sérica
BXSB	ratinhos que desenvolvem espontaneamente um sindrome de autoimunidade caracterizado por uma linfoadenopatia moderada, hipergamaglobulinémia, esplenomegalia, anemia hemolítica com teste de Coombs positivo, complexos autoimunes e glomerulonefrite com sindroma nefrótico
cADN	ADN complementar
cAMP	adenosina 5'-monofosfato cíclico
CAP	7-metilguanilato (m^7G)
CD	"clusters of differentiation"
CD3	antigénio de superfície de todas as células T
CD4	antigénio de superfície dos linfócitos T "helper"
CD4+	células que expressam o antigénio CD4
CD4-	células que não expressam o antigénio CD4
CD8	antigénio de superfície dos linfócitos T citotóxicos
CD8+	células que expressam o antigénio CD8
CD8-	células que não expressam o antigénio CD8
CENP-A	proteína centromérica A
CENP-B	proteína centromérica B
CENP-C	proteína centromérica C
CENP-D	proteína centromérica D
CENP-E	proteína centromérica E
cdc	gene do ciclo celular ("cell division cycle")
Cdi	"Cdk inhibitor protein"
Cdk	"cyclin-dependent kinase"
CDR	região complementar determinante
Clb	ciclina B

Cln	ciclina
CPF	factor de clivagem e poliadenilação
CREST	"Calcinosis, Raynaud's Phenomenon, Esophageal dysmotility, Sclerodactyly, Telangiectasia"
dATP	2'-desoxiadenosina 5'-trifosfato
ddATP	2',3'-didesoxiadenosina 5'-trifosfato
DCA	"Dividind cell antigen"
dCTP	2'-desoxicitidina 5'-trifosfato
ddCTP	2',3'-didesoxicitidina 5'-trifosfato
DEPC	dietil pirocarbonato
dGTP	2'-desoxiguanosina 5'-trifosfato
ddGTP	2',3'-didesoxiguanosina 5'-trifosfato
DMEM	"Dulbecco's modified Eagle's medium"
DMSO	dimetil sulfóxido
DNase	desoxiribonuclease
dNTP	2'-desoxinucleótido 5'-trifosfato
ddNTP	2',3'-didesoxinucleótido 5'-trifosfato
D.O.	densidade óptica
DTT	ditiotreitol
dTTP	2'-desoxitimidina 5' trifosfato
ddTTP	2',3'-didesoxitimidina 5' trifosfato
E. coli	*Escherichia coli*
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
EGTA	ácido etilenoglicol-N,N,N',N'-tetracético
ELISA	"enzyme-linked immunosorbent assay"
Fc	fragmento cristalizável da imunoglobulina
FCS	soro bovino fetal ("fetal calf serum")
g	força centrífuga relativa
GMP	guanosina 5'-monofosfato
h(s)	hora(s)
HAT	hipoxantina, timidina, aminopterina
HGPRT	hipoxantina-guanina fosforibosil transferase
HLA	"human leucocyte antigen"
HMW	padrões de alto peso molecular
hnARN	ARN heterogénio nuclear
Hsp	proteína de choque térmico
hY ARN	ARN citoplasmático humano
Ig	imunoglobulina
IL	interleuquina
IMP	inosina 5'-monofosfato
INCENP	"inner centromere proteins"
INF	"interferon"
"insert"	fragmento de ADN isolado de um vector de clonagem
IPTG	isopropil-β-D-tiogalactopiranosídio

kb	quilobase
kDa	quilodalton
λ	fago lambda
λgt11	fago lambda gt11
λ*Hind*III	fago lambda digerido com a enzima de restrição *Hind*III
λH3	fago lambda digerido com a enzima de restrição *Hind*III
LB	meio de Luria-Bertani
LES	lupus eritematoso sistémico
LMW	padrões de baixo peso molecular
M	molar
mA	miliamper
mAb	anticorpo monoclonal
MHC	complexo maioritário de histocompatibilidade
min	minuto
ml	mililitro
mM	milimolar
MAP	"mitogen-activated protein kinase"
MAPs	"microtubule-associated proteins"
MPF	"M-phase promoting factor"
MRL/*lpr*	ou MRL/Mp-*lpr*/*lpr* - ratinhos que servem de modelo biológico para o estudo do lupus eritematoso sistémico humano. Desenvolvem um sindrome linfoproliferativo generalisado aos 2 meses de idade com nódulos linfóides muito extensos e geralmente morrem antes dos 6 meses de idade
MRL- +/+	ou MRL/Mp- +/+ - ratinhos que servem de controlo nos estudos com os MRL/*lpr*. Não desenvolvem um sindroma linfoproliferativo generalisado. Geralmente as fêmas morrem com 72 semanas e os machos com 92 semanas com glomerulonefrite crónica. Os anticorpos antinucleares aparecem, em geral, aos 10 meses de idade
MTOC	centro organizador de microtúbulos ("microtubule-organizing center")
mARN	ARN mensageiro
MW	peso ou massa molecular aparente ("molecular weight")
Na Ac	acetato de sódio
ND	"nuclear dots"
ng	nanograma
NOR	região organizadora dos nucléolos ("nucleolus-organizing region")
NP-40	nonidet P-40
NZB	ratinhos pretos que desenvolvem autoimunidade aos 6 meses de idade caracterizada por anemia hemolítica autoimune com teste de Coombs positivo, eritropoiese extramedular, lesões renais tubulares e glomerulares
(NZB x NZW)F1	ou BWF1 - ratinhos híbridos obtidos através do cruzamento de ratinhos NZB e NZW. Desenvolvem lupus eritematoso sistémico, anticorpos antinucleares, anemia hemolítica e proteinúria
NZW	ratinhos brancos que não desenvolvem um sindrome de autoimunidade
nRNP	ribonucleoproteína nuclear
NuMA	"nuclear mitotic antigen"

ON	durante a noite ("overnight")
OPD	orto-fenilenodiamina
PAGE	electroforese em gel de poliacrilamida
PBS	tampão de fosfatos pH=7,4 ("phosphate buffer saline")
PBS-T	PBS contendo 0,1% Tween-20
PBS-T-C	PBS contendo 0,05% Tween-20 e 1% caseína
PBS-TG	PBS contendo 1% de Triton X-100, 5% gelatina e 0,25% NaN_3
PCNA	"proliferating cell nuclear antigen"
PCR	"polimerase chain reaction"
PEG	polietilenoglicol
pfu	unidade formadora de placas ("plaque forming units")
PIKA	"polymorphic interphase kariosomal association"
PLL	poli-L-lisina
PMSF	fenilmetil-sulfonilfluor
(poli)ADP-ribose	poli-adenosina difosfato ribose
POPA	"prophase-originating polar antigen"
"poli-linker"	pequena sequência de ADN que contem locais de restrição únicos
"primer"	iniciador
PRPP	5-fosforil-1-pirofosfato
PTU	1-fenil 2-tioureia
p/v	peso/volume
RE	retículo endoplasmático
RMSA-1	"regulator of mitotic spindle assemby"
RNase	ribonuclease
RNAse A	ribonuclease A
r.p.m.	rotações por minuto
rRNP	ribonucleoproteína ribossomal
scRNP	"small citoplasmic" ribonucleoproteína
snARN	"small nuclear" ARN
SDS	dodecilsulfato de sódio
SDS-PAGE	electroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio
SET	solução contendo NaCl, Tris e EDTA
SRP	"signal regognition particle"
SS	sindrome de Sjögren's
SSC	solução contendo NaCl e citrato de sódio
SSPE	solução contendo NaCl, NaH_2PO_4 e EDTA
TAE	tampão de electroforese contendo Tris-acetato-EDTA
tARN	ARN transferência
TBE	tampão de electroforese contendo Tris-borato-EDTA
TE	tampão contendo Tris-EDTA
Thy-1	antigénio de superfície dos linfócitos T
TK	cinase da timidina
TM	temperatura de desnaturação ou fusão ("temperature melting")
TCA	ácido tricloroacético

TCR	receptor das células T
TEMED	N, N, N', N'-tetrametiletilenodiamino
TMG	5'-metilguanosina
TNF	"tumor necrosis factor"
Top agarose	meio de LB contendo 0,7% de agarose e 10 mM $MgSO_4$
U	unidade internacional
UMP	guanidina 5'-monofosfato
U.V.	ultravioleta
v/v	volume/volume
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indol-β-galactopiranosídio
Y ARN	ARN citoplasmático

Nota: os termos conservados em inglês aparecem entre aspas no texto.

RESUMO

RESUMO

Os anticorpos que se produzem no decorrer dos processos autoimunes têm sido muito utilizados para a caracterização de antigénios que desempenham variadas funções a nível celular. Estes autoantigénios têm possibilitado a análise e compreensão de processos celulares fundamentais. A identificação dos antigénios associados às diferentes formas de autoimunidade também poderá contribuir para a determinação das causas que promovem o desenvolvimento destas doenças.

O estudo efectuado durante este trabalho teve por objectivo, numa primeira fase, caracterizar os autoanticorpos de ratinhos com o genótipo (NZB/NZW) F1 e MRL/Mp-*lpr/lpr*, que desenvolvem o lupus eritematoso sistémico. A caracterização dos anticorpos monoclonais dos ratinhos com lupus foi feita por imunofluorescência, "immunoblotting" e imunoprecipitação. A reactividade destes anticorpos, em células eucariotas, foi analisada de forma a determinar a sua relação com o ciclo celular. Desta análise, verificou-se o reconhecimento de antigénios específicos que sofrem alterações na sua distribuição em diferentes fases do ciclo celular. Os estudos de imunoprecipitação e "immunoblotting" evidenciaram que estes anticorpos reagem com um conjunto variado de antigénios com pesos moleculares aparentes muito diversificados. A presença de epítopos fosforilados em alguns destes antigénios foi determinada através de ensaios com fosfatase alcalina e de imunoprecipitação.

Numa segunda fase, dois destes autoanticorpos foram utilizados como sondas moleculares para o isolamento de genes que codificam para os antigénios reconhecidos pelos mesmos. O rastreio efectuado em bibliotecas de expressão de cADNs humanas com um destes autoanticorpos possibilitou a clonagem e análise estrutural de um gene humano. A análise da sequência de nucleótidos do gene clonado, quando comparada com outras já existentes, não revelou a presença de homologias significativas.

A proteína codificada por este gene foi usada para a produção de um anticorpo policlonal. O anticorpo obtido permitiu verificar que a proteína apresenta uma localização diferencial no decorrer do ciclo celular. Durante a interfase este antigénio tem uma distribuição nuclear que se encontra mais acentuada na periferia dos nucléolos. Na mitose, a localização desta proteína é essencialmente cromossómica. Este padrão de imunofluorescência já tinha sido obtido com o autoanticorpo usado para o rastreio da biblioteca de cADN. Adicionalmente, esta proteína é reconhecida por alguns soros de doentes com lupus.

Estes resultados permitem que futuramente sejam feitas experiências com o objectivo de analisar estrutural e bioquímicamente a proteína codificada por este gene e determinar a sua possível função durante a formação dos cromossomas mitóticos e na mitose. O reconhecimento desta proteína por soros de doentes com lupus, poderá permitir a utilização deste antigénio como possível marcador clínico no diagnóstico de determinadas formas de lupus eritematoso sistémico.

ABSTRACT

Antibodies produced in different systemic autoimmune diseases have been used for the caracterization of antigens that have several cellular functions. These autoantigens have proven to be remarkably powerful tools for the study and understanding of important cellular events. Identification of antigens associated with different autoimmune disorders could provide the clues responsible for driving the autoimmune diseases.

The first aim of this study was the caracterization of a set of autoantibodies produced from (NZB/NZW) F1 and MRL/Mp-*lpr/lpr* mice with systemic lupus erythematosus. These murine lupus monoclonal antibodies were caracterized by immunofluorescence, immunoblotting and immunoprecipitation assays. In eukaryotic cells, the reactivity of these antibodies was analysed in order to know their relation with the cell cycle. It was demonstrated their reactivity with several specific antigens that have a peculiar distribution throughout the cell cycle. Immunoprecipitation and immunoblotting studies showed evidence that mouse monoclonal antibodies reacted with a wide range of antigens with several apparent molecular weights. Immunoprecipitation studies and alkaline phosphatase treatment have demonstrated that some of these antigens have phosphorylated epitopes.

In the second part of this work, two of these autoantibodies have been used as molecular probes for the isolation of genes encoding the antigens that are recognized by them. Screening of humans expression cDNA lybraries allowed the isolation and cloning of a human cDNA. A search through the nucleic acid sequence and amino acid data banks revealed no significant homology of the protein coded by cDNA XT-2 with other eukaryotic nucleic or amino acid sequences.

The protein codified by this gene was used for the production of a polyclonal antibody in rabbits. Polyclonal antiboby demonstrated that this antigen shows a differential distribution througouth the cell cicle. During interphase, the antigen shows a nuclear speckled distribution with a peripheral accentuation around the nucleoli. At mitosis, the localization of this antigen is resctrited to the condensed chromosomes. This immunofluorescence pattern had already been identified with the autoantibody used for the screening of the cDNA library. Additionally, this protein is also recognized by some sera from patients with systemic lupus erythematosus.

In the future, we pretend carry out structural and biochemical analysis of gene product encoded by the cDNA already cloned, and to determine functional aspects of the protein in order to know it's function during chromosomal condensation and mitosis. In addition, as

this protein has been recognized by some sera from patients with lupus, studies will be also performed in order to investigate if this autoantigen could be used as a diagnostic marker of certain types of systemic lupus erythematosus.

RÉSUMÉ

Les anticorps produits lors des réactions autoimmunes ont été très utilisés dans la caractérisation d'antigènes impliqués dans différentes fonctions de la cellule. Ces autoantigènes ont permis l'analyse et la compréhension de certains processus cellulaires fondamentaux. L'identification des antegènes associés aux différentes formes d'autoimmunité pourrait aussi contribuer à la détermination des causes de l'évolution de ces maladies.

Dans un premier temps, le but du présent travail était de caractériser les autoanticorps de souris ayant le génotype (NZB/NZW) F1 et MRL/Mp-*lpr/lpr*, atteints de lupus érythémateux systémique. La caractérisation des anticorps monoclonaux de ces souris a été effectuée par immunofluorescence, "immunoblotting", et immunoprécipitation. La réactivité de ces anticorps dans les cellules eucaryotes a été analysée au cours du cycle cellulaire. Cette analyse a montré une altération dans la distribution des antigènes spécifiques reconnus dans les différentes phases du cycle cellulaire. L'immunoprécipitation et l'"immunoblotting" ont montré que ces anticorps réagissent avec une variété d'antigènes de différents poids moléculaires apparents. La présence d'épitopes phophorylés au niveau de certains antigènes a été vérifiée par des essais de phosphatase alcaline et d'immunoprecipitation.

Dans la deuxième phase de ce travail, deux de ces anticorps on été utilisés comme sondes moléculaires pour isoler les gènes codant pour leurs antigènes correspondants. Le criblage d'une série de banques d'expression de cDNA humain a permis de cloner et d'analyser la structure d'un gène. L'analyse de la séquence nucléotidique de ce gène n'a pas révélé une homologie significative avec d'autres séquence préexistantes.

Un anticorps polyclonal dirigé contre la protéine codée par ce gène a été produit chez le lapin. Cet anticorps a permis de vérifier que la protéine présente une localisation différentielle au cours du cycle cellulaire. A l'interphase, l'antigène est localisé dans le noyau et est plus concentré à la periphérie des nucléoles. Pendant la mitose, sa localisation est essentiellement chromosomique. Cette localisation a été également obtenue par l'autoanticorps utilisé dans le criblage de la banque de cDNA. En outre, cette protéine est également reconnue par certains serums de malades de lupus.

Ces résultats ouvrent la perspective d'une étude structurale et biochimique de la protéine codée par le gène isolé, et la détermination de son possible rôle dans la formation des chromosomes mitotiques et dans la mitose. Le fait que cette protéine soit reconnue par des serums de malades de lupus suggère qu'elle pourrait servir de marqueur clinique dans le diagnostic de formes déterminées du lupus érythémateux systémique.

INTRODUÇÃO TEÓRICA

INTRODUÇÃO

Os soros humanos autoreactivos têm tido múltiplas aplicações em biologia celular. Estes soros possuem autoanticorpos específicos para antigénios que permitem a identificação de proteínas celulares, a clonagem de cADNs que codificam para essas proteínas, a purificação e caracterização de partículas e organelos intracelulares. Os autoanticorpos são também fundamentais na caracterização de autoantigénios envolvidos nas reacções autoimunes.

Os autoanticorpos estão habitualmente presentes em fenómenos de autoimunidade, embora não conduzam necessariamente a doenças autoimunes. A autoimunidade natural difere da doença autoimune porque é um processo fisiológico, que tem a ver com a homeostasia de um sistema de autoreconhecimento molecular. A autoimunidade pode também ser induzida por agentes infecciosos e drogas. A remoção destes agentes, em determinadas circunstâncias, é capaz de reverter o estado de autoimunidade (Talal, 1993). As doenças autoimunes são caracterizadas pela activação de células T e de células B autoreactivas que podem conduzir à formação de autoanticorpos e de anticorpos com outras especificidades, por mecanismos que ainda não foram completamente esclarecidos. Os complexos imunes resultantes das reacções antigénio-anticorpo depositam-se em diferentes orgãos e podem ser responsáveis pela lesão tecidular que ocorre nestas doenças. A etiologia dos síndromes autoimunes é multifactorial e envolve nomeadamente factores genéticos, microbianos ou infecciosos, endócrinos, psiconeuroimunológicos, etc. (Talal, 1993). Estes vários factores têm sido analisados experimentalmente em espécies diferentes da humana. O desenvolvimento do lupus no cão e a utilização de ratinhos (NZB x BZW) F1, BXSB e MRL/*lpr* como modelos biológicos desta doença, tem permitido avanços na identificação dos diferentes factores que estão ligados à etiopatologenia do lupus (Steinberg et al. 1990, Soulard et al. 1990).

As doenças autoimunes podem ser divididas em duas classes: as específicas de um orgão e as sistémicas. Nas doenças específicas de um orgão, a resposta imune é dirigida contra antigénios específicos desse orgão e conduz a lesões do mesmo. Fazem parte desta classe a miastenia gravis, a anemia perniciosa e a doença de Hashimoto's. Nas doenças sistémicas, ocorre uma forma de autoimunidade generalizada conducente à formação de anticorpos contra autoantigénios distribuídos por vários tecidos e orgãos. Fazem parte desta classe um conjunto de doenças reumatológicas que incluem a artrite reumatóide, o lupus eritematoso sistémico, a esclerodermia, a dermatomiosite, etc. (Roitt et al. 1992). O tipo de

autoanticorpos produzidos nas doenças autoimunes pode ou não ser específico de cada patologia. Na maioria dos casos há produção de autoanticorpos contra um ou dois antigénios celulares. Porém, em casos particulares, como no lupus eritematoso sistémico (LES), os autoanticorpos são dirigidos contra numerosos autoantigénios (Tan,1989).

A utilização destes autoanticorpos em biologia celular e molecular tem contribuído para a identificação de componentes celulares uma vez que eles reconhecem frequentemente moléculas altamente conservadas e funcionalmente importantes (Tan, 1989). A capacidade dos autoanticorpos inibirem funções já definidas de certos autoantigénios, que funcionam como locais activos ou domínios funcionais importantes, sugere a existência de uma conservação evolutiva dos autoepítopos entre as várias espécies (Tan, 1994). Adicionalmente, a caracterização molecular dos perfis de autoanticorpos que são expressos nos diferentes processos autoimunes tem sido utilizada pelos clínicos como método de diagnóstico das doenças autoimunes (Balczon, 1993; Stollar, 1994).

As técnicas aplicadas em biologia molecular e imunologia têm permitido a análise de antigénios nucleares. Muitos dos antigénios nucleares apresentam localizações específicas nas células em interfase ou em mitose. Este facto tem possibilitado a análise funcional do aparelho mitótico e dos cromossomas em eucariotas e contribuído significativamente para o estudo da mitose (Sunkel, 1993). A maioria dos antigénios nucleares apresenta uma distribuição nas células em interfase que pode ser uniforme ou irregular. À medida que a mitose decorre estes antigénios assumem uma localização preferencial que pode estar associada aos cromossomas, às histonas e/ou às regiões centroméricas. Esta redistribuição de antigénios que se verifica durante o ciclo celular tem sido atribuída a variações na composição e na estrutura que ocorrem dentro da cromatina (Saunders et al. 1991; Blaschek et al. 1993). As modificações que ocorrem na transição metafase/anafase parecem ser da responsabilidade de dois grupos de proteínas nucleares (Earnshaw et al. 1991a,b). Um dos grupos é formado por um conjunto de proteínas, designado por "chromosomal passengers", que se associam especificamente aos cromossomas durante a metafase e anafase, e que durante a interfase têm uma localização nuclear ou ainda desconhecida (Earnshaw et al. 1991a). No outro, encontram-se as proteínas que apresentam uma localização nuclear nas células em interfase e que ficam associadas ao aparelho mitótico, no início da profase ou prometafase, através de uma região que exclui os cromossomas (Earnshaw et al. 1991a). A região que contém estas proteínas persiste durante a mitose, estende-se ligeiramente para além dos cromossomas sem atingir o citoplasma, e tem sido referenciada como região ou camada pericromossómica, periferia ou superfície externa dos cromossomas ou material que rodeia os cromossomas metafásicos (Hernandez-Verdun et al. 1994). Em qualquer destas duas classes, a identificação de alguns dos diferentes componentes subcelulares foi feita à

custa de soros autoimunes.

A caracterização de autoanticorpos e respectivos antigénios tem possibilitado a análise dos diferentes processos celulares e a identificação de antigénios directamente envolvidos nos mesmos. Porém, pouco se sabe acerca das razões que são responsáveis pela "escolha" destes componentes celulares na resposta autoimune. Por outro lado, a resposta imunológica desencadeada nas doenças autoimunes, e em particular no lupus eritematoso sistémico, tem sido abordada sob diferentes pontos de vista em conformidade com os múltiplos factores que parecem estar envolvidos na etiologia do lupus.

Numa análise preliminar da reactividade do conjunto de autoanticorpos de ratinho portadores de lupus eritematoso sistémico em células humanas foi possível verificar, por imunofluorescência, que estes anticorpos reconheciam múltiplos antigénios citoplasmáticos e nucleares e que exibiam diferentes padrões de imunofluorescência consoante as células se encontram em interfase ou em mitose. Em estudos já efectuados com autoanticorpos de ratinhos com lupus foi evidenciada a reactividade cruzada dos mesmos com antigénios humanos (Morgan et al. 1985a, b). Além disso, muitos dos autoantigénios já identificados e caracterizados estão associados ao ciclo celular (Balczon, 1993; Sunkel, 1993). Tendo em conta que estes autoanticorpos foram inicialmente isolados pela sua capacidade de reacção com as preparações de ADN, o reconhecimento de outros antigénios diferentes do ADN e o seu relacionamento com o ciclo celular constituiu um ponto de partida e um desafio que levou à determinação do conteúdo deste trabalho: a caracterização destes autoanticorpos, por métodos e com objectivos que anteriormente não tinham sido avaliados, e o isolamento dos antigénios reconhecidos pelos mesmos. A identificação dos antigénios ligados ao lupus poderá, eventualmente, ajudar a esclarecer aspectos da etiologia do lupus ou a definir um marcador clínico da mesma e, em termos de ciclo celular, poderá pemitir a identificação de moléculas que participam nele.

Nesta perspectiva, os temas abordados na introdução teórica, embora de forma sumária, estão necessariamente relacionados com o lupus e os factores que parecem determinar esta doença, com os autoantigénios já identificados e com as funções exercidas pelos mesmos, e com o ciclo celular, uma vez que antigénios reconhecidos com estes soros apresentavam padrões de imunofluorescência diferentes nas células em interfase ou em mitose. A apresentação da parte experimental é feita em três partes distintas: a produção de anticorpos monoclonais, a caracterização de anticorpos monoclonais e o isolamento de genes que codificam para os antigénios reconhecidos por estes autoanticorpos. Contudo, esta estrutura não é o reflexo da ordem cronológica deste trabalho, uma vez que a análise preliminar foi efectuada em hibridomas já existentes. No entanto, estes resultados foram

determinantes para a aprendizagem e desenvolvimento das técnicas que permitem a produção de anticorpos monoclonais, uma vez que o conhecimento das mesmas possibilitou a obtenção de um conjunto de hibridomas que se encontra já em fase de caracterização, permite autonomia em termos de trabalho e contribui para uma valorização profissional pessoal e das instituições onde este trabalho tem sido desenvolvido e onde se dará continuidade.

LUPUS ERITEMATOSO SISTÉMICO

O lupus eritematoso sistémico (LES) ou disseminado é uma doença autoimune espontânea caracterizada pela hiperprodução de autoanticorpos de especificidade variada. Alterações da fisiologia de populações de linfócitos B e T levam ao aumento da actividade das células B, com consequente hiperglobulinémia, resultante da produção de anticorpos contra haptenos, antigénios exógenos e autoantigénios (Ward et al. 1991).

O lupus tem sido descrito no homem e noutras espécies, entre as quais são de salientar o ratinho e o cão (Steinberg et al. 1990; Soulard et al. 1991). É uma doença caracterizada por uma grande diversidade clínica e serológica. Pode afectar qualquer orgão do corpo e uma das suas características mais notáveis prende-se com a variedade de autoanticorpos e perfis de especificidades de anticorpos presentes no sangue, o que poderá estar relacionado com a diversidade das manifestações clínicas da doença (Tan, 1989; Stott, 1990; Drake et al. 1992; Cervera et al. 1993).

O primeiro sintoma que leva ao diagnóstico da doença é frequentemente um eritema cutâneo da face em forma de asa de borboleta, o qual é típico do LES, embora em muitos doentes se verifique sintomatologia inespecífica, como a febre e a artrite. Os sintomas mais comuns nestes doentes são alterações cutâneas, lesões discóides, úlceras orais, fotossensibilidade, serosite (pleurite e pericardite), artrite, alterações neurológicas, nefropatia e trombocitopenia. Outras manifestações sistémicas, incluem febre, fenómeno de Raynaud, trombose, miosite, linfoadenopatia, etc. (Cervera et al. 1993).

Os autoanticorpos presentes no LES reconhecem um conjunto muito variado de antigénios de localização intracelular, nomeadamente proteínas citoplasmáticas, nucleares, da matriz nuclear e do nucléolo (Tan, 1982; Tan et al. 1988; Bronze-da-Rocha et al. 1992; Talal, 1993). Os autoanticorpos do lupus podem ainda ligar-se a receptores da superfície celular, a ácidos nucleicos (ADN e ARN), a histonas, a ribonucleoproteínas, etc. (Talal, 1993). A resposta policlonal B desta doença contrasta com a resposta imune típica de outras doenças autoimunes, em que os autoanticorpos patogénicos são específicos apenas para um número restrito de espécies moleculares (Tan, 1989). Assim, na autoimunidade induzida por drogas a especificidade dos autoanticorpos limita-se ao ADN de cadeia simples e às histonas. No síndrome de Sjögren's (SS), a maioria dos autoanticorpos produzidos são focados nos antigénios SS-B/La e SS-A/Ro. A produção de anticorpos contra antigénios de certas sintetases do ARN de transferência (tARN) é uma característica da dermatomiosite e da polimiosite. A esclerodermia tem como autoantigénio maioritário a proteína Scl-70,

idêntica à topoisomerase I. O síndrome de CREST ("Calcinosis, Raynaud's Phenomenon, Esophageal Dysmotility, Sclerodactyly, Telangiectasia"), que constitui uma forma particular de esclerodermia, é caracterizado pela presença de autoanticorpos contra as regiões centroméricas (cinétocoro e centrómero) dos cromossomas (Tan et al. 1988; Tan, 1989). A artrite reumatóide é caracterizada pela predominância do factor reumatóide, um autoanticorpo dirigido contra a porção Fc da IgG, e de anticorpos anti-histonas (Tan, 1989).

A resposta imune desencadeada no LES é responsável pela formação de complexos imunes circulantes, activação do complemento e de mediadores da inflamação, à qual se segue uma diminuição nos níveis de complemento e agressão a tecidos. A reacção dos anticorpos com antigénios (circulantes ou tecidulares) é responsável pela baixa do complemento e também pela acumulação das células (linfócitos e monócitos) que intervêm na resposta imune (Tan, 1989; Chan et al. 1989). Os mecanismos que conduzem à produção dos autoanticorpos ainda não são conhecidos, mas a disfunção das células T, a activação policlonal das células B e a imunização com antigénios microbianos têm sido vias propostas, entre muitos outros, para a indução da produção de autoanticorpos (Talal, 1993).

1 - Factores de risco no LES humano

A diversidade clínica e serológica encontrada nos doentes com lupus parece estar relacionada com diferentes factores de risco associados a esta patologia e que incluem a idade de início da doença, o sexo, a raça, o tipo de autoanticorpos produzidos, factores genéticos e agentes ambientais.

1.1. - Idade

O estudo recente realizado numa população de 1000 doentes de vários países (Cervera et al. 1993), demonstrou que a idade média de início da doença é de 29 anos. Porém, existem formas precoces e tardias da doença que se iniciam, respectivamente, depois dos 14 e dos 50 anos de idade (Cervera et al. 1993). A idade parece influenciar as manifestações serológicas do lupus, mas até ao momento os estudos efectuados são divergentes e até contraditórios (Ward et al. 1991; Cervera et al. 1993).

1.2 - Sexo

Embora o lupus se manifeste preferencialmente em mulheres e como tal seja considerado como uma doença tradicionalmente feminina, uma pequena percentagem de doentes masculinos também desenvolve esta patologia, sem apresentar diferenças

imunológicas significativas com o lupus feminino (Cervera et al. 1993). Esta "protecção" nos doentes masculinos parece estar relacionada com a produção de androgénios. Os estrogénios e a prolactina parecem exercer um efeito agravante do lupus (Steinberg et al. 1990, 1991; Harley et al. 1991; Cervera et al. 1993).

1.3 - Raça

A raça tem alguma influência no desenvolvimento desta forma de autoimunidade, uma vez que nas populações negras, as manifestações clínicas do lupus ocorrem mais cedo (Ward et al.1991). Estas populações apresentam também uma maior incidência do lupus relativamente às populações brancas (Slor et al. 1989; Harley et al. 1991). Contudo, os factores de risco associados aos diferentes grupos raciais e étnicos ainda não estão esclarecidos e o fundamento destas diferenças ainda não foi definido como de base exclusivamente genética ou reflectindo diferenças em factores ambientais (Abuaf et al. 1990; Harley et al. 1991).

1.4 - Tipo de autoanticorpos

A activação policlonal das células B tem sido referida como responsável pela produção exagerada de autoanticorpos, pela severidade e velocidade de progressão da doença, e pela estimulação autoantigénica perpetua e amplifica a resposta autoimune (Steinberg et al. 1991). O aumento da resposta dos linfócitos B em doentes com lupus e em ratinhos jovens que desenvolvem o lupus não é limitado à produção de autoanticorpos, mas atinge também linfócitos que produzem anticorpos não autoreactivos. Porém, tanto os doentes como os ratinhos com lupus de longa evolução tendem a expandir preferencialmente os clones que produzem autoanticorpos (Steinberg et al. 1990).

A presença de autoanticorpos tem sido estudada não só em doentes com lupus como em indivíduos normais. Em ambas as populações foi detectada a presença de anticorpos antinucleares, que no entanto diferem na classe de imunoglobulinas, na sua especificidade e afinidade para o antigénio. Entre os anticorpos anti-ADN, os autoanticorpos naturais presentes em indivíduos normais são geralmente IgM e apresentam baixa afinidade para o ADN. Em contraste, os anticorpos anti-ADN patogénicos são IgG, apresentam uma alta afinidade para os autoantigénios e são portadores de mutações somáticas nas regiões variáveis (Pisetsky, 1991; Stollar, 1994; Isenberg et al. 1994). A análise molecular dos autoanticorpos tem sido complementada através da análise estrutural do seu autoantigénio. A presença de proteínas constituídas por segmentos ricos em aminoácidos carregados parece promover a imunogenicidade (Brendel et al. 1991); adicionalmente, estas regiões podem ser

homólogas às de antigénios derivados de vírus (Scofield et al. 1991).

O lupus é caracterizado pelo reconhecimento de uma grande variedade de autoantigénios. A presença de autoanticorpos anti-ADN de cadeia dupla (ADNcd) e anti-Sm são considerados como os mais comuns da doença e os mais sensíveis à sua progressão (Tan, 1989; Harley et al. 1991). Estes autoanticorpos têm também valor prognóstico pelo que os seus títulos são utilizados para a monitorização da doença. Outros anticorpos do lupus incluem anti-ADN de cadeia simples (ADNcs), anti-histonas, anti-ribonucleoproteínas nucleares (nRNP), anti-SS-A/Ro, anti-SS-B/La, anti-Ku, anti-PCNA ("proliferating cell nuclear antigen"), anti-proteínas de choque térmico - Hsp - ("heat shock proteins") e anti-ribonucleoproteínas ribossomais (rRNP). Nenhum destes autoanticorpos é específico do lupus, uma vez que podem ser detectados noutras doenças autoimunes e mesmo em indivíduos normais (Tan, 1989).

1.5 - Factores genéticos

Os factores genéticos associados ao lupus têm sido identificados com base nos estudos da expressão da doença em famílias com alta incidência de lupus e por comparação da incidência em gémeos idênticos e não idênticos Os resultados obtidos indicam que os factores genéticos condicionam o desenvolvimento desta doença, embora de uma forma não determinante, uma vez o índice de concordância foi estimado em 24% para gémeos idênticos e em 2% para gémeos não idênticos (Deapen et al. 1992; Drake et al. 1992).

Os vários antigénios do HLA ligados ao LES variam de estudo para estudo e também com a origem étnica das populações (Arnett, 1992; Yao et al. 1993). No homem, a associação que se verifica entre as moléculas da classe II do complexo maioritário de histocompatibilidade (MHC), nomeadamente dos genes do locus HLA-D, e os anticorpos que caracterizam o lupus (Reveille et al. 1991), parece reflectir a capacidade que as moléculas da classe II têm em capturarem e apresentarem os autoantigénios às células T (Reveille et al. 1991; Casciola-Rosen et al. 1994).

1.6 - Agentes ambientais

Os agentes ambientais que estão implicados na activação ou indução do lupus têm sido separados como definitivos, prováveis e possíveis (Steinberg et al. 1991).

São agentes definitivos a luz ultravioleta, algumas drogas e aminas aromáticas. A luz ultravioleta por si só não desencadeia o lupus, mas cerca de um terço dos doentes com lupus apresentam fotossensibilidade. A luz ultravioleta diminui a activação dos macrófagos e das células T supressoras, contribuindo deste modo para a progressão da doença (Steinberg et al. 1991).

A administração de certas drogas, nomeadamente de procainamida e hidralazida está associada à produção de anticorpos antinucleares e, mais raramente, à expressão do lupus (Tan, 1989; Steinberg et al. 1991; Talal, 1993). A autoimunidade induzida por drogas é caracterizada pela presença de autoanticorpos contra o ADN de cadeia simples e as histonas nucleares, mas tem a particularidade de não induzir a formação de autoanticorpos contra outros antigénios nucleares (Tan, 1989).

Dentro dos agentes prováveis são de referir substâncias químicas (aminas aromáticas, corantes e aditivos alimentares), determinados alimentos (ricos em L-canavanina e hidrazinas), solventes orgânicos (Tan, 1989; Talal, 1993), o "stress" físico e psicológico, e as infecções. Os agentes possíveis com capacidade de acelerar ou induzir o lupus englobam o cloreto de vinilo, os asbestos, a sílica e os implantes de polímeros de silicone (Steinberg et al. 1991; Talal, 1993).

2 - Autoantigénios e autoanticorpos

Os anticorpos que se produzem no lupus reagem contra uma grande variedade de autoantigénios. Os antigénios envolvidos incluem o ADN de cadeia simples (ADNcs), ADN de cadeia dupla (ADNcd), Sm, ARN, SS-A/Ro, SS-B/La, histonas, fosfolípidos, Ku, PCNA/ciclina, Hsp 90, Hsp 70, Ki-67, rRNPs, topoisomerase I, proteína Alu RNA, lâminas nucleares e U1-RNA (Tan et al. 1988; Tan, 1989; Chan et al. 1989). Alguns destes autoanticorpos são caracteristicamente mais frequentes no LES, como os anticorpos contra o ADNcd e Sm. Os autoanticorpos que reconhecem o ADN de cadeia simples, as histonas, as snRNPs, SS-A/Ro e SS-B/La estão presentes noutras doenças autoimunes (Chan et al. 1989). A frequência com que cada um dos autoanticorpos aparece é variável e parece manter-se em doentes de origens raciais e étnicas diferentes. Na tabela 1 é apresentada a frequência dos autoanticorpos que caracterizam o lupus e os antigénios celulares envolvidos na resposta imune.

A reactividade dos anticorpos anti-ADN de cadeia simples é feita por reconhecimento de polímeros de purinas ou pirimidinas, inacessíveis no ADNcd. Os anticorpos anti-ADNcd reagem preferencialmente com os grupos fosfato das riboses e por isso têm a capacidade de interactuar com o ADNcs. De qualquer modo, o anticorpo acaba por estar em contacto directo com as bases, os açúcares e os fosfatos que constituem o ADN (Stollar, 1994). A deposição deste tipo de anticorpos a nível renal, como parte dos complexos imunes, sugere que o ADN terá um papel importante na etiologia do lupus. Porém, este mecanismo de patogenicidade requer que o ADN intracelular seja exteriorizado, quer na circulação, quer

nos tecidos, de forma a reagir com os autoanticorpos e formar complexos imunes (Tan, 1989). Estes anticorpos são poliespecíficos e podem ligar antigénios que não o ADN, especialmente produtos bacterianos (Pisetsky et al. 1990). Os anticorpos antinucleares estão presentes em cerca de 95% dos doentes, mas a sua detecção não é um marcador específico do lupus, uma vez que estes anticorpos existem noutras doenças reumáticas autoimunes, mesmo em indivíduos saudáveis (Harley et al. 1991) e podem inclusivé estar ausentes nos doentes com sintomatologia típica do lupus (Cervera et al. 1993).

Tabela 1 - Autoanticorpos e antigénios celulares do lupus eritematoso sistémico (adaptado de Tan, 1989)

ANTIGÉNIOS	AUTOANTICORPOS	
Designação clínica	**Identidade molecular**	**Frequência (%)**
ADN nativo*	ADN de cadeia dupla	40
ADN desnaturado	ADN de cadeia simples	70
Histonas	H1, H2A, H2B, H3 e H4	70
Sm*	Proteínas de 29 (B'), 28 (B), 16 (D) e 13 (E) kDa complexadas com U1, U2 e U4/U6 snARNs; componentes do "spliceosome"	30
RNPs nucleares	Proteínas de 70, 33 (A) e 22 (C) kDa complexadas com U1-snARN; componentes do "spliceosome"	32
SS-A/Ro	Proteínas de 60 e 52 kDa complexadas com Y1-Y5 ARNs	35
SS-B/La	Fosfoproteína de 48 kDa complexada com os transcritos nascentes da ARN polimerase III	15
Ku	Proteínas com 80 e 70 kDa que se ligam ao ADN	10
PCNA/ciclina	Proteína de 36 kDa, auxiliar da ADN polimerase δ	3
RNPs ribossomais	Fosfoproteínas de 38, 16 e 15 kDa associadas aos ribosomas	10
Hsp 90	Proteína de choque térmico com 90 kDa	50

* Autoanticorpos mais comuns e sensíveis da doença utilizados como marcadores de diagnóstico.

Anticorpos contra as histonas são uma característica do lupus e de outras doenças autoimunes, entre as quais a autoimunidade induzida por drogas, a artrite reumatóide e outras doenças do tecido conjuntivo. Estes anticorpos são responsáveis pela reactividade com as células LE (fagócitos contendo material nuclear que resulta da ingestão de outras células) e pelo reconhecimento de todas as classes de histonas (Tan, 1989). Os diferentes subtipos da histona H1 podem ser parcial ou totalmente reconhecidos, em função da reactividade específica encontrada em cada doente (Tan, 1989; Wesierska-Gadek et al. 1990). O anticorpo anti-DCA ("dividing cell antigen"), que está presente apenas no soro de doentes com lupus, tem 60 kDa e só é detectado nas células em mitose. Este anticorpo parece ser dirigido contra as histonas, dado que a sua reactividade é inibida pelas histonas H2A e H2B (Blaschek et al. 1993).

Anticorpos anti-Sm e anti-snRNP aparecem conjuntamente no lupus. Os autoantigénios Sm e snRNP têm uma localização nuclear. A reactividade contra os antigénios nucleares das RNP não ocorre com o ARN, mas sim com as proteínas que lhe estão associadas, o que foi evidenciado em "western blot" (Tan et al. 1988; Tan, 1989). O antigénio Sm é constituído por um conjunto de proteínas com diferentes pesos moleculares e com uma grande diversidade de epítopos. Estas proteínas podem complexar-se com snARNs (U1, U2, U4, U5 e U6) que são componentes do "spliceosome" (Lehmeier et al. 1990).

Autoanticorpos anti-SS-A/Ro e anti-SS-B/La existem em maior frequência no síndrome de Sjögren's do que no LES. Estes antigénios têm uma origem nuclear (Tan, 1989). O antigénio SS-A/Ro é constituído por um conjunto de proteínas cujo peso molecular varia entre os 50 kDa e os 150 kDa (Ben-Chetrit et al. 1988). Duas destas proteínas, com 60 e 52 kDA, associam-se ao ARN citoplasmático humano (hY ARN) (Harley et al. 1991; Itoh et al. 1991). O antigénio SS-B/La é composto por uma fosfoproteína com 48 kDa que se complexa com a ARN polimerase III (Gottlieb et al. 1989a, b;Tan, 1989).

Os antigénios das ribonucleoproteínas ribossomais (rRNPs) são constituídos por três proteínas fosforiladas com 36 kDa, 16 kDa e 15 kDa que se encontram associadas à subunidade maior dos ribossomas (Tan et al. 1988; Tan, 1989). O antigénio Ku é constituído por dois polipeptídeos de 70 kDa e 80 kDa, que apresentam epítopos diferentes e são proteínas que se ligam ao ADN (Tan, 1989). Anticorpos anti-PCNA e contra a proteína de 68 kDa complexada com Alu-ARN estão presentes numa baixa frequência nos doentes com lupus e parecem não ser responsáveis por características clínicas particulares (Mathews et al. 1984; Takasaki et al. 1984; Tan, 1989). O antigénio Ki-67 é uma proteína nuclear de 32 kDa cuja concentração varia ao longo do ciclo celular (Tan, 1989; Landeberg et al.

1990). Os antigénios Ku, PCNA e rRNP não são co-precipitados com as snRNPs. Anticorpos anti-topoisomerase I têm uma baixa prevalência nos doentes com lupus (Chan et al. 1989). Os antigénios PCNA, Ki-67 e topoisomerase I estão associados à replicação do ADN e consequentemente ao ciclo celular.

As proteínas de choque térmico Hsp 70 e Hsp 90 são autoantigénios que apresentam uma localização citoplasmática e membranar (Tan, 1989). A expressão aumentada dos genes que codificam para a Hsp 70 e para a Hsp 90 não parece depender da idade destes doentes (Twomey et al. 1993).

Autoanticorpos contra uma proteína intracelular fosforilada de 100 kDa, que foi identificada como nucleolina, têm sido detectados nos soros dos doentes com lupus e outras desordens autoimunes (Minota et al. 1991).

Os anticorpos anti-laminas nucleares são também detectados em doentes com lupus. Estes anticorpos reconhecem as laminas A (74 kDa), B (68 kDa) e C (60 kDa), mas a afinidade para os antigénios da lamina B é maior do que para os das laminas A e C (Reeves et al. 1987; Lassoued et al. 1988; Tan, 1989; Senécal et al. 1991).

Anticorpos anti-fosfolípidos constituem uma família heterogénea com isotipos variados e com características imunoquímicas e especificidades diferentes. Estes anticorpos existem nas pessoas saudáveis, na forma de complexos imunes, e nos doentes com lupus que têm outras manifestações clínicas associadas (Alarcón-Segovia, 1989; Alarcón-Segovia et al. 1994). A presença destes anticorpos tem sido associada à predisposição genética determinada pelos antigénios MHC, à estrutura idiotípica dos antigénios, como resultado de processos infecciosos, uma vez que os fosfolípidos fazem parte das paredes bacterianas, ou à combinação destes factores (Alarcón-Segovia, 1989; Alarcón-Segovia et al. 1994).

Para além da diversidade de autoantigénios reconhecidos pelos autoanticopros presentes no lupus, a reactividade cruzada é uma característica exibida por estes anticorpos. Embora se saiba que os autoanticorpos existem em indivíduos saudáveis, estes não têm tendência a reagir com antigénios exógenos ou autoantigénios. Esta reactividade cruzada foi analizada em ratinhos com e sem expressão de lupus e verificou-se que os anticorpos produzidos pelas espécies autoimunes apresentam uma reactividade cruzada muito superior às espécies normais, sem contudo fazerem distinção entre os antigénios convencionais e os autoantigénios (Klinman et al. 1988). A presença de idiotipos comuns entre os autoanticorpos, quer entre os humanos ou os de ratinho (Shoenfeld et al. 1983a,b), e entre os de ratinho e os do homem (Morgan et al. 1985b;Watts et al. 1991) demonstra que muitos destes anticorpos são poli-específicos. Recentemente foi demonstrado *in vivo* que as células B produtoras de anticorpos anti-ADN, nos doentes com LES, apresentam reactividade cruzada, uma vez que para além do ADN reagem com outros antigénios não

relacionados como a actina e a ovalbumina. Dentro das imunoglobulinas produzidas, as IgGs mostram maior afinidade e menor reactividade cruzada do que as IgM, embora as células B produtoras de anticorpos contra o ADN, nos doentes com LES relativamente aos controlos, tenham um elevado índice de reactividade (Klinman et al. 1994).

3 - Factores associados à etiologia do lupus

A variabilidade das manifestações clínicas e serológicas que caracterizam o lupus eritematoso sistémico tem permitido a defesa de conceitos muito diversificados no que respeita à etiologia desta doença. Factores genéticos, imunológicos e ambientais, assim como a interacção que parece existir entre os mesmos, têm todos sido apontados como determinantes para a etiologia do lupus.

3.1 - Factores genéticos

A análise de várias famílias evidenciou que existe uma maior incidência de lupus nos descendentes de doentes com LES relativamente às populações controlo e que a tendência familiar para a formação de autoanticorpos e a detecção dos mesmos em familiares assintomáticos denotam a influência de factores hereditários no desenvolvimento desta doença (Slor et al. 1989; Deapen et al. 1992; Drake et al. 1992; Reichlin et al. 1992).

Estudos imunogenéticos, tanto em populações normais como de doentes, demonstraram que os genes contidos no MHC, ou próximo deste, têm um papel importante no desenvolvimento de muitas doenças humanas e em particular na determinação da susceptibilidade à autoimunidade. Na população caucasiana a frequência dos genes HLA-DR2, HLA-DR3 e dos alelos nulos do locus C4 do complemento tem sido referida como um factor que condiciona a susceptibilidade ao lupus (Hartung et al. 1991; Campbel et al. 1993). A análise de grupos de doentes que produzem autoanticorpos específicos revelou uma estreita associação entre a produção de um anticorpo particular e o polimorfismo da classe II do locus HLA-DQ, relativamente ao HLA-DR e ao HLA-DP (Harley et al. 1989; Reveille et al. 1991; Arnett, 1992; Drake et al. 1992), embora a frequência determinada para estes haplotipos não seja mais elevada que a da população controlo, o que não permite determinar de forma conclusiva qual destes alelos é responsável pela susceptibilidade ao lupus (Campbel et al. 1993; Yao et al. 1993). Dentro da classe III, tem sido referido que os doentes com deficiências nos factores do complemento, particularmente em C2 e C4,

apresentam uma maior incidência de lupus (Provost et al. 1983; Kemp et al. 1987; Gatenby, 1991; Arnett, 1992).

A contribuição de genes específicos para o desenvolvimento do lupus, em particular o gene *lpr*, tem sido estudada nos ratinhos (NZB x NZW) F1, BXSB e MRL/*lpr* que exibem uma linfoproliferação e produção aumentada de autoanticorpos muito semelhantes ao lupus humano. O locus *lpr* parece ser único, autossómico e essencialmente recessivo (Steinberg et al.1990; Cohen et al. 1991). No locus *lpr* existe o gene *fas* que codifica para o antigénio Fas, uma glicoproteína de 45 kDa (Watanabe-Fukunaga et al. 1992), que tem sido referido como mediador da apoptose, tanto *in vivo* como *in vitro* (Itoh et al. 1991; Suda et al. 1993). As estirpes MRL/*lpr* têm o gene *lpr* mutado por inserção do retrotransposão ETn ("for early transposable element") no gene *fas*. A mutação no gene *lpr* afecta a expressão do antigénio Fas e a ausência deste receptor inibe a seleção negativa das células autoreactivas B e T durante o processo de maturação, uma vez que a expressão deste antigénio é máxima num estado intermediário do desenvolvimento tímico e quando os linfócitos maduros são activados. A fraca expressão da proteína Fas nas espécies MRL/*lpr*, homozigóticas para mutação *lpr*, parece contribuir de forma determinante para a linfoproliferação e produção de autoanticorpos que caracterizam o LES (Watanabe-Fukunaga et al. 1992; Drappa et al. 1993).

3.2 - Apoptose

A apoptose é uma forma programada de morte celular, caracterizada pela condensação e fragmentação da cromatina em fragmentos de 180 a 200 pares de bases que depois são ingeridos por fagócitos (Itoh et al. 1991; Drappa et al. 1993; Tan, 1994). O produto do gene *fas*, no homem, é uma glicoproteína da superfície celular, com 48 kDa, com uma estrutura similar aos receptores do factor de necrose tumoral (TNF) e ao factor de crescimento do nervo (Itoh et al. 1991). O antigénio Fas é expresso na células B e T, nos linfoblastos B transformados com o vírus Epstein-Barr (Itoh et al. 1991; Drappa et al. 1993) e noutros tecidos. Anticorpos anti-Fas funcionam como agonistas da apoptose *in vitro* (Itoh et al. 1991; Drappa et al. 1993). Recentemente foi clonado e expresso o ligando do antigénio Fas (FasL), que apresenta uma sequência em aminoácidos homóloga aos membros da família TNF, e cuja expressão é restrita aos linfócitos T maduros e activados com consequente indução da apoptose (Suda et al. 1993, 1994; Drappa et al. 1994, Watanabe et al. 1995). A ligação do antigénio Fas à morte celular por apoptose vai então estar associada à manutenção de homeostasia, que nos tecidos normais reflete um balanço crítico entre a proliferação e a morte celular. O efeito do antigénio Fas parece ser inibido por uma proteína associada à membrana, expressa pelo proto-oncogene *bcl-2* (Itoh et al. 1993). Esta proteína parece

promover a sobrevivência das células mais do que induzir a linfoproliferação e é capaz de prevenir a apoptose pela acção anti-oxidante que apresenta (Hockenbery et al. 1993; Veis et al. 1993). A localização específica das vesículas apoptóticas, na proximidade das membranas do núcleo e do retículo endoplasmático, locais primordiais para a geração de radicais livres, pode tornar os autoantigénios mais vulneráveis às modificações oxidativas e estas alterações, em conjunto com a susceptibilidade genética de cada indivíduo, poderão conduzir à exposição de péptidos inicialmente inacessíveis, que passariam a ser capturados e apresentados pelas moléculas de classe II do MHC. Como consequência, a resposta imune dirigir-se-à para áreas do autoantigénio para o qual o organismo inicialmente era tolerante (Casciola-Rosen et al. 1994). Por outro lado, a libertação de nucleossomas intactos para o meio extracelular durante a apoptose tem sido apontado, embora sem confirmação *in vivo*, como uma fonte de antigénios que podem conduzir à activação da doença (Emlen et al. 1994), nomeadamente através da produção de anticorpos por clones T "helper" específicos, as células T $CD4^+$ que existem no baço do ratinho com tendência para desenvolver o lupus, mesmo antes de haver manifestações autoimunes, e não no ratinho normal (Mohan et al. 1993).

3.3 - Células B

Defeitos intrínsecos das células B parecem determinar a produção de autoanticorpos. Esta hipótese é favorecida pela activação selectiva das células B *lpr* de ratinhos quiméricos contendo células B normais e *lpr*, onde a produção de autoanticorpos IgM e IgG2a de origem *lpr* foi sempre mais acentuada, mesmo em presença de um excesso de células B normais na construção dos duplos quiméricos (Sobel et al. 1991). Além disso, a transferência de esplenócitos de ratinhos com lupus para ratinhos SCID ("severe combined immunodeficiency") é responsável pelo aparecimento de altos títulos de anticorpos e pela marcada deposição de complexos imunes a nível renal. Comparativamente, a transferência para ratinhos SCID de células de baço de ratinhos não autoimunes leva apenas à formação de baixos títulos de anticorpos (Segal et al. 1992). Por outro lado, foi evidenciado que existem mecanismos diferentes para a estimulação das células B, dado que a administração de um anticorpo monoclonal anti-$CD4^+$ nos ratinhos MRL/*lpr* inibe a síntese de IgG contra o ADN e não tem qualquer efeito a nível da síntese de IgM (Merino et al. 1993). Contudo, os anticorpos anti-ADN, quer sejam IgM ou IgG, têm regiões das imunoglobulinas estruturalmente relacionadas e em cada ratinho individual algumas células B produtoras de IgG autoreactivas derivam do mesmo precursor das células B produtoras de IgM autoreactivas (Tillman et al. 1992).

O processo fisiológico de remoção de células autoreactivas envolve a eliminação activa

destas células (delecção clonal), a inactivação funcional (anergia clonal), ou a combinação destes dois processos e parece ser condicionado pela natureza do autoantigénio (Drake et al. 1992). Estudos em ratinhos transgénicos que expressam os genes que codificam para os anticorpos autoreactivos demonstraram que durante o desenvolvimento das células B existe um processo de tolerância que remove quase todos os linfócitos B autoreactivos, mas as células autoreactivas que persistem têm a capacidade de proliferar após estímulo antigénico. A activação destas células autoreactivas, poderá conduzir ao início da doença autoimune (Murakami et al. 1992; Drake et al. 1992), que posteriormente será desenvolvida pela maturação, modificação de classe e diferenciação terminal, para além da possível acção de factores ambientais e das alterações a nível dos linfócitos T e B. A falta de expressão do antigénio Fas em células B activadas ou não (Drappa et al. 1993), parece contribuir para o conceito actual de que a estimulação das células B e T autoreactivas está directamente relacionada com a mutação que afecta a expressão do gene *fas*.

3.4 - Células T

A linfopenia de células T parece ser uma característica dos doentes com lupus e a sua severidade está relacionada com a actividade da doença (Steinberg et al. 1990). Esta diminuição das células T, tanto no homem como ratinho, tem sido apontada como resultado da produção espontânea de anticorpos reactivos contra as células T (Sakane et al. 1979; Steinberg et al. 1990, 1991). Estes autoanticorpos podem preceder ou resultar da resposta autoimune. Os anticorpos anti-T são preferencialmente citotóxicos para os timócitos imaturos (Sakane et al. 1979), interferem com a função supressora normal, parecem ser importantes na distribuição de subpopulações das células T no sangue periférico dos doentes com lupus (Morimoto et al. 1984) e contribuem para o desenvolvimento da doença (Steinberg et al. 1990, 1991).

Nos ratinhos portadores do gene *lpr* a linfoadenopatia que se desenvolve é caracterizada pela acumulação de uma população invulgar de células T duplamente negativas (TCR-$\alpha\beta^+$CD3$^+$CD4$^-$CD8$^-$B220$^+$) e (CD4$^-$CD8$^-$Thy-1$^+$CD3$^+$). Os linfócitos TCR-$\alpha\beta^+$CD3$^+$CD4$^-$CD8$^-$B220$^+$ também constituem uma população característica dos doentes com lupus activo (Steinberg et al. 1991; Matsuzaki et al. 1992). Tanto as células CD4$^+$ como as células CD4$^-$, CD8$^-$, CD3$^+$ estimulam os linfócitos B na produção de anticorpos anti-ADN patogénicos (Steinberg et al. 1991). Recentemente, foi demonstrado em ratinhos quiméricos (*lpr*-+/+) que as células T *lpr* são necessárias para a produção de autoanticorpos por interacção com as células B *lpr* (Sobel et al. 1993). Para além disso, foi evidenciado que no timo existem duas vias paralelas de diferenciação, uma para as células T

lpr e outra para as células T normais (Matsuzaki et al. 1992). A expansão da população de células CD4-, CD8-, B220+ nos ratinhos *lpr* parece resultar de uma diminuição da apoptose dos linfócitos T com o gene *lpr* mutado (Zhou et al. 1993). A análise da expressão da proteína Fas nos timócitos CD4+ e CD8+ e nos linfócitos maduros activados revelou que este antigénio é expresso nas células normais de ratinho e não é expresso nas células de MRL/*lpr* (Drappa et al. 1993). Num estudo comparativo do desenvolvimento tímico das células T selvagens e de ratinhos *lpr*, verificou-se que alguns dos linfócitos *lpr* escapam à apoptose do timo, o que sugere que o produto do gene *fas* pode contribuir para a resposta policlonal que se verifica no lupus (Suda et al. 1993; Bossu et al. 1993). Embora o timo não seja o único local onde se dá a remoção ou delecção de clones autoreactivos, ele pode funcionar como fonte de autoantigénios apoptóticos para os quais o organismo tem de ficar tolerante. O defeito no antigénio Fas, que medeia a apoptose das células T no ratinho *lpr*, parece facilitar a persistência de clones autoreactivos e também privar o organismo de formar um repertório completo de autoantigénios "apoptóticos" para os quais o próprio organismo deveria ser tolerante (Casciola-Rosen et al. 1994). As mutações no gene *fas* parecem, no entanto, estar envolvidas num número muito diminuto de doentes humanos com lupus.

3.5 - Interleuquinas

As interacções entre as diferentes células do sistema imunológico são mediadas, na sua grande maioria, por proteínas designadas por interleuquinas (IL). Estas são produzidas pelos linfócitos e pelos monócitos, actuam entre si e sobre elas próprias. As interleuquinas têm uma acção pleotrópica e a sua actividade ocorrre predominantemente entre células num determinado local, mais do que a nível sistémico, e por isso as determinações séricas não refletem a sua concentração no orgão alvo. Embora a presença de interleuquinas circulantes pareça fazer parte da activação do sistema imune nas doenças autoimunes, e eventualmente contribuir para a sua propagação ou sintomatologia, ainda não está completamente definido se a sua acção nestas doenças tem uma função iniciadora e efectora ou se resulta de um epifenómeno. As interleuquinas, em particular as IL-1 e IL-2, os interferons (IFN) e o TNF são factores imunológicos que têm estado associados ao desenvolvimento da autoimunidade (Steinberg et al. 1991; Schattner, 1994).

3.6 - Mímica molecular

A mímica molecular poderá ser o resultado da exposição do hospedeiro a antigénios exógenos que sejam estruturalmente semelhantes a autoantigénios. Tanto os antigénios próprios como os externos podem ter estruturas tridimensionais semelhantes e possuir

sequências de aminoácidos idênticas. O reconhecimento destas estruturas e/ou sequências em antigénios próprios por parte das células do sistema imune, que inicialmente foram dirigidas para um antigénio exógeno, pode ser a causa da formação de autoanticorpos, embora condicionada por modificações a nível das células B e das células T. Estes agentes podem induzir uma activação policlonal das células B e simultaneamente conduzirem a uma quebra na tolerância (Steinberg et al. 1990; Talal et al. 1990).

As mutações somáticas, que ocorrem em agregados, nas regiões complementares determinantes (CDRs), como a utilização ao acaso ou em quadros de leitura pouco comuns da região D, conduzem à produção de um elevado número de resíduos de arginina e asparagina. Estes aminoácidos carregados positivamente (arginina, asparagina e lisina) parecem estar implicados na ligação a moléculas de ADN, especialmente ao ADN de cadeia dupla (Shlomchick et al. 1990; Tillman et al. 1992; Drake et al. 1992; Stollar, 1994). A substituição de resíduos de arginina por resíduos de glicina, induzida por mutagénese *in vitro*, resulta numa perda da capacidade de ligação dos anticorpos anti-ADN produzidos por ratinhos MRL/*lpr* e NZW/NZB (Isenberg et al. 1994; Stollar, 1994). Assim, o efeito produzido pelas mutações pode aumentar ou diminuir a afinidade para os determinantes antigénicos, como acontece com os anticorpos anti-ADN, e sustenta a hipótese de que o aumento de afinidade pode potenciar a patogenicidade, pela reactividade cruzada com estruturas carregadas negativamente, nomeadamente a nível da membrana glomerular. Adicionalmente, os receptores das células T apresentam como característica particular a presença de resíduos aniónicos na região CDR3, que está envolvida na ligação de péptidos antigénicos. Estes resíduos podem reconhecer antigénios catiónicos, como as histonas e a outras proteínas que se ligam ao ADN, e serem responsáveis pela seleção de clones T "helper" específicos durante o processamento desses antigénios nas células B (Drake et al. 1992; Moham et al. 1993).

Dos vários estudos efectuados nos diferentes autoepítopos tem sido defendido que a conformação dos antigénios é determinante para o seu reconhecimento por parte do anticorpo. É provável que as afinidades diferentes dos autoanticorpos possam estar relacionadas com a frequência de repetição dos determinantes antigénicos e também com as características conformacionais que o antigénio exibe em solução, uma vez que estas podem determinar a acessibilidade dos epítopos (Stollar, 1994). As sequências descontínuas, resultantes da estrutura terciária das proteínas ou das interacções proteína-proteína, podem determinar o reconhecimento de vários epítopos por diferentes anticorpos ou, condicionar a multireactividade dos anticorpos por adaptação da conformação entre o antigénio e o anticorpo (Chou et al. 1992; Roos et al. 1993; Tan 1994). A conformação dos antigénios

como factor essencial para o seu reconhecimento por parte dos anticorpos é reforçada pelo facto dos autoanticorpos humanos contra as sintetases do tARN reconhecerem estes antigénios apenas na forma nativa (Tan, 1989; Tan, 1994). Para além disso, muitos autoepítopos envolvem domínios funcionais ou locais activos dos autoantigénios. Foi demonstrado que os autoanticorpos humanos contra a sintetase do tARN da treonina são capazes de inibir a actividade desta enzima, enquanto que o anticorpo obtido por imunização em coelhos não é capaz de inibir a função da sintetase (Tan, 1989). Estes resultados sugerem que a mímica molecular poderá estar condicionada ou relacionada com a conformação dos antigénios mais do que com as homologias existentes entre as sequências de aminoácidos.

FUNÇÕES DOS AUTOANTIGÉNIOS

Muitos dos autoantigénios correspondem a proteínas ou partículas subcelulares que estão envolvidas em funções essenciais na célula. A utilização de autoanticorpos tem permitido a identificação de autoantigénios envolvidos nas reacções autoimunes e de proteínas com funções importantes nos processos celulares. Dentro das funções já evidenciadas têm sido descritas proteínas e moléculas de ARN, que estão associadas ao "spliceosome" e ao processamento e maturação do ARN (reacções de poliadenilação) e proteínas que estão ligadas à reformulação do nucléolo, à síntese de ácidos nucleicos, à mitose e ao centro organizador de microtúbulos.

Processamento de ARNs

Os soros humanos que contêm autoanticorpos contra os autoantigénios Sm e RNP têm sido usados para a caracterização do arranjo molecular das snRNP (Tan, 1989; Balczon, 1993). As snRNPs estão altamente conservadas nas diferentes espécies e são abundantes nas células metabolicamente activas (Lerner et al. 1980). O envolvimento das snRNPs no processamento do hnARN foi determinado com base nas experiências de inibição com anticorpos contra estas partículas. Os ensaios de proteção/imunoprecipitação com a RNAse permitiram verificar a existência de uma zona complementar entre a U1 snRNP e uma pequena região de 17 nucleótidos na proximidade da extremidade 5' do intrão (Mount et al. 1983). Do mesmo modo, foi determinada a interacção da U5 snRNP com 15 nucleótidos da extremidade 3' do intrão (Balczon, 1993). Os antigénios Sm, que formam o "core" de proteínas das snRNPs, são constituídos por seis proteínas com pesos moleculares de 11, 12, 13, 16, 28 e 29 kDa (Tan, 1989; Balczon, 1993). Estas proteínas existem em todas as snRNPs, mas há snRNPs individuais que contêm componentes proteicos únicos. Associadas exclusivamente à U1 snRNP, existe um conjunto de proteínas com 22, 23 e 70 kDa, que foram detectadas com o soro designado anti-RNP, isolado de doentes com lupus (Tan, 1989; Balczon 1993). Com a U2 snRNP precipitam duas proteínas específicas com 28,5 kDa (B") e 32 kDa (A') (Tan, 1989). Doentes com esclerodermia apresentam uma proteína específica, a fibrilarina, que é o componente específico da U3 snRNP (Lischwe et al. 1985; Ochs et al. 1985). Anticorpos anti-MaS, presentes nos doentes com esclerose sistémica, reagem com a proteína p150 que imunoprecipita apenas as U4/U6 snRNPs (Okano et al. 1991). Mais recentemente foi demonstrado que a p150 se associa preferencialmente à partícula U6 snRNP, para além de se ligar a 20S U5, na forma de

complexo triplo U4/U6/U5, e à 17S U2 (Blencowe et al. 1993).

Os anticorpos anti-Sm estão envolvidos no processamento dos transcriptos da ARN polimerase II, uma vez que a adição destes anticorpos impede as reacções de poliadenilação (Tan, 1989; Balczon, 1993). Neste processo de maturação do ARN, a U11 snRNP parece estar associada à poli-A polimerase, uma vez que esta partícula é co-purificada com o factor de clivagem e poliadenilação (CPF), factor que é necessário à clivagem do ARN e que confere especificidade à reacção de poliadenilação (Christofori et al. 1988). O tratamento com a RNAse A e a síntese de oligonucleótidos complementares para as diferentes regiões da U2 snRNP demonstraram que esta ribonucleoproteína interage com o local de ramificação, antes da formação da estrutura "lariat", que carateriza um dos modelos de processamento dos pré-mARNs (Black et al. 1985).

Os autoanticorpos contra as U3, U8 e U13 snRNPs nucleolares, detectados no soro de doentes com esclerodermia/polimiosite, evidenciaram que estas proteínas estão ligadas ao processamento do ARN ribossómico (Tyc et al. 1989). Existem outros autoanticorpos humanos, de doentes com esclerose sistémica, que estão dirigidos contra a estrutura CAP do terminal 5' trimetilguanosina (TMG) das U snARNs (Okano et al. 1992).

Alguns soros de doentes com LES apresentam autoanticorpos que estão associados à maturação do ARN de histonas, que é feita por uma reacção de clivagem simples, uma vez que a extremidade-3' não contém a sequência consenso para a poliadenilação (Krieg et al. 1984). Os autoanticorpos contra a U7 snRNP e um factor proteico que contem epítopos do antigénio Sm e do 5'm_3CAP são essenciais no processamento do mRNA das histonas, como foi evidenciado por estudos de imunoprecipitação e de proteção nucleásica (Mowry et al. 1987).

Nucléolo

Os doentes com esclerose sistémica têm uma maior predominância de autoanticorpos que reagem com antigénios nucleolares. Dentro dos autoantigénios identificados, a fibrilarina, uma proteína com 34 kDa, está associada às snRNP nucleolares e localiza-se nos centros fibrilares do nucléolo (Lischwe et al. 1985; Ochs et al. 1985). A presença de uma suposta região de ligação ao ARN, na sequência desta proteína, parece determinar o seu envolvimento no processamento do ARN ribossómico (Ochs et al. 1985; Balczon, 1993). Os antigénios Pm-Scl e 7-2 RNP foram localizados na região granular do nucléolo, que é local proposto para a reunião dos ribossomas (Hashimoto et al. 1983; Reddy et al. 1983; Reimer et al. 1986). Os soros anti-Pm-Scl reconhecem um conjunto de 11 péptidos com pesos moleculares que variam dos 20 kDa aos 110 kDa (Reimer et al. 1986). O antigénio NOR-90, detectado com soros de várias doenças autoimunes, tem sido apontado como

tendo um papel estrutural na reformulação do nucléolo após a mitose, uma vez que parece mediar a reunião das NOR ("nucleolus-organizing regions") na reconstituição do nucléolo (Rodrigo-Sanchez et al. 1987). Alguns destes soros têm anticorpos contra as ARN polimerases I e II. Mais recentemente, foi demonstrado que o antigénio NOR-90 existe sob duas formas moleculares, com 89 kDa e 93 kDa, e foi identificado como um factor de transcrição nucleolar humano, designado por hUBF ("human upstream binding factor"), que tem a capaciadade de se ligar ao promotor dos genes do ARN ribossómico aumentando a actividade de transcrição da ARN polimerase I (Imai et al. 1994). Autoanticorpos de doentes com esclerodermia estão também envolvidos no reconhecimento da ARN polimerase I e de outros antigénios nucleolares com pesos moleculares variados (entre 14 kDa e 210 kDa). A microinjecção destes anticorpos em oócitos de *Xenopus laevis* leva a uma acumulação das subunidades 18S e 28S do ARN ribossómico, o que traduz uma acção efectora destes anticorpos na inibição da transcrição dos genes ribossomais, catalizada pela ARN polimerase I, por reacção específica com a subunidade de 190 kDa desta enzima (Reimer et al. 1987).

As subunidades p70 e p80 (p80/p70) do antigénio Ku, reconhecido por soros de doentes com lupus e de doentes com eclerodermia/polimiosite, localizam-se no núcleo e nucléolo das células em interfase, mas apresentam uma distribuição diferente nas células em mitose (Higashiura et al. 1992; Li et al. 1992; Wang et al. 1994). O antigénio Ku é um componente da proteína cinase dependente do ADN (DNA-PK - "DNA dependent protein kinase"). A DNA-PK tem a capacidade de fosforilar *in vitro* várias proteínas associadas à cromatina, entre elas os factores de transcrição Sp-1 e Oct-1, a ARN polimerase II e a proteína supressora de tumores p53 (Suwa et al. 1994; Wang et al. 1994).

Mitose e centro organizador de microtúbulos

A utilização de soros de doentes com CREST tem sido particularmente útil no estudo da mitose, nomeadamente na avaliação da formação do cinetocoro, na formação do fuso e na segregação dos cromossomas.

Autoantisoros de CREST permitiram a identificação de proteínas ligadas ao cinetocoro e ao centrómero, que têm pesos moleculares que variam entre os 14 kDa e os 140 kDa. As proteínas centroméricas CENP-A, CENP-B, CENP-C e CENP-D apresentam, respectivamente, pesos moleculares de 18 kDa, 80 kDa, 140 kDa e 50 kDa (Earnshaw et al. 1987; Cooke et al. 1990; Saitoh et al. 1992; Balczon, 1993). A CENP-A corresponde a uma variante da histona H3 específica do centrómero. A CENP-B é uma proteína que se liga ao ADN α-satélite através de uma sequência específica de 17 pares de bases designada por

"CENP-B box" (Masumoto et al. 1989). As propriedades ácidas da CENP-B têm sido referidas como potenciais desestabilizadoras da estrutura ordenada da cromatina, por interacção com as histonas. A CENP-B possui uma pequena região com um domínio acídico homólogo a uma subregião da tubulina. Esta região na tubulina está envolvida na ligação das MAPs ("microtubule-associated proteins") aos microtúbulos. Assim, este domínio acídico da CENP-B poderá explicar a ligação dos cinetocóros aos microtúbulos, através da interacção da CENP-B com as MAPs e destas com os microtúbulos (Balczon, 1993). A injecção de anticorpos de soros de CREST em oócitos de ratinho demonstrou que o antigénio com 80 kDa é capaz de inibir a formação da placa metafásica e a segregação aberrante que daí resulta é responsável pela aneuploidia das células filhas (Simerly et al. 1990). A CENP-C situa-se na placa interna do cinétocoro e por isso pode estar envolvida nas interacções cromossoma/fuso que caracterizam a mitose, enquanto que a CENP-D não tem uma função conhecida a nível do centrómero (Saitoh et al.1992).

Soros de doentes com esclerodermia e/ou síndrome de Raynaud's reagem com antigénios específicos do centrossoma que têm pesos moleculares de 110-115 kDa (Sager et al. 1986) e de 38, 185, 190 e 220 kDa (Balczon et al. 1991). Alguns destes antigénios (38, 185 e 220 kDa) são detectados no centrossoma das células em interfase e mitose, enquanto que outros (190 kDa) só são reconhecidos nos centrossomas mitóticos (Balczon et al. 1991). A proteína NuMA ("nuclear mitotic antigen"), também designada por POPA ("prophase-originating polar antigen") e centrofilina, é um antigénio intranuclear associado ao centrossoma isolado a partir de autoanticorpos que reagiam com o núcleo e fuso mitótico. Esta proteína apresenta três isoformas com pesos moleculares de 194, 195 e 230 kDa que estão associadas ao fuso mitótico (Yang et al. 1992a, b; Compton et al. 1992; Tang et al. 1994). A injecção de anticorpos anti-NuMA *in vivo*, nas células em diferentes fases da mitose, impede a formação do fuso na profase, conduz ao colapso do aparelho mitótico para a região do centrossoma na metafase e não inibe a segregação dos cromossomas na anafase (Yang et al. 1992b). Estes resultados, em conjunto com a persistência deste antigénio nos pólos do fuso em células tratadas com nocodazole, favorecem a hipótese de o mesmo ser um constituinte do centro organizador dos microtúbulos -MTOC- (Sager et al. 1986; Yang et al. 1992b).

O antigénio MSA-36, isolado com soros autoimunes variados, tem uma distribuição complexa durante o ciclo celular (Rattner et al. 1992). Nas células em interfase tem um localização nuclear, mas a separação desta proteína dos cromossomas quando a célula entra em anafase, coloca-a no conjunto de proteínas designadas por "chromosomal passengers" (Rattner et al. 1992). O antigénio p330, identificado com soros humanos autoimunes variados, está associada ao centrómero na profase e distribui-se pela zona média do fuso no

início da anafase. Embora a sua função ainda não seja conhecida, esta proteína tem sido referenciada como uma "chromosomal passenger", uma vez que a localização subcelular apresentada é compatível com as possíveis funções ligadas ao movimento dos cromossomas e citocínese (Casiano et al. 1993). Esta proteína, tal como a NuMA não é afectada pelo tratamento específico para a preparação de matrizes nucleares *in situ*, antes da fixação, que remove 90% da proteínas celulares totais e cerca de 99% do ADN e ARN da células, e por isso é considerada como um componente da matriz nuclear, onde se acumula durante a fase S, indo depois para o centrómero. Para as "chromosomal passengers" têm sido propostas várias funções, que eventualmente asseguram o processo irreversível da célula completar a divisão celular: 1) regulação da transição metafase/anafase, por influência na separação das os cromatídeos irmãos; 2) interacção com as extremidades positivas dos microtúbulos do centro do fuso, com consequente estabilização dos mesmos durante a mitose; 3) na elongação do fuso durante a anafase B, como proteínas motoras associadas à movimentação dos microtúbulos ; 4) determinação do local de formação do anel contráctil (Cooke et al. 1987; Earnshaw et al. 1991a).

Recentemente, o soro de um doente com lupus permitiu a identificação de uma proteína de 47 kDa, designada por RMSA-1 ("regulator of mitotic spindle assembly"). Este autoanticorpo quando electroporado em fibroblastos de ratinho impede a forma formação do fuso, o que sugere uma função essencial desta proteína na progressão do ciclo celular (Yeo et al. 1994a). Nos insectos, este soro permitiu a detecção de uma proteína, com 31 kDa, associada com os cromossoma mitóticos e meióticos (Yeo et al. 1994b). Para além da relação deste antigénio com o ciclo celular, a sua detecção em espécies tão distintas reforça a capacidade dos autoanticorpos reconhecerem os locais activos de moléculas altamente conservadas (Tan; 1989; Yeo et al. 1994b).

Síntese de ácidos nucleicos

A nível da síntese dos ácidos nucleicos, os autoanticorpos de doentes com lupus identificam um antigénio nuclear com 36 kDa, que é o PCNA ("proliferating cell nuclear antigen"), inicialmente designado por ciclina (Takasaki et al. 1984; Mathews et al. 1984). Este antigénio cuja síntese é induzida na transição G1/S, é necessário para a replicação do ADN catalizada pela ADN polimerase δ *in vitro*, mas não é requerido pela ADN polimerase α (Prelich et al. 1987; Fairman, 1990).

O antigénio Scl-70, detectado com soros de doentes com esclerodermia, tem sido referido como sendo a topoisomerase I, dado que estes autoanticorpos são capazes de reconhecerem preparações purificadas de topoisomerase I bovina e exibem um padrão de

imunofluorescência característico desta proteína (Shero et al. 1986; Guldner et al. 1986).

Anticorpos contra a poli(ADP-ribose) polimerase tem sido identificados nos soro de doentes com o síndrome de Sjögren's (Tan, 1989; Balczon, 1993). A poli(ADP-ribose) polimerase catalisa a transferência dependente do ADN da ADP-ribose para a nicotinamida adenina difosfato (NAD) para as proteínas nucleares formando cadeias ramificadas e maiores de poli(ADP-ribose).

O antigénio La é uma fosfoproteína de 48 kDa que está ligado à terminação da transcrição da ARN polimerase III (Glottlieb et al. 1989a, b). Os antigénios Ro e 8-2 (Hashimoto et al. 1983; Reddy et al. 1983; Balczon, 1993), estão associados a pequenas subclasses de ARN designadas por YARN (ARN citoplasmático). Tal como as snRNP, a nível do citoplasma existem as scRNPs ("small cytoplasmic ribonucleoproteins"). O componente maioritário do antigénio Ro é uma scRNP de 60 kDa (Wolin et al. 1984) cuja função ainda não é conhecida, embora tenha sido proposto como cofactor regulador da actividade da proteína La na terminação da transcrição da ARN polimerase III (Wolin et al. 1983; Balczon, 1993).

Outras funções

Aos autoantigénios têm sido atribuídas outras funções que envolvem a aminoacetilação de ARNs por tARN sintetases (Tan, 1989; Miyachi et al. 1991), a translocação através do retículo endoplasmático, nomeadamente via SRP ("signal recognition particle") e a manutenção da arquitectura nuclear através das proteínas que se ligam aos cromossomas (Tan et al. 1988; Tan, 1989).

Os soros de doentes com dermatomiosite e polimiosite têm como antigénios alvo as sintetases do tARN. Os autoanticorpos Jo-1, PL-7 e PL-12 reconhecem, respectivamente, as sintetases do tARN da histidina (50 kDa), da treonina (80 kDa) e da alanina (110 kDa) Estes anticorpos são específicos destas doenças e usados como marcadores de diagnóstico. Estes soros reconhecem a proteína de 54 kDa, constituinte da SRP. A SRP é formada por um complexo de ARN citoplasmático designado por 7SL ARN e um conjunto de seis polipeptídeos. O antigénio de 54 kDa, que contitui o determinante antigénico da SRP, é necessário para a terminação da elongação da síntese proteica e para a translocação através do retículo endoplasmático. Por imunofluorescência, estes anticorpos marcam componentes citoplasmáticos e nucleolares (Tan, 1989).

Soros autoimunes variados reconhecem um antigénio nuclear de 80 kDa designado por p80-coilin, que faz parte dos "coiled bodies" nucleares, estruturas localizadas no espaço intercromatínico entre o nucléolo e o invólucro nuclear, mas cuja função é desconhecida (Andrade et al. 1991). Autoanticorpos de doentes com o síndrome de Sjögren's

identificaram uma proteína membranar da perifería do aparelho de Golgi, com 230 kDa, para o qual foi sugerida uma função na organização específica da membrana do Golgi ou, no transporte proteínas associado a este organelo (Kooy et al. 1992). O antigénio ND ("ND-nuclear dots"), de 72 kDa, foi assim designado pelo padrão de imunofluorescência que exibe nas células em interfase que é caracterizado pela presença de pontos nucleares. Esta proteína é capaz de activar a transcrição *in vitro* e a sua sequência apresenta homologia com outros activadores da transcrição (Xie et al. 1993). Os soros de doentes com esclerodermia identificam um conjunto de autoantigénios com pesos moleculares aparentes entre os 23-25 kDa, designados por PIKA ("polymorphic interphase karyosomal association"), que ocupam as zonas menos densas do nucleoplasma, que são os locais activos de processamento e transcrição de ARNs. Estes antigénios diferem estruturalmente e fisicamente dos "coiled bodies" e dos "nuclear dots" (Saunders et al. 1991). A variação na distribuição morfológica destes antigénios poderá traduzir os rearranjos estruturais que ocorrem no núcleo durante o ciclo celular.

Dentro das funções já conhecidas e aquelas que se pensa serem desempenhadas pelos autoantigénios, verifica-se que parece haver uma preferência para a formação de autoanticorpos contra componentes citoplasmáticos e nucleares, relativamente à resposta imune contra componentes estruturais e membranares, que é escassa (Tan, 1994). Contudo, persiste por esclarecer uma questão fundamental e que diz respeito ao facto destes componentes celulares autoantigénicos, com funções biossintéticas importantes, funcionarem como alvo das reacções autoimunes. A tabela 2 sumariza as funções dos autoantigénios até agora evidenciadas.

Tabela 2 - Autoantigénios identificados com soros humanos utilizados no estudo de processos celulares (adaptado e modificado de Tan, 1989; Balczon, 1993; Tan, 1994).

Localização	Autoantigénio	M.W. (kDa)	Função
Núcleo	ANA, Sm ou SnRNP	13, 16, 28, e 29	- processamento ARN - U7 proc. mARN histonas - U3, U8 e U13 - produção rARN - U11 - poliadenilação
Núcleo	U1 snRNP	70 (22 e 33 raros)	- liga-se à extremidade 5' do intrão
Núcleo	U2 snRNP	29 e 32	- liga ramificação do intrão
Nucléolo	U3 e fibrilarina	34	- processamento pre-rARN
Nucléolo	ARN pol I	190 (?)	- transcrição dos genes rARN
Nucléolo	PM-Scl	120-110 (11 pép.)	- reunião dos ribossomas (?)
Nucléolo	7-2 RNP	40	- biogénese ribossomal (?)
Reg. Org. Nucléolo	NOR-90	90	- reformação nucléolo (?)
	NOR-90	89/93	- factor activador da transcrição nucleolar
Cent/Cinétocoro	Antigénios CREST	15, 50, 80 e 140	- organização do centrómero e ligação a microtúbulos (?)
Centríolo	Centrossoma/centríolo	39, 185 e 220	- desconhecida
Núcleo e pólos do fuso	NuMA, POPA ou centrofilina	110-115, 185 e 220	- desconhecida
Núcleo	PCNA, ciclina, factor acessório da ADN polimerase δ	29	- síntese de ADN; factor acessório da ADN pol. δ
Núcleo	Topoisomerase I	100	- síntese de ADN, relaxamento do ADN superenrolado
Núcleo	SS-A ou Ro	60	- terminação transcrição da ARN polimerase III (?)
Núcleo	SS-B ou La	50	- factor transcrição da ARN pol. III
Núcleo	poli(ADP-ribose)	116	- reparação do ADN e diferenciação celular
Cromossomas	RMSA-1	47	- formação do fuso
Citoplasma	Jo-1, PL-7 e PL-12	50, 80 e 110	- aminoacetilação

CICLO CELULAR

O ciclo celular é um processo essencial da vida de todas as células e tem uma importância fundamental no desenvolvimento e na diferenciação celular. A proliferação celular está associada à duplicação do ADN e à divisão física de uma célula em duas células filhas. A informação necessária para a realização do ciclo celular está contida nas sequências de ADN existentes nos cromossomas. Estas sequências de ADN têm essencialmente duas funções. Como detentoras da informação genética, necessitam de ser duplicadas através de enzimas específicas da replicação e depois segregadas em duas células filhas, processo que resulta do rearranjo do citosqueleto que divide uma célula em duas. Além disso, devem expressar os genes que dirigem a produção de duas classes de proteínas: as que regulam o ciclo celular e as que constituem os componentes da próxima geração de células. O ciclo celular é um processo sequencial e ordenado, sujeito a regras próprias que quando são modificadas podem alterar a proliferação celular e dar origem ao aparecimento do cancro ou conduzir à morte de um organismo.

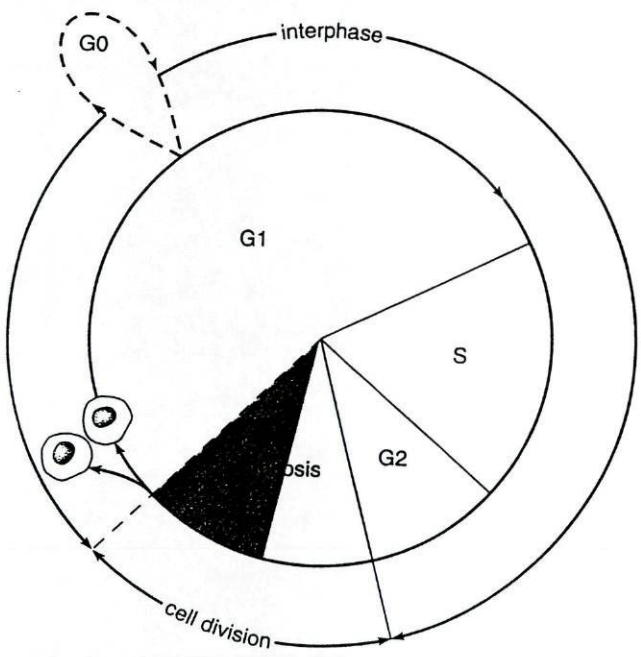


Figura 1 - Ciclo celular. A fase G1 da interfase é variável, mas para um determinado tipo de célula o tempo das fases S, G2 e mitose é relativamente uniforme. A fase G1 pode prolongar-se quando a célula entra no estado estacionário, fase G0 (a tracejado). A divisão citoplasmática ou citocinése (a escuro) geralmente começa no decorrer da mitose e termina no fim da mitose (adaptado de Wolfe, 1993).

O ciclo celular é constituído por duas fases: a interfase e a mitose. A interfase ocupa a maior parte deste processo e é formada por três fases: G1, S e G2. A mitose, decorre num curto período do ciclo e é constituída pela profase, pró-metafase, metafase, anafase, telofase e citocinese (Fig. 1). As células que não se dividem, por terem atingido o estado final de

desenvolvimento e diferenciação ou por carência de nutrientes, suspendem este ciclo logo após a mitose, antes da síntese do ADN, e entram num estado estacionário que é designado por fase G0. A duração do ciclo celular e dos períodos que o constituem varia em função do tipo de células onde o mesmo decorre. As transições G1/S e G2/M são dominadas por eventos peculiares que estão sujeitos a mecanismos de regulação próprios (pontos de controlo) e que permitem assegurar a sequência ordenada de eventos que caracteriza o ciclo celular.

Características das várias fases do ciclo celular

- Interfase

A interfase inicia-se depois da divisão mitótica terminar. É caracterizada por um período de crescimento, em que há a síntese de proteínas e de outras moléculas (fase G1), pela duplicação do ADN (fase S) e pela formação de proteínas essenciais para a mitose (fase G2).

Na fase G1 é assegurada a síntese de proteínas, hidratos de carbono e lípidos característicos de cada célula. Durante este período a massa celular duplica e não se verifica a síntese do ADN (Wolfe, 1993).

A fase S é caracterizada pela duplicação do ADN, em que oas duas cadeias filhas são referidas como cromatídeos irmãos. A replicação é feita pelas ADN polimerases, a partir dos locais de origem de replicação, e por um conjunto de enzimas que viabilizam a actuação das ADN polimerases e a formação completa das cadeias filhas, através de um processo semi-conservativo. Durante este período a transcrição continua e verifica-se a síntese de proteínas, histonas e não histonas, que estão associadas aos cromossomas. Porém, a replicação do ADN é precedida pela duplicação dos centrossomas, que se verifica no final da anafase da mitose precedente. Nas células animais o centrossoma faz parte do centro organizador de microtúbulos e é constituído por um par de centríolos rodeado de material amorfo (Wolfe, 1993). A replicação dos centríolos é conservativa e a sua distribuição é semi-conservativa (Kochanski et al. 1990; Murray et al. 1993; Sunkel, 1993).

A fase G2 determina o fim da interfase e o início da mitose. Neste período é assegurada a síntese de proteínas que vão ser necessárias à progressão da mitose. A maioria das células permanece pouco tempo nesta fase, embora haja excepções: no protozoário *Amoeba* a maior parte do ciclo e do crescimento celular é feito na fase G2 (Wolfe, 1993).

- **Mitose**

A condensação dos cromossomas caracteriza o início da profase. Os cromossomas condensados são formados por dois cromatídeos irmãos. As bases moleculares dos mecanismos de condensação e descondensação cromossómica ainda estão por determinar. A estrutura característica dos cromossomas condensados parece resultar do arranjo em forma de laços que os nucleossomas fazem à volta de uma estrutura designada por "chromosome scaffold", definida como o conjunto de proteínas associadas aos cromossomas após remoção das histonas, das quais o componente maioritário é a topoisomerase II (Jackson, 1991; Murray et al. 1993; Saitoh et al. 1994). Além disso, a presença da topoisomerase II parece determinar a condensação cromossómica dado que a presença de inibidores específicos da topoisomerase II têm a capacidade de bloquear a condensação dos cromossomas nos extractos mitóticos de ovos de *Xenopus* (Wood et al. 1990; Adachi et al. 1991; Swedlow et al. 1993). A dissolução do nucléolo, com consequente paragem da síntese do rARN, e a separação dos centríolos e dos asteres, com posterior migração para os pólos opostos da célula por forma a constituírem o fuso, são os acontecimentos dominantes da profase. Os elementos maioritários do citosqueleto (microtúbulos, microfilamentos e filamentos intermediários) também sofrem alterações drásticas no início da mitose. No final da interfase, o citosqueleto unipolar das células em interfase é transformado numa forma bipolar característica das células em divisão. Ao mesmo tempo, a maioria dos microtúbulos interfásicos quebram-se e são substituídos por outros menores e mais numerosos que se reunem ou reorganizam no fuso. Nas células animais, os centríolos constituem o centro dos pólos mitóticos e é a partir do centrossoma que se formam os microtúbulos que constituem os pólos do fuso. Depois da divisão citoplasmática, os microtúbulos do fuso desaparecem e o seu arranjo inicia-se pelo crescimento a partir do centro da célula tomando a posição característica próxima do núcleo. A rede de microfilamentos no início da mitose é quebrada e os microfilamentos concentram-se no fuso, embora a sua função ainda não seja conhecida. Nas células animais, a faixa de microfilamentos organiza-se à volta da periferia da célula e contrai-se para que o citoplasma se divida. Quando a divisão termina, a estrutura típica dos microfilamentos das células reorganiza-se. As alterações inerentes à organização e distribuição dos filamentos intermediários durante a divisão celular variam de uma forma significativa nos vários tipos de células animais: pode não haver rearranjo e os filamentos intermediários existentes são separados em duas partes à medida que o citoplasma se divide; pode verificar-se o colapso dos filamentos intermediários numa camada sobre o invólucro nuclear, à medida que os microtúbulos se quebram e se reorganizam no fuso; os filamentos intermediários que envolvem o núcleo podem manter-se nesta posição durante a divisão celular e formar uma "gaiola" ("cage") à volta do fuso; os filamentos intermediários podem

dissociar-se e desaparecerem quase na totalidade durante a divisão celular. Geralmentos, os filamentos intermediários tornam-se mais fosforilados à medida que a célula faz a transição da interfase para a divisão celular (Wolfe, 1993).

A pró-metafase é caracterizada essencialmente pela dissolução do invólucro nuclear e pelo início da formação do fuso mitótico. A formação dos microtúbulos do fuso parece ser determinada pela presença do material pericentriolar (Mitchison et al. 1984a), da qual a γ–tubulina é um dos constituintes já identificados (Zeng et al. 1991; Joshi et al. 1992; Stearns et al. 1994, Sunkel et al. 1995), e não pela presença dos centríolos no aster. Os microtúbulos são formados por dímeros de α e β-tubulina. A polaridade e a instabilidade dinâmica são características destas estruturas. As extremidades (-) situam-se junto ao MTOC e as extremidades (+) localizam-se na zona equatorial do fuso. Os microtúbulos são estruturas dinâmicas que estão em constante polimerização e despolimerização (Mitchison et al. 1984b; Belmond et al. 1990). Os microtúbulos estão ligados a proteínas designadas por MAPs ("microtubule-associated proteins"), que exercem funções estruturais, pois afectam a estabilidade dos mesmos por ligação às suas extremidades ou lados, e funções motoras, que permitem a deslocação longitudinal das mesmas à superfície destas estruturas, através da hidrólise do ATP. A maioria destas proteínas motoras pode deslocar-se para o pólo (+), como a cinesina, ou para o pólo (-), como a dineína (Mitchison et al. 1984b). A dissolução do invólucro nuclear é determinada pela fusão, em diferentes locais, das membranas externa e interna, na forma de vesículas membranosas e também, pela fosforilação das laminas (Heal et al. 1990; Peter et al. 1990b). Neste processo, a lamina B mantem-se ligada às vesículas que são libertadas do invólucro nuclear para o citoplasma, enquanto que as laminas A e C, à medida que as membranas nucleares se dissolvem, são libertadas e passam a localizar-se ou no citoplasma ou ligadas à superfície dos cromossomas metafásicos, ou entre estes dois locais (Wolfe, 1993).

A metafase é dominada por três acontecimentos. O primeiro corresponde à migração do fuso para a região ocupada pelo núcleo e a completa formação do mesmo. O segundo está associado à fixação dos cromossomas ao microtúbulos do fuso, induzida pela ligação dos cinetocoros aos microtúbulos polares. O terceiro relaciona-se com a congressão dos cromossomas ou seja, com o movimento dos cromossomas para a zona central do fuso onde constituem a placa metafásica ou placa equatorial. Este movimento depende das interacções feitas pelos cinetocoros com os microtúbulos polares (Wolfe, 1993). A estabilização dos cromossomas na placa metafásica depende da interacção de forças entre os microtúbulos polares e os cinetocorianos e das proteínas motoras que lhes estão associadas, como a cinesina ou a dineína (Murray et al. 1993).

O cromossoma metafásico tem uma estrutura própria e é constituído por dois cromatídeos irmãos. Cada cromatídeo corresponde a uma molécula de ADN linear associado a dois tipos de proteínas: histonas e não histonas. Os dois cromatídeos associam-se através de uma constrição primária onde se localiza o centrómero. Esta estrutura é caracterizada pela presença de sequências de ADN repetidas que permitem a ligação de proteínas específicas. Associada a esta região, e em cada cromatídeo, existe uma estrutura designada por cinetocoro, que constitui o local de interacção com os microtúbulos polares durante a mitose. Para cada lado do centrómero projectam-se os braços do cromossoma que terminam no telómero. Pelo menos num dos cromossomas ou no par de alguns cromossomas existe uma constrição secundária que corresponde à região organizadora nucleolar (NOR - "nucleolus-organizing region"), local que é rico em genes do rARN e onde se reformula o nucléolo no final da mitose (Fig. 2).

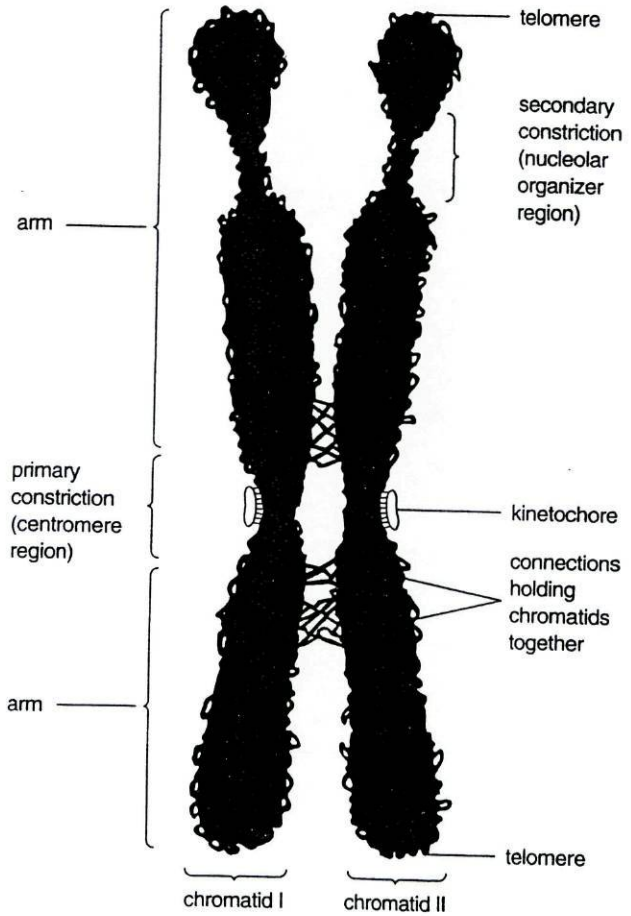


Figura 2 - Estruturas e regiões características do cromossoma condensado. O cromossoma está dividido em dois cromatídeos irmãos, que resultaram da replicação do ADN e duplicação das proteínas associadas aos cromossomas, na interfase. Cada cromatídeo é formado por uma molécula linear de ADN associado a proteínas histonas e não histonas. A constrição primária ou centrómero contém o cinetocoro, estrutura que se liga aos microtúbulos do fuso durante a mitose. Para cada lado do centrómero estão os braços do cromossoma que terminam no telómero. A constrição secundária, que pode existir num cromossoma ou no par, corresponde à região organizadora nucleolar (NOR), local rico em genes do rARN, e onde se reforma o nucléolo após a mitose (adaptado de Wolfe, 1993).

A anafase é caracterizada pela separação dos cromatídeos e pela movimentação dos mesmos para pólos opostos do fuso. A separação dos cromatídeos é um processo autónomo que parece ser independente do fuso ou dos microtúbulos do fuso (Wolfe, 1993), mas é condicionado pela existência de sequências específicas existentes nos centrómeros, pela presença da topoisomerase II e das proteínas INCENP. Embora ainda não haja evidência de que as proteínas INCENP (Cooke et al. 1987), são as responsáveis pela união dos cromatídeos irmãos, a sua localização entre os cromatídeos irmãos, na metafase, e a sua dissociação dos cromossomas no início da anafase, apontam para esta possível função (Cooke et al. 1987; Earnshaw et al. 1991a, b; Murray et al. 1993; Mackay et al. 1993). A combinação de movimentos separados, mas coordenados, entre os microtúbulos polares e os cinetocorianos e o aumento da concentração do cálcio regulam os movimentos que caracterizam a anafase (Lohka et al. 1985; Dinsmore et al. 1988). A migração dos cromatídeos durante a anafase tem duas etapas distintas: a anafase A e a anafase B. A anafase A é caracterizada pela diminuição da distância entre os cinetocoros e os pólos do fuso, que é feita através do movimento dos cinetocoros ao longo do microtúbulos cinetocorianos e com a consequente despolimerização destes últimos. A anafase B é caracterizada pelo aumento da distância que separa os pólos do fuso e pelo aumento o tamanho dos microtúbulos polares. A presença de ATP necessária para estes movimentos suporta a hipótese da associação das proteínas motoras do tipo cinesina e dineína neste processo (Cande et al. 1989; Rodionov et al. 1993). A proteína CENP-E tem sido apontada como um possível regulador do movimento dos cromossomas ou da elongação do fuso, na medida em que a microinjecção dos anticorpos anti-CENP-E em células humanas provoca um atraso na progressão da metafase para a anafase (Yen et al. 1991) e adicionalmente esta proteína possui uma sequência homóloga, no terminal amino, ao domínio motor que caracteriza as proteínas do tipo cinesina (Yen et al. 1992). Além disso, esta proteína é degradada no final da mitose e depois da proteólise da ciclina B (King et al.1994).

Quando os cromatídeos chegam aos pólos do fuso e os movimentos da anafase estão completos inicia-se a telofase. Durante a telofase, o fuso decompõem-se, com a excepção dos microtúbulos que persistem para tomarem parte na divisão citoplasmática, os cromossomas descondensam-se, o nucléolo reformula-se a partir dos locais NOR e o invólucro nuclear volta a constituir-se por fusão das vesículas aderentes (Vigers et al. 1991) aos cromossomas já descondensados. A reformulação do invólucro nuclear permite que haja a replicação do ADN no novo ciclo que se inicia (Blow, 1989).

A citocinese inicia-se numa fase tardia da anafase e continua durante a telofase. A sobreposição de microtúbulos polares na zona média do fuso vai constituir uma estrutura

densa, à qual estão associadas vesículas, designada por corpo médio. O anel contrácil, constituído essencialmente por filamentos de actina e miosina, vai ser responsável pela separação do citoplasma das células filhas. Este anel resulta da sobreposição e da interacção dos microtúbulos astrais, que crescem durante a anafase, com o cortex da célula. A presença do cálcio parece regular a formação deste anel. À medida que o anel contráctil se evidencia, o corpo médio vai sendo comprimido e acaba por desaparecer quando se dá a separação do citoplasma nas duas células filhas (Wolfe, 1993).

Pontos de controlo no ciclo celular

O ciclo celular é um processo sequencial onde as várias etapas que o constituem se processam de um modo ordenado. Para que isto se verifique, existem pontos de controlo em cada fase do ciclo, determinados pela presença de moléculas específicas, que permitem ou têm por função verificar se certos requisitos foram atingidos, antes de se progredir no ciclo, de forma a que a sua ordem temporal seja mantida (Hartwell et al. 1989).

Existe também um conjunto de factores que é responsável pelas alterações no decorrer do ciclo celular. A falta de nutrientes e a presença de inibidores da síntese proteica ou do ARN conduzem à paragem do ciclo na interfase. Constituem exemplos de factores que regulam ou influenciam o ciclo celular (Wolfe, 1993): a presença de hormonas esteróides e factores de crescimento que se ligam a receptores específicos e determinam a síntese de mensageiros secundários (cAMP, diacilglicerol e inositol trifosfato), que estimulam ou inibem determinados processos associados ao crescimento e divisão celulares; a alteração do transporte de iões através da membrana, nomeadamente do cálcio, potássio e sódio; as modificações do pH, dado que nas células em cultura a divisão celular pode ser induzida pelo aumento do pH citoplasmático; a alteração do número das proteínas histonas e não histonas associadas aos cromossomas e do seu estado de fosforilação que é característico para cada fase do ciclo; a concentração das poliaminas (putrescina, espermina e espermidina) parece ser determinante para a replicação do ADN; o volume crítico do citoplasma que cada célula tem de apresentar deve ser atingido na fase G1 para que uma segunda divisão ocorra (Nurse, 1975).

Os genes que regulam o ciclo celular podem ser classificados em três categorias (Wolfe, 1993). Na primeira encontram-se os genes que actuam como controladores fundamentais na regulação directa da passagem das diferentes fases do ciclo celular. Na segunda estão contidos os genes que codificam para proteínas que modificam a actividade dos genes da primeira categoria ou que actuam nos seus produtos. Os genes da terceira

categoria codificam para enzimas e factores adicionais que são requeridos para a manutenção de actividades críticas da célula, como a replicação do ADN. A identificação destes genes foi conseguida com a selecção de mutantes condicionais, geralmente sensíveis à temperatura. Os mutantes *cdc* ("cell dividing cycle") sensíveis à temperatura (cdc^{ts}) têm a capacidade de crescerem e de se dividirem a temperaturas permissivas, mas têm o seu ciclo celular inibido quando são colocados a temperaturas restritivas (Wolfe, 1993; Murray et al. 1993). Deste modo, os genes reguladores do ciclo celular têm sido identificado à custa das mutações induzidas na levedura (*Saccharomyces cerevisiae* e *Schizosaccharomyces pombe*), nos fungos (*Aspergillus*), nos protozoários (*Tetrahymena*), nas algas verdes (*Chlamydomonas*) e na *Drosophila* (Wolfe, 1993; Murray et al. 1993).

Existem dois pontos de controlo fundamentais no ciclo celular que regulam a transição G1/S e a transição G2/M e que dependem do MPF ("M-phase promoting factor") e das ciclinas (Cln). Estes dois pontos de controlo fazem com que a célula esteja determinada a fazer a síntese de ADN (transição G1/S) e a iniciar a mitose (transição G2/M). A actividade da cinase do MPF oscila ao longo do ciclo mitótico, o que faz com que este factor desempenhe um papel fundamental na regulação do ciclo celular (Gerhart et al. 1984) e na indução da mitose (Newport et al. 1984). As ciclinas são proteínas cuja síntese e degradação é periódica ao longo do ciclo celular. As ciclinas mitóticas são acumuladas até a célula entrar em mitose e têm de ser degradadas para a célula sair da mitose (Evans et al. 1983; Murray et al. 1989a). A síntese das ciclinas G1, durante a fase G1, está dependente da presença de factores de crescimento e exibem oscilações moderadas durante o ciclo celular, embora atinjam níveis máximos na trasição G1/S (Sherr, 1994). Qualquer um destes pontos está sujeito à regulação positiva e negativa de múltiplos factores, tanto de carácter endógeno como exógeno (para a transição G1/S), que condicionam não só o ciclo celular, mas também os processos que lhe estão inerentes como a proliferação celular, o desenvolvimento do cancro e a morte celular (apoptose). As modificações pós-tradução das proteínas que regulam o ciclo celular, assim como muitos dos processos celulares, são essencialmente mediadas por fosforilações e desfosforilações.

- Regulação da transição G1/S

A transição da fase G1 para a fase S requer a passagem de um ponto que determina o início da síntese do ADN e que é designado por START, nos eucariotas unicelulares, e ponto de restrição, nos eucariotas pluricelulares. A expresssão dos genes *cdc* e a síntese de proteínas específicas relacionadas com o ciclo celular, as ciclinas da fase G1 (A, C, D, E e F), vão fazer com que a célula esteja determinada a completar o ciclo celular, depois de ter

passado o ponto de restrição. A passagem por este ponto é condicionada pela actuação conjunta de proteínas activadoras, designadas por cinases dependentes das ciclinas (Cdk - "cyclin-dependent kinases"), cuja actividade depende das cinases activadoras das Cdk (CAK - "Cdk activating kinases), e de proteínas inibidoras das Cdks, as Cki ("Cdk inhibitory protein"), que se ligam ao complexo Cdk-ciclina e inibem a sua actividade. A ausência de nutrientes, nas leveduras, e de factores de crescimento, nas células somáticas, fazem com a célula não seja capaz de ultrapassar este ponto de controlo e passe ao estado estacionário (Zettenberg et al. 1985). A presença de feromonas inibe igualmente a passagem pelo ponto START. O tamanho da célula é também um pré-requisito necessário à passagem do START (Nurse, 1975; Hartwell et al. 1977).

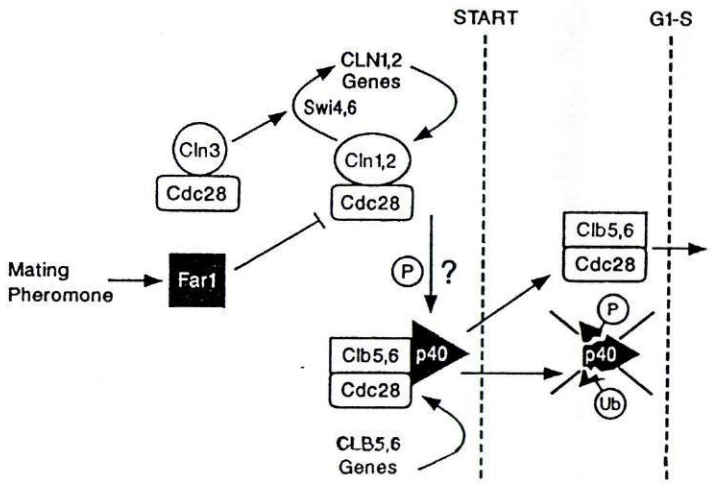


Figura 3 - Reguladores da fase G1 em *S. cerevisiae*. A actividade do complexo Cln3-Cdc28 facilita a activação das cinases Cln1 e Cln2, na fase G1 tardia. A regulação positiva das proteínas Swi4 e Swi6, dependente da activação da cinase Cdc28, é responsável pela activação exponencial da actividade do Cdc28 requerida para a passagem do ponto START. A inactivação da $p40^{sic1}$, inibidor da cinase Cln-Cdc28, pela via da ubiquitina, é um pré-requisito necessário para a activação da Cln-Cdc28 e a entrada na fase S. Está ainda exemplificado a acção das feromonas de acasalamento que induzem a síntese do Far1, um inibidor da cinases dependentes das ciclinas, que pode ser responsável pela paragem do ciclo na fase G1 antes do ponto START (adaptado de Sherr, 1994).

O produto do gene *cdc2* é uma proteína cinase, a $p34^{cdc2}$, com peso molecular de 34 kDa, que faz parte do MPF (Lee et al. 1987). A passagem pelo ponto de restrição está dependente da associação das ciclinas G1 (algumas ciclinas do tipo D) a proteínas cinases, nomeadamente à Cdk4 ou Cdk6 (Serrano et al. 1993; Hunter et al. 1994), e da ciclina A e E, que se combinam com Cdk2 no final da fase G1 (Sherr, 1994). Os complexos Cdk-ciclina

para serem activados requerem a fosforilação por parte da CAK e a presença da ciclina H. A microinjecção de anticorpos anti-ciclina-A atrasa a entrada das células humanas na fase S, por inibição da síntese do ADN (Pagano et al. 1992). Do mesmo modo, a passagem pelo ponto START requer a associação das ciclinas G1 (Cln1, Cln2 e Cln3) ao produto do gene *cdc28*, a p34^{cdc28}, que é um homólogo do *cdc2* (Beach et al. 1982; Richardson et al. 1989). A síntese destas ciclinas sofre a regulação positiva do factor de transcrição constituído pelas proteínas Swi4 e Swi6, cuja actividade depende do estado de fosforilação (Ogas et al. 1991; Sherr, 1994). As cinases das ciclinas G1 são inibidas pelo Far1, uma Cki, cuja síntese é induzida pela acção das feromonas de acasalamento. A presença das ciclinas do tipo B (Clb5 e Clb6), que são sintetizadas tardiamente na fase G1 e degradadas quando a célula termina a mitose e durante a fase G1, constitui um factor determinante para o início da síntese do ADN. A actividade cinásica do complexo Clb-*cdc28* é inibida pela proteína p40^{sic1}, que se acumula no ínicio da fase G1 e é degradada pouco antes da fase S (Fig. 3). A fosforilação da p40^{sic1} pela Cln1, Cln2-*cdc28* vai mediar a degradação desta proteína, pela via da ubiquitina, e possibilitar a entrada na fase S (Sherr, 1994).

Nos mamíferos, a progressão ao longo da fase G1 é facilitada por um conjunto de oncoproteínas, entre elas o antigénio T do vírus SV40, o factor E1A do adenovírus e o factor E7 do papilomavírus. Estes antigénios reconhecem os mesmos locais da ligação das ciclinas D à proteína supressora de tumores, a pRb (Kato et al. 1993), que constitui, juntamente com outras proteínas, um substracto para as Cdks da fase G1. A ligação destes antigénios e das ciclinas D à pRb permite a fosforilação da pRb pelas Cdks, nomeadamente pela Cdk4, altera a estabilidade do compexo pRb-E2F e promove a libertação do factor de transcrição E2F que tem a capacidade de induzir a entrada na fase S (Sherr, 1994). A actividade catalítica dos complexos binários Cdks-Clns está ainda sujeita à regulação negativa de um conjunto de proteínas, as Ckis, das quais a proteína p21^{cip1} tem sido referida como um inibidor universal (Xiong et al. 1993). A expressão genética da p21^{cip1} é regulada pela proteína supressora de tumores, a p53, embora haja outros factores de transcrição que regulem a sua expressão. A expressão da p53 impede a fosforilação da pRb e a libertação do E2F, o que se traduz numa inibição indirecta na actividade Cdk. A inactivação da p53 e da pRb anula este ponto de controlo e acelera a tumorogénese. A inibição ou activação dos complexos Cdks-Clns depende do número de subunidades da p21^{cip1} que estão associados aos mesmos (Xiong et al. 1993). Normalmente a p21^{cip1} é encontrada na forma de um complexo quaternário que inclui uma ciclina, uma Cdk e o PCNA (Xiong et al. 1993). O PCNA actua na replicação e reparação do ADN, como subunidade da DNA polimerase δ. Assim, a p21^{cip1} comporta-se como um mediador do ponto de controlo da transição G1/S. A p27^{kip1} é outro regulador negativo da actividade

das Cdks, cuja actividade também depende do número de subunidades associadas a estes complexos. A p27^{kip1} é sintetizada no estado estacionário e a sua concentração decresce à medida que a célula caminha para a fase S, por acção do complexo ClnD-Cdk (Polyak et al. 1994). Os inibidores específicos das Cdk4 constituem uma família de proteínas de 15-20 kDa (Fig. 4). O aumento da expressão da proteína p15^{ink4a}, induzido pela presença do TGFβ ("transforming growth factor β"), factor que pára as células em G1 (Polyak et al. 1994; Sherr, 1994) e da proteína p16^{ink4b}, produto do gene supressor de tumores *MTS1* (Peter et al. 1994), conduzem à perda de actividade da Cdk4. A proteína p16^{ink4b} parece ser um inibidor selectivo das cinases Cdk4 e Cdk6 activadas pelas ciclinas do tipo D.

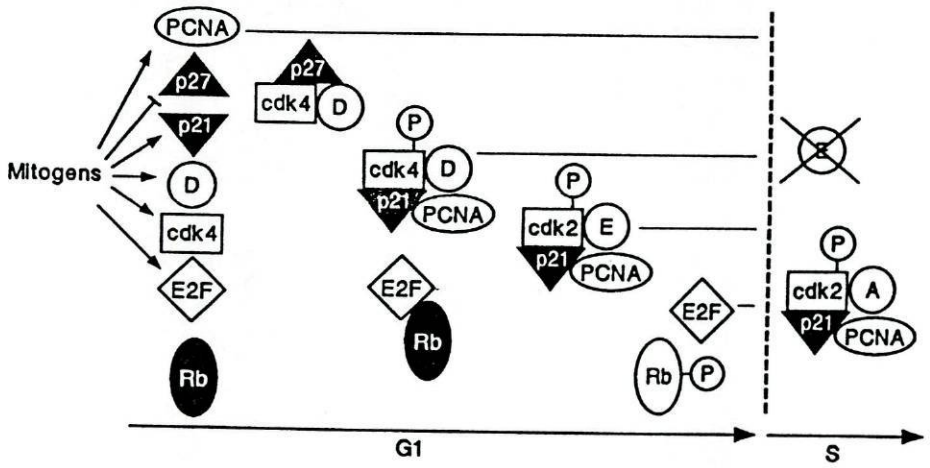


Figura 4 - Reguladores da fase G1 nos mamíferos. Nas células que saem do estado estacionário e entram no ciclo celular, por acção de mitogénios, verifica-se uma estimulação da expressão das Cln do tipo D, das Cdk4 e Cdk6, da p21^{cip1}, do E2F e do PCNA, uma diminuição dos níveis de p27^{kip1} e a pRb ainda se encontra na forma não fosforilada (inactiva). A concentração da p27 diminui por acção complexo ClnD-Cdk4, o que permite a associação deste complexo à p21 e ao PCNA. A fosforilação deste complexo pela CAK ocorre quando a concentração da p21 atinge um determinado limiar. Durante a fase G1 o factor de transcrição E2F complexa-se com a pRb inactivado. Numa fase mais tardia da fase G1, a ClnE forma o complexo quaternário do Cdk2-p21-PCNA-ClnE. A activação das Cdks da fase G1 permite a fosforilação da pRb e libertação desta proteína do E2F. Quando a célula entra na fase S, a ClnE é degradada e a ClnA passa a estar associada ao complexo Cdk2-p21-PCNA (adaptado de Sherr, 1994).

- Regulação na transição G2/M

A transição G2/M é determinada pela presença de um regulador mitótico que é constituído pela proteína p34^{cdc2}, com actividade cinásica, e pela presença das ciclinas mitóticas A e B (Booher et al. 1987a, b; Draetta et al. 1988a; Draeta et al. 1989; Gautier et al. 1990). A microinjecção de anticorpos anti-ciclina A em células que já replicaram o ADN bloqueia as células em G2 e parece ser essencial para a activação do complexo ciclina B-p34^{cdc2} (Pagano et al. 1992). O conjunto das proteínas p34^{cdc2} e ciclina B constitui o MPF, cuja actividade oscila no decorrer do ciclo celular. Como a quantidade da p34^{cdc2} se mantém constante durante o ciclo celular, a activação e inactivação do MPF reflecte a acumulação e destruição periódica das ciclinas (Fig. 5). A destruição do mARN de ciclina B promove a paragem do ciclo celular na interfase, o que demonstra que a síntese da ciclina B é um pré-requisito essencial para a célula entrar em mitose (Minshull et al. 1989a).

Em todas as células, a ciclina B tem de se acumular até um determinado limiar (Murray et al. 1989b), que é definido como o ponto a partir do qual a síntese de mais proteína não é necessária, ao qual se segue um período em todos os componentes do MPF estão presentes, mas em que o MPF permanece inactivo (Karsenti et al. 1987). Este facto demonstra que a activação do MPF está dependente da existência de reguladores positivos e negativos (Draetta et al. 1988b). O controlo da actividade do MPF depende do estado de fosforilação, nomeadamente na tirosina 15 da p34^{cdc2}, que é a subunidade catalítica (Gould et al. 1989; Morla et al. 1989). Na forma inactiva a p34^{cdc2} está fosforilada nos resíduos Thr-14 (mamíferos) e Tyr-15, constituindo o complexo pré-MPF. A fosforilação do resíduo 15 é catalizada pelas cinases codificadas pelos genes *mik1* ("mitotic inhibitory kinase") e *wee1* (Russel et al. 1987a, b). O gene *wee1* sofre uma regulação negativa por parte do gene *nim1+*, que tal como o *cdc25* é um indutor da mitose (Russel et al. 1986; Russel et al. 1987b). A fosforilação do resíduo de Thr-161 é feita pela cinase activadora da Cdc2 (CAK - "Cdc2-activating kinase"), cuja subunidade catalítica Cdk7 tem homologia com o *cdc2*, e requer a presença da ciclina H (King et al. 1994). A activação do MPF é feita após a desfosforilação dos resíduos Thr-14 e Tyr-15 catalizada por uma tirosina fosfatase, produto do gene *cdc25* (Russel et al. 1986; Izumi et al. 1992) (Fig. 6). A activação da Cdc25 depende da acção de outras cinases. O MPF tem a capacidade de fosforilar e activar a Cdc25 *in vitro* (Izumi et al. 1992). A Cdc25 pode ser fosforilada pela cinase do MPM-2 (Kuang et al. 1994) que por sua vez pode ser fosforilada pela cinase MAP ("mitogen activated kinase"). A activação das cinases MAP e MPM-2 também parece depender da regulação positiva da actividade da cinase do Cdc2 (King et al. 1994; Kuang et al. 1994). A maioria dos antigénios reconhecidos pelo anticorpo monoclonal MPM-2 correspondem

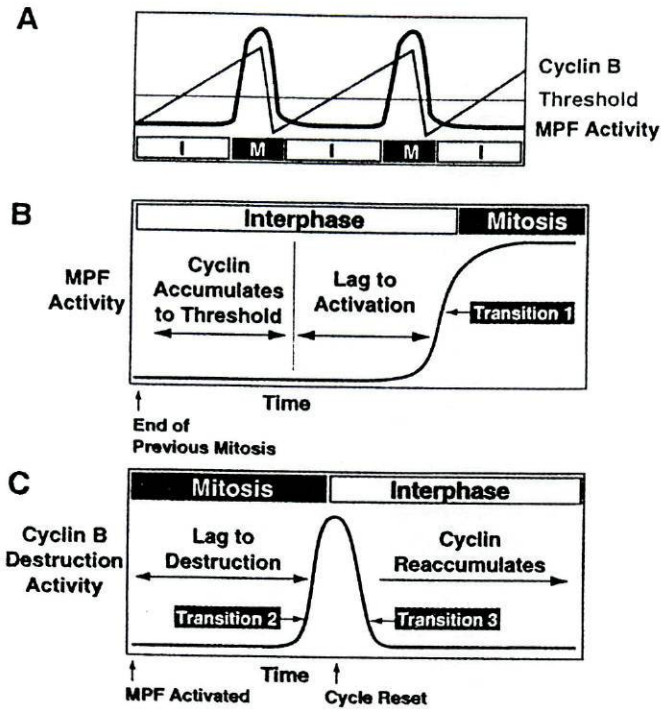


Figura 5 - Transições no ciclo mitótico. (A) - O nível de ciclina B oscila durante o ciclo celular e permite a repetida activação do MPF e da mitose. O limiar representa ("threshold") o nível de acumulação da Cln que permite a activação do MPF. O (I) refere-se a interfase e o (M) a mitose. (B) - A primeira transição da mitose envolve a activação do MPF, caraterizada por um período de retardação que está dividido em duas fases. O primeiro requer a acumulação da ciclina até um determinado limiar. O segundo corresponde à reunião de todos os componentes que promovem a activação do MPF. (C) - A segunda e a terceira transições da mitose regulam a estabilidade da ciclina B. Na segunda transição,a activação da degradação da ciclina, segue-se ao período de activação do MPF, permitindo que os acontecimentos iniciais da mitose se processem. Na terceira transição, a inactivação do sistema de degradação da ciclina ocorre em resposta a controlos externos do ciclo mitótico e induz a célula para um novo ciclo celular, permitindo a acumulação de Cln (adaptado de King et al. 1994).

a fosfoproteínas mitóticas, que apesar de existirem durante a interfase só são reconhecidos pelo MPM-2 durante a indução da fase M, ou seja depois de serem fosforilados (Davis et al. 1983). A detecção, em diferentes espécies, de antigénios específicos da mitose pelo MPM-2 sugere que este anticorpo reconhece um epítopo altamente conservado que é compartilhado por estas fosfoproteína mitóticas (Kuang et al. 1994). A desfosforilação dos epítopos reconhecidos pelo MPM-2 ocorre no início da anafase, em paralelo com a inactivação do

MPF (Davis et al. 1983; Vandre et al. 1989). Para além da Cdc25, as fosfoproteínas mitóticas MAP4 (proteína maioritária associada aos microtúbulos de células não neuronais) e topoisomerase II (proteína nuclear do "scaffold") também são reconhecidas pelo MPM2 (Vandre et al. 1991; Taagepera et al. 1993). A concentração da proteína Cdc25, em *Schizosaccharomyces pombe*, tem uma cinética semelhante à da ciclina, pois aumenta durante a interfase e decresce na mitose (Murray et al 1993). A inactivação do *cdc25* pode ser feita pelas proteínas fosfatase 1 (PP1) e 2A (PP2A) que modificam o seu estado de fosforilação e consequentemente a sua actividade (Izumi et al. 1992; Clarke et al. 1993). O MPF activado vai promover alterações na estrutura e na função da célula através da fosforilação de vários substratos entre eles as histonas (Wittenberg et al. 1988), as laminas nucleares (Heald et al. 1990; Peter et al. 1990b) com a consequente dissolução do invólucro nuclear (Miake-Lye et al. 1983; Labbe et al. 1989b), as proteínas associadas aos microtúbulos, filamentos intermediários e proteínas nucleolares (Peter et al. 1990a).

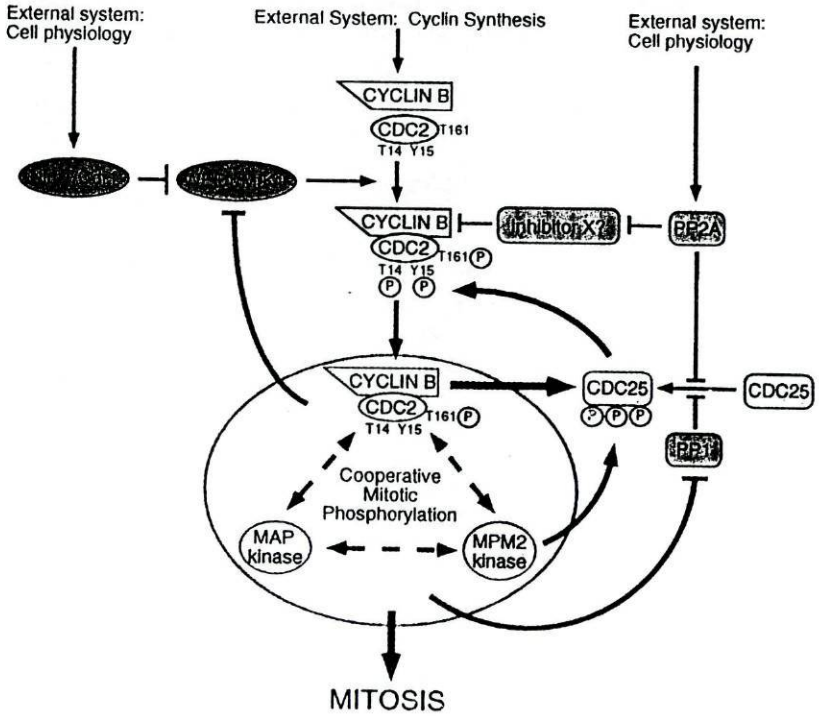


Figura 6 - Activação do MPF e a fosforilação cooperativa da mitose. A ClnB associa-se ao *cdc2* não fosforilado, que passa a estar activo depois da fosforilação do resíduo Thr-161. Na interfase, a activação do MPF é inibida pelo *wee1*, através da fosforilação da Tyr-15. A fosfatase Cdc25 desfosforila a Tyr-15 do complexo *cdc2*-ClnB, activando-o. A forma activa do complexo *cdc2*-ClnB promove a fosforilação de várias cinases mitóticas, entre elas a MAP e a MPM-2. O Cdc25 é activado quando fosforilado pela cinase do MPM-2 e provavelmente pela cinase do Cdc2, promovendo a desfosforilação da tirosina e a activação do MPF. Durante a mitose há inibição dos reguladores negativos da progressão mitótica: o *wee1* é inibido por fosforilação mitótica, o que se traduz numa diminuição do efeito inibitório causado pela fosforilação da Tyr-15 do *cdc2*; as fosfatases PP1 e PP2A também são inibidas, removendo-se os potencial bloqueadores da activação do Cdc25. Os controlos externos que afectam esta estrutura mitótica incluem a síntese de ciclinas e o control de alguns reguladores como o *nim1* ou a fosfatase PP2A (adaptado de King et al. 1994).

Depois do alinhamento dos cromossomas na placa metafásica, a actividade da cinase do *cdc2* acima de um determinado limiar conduz à degradação das ciclinas e à inibição da própria actividade do MPF promovendo o início da anafase. A adição da cinase ciclina B-*cdc2* purificada a extractos de ovos de *Xenopus* activa a degradação das ciclinas (Félix et al. 1990). Contudo, a degradação das ciclinas é mediada pela presença de uma sequência específica de nove aminoácidos no seu terminal amino designada por sequência de destruição mitótica ("destruction box") (Murray et al. 1989a; Glotzer et al. 1991). O MPF regula a conjugação da ubiquitina às ciclinas que depois são rapidamente destruidas através do sistema proteolítico dependente da ubiquitina (Glotzer et al. 1991). A existência de mutantes de ciclina A e B não degradáveis mostrou que a actividade cinásica da Cdc2 se mantém, o que sugere que a degradação das ciclinas é um processo necessário à inactivação do MPF (Murray et al. 1989a; Lorca et al. 1992; King et al. 1994). A degradação da ciclina A na anafase ocorre antes da ciclina B e a adição de ciclina A a extractos de *Xenopus* não tem a capacidade de activar a degradação das ciclinas A e B, enquanto que a adição de ciclina B promove a degração destas duas ciclinas (Lorca et al. 1992). Nas leveduras, o sistema de proteólise das ciclinas B é inactivado após a expressão das ciclinas G1, ou seja as ciclinas B são degradadas no final da mitose e durante a fase G1, o que garante que a síntese das ciclinas G1 ocorre antes da síntese das ciclinas B (Amon et al. 1994; King et al. 1994). A capacidade de determinados mutantes de *S. cerevisiae* completarem a anafase sem que o MPF esteja inactivado sugere que a destruição das ciclinas é um processo que vai mediar a anafase e a separação dos cromatídeos irmãos (Holloway et al. 1993), enquanto que a inactivação do MPF será necessária para que a célula complete a citocinese (Murray et al. 1993; King et al. 1994). A formação do anel contráctil parece estar dependente da inactivação do MPF. Apesar dos microtúbulos polares serem necessários à síntese do anel contráctil, a onda de contracções requerida para a formação do mesmo, depende da activação dos dispositivos celulares de contracção que são bloqueados quando a inactivação do MPF é induzida pela presença de ciclinas não degradáveis (Murray et al. 1993). Foi demonstrado *in vitro* que o MPF purificado tem a capacidade de fosforilar a cadeia leve da miosina nos locais de interacção com a actina (Satterwhite et al. 1992). A fosforilação destes locais impede a ligação da miosina à actina e a hidrólise de ATP, o que sugere que a citocinese é inibida até que o MPF seja inactivado (Satterwhite et al. 1992; Holloway et al. 1993; Murray et al. 1993). Deste modo, a separação dos cromatídeos irmãos será condicionada pela activação do sistema de degradação das ciclinas, mas a citocinese só se iniciará depois da inactivação do MPF e das fosforilações induzidas pelo MPF terem sido revertidas (Murray et al. 1993).

Em termos de ciclo celular, as ciclinas B estão envolvidas em três transições

importantes. A primeira transição envolve a passagem da interfase para a profase e requer a acumulação das ciclinas B até um determinado limiar por forma a activarem o MPF que por sua vez vai catalizar a fosforilação de muitos componentes celulares. Na transição da metafase para a anafase, o MPF activa o sistema proteolítico dependente da ubiquitina que promove a destruição das ciclinas B, com a consequente separação dos cromatídeos irmãos e o início da anafase. Na terceira transição, que requer a passagem do ponto START, o sistema de degradação das ciclinas B é inactivado, depois da síntese das ciclinas G1, e a célula está novamente determinada a duplicar o DNA e a iniciar outra mitose. Esta transição, contrariamente às outras duas, está dependente de sinais externos.

Ciclo celular e transformação celular

A identificação e estudo das funções exercidas pelas ciclinas e pelos reguladores positivos e negativos que condicionam as várias fases do ciclo celular têm permitido verificar que muitas destas proteínas estão directamente associadas à oncogénese. A desregulação de pontos de controlo do ciclo celular nas células tumorais parece ser o reflexo da expressão anormal de reguladores positivos, como as ciclinas, ou de reguladores negativos, como os Ckis (Fig. 7).

Para referir a relação entre o ciclo celular e a transformação celular citam-se alguns exemplos. As ciclinas D parecem actuar como sensores da proliferação e como tal, a desregulação da sua síntese pode tornar a progressão do ciclo celular menos dependente de factores de crescimento, favorecendo a transformação celular (Sherr, 1994). Além disso, estas ciclinas são expressas em maior quantidade nas células tumorais. O complexo ciclinaD1-Cdk4 tem a capacidade de fosforilar a proteína supressora de tumores pRb, permitindo a libertação do E2F, um factor de transcrição dos genes envolvidos na síntese do ADN, e a consequente entrada na fase S e replicação do ADN (Kato et al. 1993; Hunter et al. 1994). A expressão ectópica de ciclina D1 promove a fosforilação precoce da pRb e acelera a progressão na fase G1. Contudo, tanto a ciclina D1 como a pRb cooperam com alguns proto-oncogenes regulando a proliferação e a diferenciação celular (Hunter et al. 1994).

Os inibidores das Cdks têm sido apontados como potenciais proteínas supressoras de tumores. A $p16^{ink4}$ tem a capacidade de inibir a Cdk4 por competição com a ciclina D. O nível da $p16^{ink4}$ está elevado quando as células não possuem a pRb funcional (Serrano et

al. 1993; Hunter et al. 1994). O aumento da expressão da proteína p15^{ink4a}, induzido pela presença do TGFβ, em conjunto com a p27^{kipl}, é responsável pela manutenção da célula na fase G1. A p21^{cipl} liga-se a alguns complexos Cdk-ciclina que estão envolvidos na regulação da fase G1 e S (Peter et al. 1994). Na fase G1, os complexos quaternários ciclina/Cdk/PCNA/p21^{cipl} facilitam a transição G1/S (Sherr, 1994). Na fase S e quando o ADN está danificado, a p21^{cipl} tem a capacidade de se ligar e inactivar o PCNA, que é uma subunidade da ADN polimerase δ, o que sugere uma dupla função para esta proteína (Heichman et al. 1994; Hunter et al. 1994). Na presença de genes não funcionais da p53 e quando o ADN está danificado, a indução da expressão da p21^{cipl} é feita em níveis muito menores o que pode contribuir para o aumento das anomalias cromossómicas e para a instabilidade das células transformadas (Hunter et al. 1994). A ausência da pRb faz com que algumas células não consigam sair do ciclo celular e terminar a diferenciação, mas a presença da p53 ajuda a eliminar estas células por apoptose (Hunter et al. 1994).

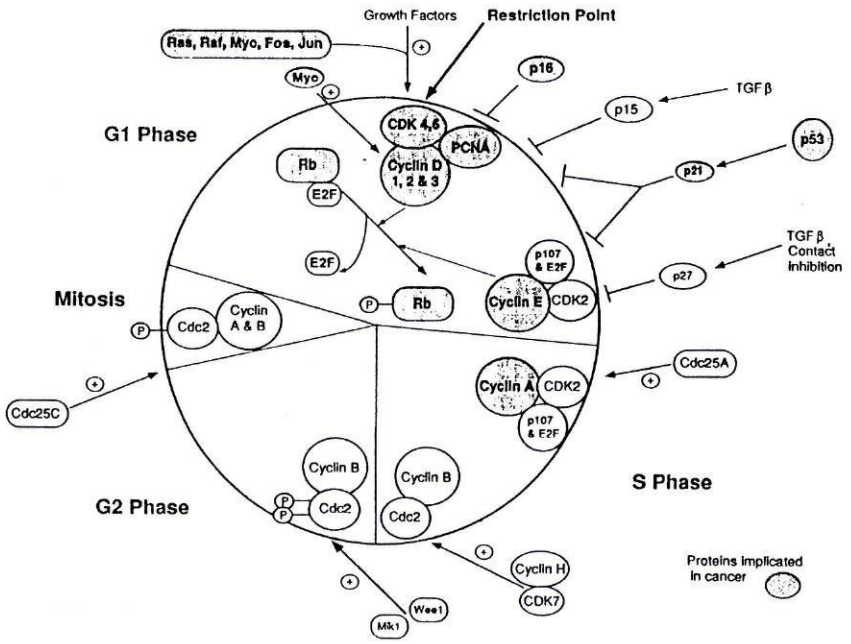


Figura 7 - Reguladores do ciclo celular implicados no cancro. No esquema estão representados os locais de acção dos complexos Cln-Cdk dos mamíferos no ciclo celular. A sombreado estão os componentes implicados no cancro, resultantes de mutações ou da expressão exagerada, como acontece com a p53 e com a ciclina D, ou através da sua ausência em tumores ou em células transformadas, como sucede com a p16 e com a p21 (adaptado de Hunter et al. 1994).

As ciclinas A e E são necessárias para o início da replicação do ADN. Estas ciclinas complexam-se com outras duas proteínas, a p107 (proteína relacionada com a pRb) e o E2F (factor de transcrição), e este complexo é alvo de determinados antigénios víricos, que o podem quebrar e por isso estimular os genes da fase S (Kato et al. 1993; Schwarz et al. 1993; Hunter et al. 1994). A expressão exagerada de ciclina E acelera ligeiramente a entrada na fase S, apesar desta proteína ser expressa em grandes quantidades em muitos tumores humanos. A ciclina A, necessária à progressão G1/S e G2/M, parece estar ligada à apoptose, na medida em que a actividade da cinase dependente da ciclina A está aumentada nas células apoptóticas (Hunter et al. 1994). As células tumorais que entram na fase S com o ADN danificado ou não totalmente replicado, por activação do complexo *cdc2*-ciclina B, apontam para a presença de um defeito na regulação da fosforilação da Tyr-15/Thr-14, ou na fosfatase codificada pelo *cdc25* ou nas cinases codificadas pelo *wee1/mik1*.

Alguns proto-oncogenes (*ras*, *raf*, *myc*, *fos*, *jun*, *alb*, *scr*) estão, de diversas formas, relacionados com o ciclo celular: síntese de ciclinas; activação de cinases; substratos de fosforilação do complexo *cdc2*-ClnB; factores de transcrição e proteínas supressoras de tumores associadas ao ciclo celular. Além disso, a indução da expressão de determinados proto-oncogenes parece ser mediada por algumas ciclinas (Heichman et al. 1994; Hunter et al. 1994; Sherr, 1994; Peter et al. 1994). Por outro lado, algumas ciclinas têm sido identificadas como proto-oncogenes. A ciclina D1 foi identificada como o proto-oncogene *PRAD1* (Motokura et al. 1991). Esta ciclina é expressa em exagero em certos adenomas da paratiróide sem contudo provocar lesões proliferativas, uma vez que estes tumores são benignos e não invasivos (Motokura et al. 1991). A expressão da ciclina D1 em determinados tumores das células B caracterizados por rearranjos no gene *bcl1*, coloca o *PRAD1* como possível candidato ao oncogene *bcl1* (Motokura et al. 1991; Hunter et al. 1994). A localização dos genes que codificam para as ciclinas D2 e D3, em locais de rearranjo cromossómico associados a desordens linfoproliferativas, sugerem que os mesmos possam vir a ser identificados como proto-oncogenes (Hunter et al. 1994).

OBJECTIVOS

Em definitivo, os autoanticorpos que caracterizam os diferentes síndromes autoimunes têm contribuído para a identificação de proteínas e moléculas que desempenham funções essenciais a nível de muitos processos celulares. Além disso, os perfis de autoanticorpos que se podem encontrar nas várias doenças autoimunes têm permitido aos clínicos a sua utilização como método de diagnóstico. Os temas desenvolvidos nesta introdução teórica procuraram fornecer uma informação sobre o conhecimento actual dos aspectos que parecem estar implicados na etiologia do lupus, dos autoanticorpos produzidos, dos autoantigénios caracterizados e das funções que os mesmos exercem.

No lupus, os autoanticorpos patogénicos são dirigidos para mais de uma espécie molecular e esta característica possibilita a análise desta doença em diversas áreas que incluem por exemplo a imunologia, a genética, a biologia celular e molecular. O desenvolvimento espontâneo do lupus em ratinhos tem permitido a utilização destes animais como modelos biológicos para a análise dos factores que parecem estar associados a esta doença. O aperfeiçoamento crescente de técnicas bioquímicas, imunológicas e de ADN recombinante tem permitido um avanço primordial na identificação de antigénios, anticorpos e genes que se revelam fundamentais para o esclarecimento de processos fisiológicos e patogénicos.

A multireactividade exibida pelos autoanticorpos presentes nas doenças autoimunes e particularmente no lupus tem servido de ponto de partida para o estudo destas doenças sob diferentes pontos de vista. Embora os autoanticorpos presentes no soro de doentes e de ratinhos com lupus reconheçam preferencialmente moléculas de ADN, a sua reactividade com outros componentes celulares já foi evidenciada. No estudo preliminar efectuado com um conjunto de anticorpos monoclonais produzidos por ratinhos portadores de lupus eritematoso sistémico verificou-se que os mesmos, para além do ADN, reconheciam outros antigénios intranucleares com uma distribuição particular nas células em interfase e em mitose. Esta constatação determinou o objecto deste estudo.

Concretamente pretende-se caracterizar um conjunto de anticorpos monoclonais produzidos por ratinhos portadores de lupus, por imunofluorescência em células humanas (HEp-2), de forma a determinar a sua especificidade relativamente a antigénios que possam estar associados à condensação da cromatina e às modificações e movimentos dos cromossomas durante a mitose. Para além dos anticorpos existentes, proceder-se-á à preparação de novos hibridomas que serão rastreados e caracterizados por ELISA, usando

preparações de ADN e de extractos proteicos (nucleares e citoplasmáticos), e por imunofluorescência, com células HEp-2 nas diferentes fases do ciclo celular.

Os autoanticorpos que eventualmente possam reagir com nucleoproteínas associadas à mitose serão usados nos ensaios de "immunoblotting" e imunoprecipitação usando extractos totais de células HEp-2. Uma vez que a fosforilação e a desfosforilação constitui um processo de modificação de pós-tradução que está ligado a muitos dos componentes que regulam o ciclo celular, procurar-se-á determinar se os polipeptídeos detectados por estes mAbs contêm ou não epítopos fosforilados. Os resultados obtidos nestes ensaios determinaram a escolha dos autoanticorpos que serão usados como sondas para o rastreio de bibliotecas de expressão de cADNs humanas para se fazer o isolamento de genes que codificam para os antigénios que estes reconhecem.

Nos genes isolados proceder-se-á à determinação do mapa de restrição, da sequência de nucleótidos, das regiões codificantes à detecção de homologias por comparação com as sequências já existentes no banco de dados. Os cADNs isolados serão subclonados em vectores de expressão em *E. coli* para a produção de proteínas de fusão. A confirmação da identidade das sequências codificantes será feita com a produção de anticorpos policlonais em coelhos que serão analisados por imunofluorescência e "immunoblotting" contra os antigénios originais. As proteínas codificadas por estes genes serão testadas por "immunoblotting" com soros humanos de doentes com lupus para posterior avaliação da relação destes autoantigénios com a caracterização de certas formas de lupus ou com o desenvolvimento desta doença.

PARTE EXPERIMENTAL

I - PREPARAÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS

INTRODUÇÃO

Nos animais, os anticorpos são sintetizados primáriamente pelas células terminais do processo de diferenciação dos linfócitos B e que se formam após a estimulação antigénica. Estas células não podem ser utilizadas como fonte de anticorpos *in vitro* uma vez que são incapazes de crescerem em culturas celulares. Köhler e Milstein em 1975 (Harlow et al. 1988) desenvolveram uma técnica que possibilitou o crescimento das populações de células produtoras anticorpos de especificidade definida, através da fusão das mesmas com um tipo de células B tumorais, as células de mieloma. Estas células híbridas ou hibridomas podem ser mantidas *in vitro* e produzem anticorpos de especificidade definida que são designados por anticorpos monoclonais. As células de mieloma fornecem os genes necessários para a divisão celular *in vitro*, ou seja conferem a imortalidade aos hibridomas, e as células secretoras de anticorpos fornecem os genes funcionais das imunoglobulinas.

Os anticorpos monoclonais, como produto de clones individualizados, apresentam a vantagem, em relação aos anticorpos policlonais, do reconhecimento de um epítopo específico. A produção de anticorpos monoclonais (mAbs) permite que cada linha celular obtida produza, continuamente, anticorpos homogéneos e específicos. Contudo, esta produção está condicionada pela eficácia de uma fusão e esta depende da célula de mieloma utilizada. As células de mieloma selecionadas devem possuir um conjunto de propriedades que viabilizem o crescimento das células híbridas. Primeiro, devem permitir a expressão dos genes das imunoglobulinas e/ou secreção de imunoglobulinas. Segundo, não devem produzir as suas próprias cadeias imunoglobulínicas, devendo permitir a expressão dos genes das imunoglobulinas no genoma complementar dos hibridomas. Terceiro, as células de mieloma devem ser susceptíveis às condições selectivas de crescimento escolhidas para um determinado meio de cultura (Lake et al. 1987).

Nas fusões que se efectuaram, a produção dos anticorpos monoclonais (mAbs) foi feita a partir de híbridos gerados entre as células de baço de ratinhos MRL/Mp-*lpr/lpr* e as células de mieloma SP2/O-Ag14, geralmente designado por SP2/O. A linha celular SP2/O é uma variante da P3/X63-Ag8, que tem a vantagem de não sintetizar nem secretar imunoglobulinas mantendo, contudo, a capacidade de produção de imunoglobulinas por parte dos híbridos gerados (Shulman et al. 1978).

O isolamento e crescimento dos hibridomas foi feito em meio contendo agentes de seleção específicos (hipoxantina, timidina e aminopterina), que interferem nas vias de síntese dos ácidos nucleicos e que possibilitam a eliminação das células tumorais que

formaram híbridos entre si e as que não formaram híbridos. Geralmente, a síntese dos nucleótidos necessários à formação de ADN ocorre pela *via de novo*, a partir do carbono e do azoto, embora também se possa processar através das purinas e pirimidinas existentes. Nesta via, as purinas e timidilato requerem a transferência de um grupo formil ou metil a partir de uma das formas activadas do tetrahidrofolato (por exemplo, N^5-N^{10}-metileno terahidrofolato). Na presença de inibidores, como a aminopterina ou o metotrexato (substâncias análogas ao ácido fólico), que bloqueiam a redutase do ácido fólico e interferem com a transferência dos grupos metil e formil, as células utilizam uma via alternativa para a síntese de nucleótidos, a *via de salvamento*. Esta via requer a presença de três enzimas: a cinase da timidina (TK-"thymidine kinase"), a adenina fosforibosil transferase (APRT) e a hipoxantina-guaninafosforibosil transferase (HGPRT). Neste processo alternativo, a enzima HGPRT é responsável pela incorporação de nucleótidos de origem endógena e/ou exógena. A presença ou ausência desta enzima permite classificar as células, respectivamente, de $HGPRT^+$ e $HGPRT^-$. Na presença de aminopterina, as células $HGPRT^+$ sintetizam os nucleótidos através da *via de salvamento*. Nas mesmas condições, as células $HGPRT^-$ revelam-se incapazes de sintetizarem o ADN e não sobrevivem. A maioria das células de mieloma não possuem a enzima HGPRT e, por isso, após o processo de fusão são eliminadas, uma vez que são incapazes de se desenvolverem na presença de aminopterina, timidina e hipoxantina, agentes selecção do meio de cultura. As etapas mais importantes da *via de novo* e da *via de salvamento* são apresentadas no quadro 1.

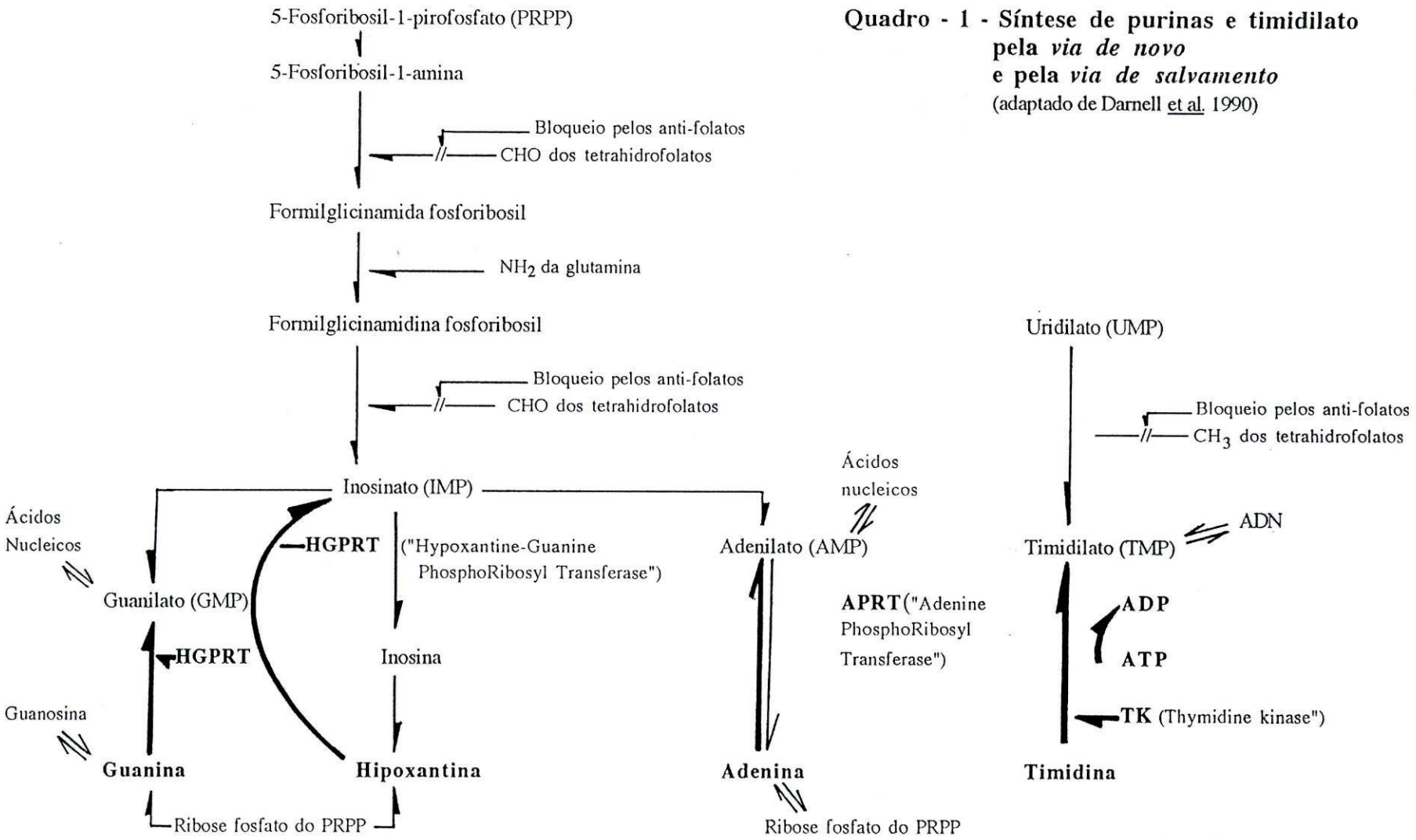
Para assegurar o crescimento eficiente dos hibridomas, resultantes de uma fusão recente na qual o número de clones exibe uma densidade celular muito baixa, as culturas são suplementadas com "feeder cells". O seu uso baseia-se no facto de não se dividirem e fornecerem determinados factores de crescimento essenciais para o desenvolvimento dos hibridomas. As "feeder cells" mais utilizadas são células do baço, timócitos, células do exsudado peritonial, eritrócitos e fibroblastos após serem irradiados (Lake et al. 1987). As células de exsudado peritonial e de baço apresentam ainda a vantagem de eliminarem, por fagocitose, os detritos celulares do meio de cultura aumentando a capacidade de sobrevivência dos clones. Os hibridomas gerados crescem no meio selectivo utilizado, uma vez que são células $HGPRT^+$, característica fornecida pelas células linfóides de ratinho com LES. Por outro lado, a imortalidade conferida pelas células SP2/O, permite a produção contínua de anticorpos.

O rastreio dos hibridomas constitui uma etapa essencial, não só pela possibilidade de detecção dos híbridos secretores de imunoglobulinas, como pelo isolamento do anticorpo pretendido com base na sua especificidade, afinidade e classe imunoglobulínica. O rastreio pode ser feito por técnicas de ELISA, de fixação do complemento, de radioimunoensaio, de

hemaglutinação, de imunofluorescência ou de precipitação em geles.

Nesta parte do trabalho são apresentadas as técnicas executadas para a obtenção de hibridomas, assim como os resultados das diferentes fusões. Os anticorpos monoclonais produzidos foram isolados e selecionados com base na reactividade apresentada com diferentes preparações antigénicas, por ELISA. Adicionalmente, os clones obtidos foram testados quanto à capacidade de reconhecimento de antigénios intra e extra-celulares de células HEp-2, por imunofluorescência, e de antigénios existentes nas preparações de extractos proteicos totais de células HEp-2, por "immunoblotting".

• **Síntese de purinas e timidilato pela *via de novo*** •



Quadro - 1 - Síntese de purinas e timidilato pela *via de novo* e pela *via de salvamento*
(adaptado de Darnell et al. 1990)

• **Síntese de purinas e timidilato pela *via de salvamento*** • (assinalado a "bold")

MATERIAL BIOLÓGICO

Animais

Ratinhos da espécie MRL/Mp-*lpr/lpr* (MRL/*lpr*) - a partir das células do baço não estimuladas procedeu-se à preparação de anticorpos monoclonais, por fusão com as células de mieloma SP2/O.

Células

Células SP2/O - As células SP2/O-Ag14 resultaram da fusão de uma célula linfóide Sp2/HL-Ag (derivada do híbrido Sp2/HLGK proveniente de células de baço de ratinho BALB/c secretoras de anticorpos anti-eritrócitos de carneiro) com uma célula de P3/X63-Ag8 (Shulman et al. 1978). Estas células de mieloma foram cultivadas em RPMI contendo 15% FCS, 2 mM glutamina, 100 U/ml penicilina e 100 µg/ml estreptomicina, à temperatura de 37°C e numa atmosfera contendo 7% de CO_2.

"Feeder cells" - As células de baço de ratinho da espécie Balb/c foram adicionadas ao meio de cultura dos hibridomas: RPMI contendo 15% de FCS, HTA (1 x 10^{-4} M Hipoxantina, 1,6 x 10^{-5} M Timidina, 4 x 10^{-7} M Aminopterina), 2 mM glutamina, 100 U/ml penicilina e 100 µg/ml estreptomicina.

Linfócitos híbridos - As células resultantes da fusão das células de mieloma (SP2/O) com as células do baço de ratinho, portadores de lupus eritematoso sistémico, foram mantidas no meio de cultura de RPMI contendo 15% de FCS, HTA (1 x 10^{-4} M Hipoxantina, 1,6 x 10^{-5} M Timidina, 4 x 10^{-7} M Aminopterina), 2 mM glutamina, 100 U/ml penicilina e 100 µg/ml estreptomicina. Depois do isolamento de clones e para o crescimento dos mesmos, o meio de cultura passou a ser constituído por RPMI contendo 10% de FCS, 2 mM glutamina, 100 U/ml penicilina e 100 mg/ml estreptomicina.

Células HEp-2 - São células epiteliais humanas de carcinoma da laringe. Foram cultivadas em meio Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) suplementado com 10% de FCS, 2 mM glutamina, 100 U/ml penicilina e 100 µg/ml estreptomicina, à temperatura de 37°C e numa atmosfera contendo 7% de CO_2.

MÉTODOS

Fusão das células de mieloma (SP2/O) com células de baço de ratinho - A fusão foi efectuada segundo o método descrito por Lake et al. 1987. O baço de ratinhos da espécie MRL/Mp-*lpr/lpr*, foi removido, colocado em 10 ml de RPMI, cortado em

pequenas fracções e passado por um crivo. Removeram-se e colocaram-se as células em 30 ml de RPMI, na estufa a 37°C, contendo 7% de CO_2 durante 4 hs, para a fixação dos fibroblastos. Depois de separar as células dos fibroblastos, transferiram-se as células do baço para um novo tubo com a ajuda de uma pipeta Pasteur, centrifugaram-se e lavaram-se 2 vezes com RPMI, durante 5 min a 1200 r.p.m.. O sedimento foi ressuspenso em 20 ml de RPMI. A contagem e determinação de viabilidade celular foi efectuada com 0,2% azul de Tripano, em câmara de Newbauer. Misturaram-se as células de ratinho com as células de mieloma (SP2/O) numa proporção de 5:1 (10^8 células baço: 2 x 10^7 células SP2/O). Centrifugou-se durante 5 min a 240 g, à temperatura ambiente. Rejeitou-se o sobrenadante e efectuou-se a fusão, adicionando gota a gota 1 ml de RPMI contendo 1g de PEG 1500 (BDH), durante 1 min e agitando sempre. A diluição foi feita com 1 ml de RPMI adicionado gota a gota durante 1 min e agitando sempre, seguida da adição de 8 ml de RPMI durante 5 min, também gota a gota. Depois da centrifugação por 5 min a 240 g, para a remoção do PEG, o sedimento foi ressuspenso em 600 ml de RPMI contendo 15% de FCS, HTA (1 x 10^{-4} M Hipoxantina, 1,6 x 10^{-5} M Timidina, 4 x 10^{-7} M Aminopterina), 2 mM glutamina, 100 U/ml penicilina e 100 µg/ml estreptomicina e "feeder cells" (células de baço de ratinho Balb/c). Dividiu-se a suspensão celular em placas de 24 poços, colocando 1 ml por poço. Incubou-se na estufa a 37°C, contendo 7% de CO_2 até crescimento macroscópico visível (7 a 11 dias). Nesta fase, procedeu-se ao rastreio para testar a produção de anticorpos.

1º Rastreio - A capacidade de um determinado hibridoma secretar imunoglobulinas pode ser testada 7-11 dias após a fusão, ou seja, após o aparecimento vísivel de clones. A técnica de ELISA, foi o método utilizado para o 1º rastreio dos hibridomas.

1ª Clonagem - Para a clonagem dos hibridomas foi utilizado o método de limite de diluição ou de diluição seriada (Lake et al. 1987). Os sobrenadantes contendo as células ressuspensas das culturas que deram reacções positivas no 1º rastreio foram sucessivamente diluídos no meio de cultura inicial (RPMI contendo 15% de FCS, 1 x 10^{-4} M Hipoxantina, 1,6 x 10^{-5} M Timidina, 4 x 10^{-7} M Aminopterina, 2 mM glutamina, 100 U/ml penicilina e 100 µg/ml estreptomicina) por forma a se plaquearem 10, 3, 1 e 0,3 células por poço em placas de 96 poços, com o objectivo de se obterem clones isolados. Verificou-se o crescimento macroscópico 10-12 dias após incubação a 37°C, numa atmosfera contendo 7% de CO_2.

2º Rastreio - O 2º rastreio foi efectuado após a 1ª clonagem, utilizando a técnica de ELISA, na presença de diferentes antigénios e teve por objectivo determinar a viabilidade dos clones previamente analisados, assim como a afinidade dos mesmos para os antigénios testados anteriormente.

2ª Clonagem - Os hibridomas que deram reacções positivas no 2º rastreio, voltaram a ser clonados pelo método de diluição seriada (Lake et al. 1987), no meio de cultura previamente usado, agora isento de aminopterina.

Os clones isolados depois desta etapa foram sujeitos a um aumento gradual da superfície de crescimento no meio de RPMI contendo 15% de FCS, 2 mM glutamina, 100 U/ml penicilina e 100 µg/ml estreptomicina.

Preparações de ADN - O ADNcd foi purificado do tecido linfóide e do extracto tímico de ratinho, de acordo com o método descrito por Morgan et al.1985a. O ADNcs foi obtido do mesmo material depois do ADNcd ter sido fervido durante 20 min e rapidamente arrefecido em gelo.

Preparação de extractos proteicos totais, nucleares e citoplasmáticos - Foram preparados de acordo com os métodos descritos na caracterização dos anticorpos monoclonais.

ELISA ("enzyme-linked immunosorbent assay") - A técnica de ELISA foi efectuada de acordo com os métodos descritos de Morgan et al.1985a e Lake et al. 1987. Placas de ELISA de 96 poços (de fundo plano) foram cobertas com 50 µl de poli-L-lisina (PLL) (BDH) numa concentração final de 25 µg/ml diluída em PBS ("phosphate buffer saline") pH=7,2, durante 1 h a 37°C. A sensibilização com a PLL foi omitida na presença de proteínas solúveis (proteína citoplasmática e nuclear) dado que estas adsorvem directamente às placas de polivinílico. Lavaram-se as placas 2 vezes com PBS. Adicionaram-se 50 µl de cada um dos antigénios utilizados no rastreio dos hibridomas produzidos: ADNcs 10 µg/ml e ADNds 20 µg/ml diluídos em PBS, e 5-10 µg/ml de extractos proteicos citoplasmáticos e 5-10 µg/ml de extractos proteicos nucleares diluídos em "coating buffer" (0,1 M carbonato/bicarbonato pH=9,6), durante 1 hora a 37°C. O bloqueio das ligações inespecíficas foi feito com 50 µl de 2% caseína (BDH) diluída em PBS, durante 1 h a 37°C. Lavaram-se as placas 2 vezes com PBS-T (PBS contendo 0,1% Tween-20). Adicionaram-se 50 µl das amostras (sobrenadantes dos hibridomas) a testar e se necessário diluídas em PBS-T-C (PBS contendo 0,05% Tween-20 e 1% de caseína), durante 1 h a 37°C. A remoção do material não ligado foi feita lavando 4 vezes com PBS-T. Adicionou-se a cada poço 50 µl de IgG de carneiro anti-ratinho, marcada com a peroxidase (Amersham, UK) diluída em PBS-T-C, durante 1 h a 37°C. O excesso de anticorpo foi removido lavando as placas 6 vezes com PBS-T. A revelação foi efectuada com a adição de 10 µl/poço de H_2O_2 a 30% (Sigma) diluída a 1:3000 em 0,01 M de tampão citrato fosfato pH=6,2 contendo 1 mg/ml de orto-fenilenodiamina (OPD) (BDH). Após incubação durante 20 min à temperatura ambiente no escuro, parou-se a reacção com a adição de 100 µl de ácido cítrico 0,5 M. Mediu-se a absorção a 450 nm, na presença de um branco em equipamento próprio

(ELISA-STL, Labinstruments 400 SFC). Foi utilizado como controlo negativo uma prepaparação de poli-L-lisina (25 µg/ml) e como controlo positivo o mAb 88. A classificação da reactividade de cada clone foi feita com base na densidade óptica (D.O.) obtida: reacção muito fortemente positiva ($D.O._{450} \geq 1,00$); reacção fortemente positiva ($D.O._{450} \geq 0,75$); reacção positiva ($D.O._{450} \geq 0,50$); reacção fracamente positiva ($D.O._{450} \geq 0,25$); reacção muito fracamente positiva ($D.O._{450} \geq 0,10$) e sem reacção ($D.O._{450} = 0,00$).

Tratamento com DNase - O tratamento dos mAbs com a DNase foi efectuado de acordo com o método descrito por Brinkman et al. 1989. Os sobrenadantes das culturas foram incubados com a DNase-I (Sigma) numa concentração final de 40 µg/ml e com $MgCl_2$ numa concentração final de 10 mM, durante 1 h, a 37°C e com agitação. Após esta incubação foi adicionado EDTA (BDH) numa concentração final de 15 mM.

Imunofluorescência indirecta (IF) - A capacidade de reconhecimento de antigénios intra e extra celulares por parte dos mAbs obtidos foi testada em células HEp-2 cultivadas em lamelas. Lavaram-se as células por duas vezes em PBS e fixaram-se durante 5 min numa mistura de 50% metanol e 50% acetona, a -20°C. Depois de fixadas as células foram lavadas com PBS durante 10 min e depois incubadas em PBS contendo 10% FCS e 0,1% Triton X-100, à temperatura ambiente durante 30 min, para bloquear os locais inespecíficos de ligação de proteínas. O primeiro anticorpo (sobrenadante das culturas ou líquido ascítico) foi diluído em PBS contendo 10% FCS e 0,1% Triton X-100 e incubado durante 1 h à temperatura ambiente. Após 3 lavagens em PBS contendo 0,1% NP-40, adicionou-se o segundo anticorpo: IgG de carneiro anti-ratinho, marcado com a fluoresceína (Amersham, UK), diluído em PBS contendo 10% FCS e 0,1% Triton X-100. Depois de 1 h de incubação, fizeram-se 3 lavagens em PBS contendo 0,1% NP-40 e 2 lavagens em PBS. A dupla marcação das células foi efectuada com Hoechst 33258, durante 10 min. As preparações foram montadas em 85% glicerol contendo 2,5% n-propilgalhato (Giloh et al. 1982).

Electroforese - A electroforese unidimensional em SDS-PAGE foi efectuada de acordo com o método de Laemmli (1970), em geles de 7,5% a 15%. Extractos proteicos totais de células HEp-2 foram solubilizados no tampão de amostra de Laemmli (62,5 mM Tris-HCl pH=6,8, 2% SDS, 10% glicerol, 5% β-mercaptoetanol). Foram usados marcadores de peso molecular da Sigma e da Bio Rad (vêr apêndice). Foi utilizado o equipamento da H.S.I. (Hoefer Scientific Instruments), unidades "Mighty Small II-Vertical Slab Gel Electrophoresis - SE 250" e "Tall Mighty Small-Vertical Slab Gel Electrophoresis - SE 280".

"Immunoblotting" - A técnica de "immunoblotting" foi realizada de acordo com o método descrito por Towbin et al. 1979. Os polipeptídeos separados por SDS-PAGE foram transferidos para papel de nitrocelulose (45μ) (Amersham) durante a noite, a uma corrente constante de 20 mA, seguida de uma corrente constante de 200 mA durante 1 h, em tampão de transferência (191 mM glicina, 25 mM Tris pH=8,3). As proteínas transferidas foram detectadas com uma solução corante de 0,2% Ponceau S em 3% TCA. Após descoloração em PBS, a nitrocelulose foi incubada numa solução de PBS contendo 5% de leite em pó e 0,1% NP-40, durante 1 h. Depois da lavagem em PBS contendo 0,1% NP-40, as tiras de nitrocelulose foram incubadas durante 3 a 4 hs à temperatura ambiente com o primeiro anticorpo (sobrenadante das culturas, líquido ascítico, anticorpos monoclonais, anticorpos policlonais e soros humanos) diluído em PBS contendo 0,5% de leite em pó e 0,1% NP-40. As lavagens foram efectuadas em PBS contendo 0,1% NP-40, durante 30 min. Como segundo anticorpo utilizou-se uma Ig de carneiro anti-ratinho, marcado com a peroxidase (Amersham, UK) diluído em PBS contendo 0,5% de leite em pó e 0,1% NP-40, durante 1h, à temperatura ambiente. As lavagens foram efectuadas em PBS contendo 0,1% NP-40 e PBS, durante 40 min. A revelação foi efectuada numa solução de 5% 4-cloro-1-naftol em etanol, diluída a 1/100 em PBS na presença de 0,025 M de peróxido de hidrogénio (Sigma). Foi utilizado o equipamento da H.S.I. (Hoefer Scientific Instruments), unidade "Transpher Electrophoresis".

RESULTADOS

ELISA dos mAbs isolados

Efectuaram-se duas fusões com ratinhos da espécie MRL/Mp-*lpr/lpr*, do sexo masculino e com 10 meses de idade. O número total de células isoladas do baço de cada ratinho foi de 5 x 10^6 células/ml, na primeira experiência, e de 5,4 x 10^6 células/ml, na segunda. As células de ratinho e de mieloma (SP2/O) apresentavam respectivamente, uma viabilidade de 95% e 100%, na primeira fusão, e de 98% e 92%, na segunda fusão. O volume da cultura com a suspensão celular foi distribuído por 20 placas de 24 poços.

Ao fim de 8 a 10 dias de incubação todas as suspensões celulares, apresentando ou não crescimento visível, foram sujeitas ao 1º rastreio feito através do método de ELISA. Os sobrenadantes foram testados com quatro preparações antigénicas diferentes: ADNcs (20 μg/ml), ADNds (10 μg/ml), extractos proteicos nucleares (10 μg/ml) e extractos proteicos citoplasmáticos (5 μg/ml). O rastreio pela técnica de ELISA tem a vantagem de testar um maior número de amostras, num espaço de tempo menor e com custos menos elevados, relativamente a outros métodos de rastreio que englobam a fixação de complemento, o radioimunoensaio, a hemaglutinação, a imunofluorescência e a precipitação em gel.

Na análise dos resultados do rastreio há que ter em conta as diferentes velocidades de crescimento de cada clone, o que é condicionado por dois factores. Primeiro, um clone positivo detectado logo após a fusão, pode perder-se na sequência do crescimento excessivo de um clone negativo em detrimento do positivo. Segundo, a actividade de uma célula positiva pode ser mascarada pelo facto de se encontrar em minoria. Daí a necessidade de um processamento rápido nas várias etapas que envolvem o isolamento de clones individualizados.

Na primeira fusão foram obtidos 20 clones positivos (tabela 3). Destes, treze (S1D6, S5C4, S5D4, S6C3, S7C3, S7D2, S9C3, S10C4, S11D3, S11D5, S12B1, S19C2 e S20B4) reagiram quer com as preparações de ADN quer com as preparações proteicas. Os sobrenadantes S10B3, S10B4 e S10C3 reconheceram apenas as preparações de ADN. Os sobrenadantes S9B2, S9B6 e S16B5 apresentaram reacções fracamente positivas com as duas preparações proteicas. Um dos sobrenadantes (S3D1) apresentou uma reacção positiva, apesar de fraca, com a preparação de proteínas citoplasmáticas.

Na segunda fusão obtiveram-se resultados positivos com 14 clones (tabela 4). Quatro deles (S6A1, S10C3, S10C4 E S16 B5) reagiram com as preparações de ADN e de

proteínas. Os sobrenadantes S1C1, S4D6, S11C2, S12D6, S19A2, S19C6, S20C6 reconheceram exclusivamente as preparações de ADN. Os sobrenadante S1A4 e S16A6 reagiram apenas com o ADN de cadeia simples. Só um dos sobrenadantes, S10C4, deu reacção positiva com as preparações proteicas.

Os resultados dos primeiros rastreios efectuados nas duas fusões são apresentados nas tabelas 3 e 4. Os sobrenadantes assinalados com um asterisco (*) representam os clones que não sobreviveram. O mAb 88 foi usado como controlo positivo, no que respeita à reactividade com preparações de ADN.

Tabela 3 - Resultados do 1º rastreio dos sobrenadantes da primeira fusão, testados por ELISA, contra vários antigénios.

ANTICORPO	ANTIGÉNIOS			
	ADNcs	ADNds	Ext. Proteicos Citoplasmáticos	Ext. Proteicos Nucleares
S1D6*	+ -	—	+ +	+ +
S3D1*	—	—	+ -	—
S5C4 **(3510)**	+++	—	+ +	+ +
S5D4	+++	—	+ +	+ +
S6C3	+++	—	+ +	+ +
S7C3 **(3511)**	+++	—	+ +	+ +
S7D2*	+++	—	+ +	+ +
S9B2	—	—	+	+
S9B6*	—	—	+	+
S9C3	+++	—	+ +	+ +
S10B3	+ -	+ -	—	—
S10B4*	+ +	+ +	—	—
S10C3	+++	+++	—	—
S10C4	+ +	+ +	+	+
S11D3	+	—	+	+
S11D5 **(3509)**	+	—	+	+
S12B1*	+	+	+	—
S16B5	—	—	+	+
S19C2	+	—	+	+
S20B4	+ -	+ - -	+ +	+ +
88	+++	+ +	+ -	—

(+++) - Reacção muito fortemente positiva / (++) - Reacção fortemente positiva / (+) - Reacção positiva / (+ -) - Reacção fracamente positiva / (+--) - Reacção muito fracamente positiva / (—) - Sem reacção

(*) - Clones que não sobreviveram

Tabela 4 - Resultados do 1º rastreio dos sobrenadantes da segunda fusão, testados por ELISA, contra vários antigénios.

ANTICORPO	ANTIGÉNIOS			
	ADNcs	ADNds	Ext. Proteicos Citoplasmáticos	Ext. Proteicos Nucleares
S1A4	+++	—	—	—
S1C1	+++	+++	—	—
S4D6	+++	+++	—	—
S6A1 (**3612**)	+++	+++	+ -	+ +
S10C3	—	—	++	+ +
S10C4 (**3615**)	—	—	+++	+++
S11C2	+ +	+ +	—	—
S11D4	+++	+++	+ +	+ +
S12D5 (**3617**)	+++	+++	+ +	+ +
S12D6	+++	+++	—	—
S16A6	+	—	—	—
S16B5 (**3613**)	+ -	—	+++	+++
S19A2	+ +	+ +	—	—
S19C6	+++	+++	—	—
S20C6	+++	+++	—	—
88	+++	+ +	+ -	—

(+++) - Reacção muito fortemente positiva / (++) - Reacção fortemente positiva / (+) - Reacção positiva / (+ -) - Reacção fracamente positiva / (+--) - Reacção muito fracamente positiva / (—) - Sem reacção
(*) - Clones que não sobreviveram

O isolamento de clones foi efectuado pelo método de diluição seriada ou de limite de diluição. Foram feitas diluições sucessivas dos clones com reacções positivas com as preparações de proteínas e que se apresentavam viáveis para serem reclonados. Da primeira fusão, reclonaram-se os seguintes sobrenadantes: S11D5, S5C4 e S7C3, que passaram a ser designados por 3509, 3510, 3511. Da segunda experiência, foram reclonados quatro sobrenadantes: S6A1, S16B5, S10C4 e S12D5, que passaram a ser denominados por 3612, 3613, 3615 e 3617 (ver tabelas 3 e 4).

Dos sete sobrenadantes reclonados foi possível isolar células individualizadas em quatro deles (3509, 3510, 3612 e 3613). As células isoladas foram novamente sujeitas a um rastreio com as preparações de extractos proteicos citoplasmáticos e nucleares. A análise do 2º rastreio mostra que as várias células individualizadas correspondentes aos diferentes clones têm uma reactividade diversificada em relação aos antigénios testados (tabelas 5 e 6)

ou seja, a partir de um mesmo clone obtiveram-se células que reagem diferentemente face aos antigénios testados.

Tabela 5 - Resultados do 2º rastreio dos sobrenadantes reclonados da primeira fusão testados por ELISA, contra preparações proteicas.

CLONE	Poço	Extractos Proteicos Citoplasmáticos	Extractos Proteicos Nucleares
3509	H3	+ -	—
	G5	+ -	—
	C11	+ - -	—
	G11	+ - -	—
	G12	—	—
	A12	+ - -	—
	B12	—	—
	F5	—	—
	C6	+ - -	—
	E8	—	—
	B9	—	—
	F1	+ +	—
	F3	+ -	+ +
	H6	+ -	+ -
	H9	+++	+ +
3510	E1	—	+ ++
	A5	—	+ -
	F12	—	—
	A10	+ +	—
	F10	+ -	—
	A11	+ - -	+ -
	D2	—	+ -
	H2	—	—
	G3	+ -	—
	C4	+ +	—
	G6	+ -	—
	C8	—	—

(+++) - Reacção muito fortemente positiva / (++) - Reacção fortemente positiva / (+) - Reacção positiva / (+ -) - Reacção fracamente positiva / (+--) - Reacção muito fracamente positiva / (—) - Sem reacção
(*) - Clones que não sobreviveram

Assim, do clone 3509 foi possível obter 15 subclones. Destes, três (F3, H6 e H9) reagem com proteínas citoplasmáticas e nucleares; sete (H3, G5, C11, G11, A12, C6 e F1) reagem apenas com proteínas citoplasmáticas; e cinco (G12, B12, F5, E 8 e B9) não mostram qualquer tipo de reactividade para os antigénios testados.

No clone 3510 isolaram-se 12 subclones, dos quais cinco (A10, F10, G3, C4 e G6) reagem com proteínas citoplasmáticas, havendo também três que reconhecem apenas proteínas nucleares (E1, A5 e D2), um que reage com os dois tipos de preparações testadas (A11) e três que não apresentam qualquer tipo de reactividade (F12, H2 e C8).

Tabela 6 - Resultados do 2º rastreio dos sobrenadantes reclonados da segunda fusão testados por ELISA, contra preparações proteicas.

CLONE	Poço	Extractos Proteicos Citoplasmáticos	Extractos Proteicos Nucleares
3612	D2	—	—
	E6	—	—
	C12	—	—
	C2	—	—
	C3	—	+ + +
	B5	—	—
	H5	+ -	—
	A6	—	—
	G7	—	+ - -
	C8	—	+ -
	H8	+ +	—
	H12	+ -	—
	C11	—	—
3613	F1	+ -	+ -
	A2	+ +	+ -
	B3	+ -	+ -
	C4	+ +	+ +
	A8	—	—
	E10	+ +	—
	H11	+ + +	+ -
	H12	+ - -	+ +
	D1	+ -	+ -
	A4	+ + +	+ +
	F4	—	+ -
	B6	+ +	—
	G9	+ +	+ -
	H3	+++	+ +
	D4	+ +	—
	A5	+ +	+ -
	C5	+ ++	+++
	H6	+ +	+ +
	D9	+ -	+ +

(+++) - Reacção muito fortemente positiva / (++) - Reacção fortemente positiva / (+) - Reacção positiva / (+ -) - Reacção fracamente positiva / (+--) - Reacção muito fracamente positiva / (—) - Sem reacção

(*) - Clones que não sobreviveram

Do clone 3612 isolaram-se treze subclones. Verificou-se que sete dos clones (D2, E6, C12, C2, B5, A6 e C11) com células isoladas não apresentavam qualquer reactividade com as preparações citoplasmáticas ou nucleares. Alguns que reagiam apenas com as proteínas citoplasmáticas (H5, H8 e H12) e outros, só reagiram com as proteínas nucleares (C3, G7 e C8).

Em relação ao clone 3613 foi possível isolar dezanove subclones. Catorze (F1, A2, B3, C4, H11, H12, D1, A4, G9, H3, A5, C5, H6 e D9) reagiam com os antigénios citoplasmáticos e nucleares testados. Dos restantes, três (E10, B6 e D4) reagiam apenas com as preparações citoplasmáticas, um (F4) com os extractos proteicos nucleares e outro (A8) não apresentou qualquer tipo de reactividade.

Reactividade dos mAbs por imunofluorescência

A reactividade dos clones isolados, depois do segundo rastreio, foi testada por imunofluorescência, em células HEp-2 fixadas em 50% metanol e 50% acetona, a -20°C. Os vários sobrenadantes, não diluídos, dos clones individualizados foram usados como primeiro anticorpo e os resultados estão apresentados nas tabelas 7 e 8. As células em interfase, revelaram dois padrões de imunofluorescência, que por vezes foram detectados nos vários subclones do mesmo hibridoma. Em todos os sobrenadantes testados, verificou-se que a marcação da células HEp-2 em mitose, nomeadamente na metafase e anafase, se restrigia aos cromossomas condensados.

No que respeita aos clones da primeira fusão (tabela 7), as células individualizadas do clone 3509 coram, na sua maioria, o núcleo de um modo homogéneo, a membrana nuclear e fracamente o citoplasma (Nh Mn C). Cinco dos subclones (G11, G12, A12, E8 e B9) não reconhecem os antigénios das células HEp-2. A coloração homogénea nuclear, sem envolver os nucléolos (Nh SN C) foi detectada em três dos subclones (B12, F5 e C6). Na reclonagem do hibridoma 3510 verificou-se que a grande maioria das células com crescimento individualizado exibia uma marcação homogénea do núcleo e membrana nuclear, com uma coloração citoplasmática ténue. Também aqui, foi possível detectar a presença de clones com reactividade distinta, ou seja, que marcavam o núcleo sem reagirem os nucléolos (E1, F12, A10 e H2).

Quanto aos clones da segunda fusão (tabela 8), a marcação detectada nos subclones do hibridoma 3612 foi restrita ao núcleo e membrana nuclear, com uma coloração pouco intensa ao nível do citoplasma. Também no hibridoma 3613, foi possível isolar subclones que apresentavam um padrão de imunofluorescência em que o núcleo aparece corado de um

modo homogéneo, com excepção dos nucléolos, e o citoplasma aparece fracamente corado. O único padrão de coloração diferente foi detectado no subclone D9, que exibia uma marcação homogénea do núcleo, membrana nuclear e citoplasma.

Tabela 7 - Padrões de imunofluorescência dos sobrenadantes reclonados da primeira fusão e testados em células HEp-2.

CLONE	Poço	Interfase	Mitose
3509	H3	Nh Mn C	Crom. Cond.
	G5	Nh Mn C	Crom. Cond.
	C11	Nh Mn C	Crom. Cond.
	G11	—	—
	G12	—	—
	A12	—	—
	B12	Nh SN C	Crom. Cond.
	F5	Nh SN C	—
	C6	Nh SN C	Crom. Cond.
	E8	—	—
	B9	—	—
	F1	Nh Mn C	Crom. Cond.
	F3	Nh Mn C	Crom. Cond.
	H6	Nh Mn C	Crom. Cond.
	H9	Nh Mn C	Crom. Cond.
3510	E1	Nh Mn C	Crom. Cond.
	A5	Nh SN C	Crom. Cond.
	F12	Nh Mn C	Crom. Cond.
	A10	Nh Mn C	Crom. Cond.
	F10	Nh SN C	Crom. Cond.
	A11	Nh SN C	Crom. Cond.
	D2	Nh SN C	Crom. Cond.
	H2	Nh Mn C	Crom. Cond.
	G3	Nh SN C	Crom. Cond.
	C4	Nh SN C	Crom. Cond.
	G6	Nh SN C	Crom. Cond.
	C8	Nh SN C	Crom. Cond.

(—) - Sem reacção ou marcação visível

(Crom. Cond.)- Cromossomas Condensados

(Nh Mn C) - Núcleo homogéneo, Membrana nuclear e Citoplasma fraco

(Nh SN C) - Núcleo homogéneo, Sem marcar os nucléolos e Citoplasma fraco

Tabela 8 - Padrões de imunofluorescência dos sobrenadantes reclonados da segunda fusão e testados em células HEp-2.

CLONE	Poço	Interfase	Mitose
3612	D2	Nh SN C	Crom. Cond.
	E6	Nh SN C	Crom. Cond.
	C12	—	—
	C2	Nh SN C	—
	C3	Nh SN C	Crom. Cond.
	B5	Nh SN C	Crom. Cond.
	H5	Nh SN C	Crom. Cond.
	A6	Nh SN C	Crom. Cond.
	G7	—	—
	C8	—	—
	H8	Nh SN C	Crom. Cond.
	H12	Nh SN C	Crom. Cond.
	C11	Nh SN C	Crom. Cond.
3613	F1	Nh SN C	Crom. Cond.
	A2	Nh SN C	Crom. Cond.
	B3	Nh SN C	Crom. Cond.
	C4	Nh SN C	Crom. Cond.
	A8	Nh SN C	Crom. Cond.
	E10	Nh SN C	—
	H11	Nh SN C	—
	H12	Nh SN C	—
	D1	Nh SN C	Crom. Cond.
	A4	Nh SN C	Crom. Cond.
	GF4	Nh SN C	Crom. Cond.
	B6	Nh SN C	Crom. Cond.
	G9	Nh SN C	Crom. Cond.
	H3	Nh SN C	Crom. Cond.
	D4	Nh SN C	Crom. Cond.
	A5	Nh SN C	Crom. Cond.
	C5	Nh SN C	Crom. Cond.
	H6	Nh SN C	Crom. Cond.
	D9	Nh Mn C	Crom. Cond.

(—) - Sem reacção ou marcação visível

(Crom. Cond.)- Cromossomas Condensados

(Nh Mn C) - Núcleo homogéneo, Membrana nuclear e Citoplasma fraco

(Nh SN C) - Núcleo homogéneo, Sem marcar os nucléolos e Citoplasma fraco

Reatividade de mAbs por "immunoblotting"

A determinação dos antigénios que poderiam ser reconhecidos pelas células dos hibridomas reclonadas foi feita com os extractos proteicos totais de células HEp-2. Para este ensaio todos os sobrenadantes foram previamente tratados com DNase I, de forma a eliminar os fragmentos de ADN resultantes da morte celular, que eventualmente ocupariam os locais de ligação dos anticorpos (Brinkman et al. 1989). Os resultados do "immunoblotting" referentes aos sobrenadantes reclonados da primeira e segunda fusão são apresentados nas tabelas 9 e 10.

Tabela 9 - Peso molecular (kDa) dos antigénios de extractos proteicos totais de células HEp-2 reconhecidos pelos mAbs presentes nos sobrenadantes reclonados da primeira fusão.

CLONE	Poço	(kDa)	CLONE	Poço	(kDa)
3509	H3	110	**3510**	E1	130, 110, 70, 60, 50
	G5	—		A5	130, 110, 70, 50
	C11	—		F12	130, 110, 70, 50
	G11	—		A10	—
	G12	—		F10	110
	A12	—		A11	—
	B12	—		D2	—
	F5	—		H2	—
	C6	—		G3	—
	E8	—		C4	—
	B9	—		G6	—
	F1	110		C8	—
	F3	110			
	H6	110			
	H9	130, 110			

(—) - Sem reacção

Em todos os hibridomas que apresentaram reacções positivas foi possível detectar a presença de um antigénio com um peso molecular aparente de 110 kDa. Para além deste, verificou-se a presença de um outro com 130 kDa que foi detectado na maioria dos

sobrenadantes testados. Outros polipeptídeos com massas moleculares aparentes de 170, 70, 60, 50 e 45 kDa foram detectados nos sobrenadantes reclonados do hibridomas 3509, 3510 e 3613. O único hibridoma que não apresentou qualquer tipo de reactividade, por "immunoblotting" com os extractos proteicos totais de células HEp-2, foi o 3612.

Tabela 10 - Peso molecular (kDa) dos antigénios de extractos proteicos totais de células HEp-2 reconhecidos pelos mAbs presentes nos sobrenadantes reclonados da segunda fusão.

CLONE	Poço	(kDa)	CLONE	Poço	(kDa)
3612	D2	—	**3613**	F1	110
	E6	—		A2	110
	C12	—		B3	110
	C2	—		C4	110
	C3	—		A8	110
	B5	—		E10	110
	H5	—		H11	110
	A6	—		H12	110
	G7	—		D1	130, 110
	C8	—		A4	130, 110
	H8	—		F4	170, 130, 110, 70, 60, 50
	H12	—		B6	130, 110, 70, 50, 45
	C11	—		G9	130, 110
				H3	130, 110, 70
				D4	130, 110, 70
				A5	130, 110, 70
				C5	110
				H6	110
				D9	110

(—) - Sem reacção

DISCUSSÃO

Os antigénios reconhecidos pelos autoanticorpos produzidos no lupus eritematoso sistémico, quer seja no homem ou no ratinho, são numerosos e diversificados (Tan, 1989; Chan et al. 1989; Bronze-da-Rocha et al. 1992; Balczon, 1993). Além disso, estes autoanticorpos apresentam características invulgares nomeadamente no que respeita à sua especificidade (Eilat, 1985; Morgan et al. 1985a) e ao conjunto de epítopos que reconhecem (Morgan et al. 1985 a,b; Watts et al. 1990; Isenberg et al. 1990). Tanto os autoanticorpos de ratinho (Morgan et al. 1985 a,b; Watts et al. 1990) como os humanos (Shoenfeld et al. 1983a, b) reagem com o ADNcs, ADNcd (formas B e Z), ARN, polinucleótidos, fosfolípidos e cardiolipina. Esta multireactividade tem sido atribuída à presença de grupos fosfodiester nos polinucleótidos e nos fosfolípidos (Shoenfeld et al. 1983a, b), ao contacto dos anticorpos com as bases, açucares e fosfatos que constituem a molécula de ADN (Stollar, 1994) e à presença de idiotipos comuns entre estes autoanticorpos, que parecem derivar da conservação evolutiva dos genes que os produzem (Watts et al. 1990).

O estudo preliminar efectuado com um conjunto de anticorpos monoclonais inicialmente selecionados pela sua capacidade de reconhecerem preparações de ADN de cadeia simples e dupla (Morgan et al. 1985a) evidenciou que a reactividade destes mAbs se verifica também com outros antigénios que apresentam uma distribuição celular diferente nas células em interfase e em mitose. Nesta perspectiva, as fusões efectuadas foram feitas com o objectivo de se isolarem clones que reagissem preferencialmente com antigénios nucleares e em particular com proteínas reconhecidas pelos soros autoimunes e associadas aos cromossomas.

A fusão celular permite o isolamento e produção de anticorpos monoclonais (mAbs) de hibridomas. Estas células possuem características próprias, tais como poderem ser cultivadas por tempo indefinido, do mesmo modo que as células de mieloma, e serem portadoras das enzimas da *via de salvamento*, como as células normais do baço, o que lhes permite o crescimento num meio selectivo contendo hipoxantina, aminopterina e timidina (HAT).

Nas duas fusões efectuadas foi possível isolar um total de 34 clones que foram inicialmente testados quanto à sua capacidade de reacção face a preparações de ADN, de cadeia simples e dupla, e a preparações proteicas citoplasmáticas e nucleares. Verificou-se que cerca de metade dos híbridos obtidos compartilhavam epítopos comuns nos dois tipos de preparações (de ADN e de proteínas). Curiosamente, devido ao facto dos anticorpos de

ratinhos com SLE reagirem preferencialmente com o ADNcd (Morgan et al. 1985a; Tan, 1989; Chan et al. 1989), alguns dos restantes hibridomas, resultantes quer da primeira (S9B2, S9B6 e S16B5) quer da segunda (S10C3, S10C4 e S16B5) fusão, reagiram preferencialmente com as preparações proteicas em vez de reconhecerem as preparações de ADN (tabelas 3 e 4). Esta reactividade com as proteínas citoplasmáticas e nucleares manteve-se após o 2ª rastreio (tabelas 5 e 6).

Estes resultados, em conformidade com os obtidos na análise preliminar efectuada com outros soros de ratinhos com lupus (ver introdução teórica), permitiram questionar qual seria a verdadeira natureza dos antigénios reconhecidos pelos autoanticorpos produzidos pelos ratinhos com SLE. Para definir a natureza destes mesmos antigénios, tentou-se verificar qual a reactividade apresentada pelos hibridomas obtidos ao serem confrontados, por imunofluorescência, com um elevado número de antigénios presentes nas células HEp-2, e por "immunoblotting", nos extractos proteicos totais destas mesmas células.

Demonstrou-se, por imunofluorescência, que os anticorpos monoclonais obtidos nestas fusões não reconhecem apenas o ADN, com já tinha sido evidenciado por ELISA (tabelas 3 e 4), mas reconhecem também um conjunto de antigénios que são detectados no no citoplasma e membrana nuclear. Os padrões de imunofluorescência evidenciados nas células em interfase, neste conjunto de hibridomas, foram dois: um, em que há marcação homogénea do núcleo, da membrana nuclear e do citoplasma; outro, em que há marcação a nível nuclear, excluindo os nucléolos, e o citoplasma é corado com pouca intensidade. Depois de reclonados, os clones isolados apresentaram dois padrões de imunofluorescência, com a excepção do clone 3612 que apresentou apenas um desses padrões. As células em mitose revelaram um padrão de imunofluorescência único e restrito aos cromossomas condensados, quer em metafase quer em anafase (tabelas 7 e 8).

A maioria dos clones deram reacções positivas quando testados por ELISA e por imunofluorescência. Um pequeno número de clones não reagiram quando testados por estas duas técnicas (3509 - G12, E8 e B9; 3612 - C12). Porém, alguns clones mostraram uma reactividade diferente nos ensaios de ELISA e imunofluorescência, dado que os resultados obtidos nem sempre foram concordantes, tendo em conta que os sobrenadantes usados para as duas determinações foram os mesmos. Verificou-se que nem todos os hibridomas que deram reacções positivas por ELISA reagiram por imunofluorescência (3509 - C11 e A12; 3612 - G7 e C8). Outros, deram reacções negativas por ELISA e mostraram reactividade por imunofluorescência (3509 - B12 e F5; 3510 - F12, H2 e C8; 3612 - E6, C2, C3, B5, A6 e C11; 3613 - A8). Esta diversidade de resultados nos dois ensaios pode ser atribuída à concentração de anticorpos em cada hibridoma, à sensibilidade de cada técnica e à conformação que os antigénios podem adquirir, após o tratamento aplicado aos mesmos

para a execução das referidas técnicas.

O reconhecimento de antigénios, por "immunoblotting", nos extratos totais de células HEp-2 pelos clones isolados e testados apresentaram uma característica comum: a presença de um polipeptídeo com o peso molecular aparente de 110 kDa. Para além deste, o outro antigénio reconhecido com maior frequência apresenta uma massa molecular aparente de 130 kDa. Existe um conjunto de antigénios de 170, 70, 60, 50 e 45 kDa que são detectados por diferentes subclones dos vários hibridomas. A única excepção diz respeito aos subclones do hibridoma 3612, que não apresentaram qualquer tipo de reactividade com os extractos proteicos totais de HEp-2. Este comportamento pode estar directamente relacionado com dois factores: primeiro, com a quantidade de anticorpo presente nestes sobrenadantes, dado que já as reacções de ELISA e imunofluorescência foram fracamente positivas; segundo, pelo facto de no 1º rastreio este hibridoma ter tido reacções fortemente positivas com as preparações de ADN e não tão intensas como as preparações proteicas.

Comparando os resultados da imunofluorescência e do "immunoblotting", verificou-se que alguns clones deram reacções negativas nestes dois ensaios (3509 - G11, G12, A12, E8 e B9; 3612 - C12, G7 e C8). As marcações obtidas por imunofluorescência e os péptidos detectados por "immmunoblotting" não evidenciaram uma relação directa entre eles, ou seja, para cada padrão específico de imunofluorescência não foi detectado um padrão característico no "western blot". Os antigénios reconhecidos por cada clone apresentaram pesos moleculares diversos. A falta de reactividade de alguns clones, como o 3612, que por imunofluorescência mostravam um padrão de reactividade essencialmente nuclear, embora sem marcar os nucléolos, e uma fraca marcação citoplasmática (Nh SN C), parece ser determinada pela concentração dos anticorpos de cada clone, dado que noutros hibridomas com o mesmo padrão de imunofluorescência (3613) houve reconhecimento de um conjunto de antigénios com pesos moleculares diversos (tabela 9 e 10).

O tratamento com DNase teve por objectivo a remoção de fragmentos de ADN que existem nos sobrenadantes, devido à morte celular que ocorre durante a produção de monoclonais (Brinkman et al. 1989), e que são capazes de se fixarem nos locais de ligação dos anticorpos. Assim, a remoção destes fragmentos após o tratamento com a DNase pode explicar a diferente reactividade dos subclones do hibridoma 3612 nos dois ensaios, ELISA e "immunoblotting".

Com base nos resultados obtidos com os hibridomas produzidos podemos apresentar várias conclusões. 1) Em cada fusão é possível obter um conjunto de clones que têm características próprias de reactividade, como foi determinado nos ensaios de ELISA,

imunofluorescência e "western blot". 2) Nem todos os anticorpos monoclonais são específicos para o ADN. 3) Por imunofluorescência, há o reconhecimento de diferentes estruturas a nível intra e extranuclear. 4) Foram evidenciados dois padrões de imunofluorescência para as células em interfase. 5) Foi detectado um único padrão de imunofluorescência para as células em mitose. 6) Os antigénios reconhecidos por "immunoblotting" apontam para a existência de polipeptídeos com pesos moleculares aparentes muito diversificados.

Neste estudo foi evidenciado que os autoanticorpos de ratinhos com lupus reconhecem um conjunto de antigénios de natureza proteica, para além do ADN, o que está de acordo com a reactividade diversificada de autoanticorpos que são encontrados nos doentes com LES (Tan, 1989; Balczon, 1993). Tendo por base estes resultados e o objectivo inicial deste trabalho, na próxima etapa deste estudo procurou-se fazer a caracterização de um conjunto de autoanticorpos (sobrenadantes ou líquido ascítico) de ratinhos com lupus eritematoso sistémico e o estudo bioquímico dos antigénios isolados.

II - CARACTERIZAÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS E ANÁLISE BIOQUÍMICA DOS AUTOANTIGÉNIOS ASSOCIADOS

INTRODUÇÃO

O lupus eritematoso sistémico é caracterizado pela produção de autoanticorpos contra uma grande variedade de antigénios e pela presença de complexos imunes circulantes. Adicionalmente, muitos dos autoantigénios têm um localização intracelular e estão associados a funções celulares importantes.

A maioria dos autoanticorpos que caracterizam o lupus são essencialmente dirigidos contra o ADN. Estes anticorpos apresentam características pouco comuns, na medida em que reconhecem várias famílias de epítopos, compartilham determinantes antigénicos comuns em espécies diferentes e nem todos são imunoquímicamente específicos para o ADN, dado que reagem com componentes nucleares, citoplasmáticos, membranares e da matriz nuclear (Morgan et al. 1985a, b; Eilat 1985; Watts et al. 1990, 1991; Isenberg et al. 1990). Apesar de ainda não ser conhecido o significado biológico destas reacções cruzadas, a identificação e análise de moléculas celulares que podem ter estruturas (epítopos) relacionadas com as do próprio ADN constitui uma área de interesse científico estimulante.

Os autoanticorpos monoclonais que se pretendem caracterizar resultaram de diferentes fusões entre as células de ratinhos (NZB x NZW) F1 e MRL/*lpr* e as células de mieloma SP2/O. Estes anticorpos monoclonais já produzidos tinham sido parcialmente caracterizados quanto à sua reactividade face a preparações de ADN e polinucleótidos (Morgan et al. 1985a). A maioria destes mAbs foi utilizada na forma de líquido ascítico e para todos já tinha sido determinada a classe imunoglobulínica a que pertenciam. Alguns destes anticorpos monoclonais foram utilizados na análise preliminar que antecedeu e determinou o objecto de estudo deste trabalho. Assim, pretende-se determinar a natureza dos antigénios e dos epítopos determinantes por técnicas de imunofluorescência, "immunoblotting" e imunoprecipitação. A linha celular HEp-2 foi usada para definir a capacidade destes autoanticorpos reconhecerem componentes subcelulares, por imunofluorescência indirecta. Para as experiências de "immunoblotting" e de imunoprecipitação foram utilizados extractos proteicos totais, citoplasmáticos e nucleares de células HEp-2.

MATERIAL BIOLÓGICO

Animais - Utilizaram-se ratinhos da espécie CBA/*nu*/*nu* ou (NZW x Balb/c)F1 ou (MRL/*Mp* x Balb/c)F1 para o crescimento de hibridomas na forma de líquidos ascíticos.

Os mAbs 58, 33, 88, 112 de ratinho adulto da espécie BWF1 e 152, 212, 228, 233, 402, 405, 406, 410 de ratinho adulto da espécie MRL/*lpr* foram usados na forma de ascites. Os anticorpos monoclonais 88 de ratinho adulto da espécie BWF1, 233 de ratinho adulto da espécie MRL/*lpr* e 423 de ratinho da espécie MRL/*lpr* com 15 dias de vida, foram utilizados na forma de sobrenadantes.

Células HEp-2 - As características e condições de cultura já foram descritas na produção de anticorpos monoclonais.

MÉTODOS

Preparação de extractos proteicos totais - As células HEp-2 foram lavadas em PBS e ressuspensas em tampão TN frio (10 mM Tris-HCl pH=7,4, 10 mM NaCl, 5 mM $MgCl_2$, contendo 1 mM PMSF, 1 mM PTU e 1% NP-40) descrito por Bailly et al. 1989. As células foram lisadas com quatro ciclos de congelamento (-70°C) e descongelamento (37°C). A clarificação dos extractos foi feita por centrifugação, primeiro a 8200 g por 10 min (centrifuga "eppendorf" 5415) e depois a 100000 g por 60 min (ultracentrifuga IEC), a 4°C. O sobrenadante obtido foi dividido em alíquotas e conservado a -70°C.

Preparação de extractos proteicos nucleares - As células HEp-2 foram lavadas em PBS e ressuspensas em tampão A (0,23 M sacarose, 60 mM KCl, 15 mM NaCl, 25 mM $MgCl_2$, 0,5 mM EGTA, 0,15 mM espermidina, 0,15 mM espermina, 14 mM β-mercaptoetanol, 1 mM PMSF, 1 mM PTU), homogeneizadas no homogeneizador Heidolph, a velocidade média, e diluídas em tampão B (2 M sacarose no tampão A). A mistura foi colocada num tubo contendo o tampão C (1,7 M sacarose no tampão A) e centrifugada a 27600 g, a 4°C, durante 45 min num rotor HB4 da Sorval. O sedimento que continha os núcleos foi ressuspenso no tampão D (1 M NaCl, 5 mM EDTA, 10 mM β-mercaptoetanol, 10 mM Tris pH=7,5 contendo 1 mM PMSF e 1 mM PTU), por agitação no vortex e incubada durante 30 min a 0°C, com agitação ocasional. A centrifugação foi efectuada a 100000 g (ultracentrifuga IEC), a 4°C, durante 60 min. O sobrenadante obtido foi dividido em alíquotas e conservado a -70°C.

Preparação de extractos proteicos citoplasmáticos - Os extractos citoplasmáticos foram preparados de acordo com uma modificação do método já descrito por

Adlaka et al. 1982. As células HEp-2 foram lavadas em PBS, ressuspensas em tampão M [15 mM Tris-HCl contendo 15 mM NaCl, 0,5 mM espermidina, 0,15 mM espermina, 15 mM β-mercaptoetanol, 2 mM EDTA, 0,5 mM EGTA, 1 mM ATP, 60 mM KCl, 1 mM PMSF, 1 mM PTU, 5 mM NaF, 5 mM β-glicerofosfato e 5% v/v glicerol (pH=7,4)] e incubadas 10 min a 37°C. A lise das células foi feita passando-as 4 vezes por uma agulha (medida 23). Após centrifugação a 30000 g (Sorval) 4°C, durante 15 min, o sobrenadante foi novamente centrifugado a 100000 g (ultracentrifuga IEC), a 4°C, durante 60 min. O sobrenadante obtido foi dividido em alíquotas e conservado a -70°C.

Imunofluorescência indirecta (IF) - Os antigénios foram localizados em células HEp-2 cultivadas em lamelas durante 2-3 dias. As células foram rapidamente lavadas duas vezes em PBS e fixadas pelos métodos seguintes: (i) 5 min numa mistura de 50% metanol e 50% acetona, a -20°C; (ii) 10 min em 3% paraformaldeído em PBS; (iii) 90 segundos no tampão PHEM (60 mM Pipes, 25 mM Hepes, 10 mM EGTA, 2 mM $MgCl_2$) pH=6,9 contendo 0,5% Triton X-100, antes de serem fixadas em 50% metanol e 50% acetona, durante 5 min a -20°C (modificação do método descrito por Vandré et al.,1989); (iv) 90 segundos no tampão PHEM (60 mM Pipes, 25 mM Hepes, 10 mM EGTA, 2 mM $MgCl_2$) pH = 6,9 contendo 0,5% Triton X-100, antes da fixação em metanol a -20°C, durante 5 min (Riabowol et al. 1989). Depois de fixadas as células foram tratadas de acordo com o método descrito para a IF na produção de anticorpos monoclonais. Como primeiro anticorpo usou-se sobrenadante ou líquido ascítico contendo os anticorpos monoclonais e como segundo anticorpo uma IgG de carneiro anti-ratinho marcado com a fluoresceína (Amersham, UK).

Electroforese - A electroforese de extractos totais, citoplasmáticos e nucleares de células HEp-2 foi feita de acordo com o método descrito na produção de anticorpos monoclonais.

"Immunoblotting" - Foi feito de acordo com o método descrito na produção de anticorpos monoclonais. Como controlos foram utilizados os seguintes soros humanos: anti-Sm diluído a 1:32, anti-SS-A diluído a 1:200, anti-SS-B diluído a 1:64 e anti-RNP diluído a 1:64 (Kallestad Diagnostic, USA), que foram detectados com IgG de carneiro anti-humana, marcado com a peroxidase, diluído a 1:200 (Amersham, UK).

Tratamento com DNase - O tratamento dos sobrenadantes das culturas, dos liquídos ascíticos e dos extractos proteicos totais com DNase foi efectuado de acordo com o método de Brinkman et al. 1989, já descrito na produção de anticorpos monoclonais. Como controlos foram usadas as mesmas amostras às quais não se adicionou DNase.

Tratamento com fosfatase alcalina - As membranas de nitrocelulose ou os extractos totais de células HEp-2 foram tratados com fosfatase alcalina bovina da mucosa intestinal (Sigma), díluida em 10 mM Tris-HCl (pH=8), com concentrações de 0,01 U/ml a 10 U/ml, à temperatura de 25°C, durante 2 hs (Davis et al. 1983). Depois do tratamento com a enzima, a nitrocelulose foi lavada em 10 mM Tris-HCl (pH=8) e depois com PBS contendo 0,1% NP-40.

Imunoprecipitação com ^{32}P and ^{35}S - Os ensaios de imunoprecipitação foram realizados de acordo com uma modificação do método descrito por Sambrook et al. 1989. Células HEp-2, com aproximadamente 75% de confluência, foram marcadas com [^{32}P] ortofosfato (Amersham, UK) numa concentração final de 3 μCi/ml, durante 9-12 hs em DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) isento de fosfatos ou, com [^{35}S] metionina (Amersham,UK) numa concentração final de 300 μCi, durante 4-6 hs, em MEM (Minimal Eagle's Medium) isento de metionina. Depois da lise das células, o extracto foi clarificado com soro não imune de coelho (50 μl de soro de coelho não imune/ml de lisado). A remoção dos imunocomplexos foi feita com 10% de células "Pansorbin" (Calbiochem). O lisado marcado com[^{32}P]ortofosfato foi dividido em duas fracções. Uma foi tratada com 10 U/ml de fosfatase alcalina (Davis et al. 1983) e a outra, não tratada com a enzima, foi utilizada como controlo. Para cada precipitação foram utilizados extractos totais de células HEp-2 (5 x 10^7) e 5 μl de cada mAb testado. Após 1 h de incubação a 4°C, adicionou-se 50 μl de células "Pansorbin" a 100 mg/ml durante 15 min, à temperatura ambiente. A amostra foi centrifugada e lavada 3 vezes com tampão NET (50 mM Tris pH=7,5, 150 mM NaCl, 0,1% NP-40, 0,5% desoxicolato de sódio, 1 mM EDTA pH=8, 0,25% gelatina, 1 mM PMSF, 0,02% azida sódica). Utilizaram-se tampões suplementados com 2 mM de metionina nos extractos marcados com [^{35}S]. O sedimento foi ressuspenso em 50 μl de tampão SDS-UREIA (8 M ureia, 1% SDS, 1 M Tris pH=7) e incubado por 1 h à temperatura ambiente, com agitação suave. Adicionou-se 12,5 μl de 5x tampão da amostra (50% glicerol; 0,25 M Tris pH=6,8; 5% SDS; 5% β-mercaptoetanol; 0,125% azul de bromofenol), ferveram-se as amostras e efectuou-se a electroforese (SDS-PAGE), em geles de 7,5% a 15%. Depois da secagem dos geles, procedeu-se à autoradiografia (Kodak), a -70°C, por exposição dos mesmos por 12-24 hs ou por 10 dias, respectivamente, para a marcação com o [^{32}P] e com o [^{35}S].

RESULTADOS

Padrões de imunofluorescência dos mAbs em células HEp-2

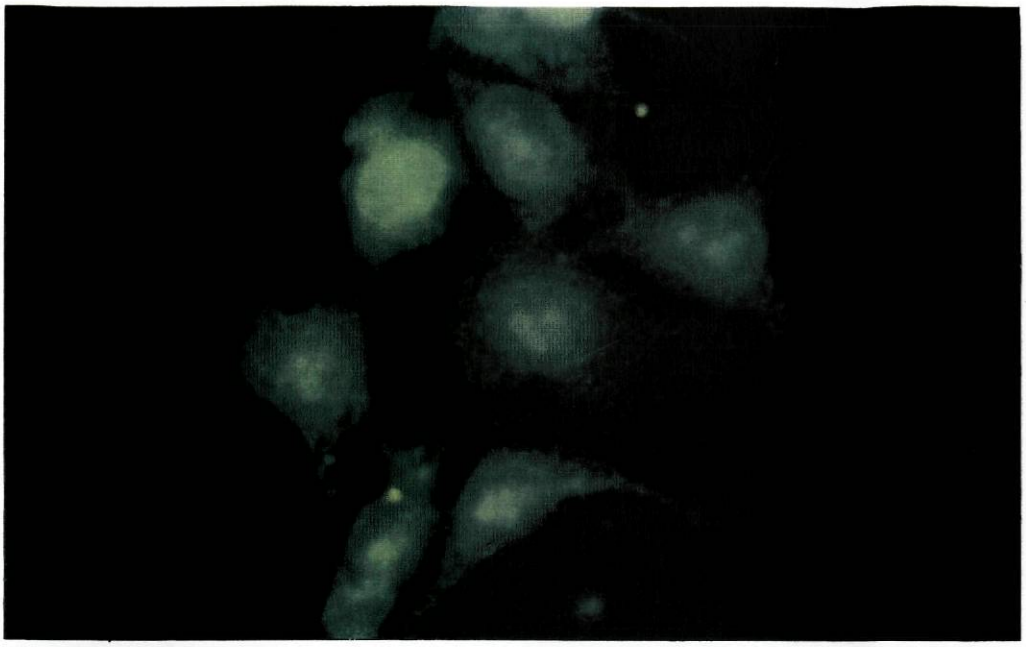
Os anticorpos monoclonais (mAbs) utilizados foram classificados por imunofluorescência indirecta, com base na sua reactividade com os diferentes componentes celulares das células HEp-2. Usaram-se células não sincronizadas por forma a verificar a distribuição dos antigénios ao longo do ciclo celular.

Os resultados obtidos mostram que a maioria dos padrões de imunofluorescência são semelhantes aos previamente descritos (Morgan et al. 1985a). Os mAbs foram divididos em cinco grupos em função dos antigénios reconhecidos nas células em interfase. Os do grupo A exibem uma forte coloração dos nucléolos e uma fraca coloração citoplasmática (Fig. 8-A1). Os mAbs do grupo B reagem com antigénios dos nucléolos, da membrana nuclear e do citoplasma (Fig. 8-B1). No grupo C, a coloração do núcleo é homogénia, mas a reactividade também ocorre a nível da membrana nuclear e do citoplasma, embora com pouca intensidade (Fig. 8-C1). No grupo D, o núcleo aparece corado de uma forma granular e a intensidade de coloração é muito mais acentuada à volta dos nucléolos (Fig. 8-D1). A coloração nuclear dos mAbs do grupo E é homogénia e exclui os nucléolos, embora o citoplasma apareça fracamente corado (Fig. 8-E1).

Durante a transição metafase-anafase existem essencialmente dois padrões de coloração. Um em que os cromossomas estão fortemente corados e que engloba os grupos A, C e D (Fig. 8-A1, C1 e D1). Outro, em que a coloração se restringe ao material que se encontra na periferia dos cromossomas, formando um halo, sem haver qualquer reactividade a nível dos cromossomas condensados. Este padrão de imunofluorescência envolve os grupos B e E (Fig. 8- B1 e E1). Na tabela 11 são apresentadas as características dos padrões de imunofluorescência das células HEp-2 em interfase e mitose e na figura 8 os padrões de coloração dos diferentes mAbs utilizados neste estudo.

Dado que a acessibilidade a determinados antigénios aumenta após o tratamento com detergentes antes da fixação, compararam-se os padrões de coloração na presença e na ausência deste pré-tratamento. A permeabilização das células tratadas com detergentes não traduziu qualquer tipo de modificação nos padrões de imunofluorescência quando comparados com os obtidos em células não tratadas. Porém, para se obter a mesma intensidade de coloração, a quantidade de anticorpo necessária foi muito menor.

(A1)



(A2)

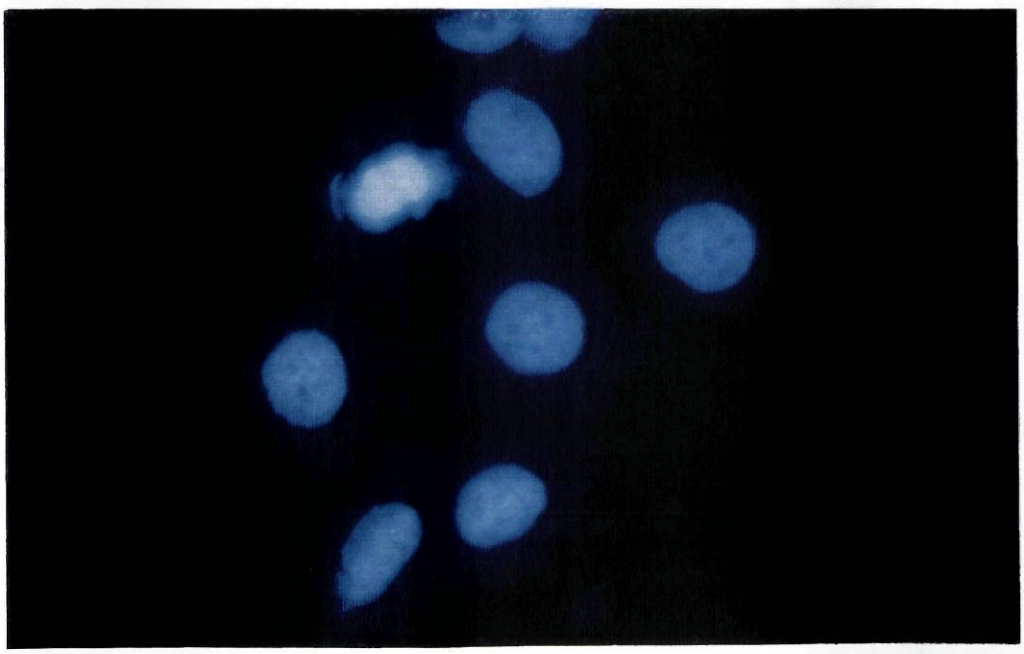
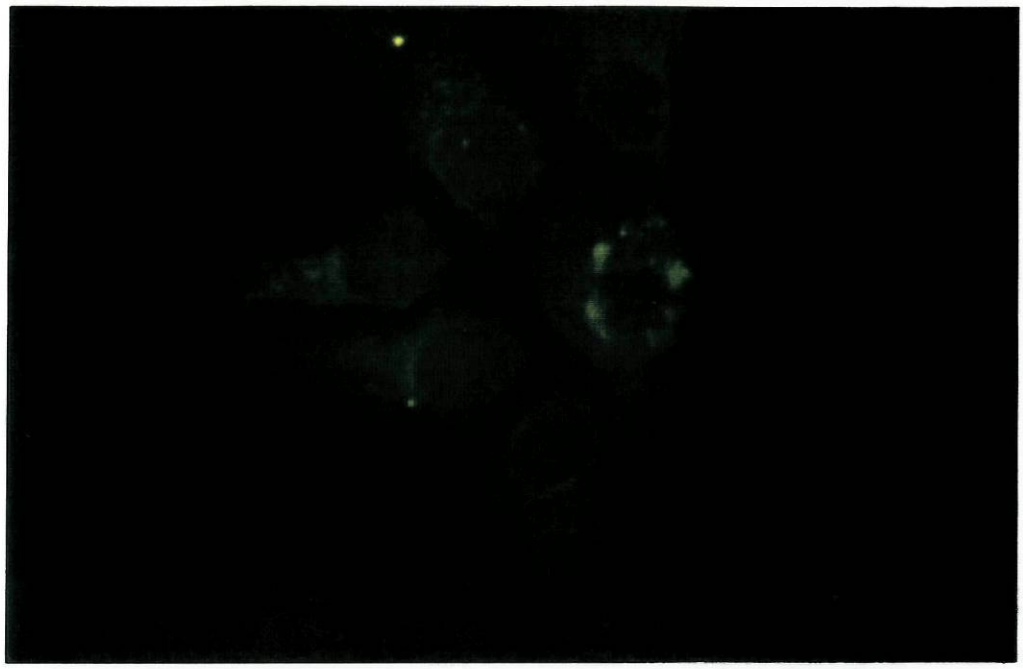


Figura 8 - Padrões de imunofluorescência das células HEp-2 em mitose e em interfase (A1) e coradas com Hoechst 33258 (A2). As células foram fixadas em 50% metanol e 50% acetona, durante 5 minutos a -20°C. **Grupo A** (mAb 228, diluído a 1:50) - forte coloração do nucléolo e citoplasma fracamente corado (interfase); marcação dos cromossomas condensados (mitose).

(B1)



(B2)

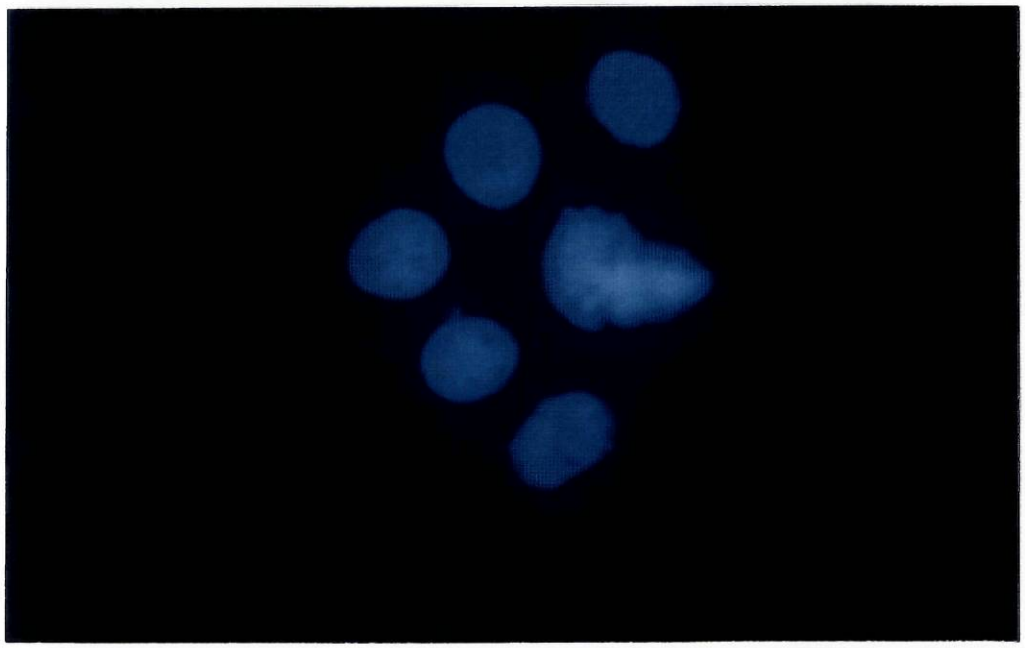
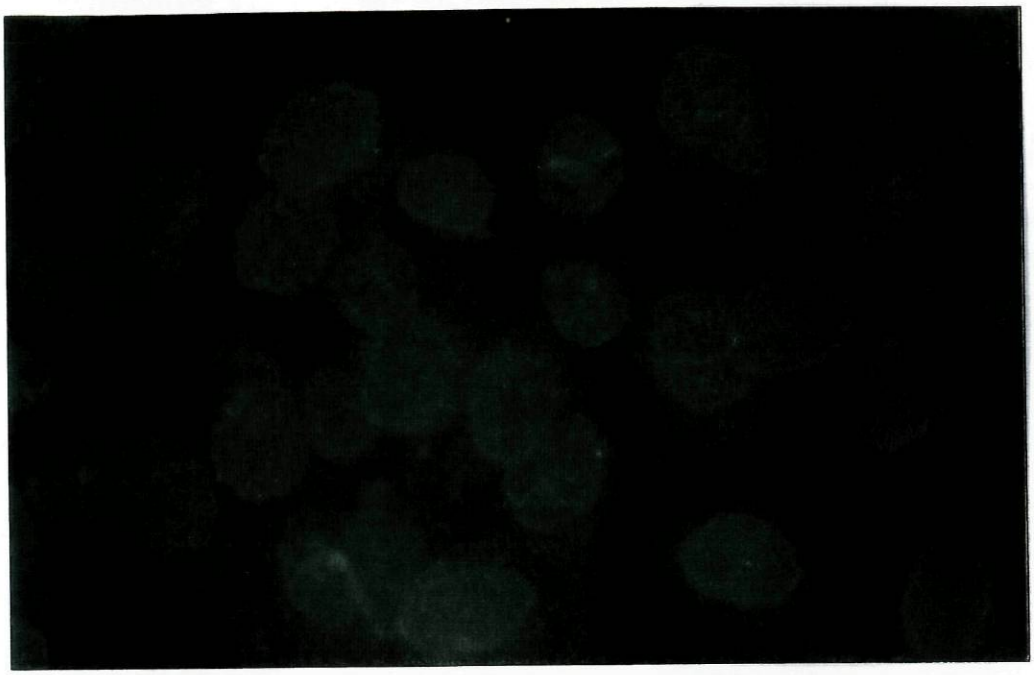


Figura 8 - Padrões de imunofluorescência das células HEp-2 em mitose e em interfase (B1) e coradas com Hoechst 33258 (B2). As células foram fixadas em 50% metanol e 50% acetona, durante 5 minutos a -20°C. **Grupo B** (mAb 406, diluído a 1:50) - coloração dos nucléolos, da membrana nuclear e o citoplasma aparece pontuado (interfase); material que rodeia os cromossomas condensados (mitose).

(C1)



(C2)

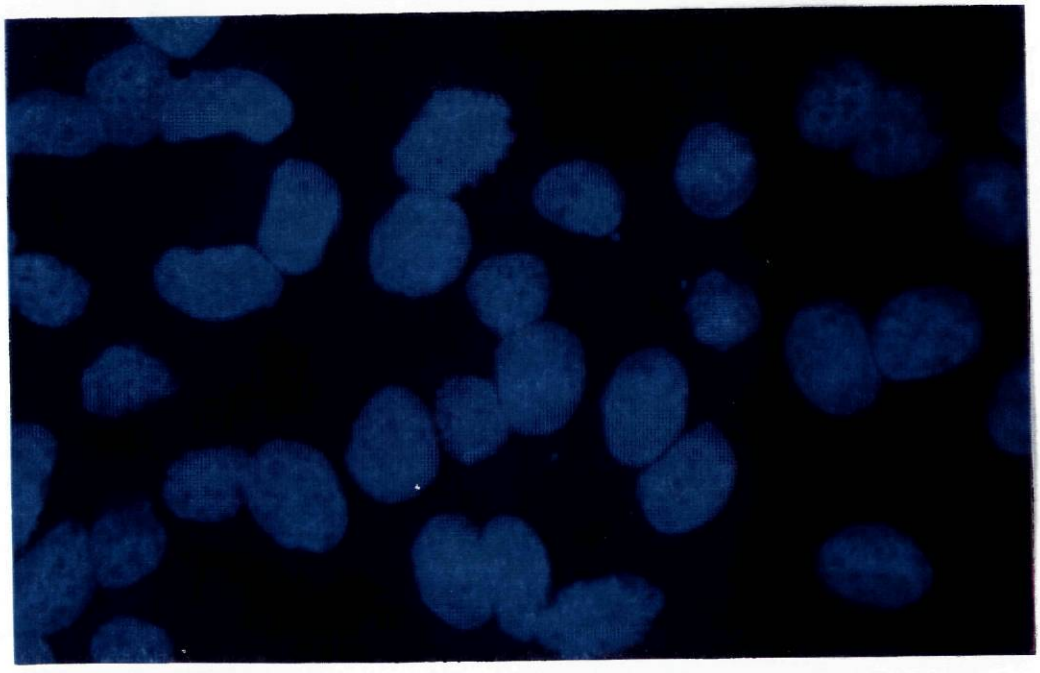


Figura 8 - Padrões de imunofluorescência das células HEp-2 em mitose e em interfase (C1) e coradas com Hoechst 33258 (C2). As células foram fixadas em 50% metanol e 50% acetona, durante 5, minutos a -20°C **Grupo C** (mAb 410, diluído a 1:50) - o núcleo está homogeneamente corado e a coloração da membrana nuclear e do citoplasma é fraca (interfase); marcação dos cromossomas condensados (mitose).

(D1)

(D2)

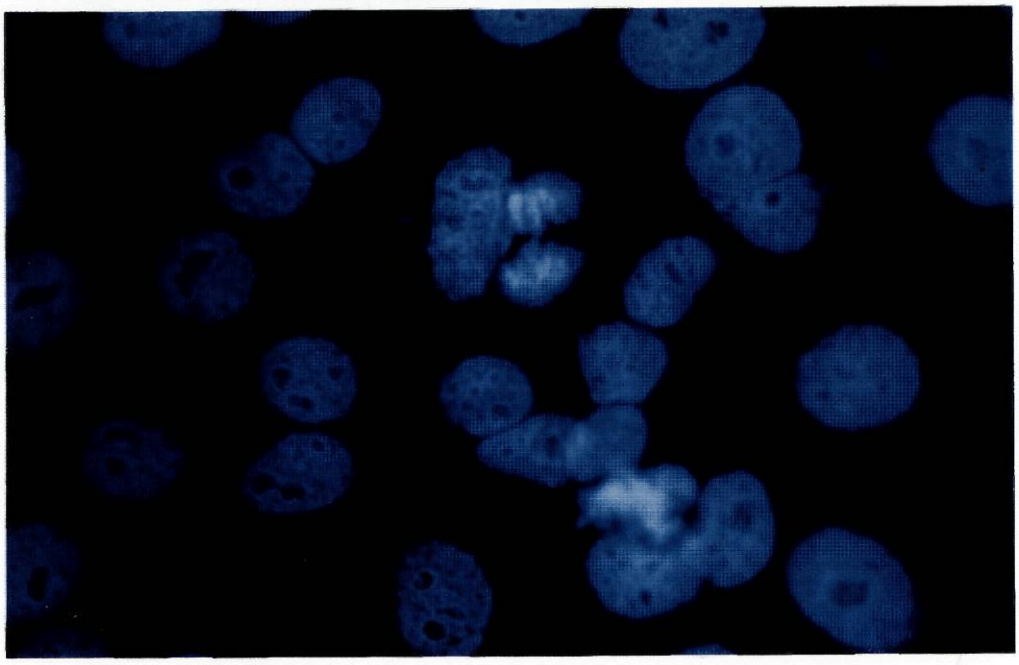
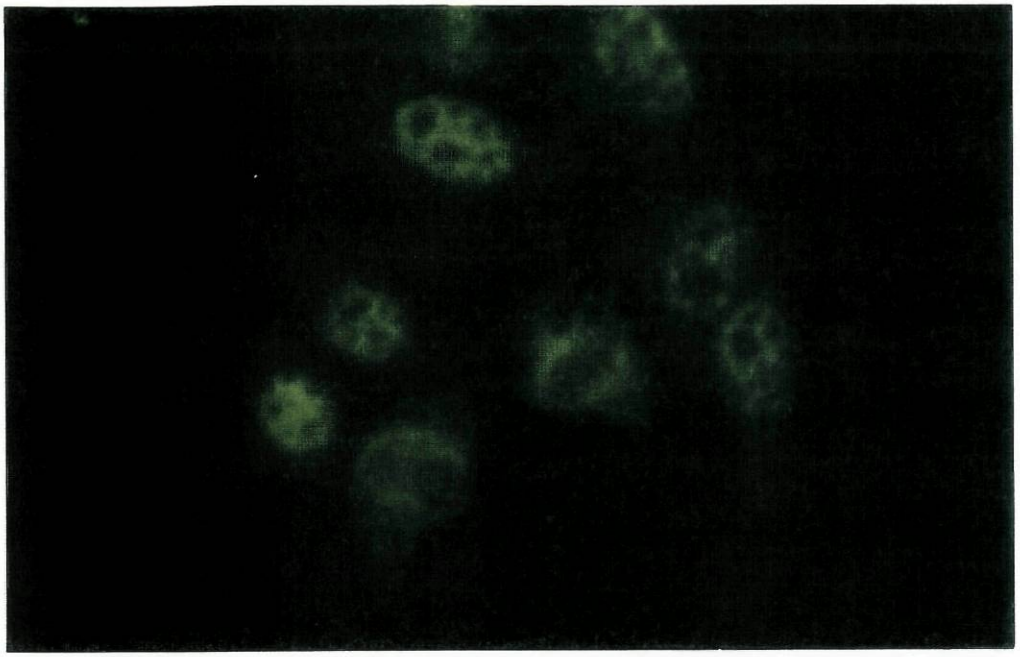


Figura 8 - Padrões de imunofluorescência das células HEp-2 em mitose e em interfase (D1) e coradas com Hoechst 33258 (D2). As células foram fixadas em 50% metanol e 50% acetona, durante 5 minutos a -20°C. **Grupo D** (mAb 233, diluído a 1:20) - o núcleo apresenta uma coloração granular, com maior intensidade à volta dos nucléolos (interfase); marcação dos cromossomas condensados (mitose).

(E1)



(E2)

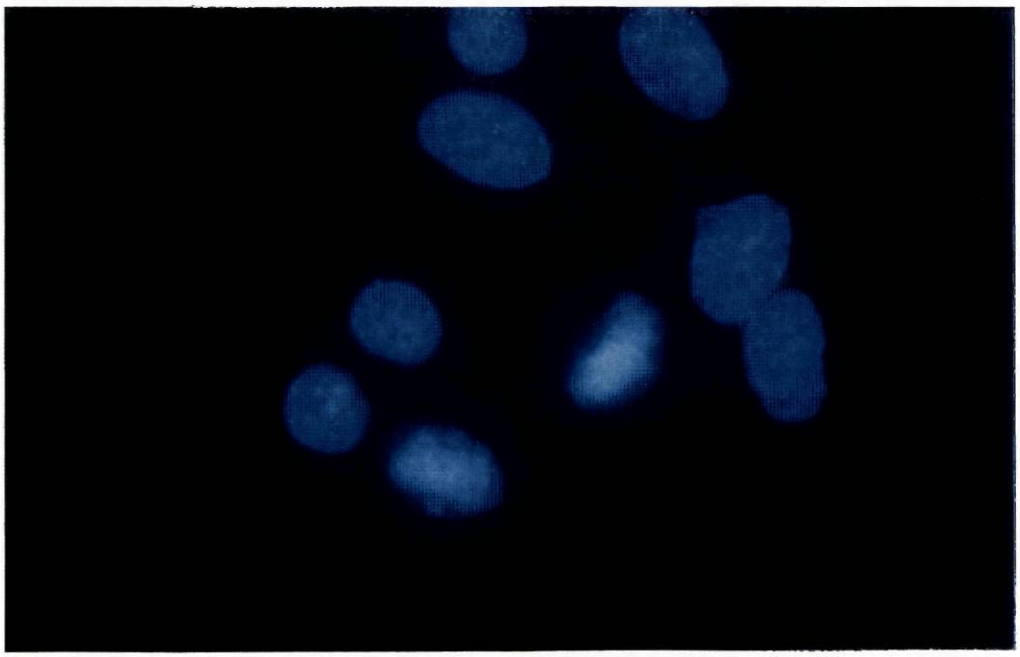


Figura 8 - Padrões de imunofluorescência das células HEp-2 em mitose e em interfase (E1) e coradas com Hoechst 33258 (E1). As células foram fixadas em 50% metanol e 50% acetona, durante 5 minutos a -20°C. **Grupo E** (mAb 423, diluído a 1:20) - a marcação nuclear homogénea exclui os nucléolos e citoplasma está fracamente corado (interfase); material que rodeia os cromossomas condensados (mitose).

Tabela 11 - Padrões de imunofluorescência em células HEp-2.

Grupo*	mAb	Interfase	Metafase/Anafase
A	228	nucléolos forte citoplasma fraco	cromossomas condensados
B	88, 406, 152	nucléolos, membrana nuclear e pontuado no citoplasma	material que rodeia os cromossomas condensados
C	33, 405, 410	núcleo homogéneo, membrana nuclear citoplasma fraco	cromossomas condensados
D	233, 212, 402, 112	núcleo granular e mais intenso à volta dos nucléolos	cromossomas condensados
E	423, 58	núcleo homogéneo excluindo os nucléolos e citoplasma fraco	material que rodeia os cromossomas condensados

(*) Grupos A, B, C, D e E correspondem aos grupos IV, V, I, II e III descritos por Morgan et al. 1985a.

Polipeptídeos reconhecidos pelos mAbs por "immunoblotting"

Os autoanticorpos de ratinhos com lupus eritematoso sistémico usados nos estudos de imunofluorescência foram inicialmente isolados de acordo com a afinidade exibida face a preparações de ADN. Contudo, os padrões de imunofluorescência em células HEp-2 mostraram que estes mAbs reconhecem um conjunto de antigénios que não estão apenas associados ao núcleo. Assim, os ensaios de "immunoblotting" foram efectuados de forma a determinar a natureza dos antigénios reconhecidos pelos mAbs de ratinhos com lupus em extractos proteicos totais, citoplasmáticos e nucleares de células HEp-2.

Os anticorpos usados reconhecem nos extractos totais um conjunto de polipeptídeos com pesos moleculares aparentes entre os 25 e os 210 kDa (Fig. 9). Existem três polipeptídeos com 130, 110 e 45 kDa que são reconhecidos por todos os mAbs testados, quer nos extractos citoplasmáticos quer nos extractos nucleares (tabela 12). Como controlos utilizaram-se soros humanos anti-Sm, anti-RNP, anti-SS-A e anti-SS-B, que reconhecem

polipeptídeos com pesos moleculares aparentes, respectivamente, de 28 kDa, 62 kDa, 52 kDa e 47 kDa.

Tabela 12 - Peso molecular aparente (kDa) dos antigénios reconhecidos pelos mAbs usados em extractos proteicos totais, citoplasmáticos (citop.) e nucleares (nucl.) de células HEp-2.

ANTICORPO			ANTIGÉNIOS (kDa) dos extractos		
Grupo	mAb	Classe	Totais	Citop.	Nucl.
A	228	(Ig G2a)	180, 170, 150, 130, 110, 90 80, 70, 60, 50, 45, 30-25		
B	88	(Ig G1)	130, 110, [80, 70, 60, 50, 45, 35]*	70	60
	406	(Ig G2a)	210, 180, 150, 130, 110, 90, 80, 70, 60, 50, 45, 30-25	70	90, 60
	152	(Ig G2a)	180, 170, 130, 110, 90, 80, 70, 60, 50, 45, 30-25	70	90, 60
C	405	(Ig G2a)	210, 180, 170, 150, 130, 110, 100, 80, 70, 60, 50, 45, 30-25	100, 70	80, 60
	410	(Ig G2a)	180,170, 150, 130, 120, 110, 100, 80, 70, 60, 50, 45, 30-25	100, 70	80, 60
D	233	(Ig G1)	180, 150, 130, 110, 90, [80, 70, 50, 45, 35]*, 30-25	90	80, 70, 50
	212	(Ig G2a)	180, 150, 130, 110, 90, 80, 70, 50, 45, 30-25	90	80, 70, 50
	402	(Ig G2a)	170, 150, 130, 110, 90, 80, 70 60, 50, 45, 35, 30, 28-25	—	80, 70, 50 35, 30
E	58	(Ig G2a)	210, 170, 150, 130, 120, 110 100, 90, 80, 60, 45, 35, 30-25	90, 80	
	423	(Ig G3)	210, 150, 130, 110, 100 90, 70, 45,30-25	90, 80	

(*) Assinalados com parênteses rectos encontram-se os pesos moleculares aparentes (kDa) dos antigénios que são eliminados após o tratamento dos mAbs (usados na forma de sobrenadantes das culturas) com DNAse.

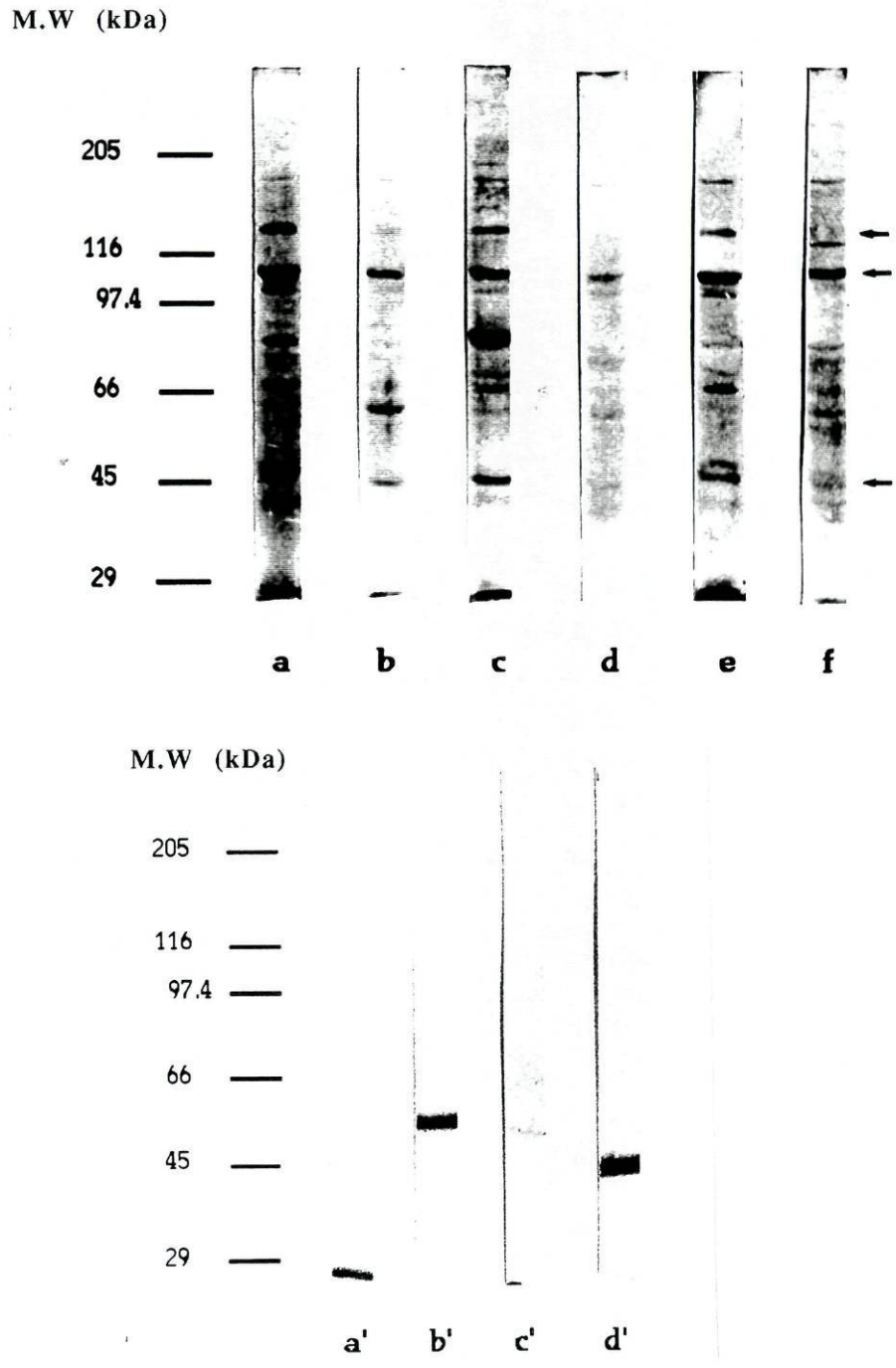


Figura 9 - (**A**) - Reactividade de seis mAbs, por "immunoblotting", contra extractos totais de células HEp-2 (em cada poço foram aplicados 50 μg de extractos proteicos totais). Os anticorpos foram usados numa diluição de 1:100: **a**-228, **b**-410; **c**-58; **d**-152; **e**- 233; **f**-405. Estes autoanticorpos reconhecem um conjunto de polipeptídeos com pesos moleculares aparentes que variam entre os 25 e os 210 kDa. Há três polipeptídeos com 130, 110 e 45 kDa que reagem com todos os mAbs (assinalado com setas).
(**B**) - "Immunoblotting" dos controlos: (**a'**) - soro anti-Sm diluído a 1:32; (**b'**) - soro anti-RNP diluído a 1:64; (**c'**) - soro anti-SS/A diluído a 1:200; (**d'**) - soro anti-SS/B diluído a 1:64. Foram usados como marcadores de peso molecular (Sigma): miosina (205 kDa), fosforilase b (97,4 kDa), albumina bovina (66 kDa), ovalbumina (45 kDa) e anidrase carbónica (29 kDa).

Os anticorpos do grupo A, tanto nas preparações citoplasmáticas como nas nucleares, reconhecem antigénios com pesos moleculares idênticos aos encontrados nos extractos totais. Dentro do grupo B, foram testados anticorpos que foram obtidos em fusões diferentes e que pertencem a classes imunoglobulínicas distintas. Estes mAbs reconhecem antigénios citoplasmáticos com a mesma massa molecular. No que respeita aos antigénios nucleares, os mAbs 406 e 152 reagem com um polipeptídeo adicional, relativamente ao único antigénio que reage com o mAb 88. Este resultado poderá estar relacionado com o facto do mAb 88 ter sido usado na forma de sobrenadante de cultura e portanto apresentar uma concentração em imunoglobulinas menor, enquanto que os mAbs 406 e 152 foram usados como líquido ascítico. Os anticorpos do grupo C pertencem à mesma classe imunoglobulínica, derivam da mesma fusão e reconhecem polipeptídeos com massas moleculares aparentes de 100 e 70 kDa, nos extractos citoplasmáticos, e de 80 e 60 kDa, nos extractos nucleares. No grupo D, apesar de um dos anticorpos (mAb 233) usados pertencer a uma classe imunoglobulínica diferente dos outros dois (mAb 212 e 402), todos eles reconhecem um antigénio de 90 kDa nos extractos citoplasmáticos e nos extractos nucleares reagem com três antigénios de 80, 70 e 50 kDa. A reactividade do mAb 402 face às preparações citoplasmáticas não foi determinada e nas preparações nucleares este anticorpo reconhece dois antigénios de 35 e 30 kDa, para além dos antigénios detectados pelos outros mAbs deste grupo. Finalmente, no grupo E existem dois antigénios de 90 e 80 kDa nos extractos citoplasmáticos, que são reconhecidos pelos dois mAbs testados e que também pertencem a classes imunoglobulínicas diferentes. Em todos os mAbs testados é comum a presença de polipeptídeos adicionais com pesos moleculares de 210, 180, 170 e 150 kDa detectados nos extractos totais quando a quantidade de antigénio aplicada é superior (80 a 100 µg/poço). Estes antigénios são detectados nos extractos citoplasmáticos (210, 180 e 170 kDa) e nos extractos nucleares (150 kDa).

Efeito do tratamento com DNase

Para se verificar se a reactividade apresentada pelos mAbs com os antigénios detectados no "immunoblotting" era devida a interacções não específicas dos anticorpos por fixação dos fragmentos de ADN aos seus locais de ligação, procedeu-se ao tratamento dos anticorpos com DNase. Os resultados obtidos mostraram que os antigénios com 80, 50 e 35 kDa dos extractos nucleares, e os antigénios com 70 e 35 kDa dos extractos citoplasmáticos, deixaram de ser detectados pelos anticorpos 233 e 88, que foram usados na forma de

sobrenadante. O antigénio com 35 kDa foi preferencialmente reconhecido quando estes anticorpos eram usados na forma de sobrenadantes. Nenhum dos anticorpos usado na forma de líquido ascítico mostrou alterações no "immunoblotting", após tratamento com DNase (Fig. 10).

Estes resultados evidenciam que muitas das reacções cruzadas, que caracterizam estes anticorpos, com as estruturas intracelulares estão dependentes do envolvimento do ADN. Assim, os polipeptídeos inicialmente reconhecidos pelos anticorpos não tratados com DNase provavelmente poderão corresponder a proteínas que se ligam ao ADN.

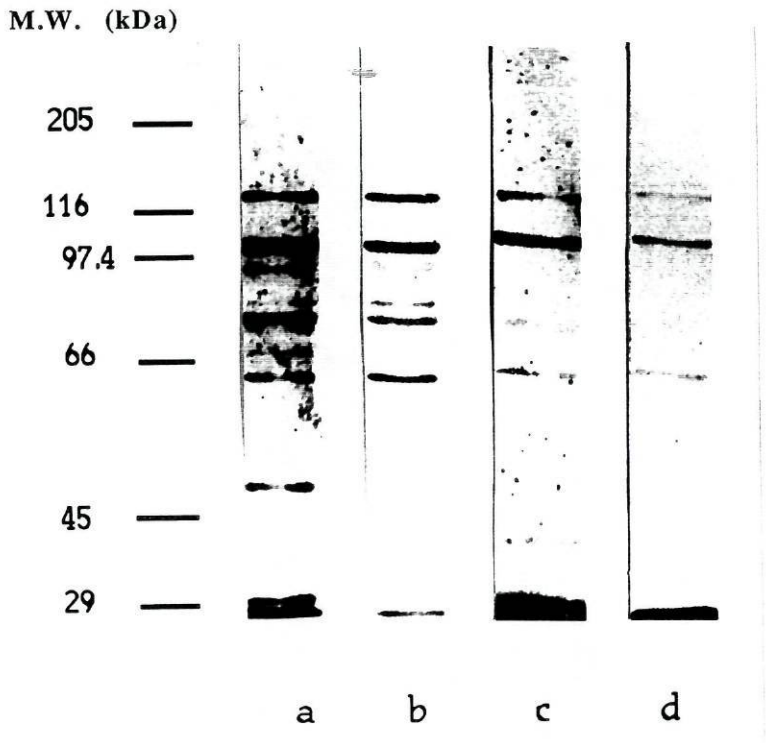


Figura 10 - "Immunoblotting" do efeito do tratamento da DNase no mAb 233 (sobrenadante) em extractos citoplasmáticos e nucleares de células HEp-2: (**a**)-extractos citoplasmáticos incubados com mAb não tratado com a DNase; (**b**)-extractos citoplasmáticos incubados com mAb tratado com a DNase; (**c**)-extractos nucleares incubados com mAb não tratado com a DNase; (**d**)-extractos nucleares incubados com mAb tratado com a DNase. Nos extractos citoplasmáticos os antigénios de 70 kDa e 35 kDa deixam de ser reconhecidos (**b**). Nos extractos nucleares os antigénios com, 80 kDa, 50 kDa e 35 kDa estão ausentes (**d**). Foram usados como marcadores de peso molecular (Sigma): miosina (205 kDa), fosforilase b (97,4 kDa), albumina bovina (66 kDa), ovalbumina (45 kDa) e anidrase carbónica (29 kDa).

Imunoprecipitação dos extractos marcados com [^{35}S]Met

Os extractos totais de células HEp-2 marcadas *in vivo* com [^{35}S]Met durante 6 horas foram imunoprecipitados com os anticorpos monoclonais. A maior sensibilidade da imunoprecipitação permite a identificação de antigénios que não são facilmente detectados por "immunoblotting". Este estudo foi efectuado com os mAbs 228, 152, 410, 212 e 58 que pertencem, respectivamente aos grupos A, B, C, D e E. Os resultados da imunoprecipitação evidenciaram que, em todos os grupos, a maioria dos antigénios reconhecidos por "immunoblotting" são também imunoprecipitados. A imunoprecipitação revelou a presença de três antigénios adicionais, com pesos moleculares aparentes de 85 kDa, 55 kDa e 43 kDa. O antigénio de 210 kDa também foi imunoprecipitado, embora a sua detecção por "immunoblotting" já tenha sido assinalada quando se utilizaram concentrações mais elevadas de extractos totais. A figura 11 mostra os antigénios imunoprecipitados pelos mAbs de cada grupo, em extractos marcados com [^{35}S]Met. Na tabela 13 estão descritos os pesos moleculares aparentes dos antigénios imunoprecipitados com os anticorpos dos vários grupos, na presença dos extractos totais marcados com [^{35}S]Met.

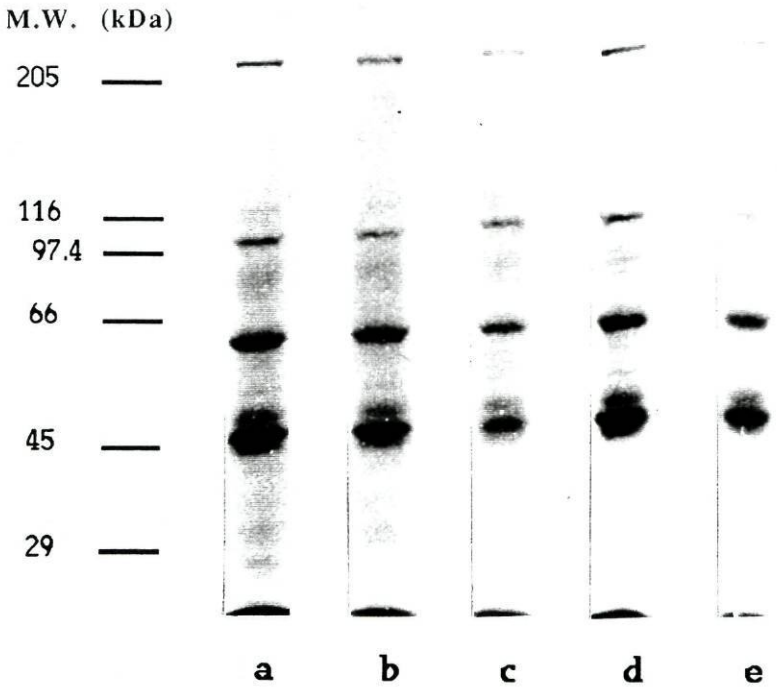


Figura 11 - Imunoprecipitação dos extractos totais das células HEp-2 marcados com [^{35}S]Met. Utilizaram-se os seguintes mAbs: 152 (**a**); 410 (**b**); 58 (**c**); 112 (**d**); e 228 (**e**). Foram usados como marcadores de peso molecular (Sigma): miosina (205 kDa), fosforilase b (97,4 kDa), albumina bovina (66 kDa), ovalbumina (45 kDa) e anidrase carbónica (29 kDa).

Tabela 13 - Peso molecular aparente (kDa) dos antigénios reconhecidos pelos mAbs por "immunoblotting", em extractos proteicos totais de células HEp-2, e por imunoprecipitação em extractos totais de células HEp-2 marcadas com [^{35}S]Met.

Grupo	mAb	"Immunoblotting"	Imunoprecipitação
A	228	180, 170, 150, 130, 110, 90 80, 70, 60, 50, 45, 30-25	210, 180, 170, 150, 130, 120, 110, 90 85, 80, 70, 60, 55, 50, 45, 43, 30-25
B	152	180, 170, 130, 110, 100, 90 80, 70, 60, 50, 45, 30-25	210, 180, 170, 150, 130, 120, 110, 90 85, 80, 70, 60, 55, 50, 45, 43, 30-25
C	410	180, 170, 150, 130, 110, 90 80, 70, 60, 50, 45, 30-25	210, 180, 170, 150, 130, 120, 110, 90 85, 80, 70, 60, 55, 50, 45, 43, 30-25
D	212	180, 150, 130, 110, 90 80, 70, 50, 45, 30-25	210, 180, 150, 130, 120, 110, 90 85, 80, 70, 60, 55, 50, 45, 43, 30-25
E	58	180, 150, 130, 110, 90 80, 70, 60, 50, 45, 30-25	210, 180, 150, 130, 120, 110, 90 85, 80, 70, 60, 55, 50, 45, 43, 30-25

Imunoprecipitação dos extractos marcados com [^{32}P]ortofosfato

De forma a determinar a presença de proteínas fosforiladas nos polipeptídeos reconhecidos pelos diferentes mAbs no ensaio de "immunoblotting", imunoprecipitaram-se os extractos totais das células HEp-2 marcadas *in vivo* com o fosfato inorgânico [^{32}P]. Os resultados obtidos demonstraram que muitos dos polipeptídeos reconhecidos pelos anticorpos de ratinhos com lupus são de facto fosforilados e apresentam pesos moleculares de 210, 180, 170, 130, 110, 90, 80, 60, 50, 45, 43, 35 e 30 kDa. A confirmação da presença de antigénios fosforilados foi evidenciada após o tratamento dos extractos marcados com [^{32}P]ortofosfato com 10 U/ml de fosfatase alcalina. A Figura 12 mostra os antigénios imunoprecipitados pelos mAbs dos grupos A, B e C em extractos proteicos totais marcados com [^{32}P]ortofosfato e a tabela 14 apresenta o peso molecular aparente desses antigénios.

Tabela 14 - Peso molecular aparente (kDa) dos antigénios imunoprecipitados pelos mAbs nos extractos proteicos totais de células HEp-2 marcadas *in vivo* com [^{35}S]Met e [^{32}P] ortofosfato .

Grupo	mAb	[^{35}S]Met	[^{32}P] ortofosfato
A	228	210, 180, 170, 150, 130, 120, 110, 90 85, 80, 70, 60, 55, 50, 45, 43, 30-25	210, 170, 130, 110, 90 80, 60, 50, 45, 30
B	152	210, 180, 170, 150, 130, 120, 110, 90 85, 80, 70, 60, 55, 50, 45, 43, 30-25	210, 170, 130, 110, 90 80, 60, 50, 45, 30
C	410	210, 180, 170, 150, 130, 120, 110, 90 85, 80, 70, 60, 55, 50, 45, 43, 30-25	210, 170, 130, 110, 90 80, 50, 45, 30
D	212	210, 180, 150, 130, 120, 110, 90 85, 80, 70, 60, 55, 50, 45, 43, 30-25	210, 180, 130, 110, 80 70, 55, 45, 30-25
	402	170, 150, 130, 110, 90, 80, 70, 60, 50, 45, 35, 30, 28-25	210, 170, 130, 110, 80 70, 55, 45, 35, 30
E	58	210, 180, 150, 130, 120, 110, 90 85, 80, 70, 60, 55, 50, 45, 43, 30-25	210, 180, 130, 110, 80 70, 50, 45, 43, 30

Reconhecimento de epítopos fosforilados pelos mAbs

Uma vez que a maioria das bandas reconhecidas pelos anticorpos correspondiam a proteínas fosforiladas, procurou-se verificar se a capacidade de reacção dos autoanticorpos com o conjunto de antigénios detectados no "immunoblotting" poderia ser alterada com o pré-tratamento dos extractos celulares totais com fosfatase alcalina. Usando concentrações crescentes de fosfatase alcalina (de 0,01 a 10 U/ml) verificaram-se duas situações. Numa, deixava de haver reconhecimento de alguns antigénios. Noutra, os antigénios reconhecidos apresentavam uma diminuição do seu peso molecular aparente. O tratamento dos extractos totais com 0,01 U/ml de fosfatase alcalina eliminou a reactividade do mAb 405 com os antigénios de 150, 100 e 70 kDa, enquanto que nos extractos não tratados todos estes antigénios continuaram a ser reconhecidos. Com 0,1 U/ml de fosfatase alcalina os antigénios com 110 e 45 kDa continuam a ser reconhecidos, embora apresentem pesos

moleculares de 105 e 42 kDa. Quando se usou a enzima numa concentração de 1 U/ml apenas foi reconhecido o antigénio de 100 kDa. A incubação com 10 U/ml de fosfatase alcalina remove toda a reactividade dos mAbs inicialmente apresentado no "western blot".

O decréscimo progressivo da reactividade por parte dos mAbs, assim como as alterações no peso molecular aparente dos antigénios que continuam a ser reconhecidos, depois do tratamento com concentrações crescentes de fosfatase alcalina indicam claramente que estes autoanticorpos reconhecem epítopos fosforilados. Os resultados obtidos com o mAb 228, do grupo A, e o mAb 405, do grupo C, são apresentados na figura 13 e 14.

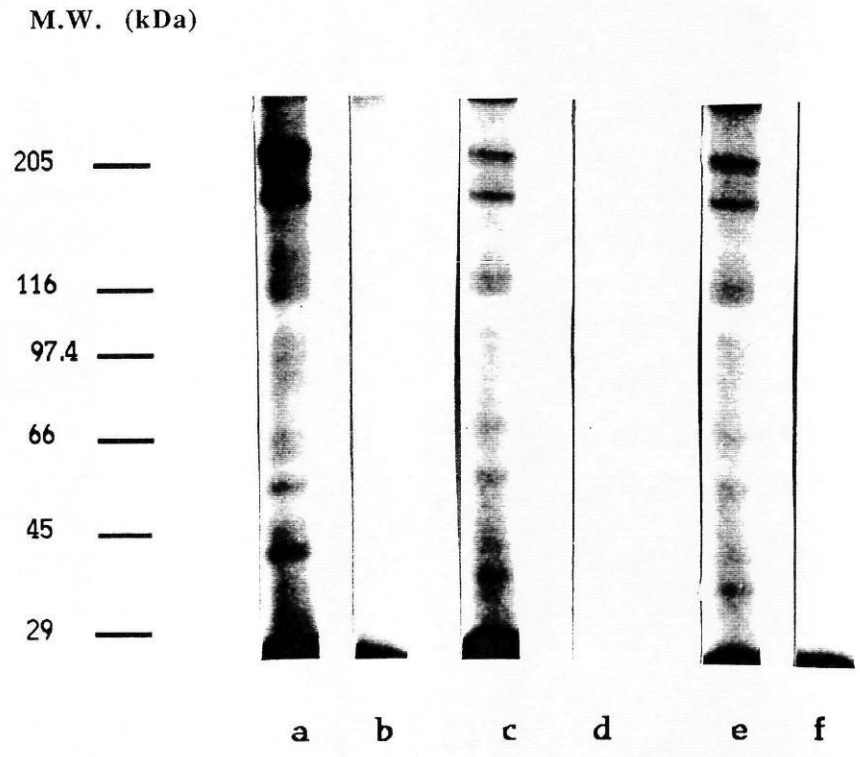


Figura 12 - Imunoprecipitação dos extractos proteicos totais das células HEp-2 (50 µg/poço) marcados com [^{32}P]ortofosfato, não tratados (**a**, **c** e **e**) e tratados (**b**, **d** e **f**) com 10 U/ml de fosfatase alcalina. Utilizaram-se os seguintes mAbs: 228 (**a** e **b**); 152 (**c** e **d**); e 410 (**e** e **f**). Gel de SDS-PAGE a 12,5%. Foram usados como marcadores de peso molecular (Sigma): miosina (205 kDa), fosforilase b (97,4 kDa), albumina bovina (66 kDa), ovalbumina (45 kDa) e anidrase carbónica (29 kDa).

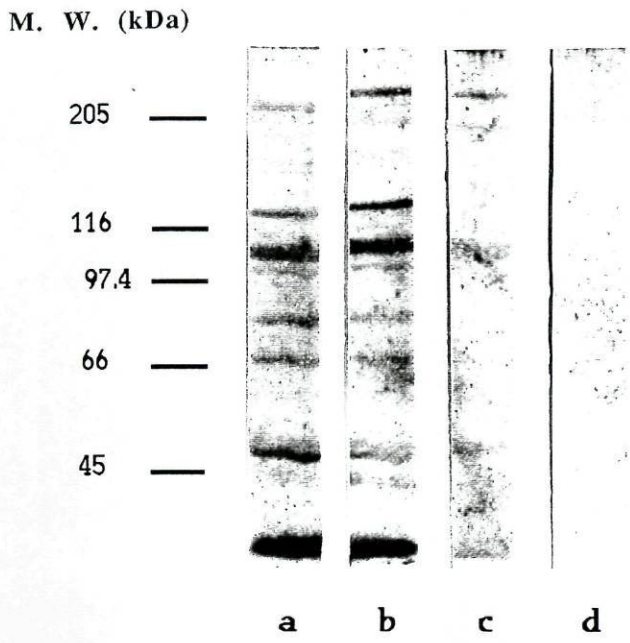


Figura 13 - "Immunoblotting" dos extractos proteicos totais de células HEp-2 (50 µg/poço) não tratadas (**a**) e tratadas com 0,01 U/ml (**b**), 0,1 U/ml (**c**) e 1 U/ml (**d**) de fosfatase alcalina e na presença do mAb 228 usado numa diluição de 1:100. Gel de SDS- PAGE 12,5 %. Foram usados como marcadores de peso molecular (Sigma): miosina (205 kDa), fosforilase b (97,4 kDa), albumina bovina (66 kDa), ovalbumina (45 kDa) e anidrase carbónica (29 kDa).

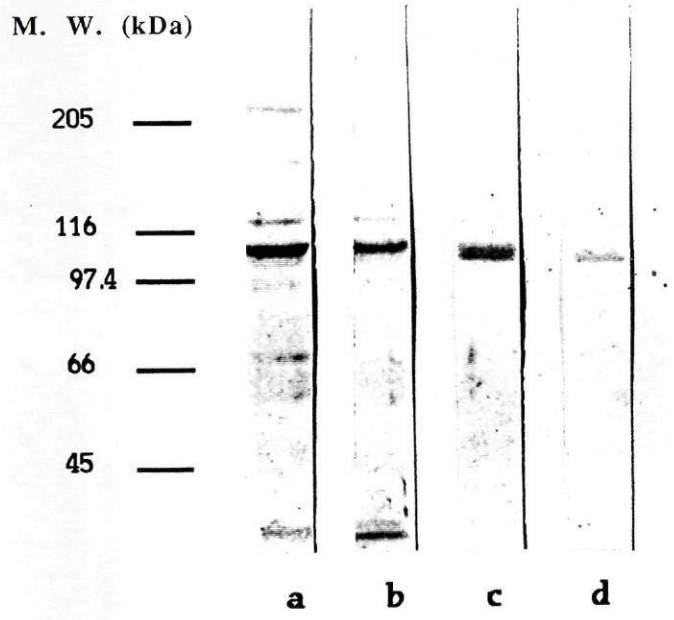


Figura 14 - "Immunoblotting" dos extractos proteicos totais de células HEp-2 (50 µg/poço) não tratadas (**a**) e tratadas com 0,01 U/ml (**b**), 0,1 U/ml (**c**) e 1 U/ml (**d**) de fosfatase alcalina e na presença do mAb 405 usado numa diluição de 1/100. Gel de SDS- PAGE 12,5 %. Foram usados como marcadores de peso molecular (Sigma): miosina (205 kDa), fosforilase b (97,4 kDa), albumina bovina (66 kDa), ovalbumina (45 kDa) e anidrase carbónica (29 kDa).

DISCUSSÃO

O síndrome autoimune desenvolvido pelos ratinhos da espécie MRL/*lpr* e BWF1 apresenta características serológicas e patológicas muito semelhantes às que se manifestam no lupus humano (Tan, 1989). Os autoanticorpos característicos desta doença reconhecem um conjunto de antigénios diversificado, em que alguns têm sido referidos como sendo os mais específicos desta doença (Sm e ADNcd), enquanto que outros estão presentes neste e noutros síndromes autoimunes (Chan et al. 1989; Tan, 1989). Além disso, a reactividade destes autoanticorpos parece depender da origem étnica e/ou genética da cada indivíduo (Abuaf et al. 1990) e mesmo para cada indivíduo os padrões de reactividade variam significativamente (Wesierska-Galek et al. 1990). Estas características são compartilhadas pelos autoanticorpos de ratinhos que desenvolvem o lupus.

No estudo efectuado procurou-se determinar a reactividade de vários autoanticorpos de ratinhos MRL/*lpr* e BWF1 relativamente aos componentes dos extractos proteicos de células HEp-2, por técnicas de "immunoblotting" e imunoprecipitação, e aos antigénios das células HEp-2 em diferentes fases do ciclo celular, por imunofluorescência. Os autoanticorpos destes ratinhos foram classificados em vários grupos tendo em conta a sua reactividade com diferentes estruturas subcelulares, polinucleótidos, mononucleótidos e nucleósidos purificados (Morgan et al. 1985a). As imunofluorescências efectuadas com estes autoanticorpos não só confirmaram os resultados anteriores, mas também revelaram que os antigénios reconhecidos pelos mesmos apresentavam uma distribuição particular ao longo do ciclo celular.

Nas células em interfase estes autoanticorpos evidenciaram a presença de cinco padrões de imunofluorescência distintos (tabela 11) que apresentam características específicas. Resumidamente: no grupo A (mAb 228), a marcação obtida é essencialmente nucleolar; no grupo B (mAbs 88, 406 e 152), os antigénios reconhecidos encontram-se dispersos pelo nucléolo, membrana nuclear e citoplasma; no grupo C (mAbs 33, 405 e 410), o núcleo apresenta uma coloração homogénea e mais acentuada na periferia do mesmo; no grupo D (mAbs 402, 112, 233 e 212), a marcação nuclear é pontuada, sendo mais intensa à volta dos nucléolos; no grupo E (mAbs 423 e 58) a marcação é nuclear, exclui os nucléolos, e no citoplasma a intensidade da coloração é fraca. Durante a mitose, os padrões de coloração dos anticorpos dos grupos A, C e D são restritos aos cromossomas metafásicos condensados. Os anticorpos dos grupos B e E marcam o material que rodeia a superfície dos cromossomas em metafase. Esta marcação dos grupos B e E já foi descrita

para um conjunto de ribonucleoproteínas nucleolares (Gautier et al. 1992a).

A ligação inespecífica a determinados constituintes celulares por parte dos anticorpos em geral pode condicionar a interpretação e a análise de um resultado. Contudo, este tipo de ligação pode ser eliminado sujeitando as células a uma breve exposição a detergentes, antes da fixação. Este tratamento permite que haja uma reacção antigénio-anticorpo mais específica (Riabowol et al. 1989). Deste modo, comparou-se a reactividade dos mAbs em células tratadas e não tratadas com detergente e verificou-se que os padrões de imunofluorescência se mantiveram. A única diferença a assinalar reflectiu-se na menor quantidade de anticorpo utilizada nas células tratadas para se obter o mesmo tipo de marcação.

Alguns anticorpos associados a diferentes doenças autoimunes evidenciaram padrões de imunofluorescência variados nas células em interfase ou em mitose. A fibrilarina, detectada com soros de doentes com esclerose sistémica, é um antigénio nucleolar das células em interfase e liga-se à totalidade da superfície do cromossoma, com excepção do centrómero, desde o início da profase até ao final da anafase. Na telofase, faz parte dos corpos pré-nucleolares que mais tarde vão constituir os nucléolos (Ochs et al. 1985). Este tipo de marcação é compartilhado pelo antigénio Pm-Scl, que também foi identificado com soros de doentes com esclerose sistémica (Reimer et al. 1986). O antigénio NOR-90, reconhecido com soros de várias doenças autoimunes, é detectado a nível dos cromossomas metafásicos e no nucléolo das células em interfase (Rodrigo-Sanchez et al. 1987). As subunidades do antigénio Ku (p80/p70), reconhecidas com soros de doentes com lupus e com esclerodermia/polimiosite, localizam-se no nucléolo das células em interfase e nas células em mitose cada uma destas subunidades tem uma localização diferente (Higashiura et al. 1992; Li et al. 1992). A p70 está associada aos cromossomas (Higashiura et al. 1992) e a p80 marca o material que rodeia os cromossomas (Li et al. 1992). Diferentes soros autoimunes reactivos com o núcleo e fuso mitótico permitiram a identificação da proteína NuMA. A isoforma p230 deste antigénio marca o núcleo das células em interfase, com excepção do nucléolo, tendo no início da profase uma localização pericentrossomal e com o decorrer da mitose passa a estar associada aos pólos do fuso. As isoformas p194 e p195 do antigénio NuMA localizam-se no citoplasma, junto à região centrossómica, das células em interfase, e na mitose movem-se para o fuso (Yang et al. 1992a, b; Compton et al. 1992; Tang et al. 1994). O antigénio MSA-36, isolado com soros autoimunes variados, tem um localização nuclear nas células em interfase, mas à medida que a mitose progride encontra-se associado aos cromossomas e cinétocoro na metafase, ao fuso na anafase, e ao corpo médio na telofase (Rattner et al. 1992). O antigénio Scl-70, detectado com soros de doentes com esclerodermia, tem uma distrubuição nuclear e nucleolar nas células em interfase, enquanto

que nas células em mitose marca os cromossomas condensados e a região organizadora nucleolar, o que corresponde ao padrão de imunofluorescência característico da topoisomerase I (Guldner et al. 1986). Dentro dos padrões de imunofluorescência obtidos com os autoanticorpos caracterizados neste estudo os que apresentam uma marcação semelhante às descritas são os dos grupos A, B e E. Os mAbs do grupo A, nas células em interfase, exibem uma marcação semelhante à subunidade p70 do antigénio Ku, enquanto que os mAbs do grupo B mostram uma marcação idêntica à subunidade p80 do antigénio Ku. Os mAbs do grupo E só compartilham a distribuição antigénica da subunidade p80 do antigénio Ku nas células em mitose.

Existem outros padrões de imunofluorescência evidenciados com anticorpos monoclonais (MPM-1, MPM-2 e MPM-13), não autoimunes, que foram induzidos utilizando extractos de células em mitose. O mAb MPM-13 reconhece os antigénios da área perinuclear de células HeLa em interfase, e os pólos do fuso das células em metafase e anafase. A marcação pericentriolar foi detectada em células humanas, de ratinho, de hamster chinês e de ouriço do mar (Rao et al. 1989). O MPM-1 reage com antigénios cromossomais das células em mitose e reconhece o núcleo das células em interfase (Davis et al. 1983). O MPM-2 reage com o núcleo das células em profase e durante a mitose reconhece estruturas associadas ao aparelho mitótico como os centrossomas, os cinetocoros e o corpo médio (Vandré et al. 1984; Vandré et al. 1989; Vandré et al. 1991). Os antigénios INCENP (Cooke et al. 1987) e a CENP-E (Yen et al. 1991, 1992) foram identificados com anticorpos monoclonais de ratinho obtidos contra o "scaffold" cromossómico. Os antigénios INCENP durante a pró-metafase e metafase estão intimamente associados aos cromossomas, mas na anafase separam-se dos cromossomas e mantêm-se na porção média do fuso, enquanto que na citocinese concentram-se no corpo médio. Na interfase estes antigénios encontram-se distribuídos no núcleo, de uma forma granular (Cooke et al. 1987). A CENP-E está associada à região centromérica dos cromossomas metafásicos e não é detectada nas células em interfase (Yen et al. 1991). Nenhum dos autoanticorpos de ratinho com lupus usados neste estudo mostrou uma localização específica com as estruturas associadas ao aparelho mitótico já anteriormente descritas para os soros de doentes com CREST (Tan, 1989; Balczon, 1993) e apenas os mAbs do grupo C revelam um padrão de imunofluorescência semelhante ao MPM-1.

O tratamento com DNAse foi efectuado com o objectivo de eliminar fragmentos de ADN bloqueadores dos locais de ligação dos anticorpos. Como se sabe estes fragmentos de ADN resultam da morte celular durante a produção de anticorpos monoclonais (Brinkman et al. 1989). A adição de DNAse aos sobrenadantes das culturas dos mAbs 88 e 233 permitiu verificar que alguns antigénios citoplasmáticos (70 e 35 kDa) e nucleares (80, 50 e 35 kDa)

deixavam de ser reconhecidos por estes mAbs. Isto indica que algumas das reacções cruzadas dos anticorpos que ligam o ADN com estruturas intracelulares dependem da ocupação pelo ADN dos seus locais de ligação. Neste estudo verificou-se que o tratamento dos mAbs (sobrenadantes das culturas ou líquido ascítico) com DNAse foi efectivo dado que melhorou significativamente a qualidade dos "blots" e diminuíu o "background" da coloração. Contudo, nenhum dos mAbs usados com origem em líquido ascítico modificou o padrão de "immunoblotting" depois do tratamento com a DNAse.

Apesar destes anticorpos terem sido selecionados pela sua capacidade de se ligarem a preparações antigénicas de ADN, verificou-se que os mAbs de ratinho reconhecem outros antigénios nas células humanas, tanto em interfase como em mitose, e vários componentes das preparações proteicas nucleares e citoplasmáticas. Para além disso, reconhecem múltiplos antigénios nos extractos totais de células HEp-2 e alguns com epítopos fosforilados, que eventualmente poderão representar os antigénios reconhecidos por imunofluorescência. Por "immunoblotting", estes mAbs reconhecem um conjunto de polipeptídeos com massas moleculares aparentes entre os 25 e 210 kDa. Existem três polipeptídeos comuns a todos os mAbs testados e que apresentam pesos moleculares de 130, 110 e 45 kDa. A reacção com qualquer dos antigénios detectados no "immunoblotting" não parece estar directamente relacionada com o padrão de imunofluorescência, uma vez que é uma característica comum dos mAbs dos vários grupos. Adicionalmente, a classe imunoglobulínica a que pertencem ou o processo de fusão que os originou não parece afectar os perfis de antigénios reconhecidos pelos autoanticorpos de cada grupo. A presença de bandas comuns nos extractos citoplasmáticos e nucleares pode estar relacionada com o facto de não terem sido usadas células sincronizadas.

As células HEp-2 foram marcadas com [^{32}P]ortofosfato com o objectivo de determinar se alguns dos antigénios reconhecidos pelos anticorpos monoclonais em estudo eram fosfoproteínas. A imunoprecipitação do lisado celular marcado com [^{32}P]ortofosfato mostrou que muitos dos antigénios reconhecidos no "immunoblotting" estavam fosforilados (tabela 14). Estes polipeptídeos não incluem todos os que são imunoprecipitados após a marcação com a [^{35}S]Met, o que sugere que nem todos os antigénios são fosforilados, ou que a forma fosforilada daqueles que não foram detectados poderia não estar suficientemente representada no lisado celular. Dentro dos antigénios que foram fosforilados, encontram-se os polipeptídeos com 130, 110 e 45 kDa e provavelmente a base da reacção dos anticorpos monoclonais com estes antigénios e com o ADN poderá estar relacionada com o reconhecimento de grupos fosfato destas moléculas. Verificou-se que muitos destes antigénios eram na realidade fosfoproteínas, pelo tratamento dos "blots" de nitrocelulose e

dos lisados celulares, antes do SDS-PAGE, com quantidades crescentes de fosfatase alcalina. Demonstrou-se que concentrações crescentes de fosfatase alcalina foram responsáveis pela diminuição da reactividade dos anticorpos monoclonais, assim como pelas modificações dos pesos moleculares aparentes dos antigénios reconhecidos. Estes resultados levam-nos a concluir que alguns dos autoanticorpos caracterizados reconhecem um conjunto de antigénios através da presença de epítopos fosforilados.

A fosforilação e desfosforilação é mecanismo de modificação pós-tradução que altera a conformação de proteínas e tem uma função essencial na regulação de determinados processos celulares, entre eles o ciclo celular. Existem vários antigénios identificados com soros autoimunes que apresentam epítopos fosforilados: os antigénios com 20 kDa e 80 kDa detectados com soros anti-Pm-Scl (Reimer et al. 1986); o antigénio La, detectado com os soros de doentes com o síndrome de Sjögren's e LES (Gottlieb et al. 1989a, b); a nucleolina, detectada com soros de doentes com lupus e com outras doenças autoimunes (Minota et al. 1991); a proteína RMSA-1 isolada com soro de uma doente com lupus (Yeo et al. 1994); o antigénio NOR-90, detectado com soros de doentes com esclerose sistémica (Imai et al. 1994). A proteína RMSA-1 para além de apresentar três locais susceptíveis de serem fosforilados pela cinase *cdc2*, está associada a mais três antigénios com 31 kDa, 67 kDa e 200 kDa. A transfecção de ARN "anti-sense" ou a electroporação do anticorpo que reconhece este antigénio em fibroblastos de ratinho demonstrou que a formação do fuso não se processa, apesar dos centrossomas terem duplicado, o que sugere uma função essencial desta proteína na progressão do ciclo celular (Yeo et al. 1994a). Os anticorpos monoclonais obtidos contra extractos de células mitóticas, como o MPM-1 e MPM-2, também reconhecem múltiplos antigénios que estão ligados ao ciclo celular através de processos que envolvem fosforilações e desfosforilações (Davis et al. 1983; Vandré et al 1984; Vandré et al. 1991).

A especificidade dos autoanticorpos parece ser condicionada pelas mutações somáticas de que são alvo, tal como as restantes imunoglobulinas, e que podem ser determinantes nas reacções cruzadas que estes anticorpos expressam com antigénios de diferente natureza (Pisetsky et al. 1990; Shlomckick et al. 1990; Tillman et al. 1992; Drake et al. 1992; Stollar, 1994; Isenberg et al. 1994). Por outro lado, a aparente diversidade de reacções que caracterizam os autoanticorpos presentes no soro de doentes lupus e nos animais que desenvolvem esta doença tem sido atribuída ao reconhecimento de antigénios que têm na sua constituição uma elevada frequência de segmentos altamente carregados, tanto na forma de cadeias extensas como na forma de aglomerados (Netter et al. 1990; Bini et al. 1990, Brendel et al. 1991), que podem conduzir ao estabelecimento de pontes de hidrogénio, nomeadamente com moléculas de ADN (Eilat, 1985). Para além destes factores, será

necessário não esquecer que os mAbs são dirigidos para uma pequena sequência peptídica, o que determina a possibilidade de se obterem falsos positivos, pelo facto de proteínas diferentes apresentarem pequenas regiões homólogas a esse determinante antigénico, cuja exposição pode ser condicionada pela conformação que as mesmas adquirem. A comparação da estrutura dos autoantigénios poderá vir a elucidar a base estrutural da reactividade cruzada que os autoanticorpos revelam em compartilharem determinantes antigénicos comuns.

Os resultados obtidos permitem apresentar várias conclusões. 1) Os mAbs caracterizados reconhecem preferencialmente antigénios citoplasmáticos e nucleares que não estão necessariamente associados ao ciclo celular, mas cuja distribuição é susceptível de reorganização conforme as células estão em mitose ou em interfase, como foi verificado por imunofluorescência. 2) Como já foi previamente descrito estes autoanticorpos reconhecem proteínas de variados pesos moleculares e especificidade diversa. 3) A imunoprecipitação de alguns antigénios que não foram detectados no "western blot" sugere que a concentração dos mesmos é muito baixa. 4) Alguns dos antigénios são fosfoproteínas e os epítopos através dos quais são reconhecidos estão fosforilados. A reactividade destes autoanticorpos com fosfoproteínas e com o ADN, poderá eventualmente resultar do reconhecimento de grupos fosfatos que existem nestas proteínas e que estão dispostos na parte externa da molécula de ADN. 5) Os antigénios que sofrem modificações do seu peso molecular aparente, quando tratados com fosfatase alcalina, indicam que os epítopos podem ou não estar fosforilados.

III - ISOLAMENTO DE GENES QUE CODIFICAM PARA ANTIGÉNIOS RECONHECIDOS POR SOROS AUTOIMUNES

INTRODUÇÃO

A caracterização dos vários soros autoimunes de ratinhos portadores de lupus permitiu constatar que estes soros reagiam com antigénios citoplasmáticos e nucleares de células humanas, apesar de inicialmente terem sido selecionados pela sua capacidade de reacção com o ADN. Este facto confirma a presença de epítopos comuns entre o homem e o ratinho e a existência da reactividade cruzada exibida por muitos destes autoanticorpos (Shoenfield et al. 1983a, b; Morgan et al. 1985b; Watts et al. 1991). Os soros autoimunes analisados foram divididos em cinco grupos em função dos padrões de imunofluorescência característicos que revelaram nas células em interfase, uma vez que nas células em mitose só foram obtidos dois padrões (Bronze-da-Rocha et al. 1992). Esta associação com o ciclo celular determinou a escolha de dois autoanticorpos com padrões de imunofluorescência distintos nas células em metafase, uma vez que a utilização de soros autoimunes tem permitido a identificação de autoantigénios e de proteínas que têm funções essenciais no decorrer de variados processos celulares. Tanto a identificação de autoantigénios ou de antigénios, como o isolamento dos respectivos genes, tem sido proporcionada pelo desenvolvimento e aperfeiçoamento das técnicas de ADN recombinante. Estas técnicas têm tido uma importância fundamental na identificação e no estudo dos genes, possibilitando ainda a análise da sua estrutura e regulação, a identificação de mutações associadas a várias doenças, o melhoramento de plantas e animais, ou a produção de vacinas e de proteínas.

A existência de bibliotecas de cADN em vectores de expressão procariotas tem permitido o isolamento de genes, tendo como base o reconhecimento das proteínas de fusão, expressas pelos genes inseridos nesses vectores, por soros autoimunes ou não. As bibliotecas de expressão podem ser construídas em vectores plasmídicos ou em derivados do bacteriófago λ. Estes vectores devem ter um promotor procariota, regulável e forte, um local de ligação ao ribossoma e marcadores específicos de seleção (resistência a antibióticos). Geralmente as sequências de ADN estranhas ao vector são clonadas num local de restrição que se situa dentro das sequências codificantes do gene (ou fragmento de um gene) procariota e imediatamente a jusante do local do promotor e do local de ligação ao ribossoma. A maioria destes vectores de expressão tem na sua constituição o gene procariota *lacZ* da *E. coli*, que codifica para a enzima β-galactosidase. Quando a inserção do ADN que se pretende clonar é feita na orientação e quadro de leitura correctos é possível a expressão de uma proteína de fusão constituída pela β-galactosidase (no terminal amino) seguida do polipeptídeo codificado pelo ADN clonado (no terminal carboxílico). As colónias

(no caso de plasmídeos) ou as placas fágicas (no caso do bacteriófago λ) obtidas são depois selecionadas através da reacção específica do anticorpo com a proteína que este reconhece. As bibliotecas de expressão em plasmídeos apresentam uma vantagem relativamente às que são feitas no bateriófago λ, uma vez que as condições da lise bacteriana podem ser selecionadas por forma a que seja mantida a estrutura nativa da proteína (Sambrook et al. 1989). Os genes detectados através do rastreio imunológico de bibliotecas podem ser isolados e reclonados em plasmídeos ou fagemídeos, por inserção do ADN em estudo em locais de restrição únicos destes vectores, para posteriormente permitirem a determinação da sequência de nucleótidos, a transcrição *in vitro* ou a tradução *in vitro* e a sua utilização como sondas, depois de marcados com compostos radioactivos ou não. O uso de sondas permite o rastreio de novas bibliotecas, a detecção de ARN específicos, por "Northern blot", ou a localização de sequências particulares no ADN genómico, por "Southern blot", na espécie em estudo ou em espécies diferentes (Sambrook et al. 1989).

A utilização de vectores de expressão procariotas apresenta vantagens e desvantagens. As vantagens dos sistemas de expressão em *E. coli* prendem-se com o facto desta bactéria ser fácil de manipular e de crescer rapidamente em meios de cultura de custos pouco elevados. Além disso, as técnicas requeridas para a expressão de proteínas são relativamente simples, as proteínas de fusão obtidas são facilmente purificadas por cromatografia de afinidade e podem ser clivadas, o que permite o isolamento da proteína codificada pelo gene clonado. As desvantagens relacionam-se com a incapacidade que as bactérias têm em fazerem modificações pós-tradução e com a insolubilização das proteínas na forma de agregados designados por corpos de inclusão, quando são expressas em grandes quantidades (Sambrook et al. 1989)..

As bibliotecas de expressão podem ser genómicas ou de cADNs. As bibliotecas genómicas são constituídas por um conjunto de moléculas recombinantes que incluem todas as sequências de ADN (intrões e exões) de uma determinada espécie. Os vectores mais comuns usados na construção das bibliotecas genómicas são os cosmídeos e os derivados do bacteriófago λ. O ADN genómico é sujeito a uma digestão parcial, os fragmentos podem ser fraccionados de acordo com o seu peso molecular, por centrifugação em gradiente de densidade ou por electroforese, e uma vez que o tamanho das sequências de ADN inseridas nestes vectores é maior, o número de recombinantes necessários para se formar uma biblioteca de ADN genómico é significativamente reduzido. Contudo, estas bibliotecas requerem o rastreio de um maior número de clones quando comparadas com as bibliotecas de ADN complementar. As bibliotecas de cADNs contêm um conjunto de ADNs complementares sintetizados a partir de todos os ARNs mensageiros de uma célula e por

isso estas sequências de ADN correspondem apenas aos exões. A proporção dos vários mARNs numa célula varia em função da velocidade da sua síntese e do seu tempo de semi-vida. Os genes que são activamente transcritos em mARNs estáveis irão contribuir de uma forma mais significativa para o conjunto total dos ARNs mensageiros, quando comparados com os genes que são transcritos mais lentamente e/ou que formam mARNs pouco estáveis. Por este motivo e para que a probabilidade de um clone de cADN correspondente a um determinado mRNA de tamanho conhecido esteja representado nas bibliotecas de cADNs estas podem ser enriquecidas por processos que envolvem: o fraccionamento das sequências de ARN de interesse em geles de agarose, mas que tem a desvantagem da fraca recuperação dos ARNs; a sedimentação em gradientes de sacarose na presença solventes não desnaturantes, que embora permita uma boa recuperação dos ARNs é condicionada pelo estabelecimento de estruturas secundárias no ARN; a centrifugação em gradientes de sacarose na presença de agentes desnaturantes como o hidróxido de metilmercúrio, que tem sido referido como o método de eleição. Adicionalmente, a concentração de mARNs inicial para o isolamento de clones de cADN pode ser enriquecida a partir de determinados tecidos ou linhas celulares onde é preferencialmente expresso, das diferentes fases do ciclo de vida ou do ciclo celular, da utilização de drogas que permitem um aumento da expressão de proteínas particulares, etc. (Sambrook et al. 1989).

Esta parte do trabalho iniciou-se com o rastreio de uma biblioteca de expressão de cADNs de células HeLa S3 humanas em λgt11 com dois anticorpos monoclonais de ratinho previamente caracterizados, o mAb 58 e o mAb 402. Estes dois anticorpos reconhecem um conjunto de antigénios, alguns dos quais com epítopos fosforilados, com pesos moleculares muito diversificados e apresentam diferentes padrões de imunofluorescência nas células em mitose. O mAb 58 reage com o material que se encontra à superfície dos cromossomas condensados e o mAb 402 reconhece os cromossomas metafásicos. Em função dos resultados obtidos neste rastreio procurou-se fazer a caracterização molecular dos clones isolados.

MATERIAL BIOLÓGICO

Estirpes bacterianas

E. coli DH5α, *E. coli* JM101, *E. coli* TB1, *E. coli* TG2, *E. coli* XL1-Blue, *E. coli* Y1089 e *E. coli* Y1090. As características e funções das estirpes bacterianas usadas estão descritas no apêndice.

Vectores

pBluescript II SK (+/-), pBS (+/-), pMALcRI, pSPT 18, pSPT 19, λgt11 e λZAPII. As características de cada vector e os locais de clonagem estão descritos no apêndice.

Linhas celulares

Usaram-se células epiteliais Hep-2 de carcinoma humano da laringe, células epiteliais HeLa de carcinoma humano cervical e as células NIH de fibroblastos de ratinho. Para cada linha celular as características e condições de cultura são as mesmas das já descritas na produção de anticorpos monoclonais.

MÉTODOS

Determinação do título da biblioteca fágica ou de "stocks" de fago - Fizeram-se diluições seriadas (10^{-2} a 10^{-6}) do fago em tampão λ. Em tubos de vidro estéreis misturaram-se 200 µl de uma cultura ON de *E. coli*, em LB contendo 10 mM $MgSO_4$ e 0,2% maltose, com 10 µl de cada uma das diluições do fago. Fez-se a incubação durante 20 min a 37°C, com agitação leve, para promover a infecção da bactéria. Adicionou-se 3 ml de Top-agarose a cada um dos tubos contendo as diluições do fago e da bactéria, misturou-se no vortex e verteu-se sobre cada placa correspondente. Após 10 min à temperatura ambiente, fez-se a incubação a 37°C durante 6-8 hs. Determinou-se o título da biblioteca ou do fago tendo em conta as diluições efectuadas:

$$\text{pfu/ml} = \frac{\text{número de placas x diluição}}{0{,}01 \text{ ml}}$$

Plaqueamento e expressão de bibliotecas - Misturaram-se 800 µl da cultura ON de *E. coli*, em LB contendo 10 mM $MgSO_4$ e 0,2% maltose, com cerca de 10^5 p.f.u. (placas de 135 mm) e incubou-se 20 min a 37°C, com agitação leve, para a infecção da bactéria. Adicionaram-se 7,5 ml de Top-agarose, misturou-se no vortex e verteu-se sobre a placa de L-agar correspondente a cada diluição, previamente aquecida a 37°C. Após 10 min

à temperatura ambiente, fez-se a incubação a 42°C durante 3 a 4 hs. Retiraram-se as placas da estufa logo que a lise foi visível. Colocou-se sobre cada placa uma membrana (ou filtro) de nitrocelulose (Stratagene), previamente embebida em 10 mM isopropil-β-D-tiogalactospiranosídeo (IPTG). Marcaram-se assimetricamente os filtros e o agar. Após um período de incubação das placas a 37°C durante 3 a 4 hs, para a indução das proteínas de fusão, retiraram-se as membranas para o rastreio e guardaram-se as placas a 4°C.

1º Rastreio da biblioteca com anticorpos - Depois da indução das proteínas de fusão, removeram-se os filtros cuidadosamente e lavaram-se 2 vezes 5 min em PBS-TG (PBS contendo 10% Triton, 5% gelatina, 0,25% NaN_3). Bloquearam-se as membranas durante 1 h com PBS-TG, com agitação leve e à temperatura ambiente. Incubaram-se os filtros com o primeiro anticorpo (mAb de ratinho) diluído a 1/100 em PBS-TG, ON, a 4°C e com agitação suave. Lavaram-se os filtros 3 vezes 5 min em PBS-TG. Fez-se a incubação com o segundo anticorpo, uma IgG de carneiro anti-ratinho, marcado com a peroxidase (Amersham, UK) diluído em PBS-TG, à temperatura ambiente, durante 1 h e com agitação suave. Fizeram-se as lavagens em PBS-TG (2 vezes 5 min) e PBS (2 vezes 10 min). A revelação foi efectuada numa solução de 5% 4-cloro-1-naftol em etanol, diluída a 1/100 em PBS na presença de 0,025 M de peróxido de hidrogénio (Sigma).

As placas fágicas que deram reacções positivas foram removidas do agar e colocadas em 500 µl de tampão λ contendo 1 gota de clorofórmio. A eluição dos fagos foi feita durante 2-4 hs à temperatura ambiente, ou ON a 4°C. Determinou-se o título do fago eluído.

1º Rastreio da biblioteca com sonda marcada com ^{32}P-dCTP - Após o plaqueamento das bactérias e fagos, a incubação das placas foi feita a 37°C durante 3 a 8 hs, retiraram-se as placas da estufa logo que a lise foi visível e colocaram-se a 4°C durante 1 a 2 hs, para endurecer a Top agarose. Colocou-se sobre cada placa uma membrana de "nylon" (Stratagene). Definiu-se a posição do filtro fazendo três marcações assimétricas. Ao fim de 60 seg removeu-se o filtro, que foi colocado 90 seg na solução de desnaturação (1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH), 5 min na solução de neutralização (1,5 M NaCl, 0,5M Tris-HCl pH=8,0) e depois lavado rapidamente em 3x SSC. Fez-se uma réplica de cada placa. Guardaram-se as placas a 4°C. O ADN foi fixado na estufa a 80°C, durante 2 horas ou 5 min nos ultra-violeta (UV). A pré-hibridização foi feita a 65°C durante 4 hs na solução de pré-hibridização (6x SSC, 2x Denhardt's, 0,25% SDS, 100 µg/ml de ADN de esperma de salmão desnaturado). Fez-se a marcação da sonda e adicionou-se à solução de pré-hibridização. A hibridização foi feita ON a 65°C. Lavaram-se os filtros em 2x SSC contendo 0,05% SDS e depois em 0,2x SSC contendo 0,1% SDS. O tempo e as respectivas condições de lavagem estiveram dependentes da intensidade da marcação. Secaram-se os filtros em 3MM e procedeu-se à autoradiografia a -70°C, durante 3 a 5 dias.

2º Rastreio - Em placas de L-agar (82 mm) plaquearam-se os fagos que deram reacções positivas no 1º rastreio, por forma a ter 500-3000 pfu/placa. Repetiram-se todas as etapas já efectuadas para o plaqueamento e 1º rastreio da biblioteca, tanto com anticorpos como com a sonda marcada.

3º Rastreio - Efectuado de acordo com o método já descrito para o 2º rastreio, em que foram plaqueados 200-500 pfu/placa (82 mm). Os fagos que deram reacções positivas foram removidos, eluídos em 500 µl de tampão λ contendo 1 gota de clorofórmio. Fez-se a determinação do título.

Preparação de lisados de fagos - Num tubo estéril misturaram-se 200 µl de uma cultura ON de *E. coli* com o fago isolado no 3º rastreio tendo um título de 10^5 pfu/ml e incubou-se a 37°C, durante 20 min. Adicionou-se 3 ml de Top-agarose a cada um dos tubos contendo as diluições do fago, misturou-se no vortex e verteu-se sobre cada placa correspondente (L-agar contendo 50 µg/ml de ampicilina). Após 10 min à temperatura ambiente, fez-se a incubação a 37°C, durante 6-8 hs até ter lise confluente. A remoção dos fagos foi feita após adição de 3 ml de tampão λ, por cima de cada placa, durante 2-3 hs à temperatura ambiente com agitação suave, ou ON a 4°C. Recolheu-se o lisado dos fagos e centrifugou-se a 4000 r.p.m. durante 5 min para remoção de qualquer resíduo de agarose. Separou-se o sobrenadante e adicionou-se 1 gota de clorofórmio. Determinou-se o título do lisado, que deverá ser de 10^{10} pfu/ml. O lisado foi conservado a 4°C.

Preparação de ADN de fago - Num matraz estéril aqueceram-se 50 ml de LB contendo 10 mM de $MgSO_4$, à temperatura de 37°C. Adicionaram-se 125 µl da cultura ON de *E. coli* e 125 µl do lisado de fago. Verificou-se a lise após 10-12 hs de incubação a 37°C, com agitação. Para a lise ser total, adicionou-se 1 ml de clorofórmio e incubou-se durante 30 min a 37°C, com agitação. Centrifugou-se a amostra a 5000 r.p.m. durante 5 min e removeu-se o sobrenadante para um tubo novo. Adicionaram-se RNase A e DNase I em concentrações finais de 30 µg/ml e incubou-se 1 h a 37°C. Fez-se a precipitação ON a 4°C após adição de PEG 8000 e de NaCl em concentrações finais de 7% e 6%. Rejeitou-se o sobrenadante, depois da centrifugação a 5000 r.p.m. 5 min, e ressuspendeu-se o sobrenadante em 2,5 µl de tampão λ. Para a extracção do ADN do fago juntou-se 1 volume de clorofórmio e centrifugou-se 10 min a 5000 r.p.m.. Removeu-se a fase aquosa e adicionou-se SDS e EDTA em concentrações finais, respectivamente, de 0,1% e 20 mM. Depois de se adicionar 1 volume de Fenol/$CHCl_3$ (1:1), a amostra foi centrifugada 5 min a 5000 r.p.m., a fase aquosa removida e re-extraída com 1 volume de Fenol/$CHCl_3$. Removeu-se a nova fase aquosa e extraíu-se com 1 volume de clorofórmio. Fez-se a precipitação do ADN (fase aquosa) a -70°C durante 1 h, adicionando 1/10 volume de 3 M NaAc e 2 volumes de etanol a 95%. Centrifugou-se 5 min a 5000 r.p.m., lavou-se o

sedimento com 1 ml de etanol a 70% e voltou-se a centrifugar 2 min a 5000 r.p.m.. O sedimento foi ressupenso em 100 µl de TE e conservado a -20°C. Retirou-se uma alíquota (5 µl) que foi dissolvida em 5 µl de tampão BPB. Desnaturou-se o ADN do fago e do padrão (ADN de λ cortado com *Hind*III) por aquecimento a 65°C, durante 5 min. Aplicaram-se as amostras num gel de agarose a 1% contendo 1 µl de brometo de etídio (10 mg/ml), em tampão 1x TAE, durante 1-2 hs, a 70-80 volts. Foi utilizado o equipamento da H.S.I. (Hoefer Scientific Instruments, USA), unidade "Max Submarine, Agarose Gel Unit, Model HE 99".

Digestão do ADN - A digestão do ADN foi feita com as enzimas de restrição específicas para cada ADN num "eppendorf" estéril. Adicionaram-se x µl de água autoclavada, 2 µl 10x tampão de digestão, x µl ADN (1-2 µg), 1 µl (10 U/µl ou 20 U/µl) enzima de restrição para um volume final de 20 µl. Misturou-se suavemente, centrifugou-se 2 seg e incubou-se no banho a 37°C, durante 2 hs. Uma alíquota do ADN cortado foi analisado em gel de agarose a 1% contendo 1 µl de brometo de etídio (10 mg/ml), em tampão 1x TAE, durante 1-2 hs a 70-80 volts. Foi utilizado o equipamento da H.S.I. (Hoefer Scientific Instruments, USA) unidade "Max Submarine, Agarose Gel Unit, Model HE 99".

Marcação de sondas com ^{32}P-dCTP - A marcação foi feita com o "Multiprime DNA Labelling System" (Amersham, UK). Fez-se um gel de agarose "low melting point" (Sea plaque GTG, FMC) a 0,7% e correu-se o ADN digerido com as enzimas de restrição próprias para o isolamento do cADN do vector de clonagem. Foi utilizado o equipamento da H.S.I. (Hoefer Scientific Instruments, USA) "unidade Mini Submarine, Agarose Gel Unit, Model HE 33". Cortou-se a banda correspondente ao fragmento separado do vector de clonagem ("insert") e colocou-se num "eppendorf" estéril contendo 50 µl de TE. Derreteu-se a agarose num banho a 65°C durante 10 min. Diluíu-se o ADN em água por forma a ter 20 ng de ADN num volume final de 31 µl. Ferveu-se durante 3 min e adicionou-se 10 µl de tampão de marcação (dATP, dGTP e dTTP em Tris-HCl pH=7,8, $MgCl_2$ e 2-mercaptoetanol), 5 µl da solução contendo "primer" (BSA e oligonucleótidos), 2 µl de ^{32}P-dCTP (10 µCi/ml) e 2 µl de enzima Klenow (1 U/ml), num volume final de 50 µl. Fez-se a incubação a 37°C, em recipiente de chumbo, durante 1-2 hs. Adicionou-se 20 µl de BFB e aplicou-se a sonda na coluna de Sephadex G-50, previamente lavada com TNE_2 (10 mM Tris-HCl pH=7,5, 20 mM NaCl, 2 mM EDTA, 0,1% SDS). Recolheu-se a sonda em "eppendorf", desnaturou-se o ADN por fervura, durante 3 min, e conservou-se em gelo.

"Dot blot" de lisados de fagos - Aplicou-se 0,5 µl de cada lisado de fago numa membrana de "nylon" (Hybond™-N-0,45 µ, Amersham). Desnaturou-se o ADN 5 min na solução de desnaturação (1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH), neutralizou-se por 5 min na solução

de neutralização (0,5 M Tris-HCl pH=7,2, 1,5 M NaCl, 1 mM EDTA) e lavou-se durante 1 min em 2x SSC. Fixou-se o ADN durante 10 min por UV (trans-iluminador). A pré-hibridização foi feita a 65°C durante 1 h, na solução de pré-hibridização (5x SSC, 1x Denhardt's, 50 µg/ml esperma de salmão, 0,1% SDS). Adicionou-se a sonda marcada com [^{32}P] à solução de pré-hibridização e fez-se a incubação ON a 65°C, com agitação. As lavagens foram feitas em 2x SSC contendo 0,1% SDS a 65°C (2 vezes 10 min), 1x SSC contendo 0,1% SDS a 65°C (2 vezes 10 min) e 0,1x SSC contendo 0,1% SDS a 65°C (2 vezes 10 min), e a radioactividade foi monitorizada com o contador próprio (Mini-monitor G-M Tube, series 9000). Depois de secar a membrana em papel de filtro, procedeu-se à autoradiografia (Kodak) a -70°C, por 2 hs.

Preparação de antigénio recombinante a partir de lisogénio λgt11 - Em tubos estéreis, e para promover a infecção numa razão de 1 bactéria : 5 fagos, adicionaram-se 10 ml de LB contendo 10 mM $MgCl_2$, 100 µl (5 x 10^6) de células de uma cultura ON de *E. coli* Y1089 e 2,5 µl (25 x 10^6 pfu) de fagos, durante 20' a 30°C. Fizeram-se diluições por forma a semear 100 µl por espalhamento, em placas de L-agar contendo 50 µg/ml de ampicilina, contendo 200, 500 e 5000 células/placa. Usou-se como controlo negativo apenas a bactéria. Incubaram-se as placas ON (18-24 hs) a 30°C. Com palitos estéreis repicaram-se 150 colónias individualizadas que foram semeadas em duas placas de L-agar contendo 50 µg de ampicilina. Fez-se a incubação de cada uma das placas a 42°C e a 30°C ON (12-16 horas). Determinou-se a presença de lisogénios recombinantes (que devem apresentar uma frequência de 10-70%) por comparação da presença de crescimento a 30°C e ausência de crescimento a 42°C.

Preparação de lisados proteicos dos lisogénios recombinantes - Inoculou-se 5 ml de LB contendo 50 µg de ampicilina com cada colónia termossensível (lisogénio) e incubou-se ON (12-16 hs) a 30°C, com agitação. Fez-se o mesmo tratamento com uma colónia termoresistente, que funcionou como controlo. Diluiram-se 400 µl de cada cultura em 20 ml de LB contendo 50 µg de ampicilina, pré-aquecido a 30°C, e incubou-se a 30°C, com agitação, durante 1 h e 30 min. Transferiram-se as culturas para um banho a 44° e incubaram-se durante 20 min, com agitação ocasional. Adicionou-se IPTG estéril numa concentração final de 5 mM e incubaram-se as culturas a 37°C durante 1 h, com agitação. Centrifugaram-se as células 5 min a 5000 r.p.m., à temperatura ambiente, removeu-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o sedimento em 500 µl de tampão SDS-lisogénios (50 mM Tris-HCl pH=6,8, 100 mM DTT, 2% SDS, 10% glicerol e 0,01% azul de bromofenol). Misturou-se no vortex e ferveu-se durante 5 min. A remoção do material insolúvel foi feita por centrifugação durante 5 min a 14000 r.p.m.. O sobrenadante removido foi conservado a -20°C. Analisou-se uma alíquota (10 a 15 µl) em gel a 7,5% de SDS-PAGE. Fez-se o "immunoblotting" com o mAb usado no rastreio da biblioteca, para a detecção das proteínas

de fusão. Foi utilizado o equipamento da H.S.I. (Hoefer Scientific Instruments, USA), unidades "Mighty Small II-Vertical Slab Gel Electrophoresis - SE 250", "Tall Mighty Small-Vertical Slab Gel Electrophoresis - SE 280" e unidade "Transpher Electrophoresis".

Isolamento ("mini-prep") de ADN de plasmídeo - Foi usado o "kit" da Promega - "Magic Minipreps™ DNA Purification System". Centrifugaram-se 2 a 3 ml de uma cultura ON de *E.coli*. Ressuspenderam-se as células em 200 µl de solução de ressuspensão (50 mM Tris-HCl pH=7,5, 10 mM EDTA e 100 µg RNase A) e transferiram-se para "eppendorf". Adicionaram-se 200 µl de solução de lise (0,2 M NaOH, 1% SDS) e misturou-se por inversão. Adicionaram-se 200 µl de solução de neutralização (2,55 M KOAc pH=4,8) e misturou-se por inversão. Centrifugou-se 5 min a 14000 r.p.m. e separou-se o sobrenadante para outro "eppendorf". Adicionou-se 1 ml de resina "Magic Minipreps DNA Purification", misturou-se por inversão e aplicou-se na mini-coluna "Magic Minipreps Columns". Lavou-se a mini-coluna com 2 ml de solução de lavagem (200 mM NaCl, 5 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl pH=7,5 diluída a 1:1 em etanol absoluto). A secagem da mini-coluna foi feita por microcentrifugação, durante 20 seg. Adicionaram-se 50 µl de água pré-aquecida a 65°C e ao fim de 1 min, o ADN de plasmídeo foi eluído da coluna por microcentrifugação, durante 20 seg. Uma alíquota do ADN foi analisado em gel de agarose a 1% contendo 1 µl de brometo de etídio (10 mg/ml), em tampão 1x TAE, durante 1-2 hs a 70-80 volts. Foi utilizado o equipamento da H.S.I. (Hoefer Scientific Instruments, USA) unidade "Max Submarine, Agarose Gel Unit, Model HE 99". Conservou-se o ADN plasmídico a -20°C.

Preparação de células competentes - Adicionaram-se 0,5 ml da cultura ON de células *E. coli* (TB1,TG2 ou XL1-Blue) a 50 ml de LB. Incubou-se a 37°C, com agitação, até a densidade óptica a 600 nm ser da ordem dos 0,2 a 0,4. Colocou-se a cultura em gelo durante 15 min. Centrifugou-se a 3000 r.p.m. (2000g) durante 5 min, a 4°C. Rejeitou-se o sobrenadante, ressuspendeu-se o sedimento em 20 ml de $CaCl_2$ 100 mM estéril e arrefecido em gelo, e colocou-se em gelo durante 20 min. Centrifugou-se a 3000 r.p.m. durante 5 min, a 4°C. Rejeitou-se o sobrenadante, ressuspendeu-se o sedimento em 5 ml de $CaCl_2$ 100 mM estéril. As células obtidas apresentam o máximo de competência ao fim de 16 horas e são viáveis durante 4 dias a 4°C. Podem ser congeladas em 10% de glicerol e conservadas durante muito tempo a -70°C.

Subclonagem do ADN isolado em plasmídeos:

a) - Ligação de fragmentos de ADN - Determinaram-se as concentrações de vector e "insert" a utilizar de modo a que a razão molar do vector para o "insert" fosse de 1:3, num volume final de 20 a 50 µl:

$$\frac{\text{Quantidade de vector (µg)}}{\text{Peso vector (kb)}} = \frac{\text{3 x Quantidade de "insert" (µg)}}{\text{Peso "insert" (kb)}}$$

A agarose "low melting" que continha o fragmento de ADN ("insert") foi aquecida a 65°C, durante 10 min e depois conservou-se a 37°C. Num "eppendorf" adicionaram-se x µl do ADN "insert", x µl ADN vector, 1/10 volume final tampão 10x ligase (50 mM Tris-HCl pH=7,6, 10 mM $MgCl_2$, 1 mM ATP, 5% PEG, 10 mM DTT), 2,5 U de T4 ADN ligase e completou-se com água destilada até 50 µl. Fez-se a incubação ON a 16°C ou durante 2 a 6 hs a 25°C.

b) - Transformação de células competentes - Misturaram-se 100 µl de células competentes com 10 µl de ADN (contendo 10 a 100 ng de ADN). Incubou-se em gelo durante 30-60 min. Colocaram-se as células a 37°C, durante 2 min, e depois em gelo durante 1 a 2 min (choque térmico). Adicionaram-se 400 µl de SOC (meio de LB pH=7 contendo 10 mM $NaCl_4$, 10 mM $MgCl_2$, 10 mM glucose) aquecido a 37°C. Incubou-se a 37°C durante 30-60 min. Plaqueram-se 125 µl da mistura/placa (L-agar contendo 50 µg/ml de ampicilina, 0,1 mM de IPTG e 40 µg/ml de X-gal) e incubou-se ON, a 37°C. Calculou-se a eficiência de transformação, ou seja, o número de transformantes/ml/µg ADN.

c) Isolamento e crescimento de recombinantes - Removeram-se as colónias recombinantes e colocaram-se em 5 ml de LB contendo 50 µg/ml de ampicilina. Incubou-se ON a 37°C, com agitação. Fez-se o isolamento do ADN de plasmídeo ("mini-preps") e verificou-se por digestão enzimática a presença ou não do "insert".

Expressão da proteína de fusão - Foi feito de acordo com as instruções da casa comercial para sistema de preparação e purificação da proteína de fusão (Biolabs, New England). Retiraram-se 2 ml de uma cultura de células de *E. coli* TB1, com o "insert" sub-clonado em pMAL-cRI, e diluiu-se em 100 ml de LB contendo 50 µg de ampicilina. Como controlo fez-se uma cultura de células de *E. coli* TB1 contendo apenas o vector pMAL-cRI. Incubou-se a 37°C durante cerca de 4 hs (densidade óptica = 0,4). Para as fracções não induzidas retirou-se de cada cultura uma alíquota de 1 ml, centrifugou-se 2 min, ressuspendeu-se o sedimento em 50 µl de 1x tampão SDS-PAGE (50 mM Tris-HCl pH=6,8, 100 mM DTT, 2% SDS, 0,1% azul de bromofenol, 10% glicerol) e conservou-se a 4°C. Para as fracções induzidas, adicionou-se IPTG 0,3 M e incubou-se 2 hs a 37°C Retirou-se uma aliquota de 1 ml, centrifugou-se 2 min e ressuspendeu-se em 100 µl de 1x tampão SDS-PAGE. Procedeu-se à electroforese em SDS-PAGE, num gel a 10%, para análise das fracções induzidas e não induzidas. A restante cultura do pMAL-cRI-"insert" foi centrifugada a 4000 g (4500 r.p.m.) durante 20 min, o sedimento ressuspendido em 5,5 ml do tampão da coluna (20 mM Tris-HCl pH=7,4, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 mM β-mercaptoetanol, 1 mM PMSF, 1 mM PTU) e colocado a -20°C, ON. A amostra foi sonicada (Sonifier B12, Brauson Sonic Power Company, Danbury, Connecticut) em 10 ciclos de 40 seg, sendo a lise celular verificada ao microscópio, e depois centrifugada a 9000 g (10500

r.p.m.) durante 30 min. O sedimento foi ressuspenso em 5 ml de tampão da coluna e conservado a 4°C . A proteína de fusão imunopurificada por cromatografia de afinidade foi clivada com o factor Xa (200 ng/µl, Boehringer) durante 20 hs à temperatura ambiente.

Purificação da proteína de fusão por cromatografia de afinidade - Foi feito de acordo com as instruções da casa comercial para sistema de preparação e purificação da proteína de fusão (Biolabs, New England). Lavou-se a resina de amilose em tampão da coluna (3 vezes 10 min) e encheu-se a coluna de cromatografia. A amostra foi aplicada na coluna depois de diluída a 1:2 em tampão da coluna. Lavou-se a coluna com tampão da coluna e eluíu-se a proteína ligada à amilose em tampão da coluna contendo 10 mM de maltose, recolhendo fracções de 0,5 ml/min. Determinou-se a concentração das várias fracções pelo método de Bradford (Protein Dye Reagent, da Stratagene). A densidade óptica foi determinada a 595 nm no "SHIMAZU-UV-260" (Shimazu Corporation, Japan). Concentrou-se a amostra com Centricon™10 (Amicon, Beverly, USA).

Produção de anticorpo policlonal - A proteína de fusão (250 µg) purificada por cromatografia de afinidade foi emulsificada 1:1 (v/v) com adjuvante de Freund's completo e injectada por via sub-cutânea no dorso de um coelho branco New Zealand. Duas semanas depois, o coelho foi injectado pela mesma via e com a mesma quantidade de proteína emulsificada 1:1 (v/v) em adjuvante de Freund's incompleto. Passados 10 dias, retirou-se sangue ao coelho, por punção nas veias da orelha e verificou-se a presença de anticorpos por "immunoblotting". Sete dias mais tarde, o coelho foi injectado de novo com a mesma quantidade de proteína e protocolo utilizado para a segunda injecção. Duas semanas depois voltou-se a sangrar o animal. O anticorpo policlonal obtido, foi designado por Rb-7.

Imunopurificação do anticorpo policlonal - Procedeu-se à electroforese e "immunoblotting" da proteína de fusão purificada. Cortou-se a tira correspondente à proteína de fusão e incubou-se durante duas hs, à TA, em 20 mM Tris-HCl pH=8,2 contendo 0,9% de NaCl e 2% de leite em pó para bloqueio de locais inespecíficos. Lavou-se 3 vezes 5 min em 20 mM Tris-HCl pH=8,2 contendo 0,2% de leite em pó. Fez-se a incubação com o soro de coelho diluído a 1:200 em 20 mM Tris-HCl pH=8,2 contendo 0,2% de leite em pó, ON, a 4°C. As lavagens foram efectuadas durante 1 h em 20 mM Tris-HCl pH=8,2 contendo 0,2% de leite em pó. Eluíu-se a IgG específica em 1 ml de 0,2 M glicina/ HCl pH=2,3 durante 2 min e neutralizou-se com 100 µl 2 M Tris base pH=11 (Harlow et al. 1988). Concentrou-se a amostra com Centricon™10 (Amicon, Beverly, USA). O anticorpo imunopurificado foi utilizado nas diluições de 1:20, 1:50 e 1:100.

"Immunoblotting" - Foi efectuado nas condições já descritas na produção de anticorpos monoclonais. Os soros de doentes com lupus (diluídos a 1:100), o anticorpo

monoclonal (diluído a 1:100) e o soro de coelho policlonal imunopurificado (diluído a 1:200) foram usados como primeiros anticorpos. Como segundos anticorpos usaram-se: IgG (H+L) de carneiro anti-humana, IgG (H+L) de cavalo anti-ratinho ou IgG (H+L) de carneiro anti-coelho marcado com a peroxidase (Vector Labs.). A proteína de fusão imunopurificada foi usada numa concentração de 0,1 μg.

Focagem isoeléctrica - Fez-se a polimerização do gel, no lado hidrofóbico de folhas "gel bond" (LKB). O gel foi composto por 5 ml da solução "stock" de acrilamida (19,4% acrilamida; 0,6% bisacrilamida), 9,6 g ureia, 1 ml de anfólitos - pH=4-6,5 (Pharmacia), 40 μl de TEMED, 200 μl de 1,2% AMPS num volume final de 20 ml. No ânodo usou-se uma solução de 0,5 M H_3PO_4 e no cátodo uma solução de 0,05 M arginina. A pré-focagem foi feita a 15 mA até se atingirem os 1200 volts. A focagem foi feita a 1200 volts durante 5,5 hs, sob refrigeração. O gel foi fixado durante 30-60 min numa solução de ácido sulfossalicílico a 3,46% e ácido tricloroacético a 11,5%. A coloração foi efectuada numa solução de 0,12% de azul brilhante de Coomassie R-250 durante 10-30 min, a 60°C. A descoloração foi feita numa solução a 30% de etanol e 10% de ácido acético. Foi utilizado o equipamento Multiphor II, unidade de electroforese 2177, da LKB.

Imunofluorescência indirecta (IF) - As células HEp-2 e HeLa cultivadas em lamelas durante 2-3 dias, e os fibroblastos de ratinho (células NIH) cultivados em lamelas e sincronizados com 0,4 μg/ml colquicina durante 16 hs, foram rapidamente lavadas em PBS por duas vezes. A fixação foi feita com 3% paraformaldeído em PBS, durante 10 min. Lavaram-se as células em PBS durante 10 min e depois colocou-se PBS contendo 10% FCS e 0,1% NP-40, à temperatura ambiente durante 20 min, para bloquear os locais inespecíficos de ligação de proteínas. Os primeiros anticorpos, mAb 402 e Rb-7, foram diluídos, respectivamente a 1:50 e 1:20, em PBS contendo 10% FCS e 0,1% NP-40 e incubado durante 40 min à temperatura ambiente. Após 3 lavagens em PBS contendo 0,1% NP-40, adicionou-se o segundo anticorpo, uma IgG de cavalo anti-ratinho ou IgG de carneiro anti-coelho marcados com a fluoresceína (Vector Labs.), diluído em PBS contendo 10% FCS e 0,1% NP-40. Depois de 30 min de incubação à temperatura ambiente, fizeram-se 3 lavagens em PBS contendo 0,1% NP-40 e 2 lavagens em PBS. A marcação do ADN celular foi efectuada numa solução de iodeto de propídio a 1μg/ml, durante 5 min. As preparações foram montadas em 85% glicerol contendo 2,5% n-propilgalhato (Giloh et al. 1982) e observadas no microscópio laser confocal de varrimento MRC-600, com o "software" COMOS (Bio Rad, Labs.)

Extracção de ARN - método ureia/cloreto de lítio - Recolheram-se células HEp-2 ou HeLa numa concentração superior a 1 x 10^6/ml e lavaram-se 3 vezes em PBS frio. Removeu-se o sobrenadante e adicionou-se ao sedimento 15-25 ml de solução de

LiCl/ureia (3 M LiCl, 6 M ureia) a 4°C, recentemente preparada. Agitou-se vigorosamente e procedeu-se à homogeneização das células no "Politron" (Politron Ultra-Turrax, T 25, Janke and Kunkel, IKA), durante 1 min. Transferiu-se a mistura para um tubo Sorvall de 30 ml e deixou-se a 4°C durante a noite. A mistura foi centrifugada na Sorval a 10000 r.p.m., durante 2 hs. Rejeitou-se o sobrenadante e secaram-se as paredes do tubo. Ressuspendeu-se o sedimento em 0,5-1 ml de TES (10 mM Tris base pH=8, 0,1 mM EDTA dissódico, 0,1% SDS) e transferiu-se para um "eppendorf" estéril no gelo. Adicionou-se um volume igual de Fenol/$CHCl_3$ (1:1), agitou-se no vortex e centrifugou-se durante 1 min a 14000 r.p.m.. Removeu-se a fase aquosa (superior) para um novo "eppendorf" e voltou-se a extrair a fase inferior com 100 µl de TES e juntou-se a fase aquosa à anterior. Repetiu-se a extracção na fase aquosa já separada com Fenol/$CHCl_3$ (1:1). Removeu-se a nova fase aquosa e re-extraiu-se com $CHCl_3$/álcool isoamílico (24:1). Antes de se proceder à precipitação com o etanol, retiraram-se 10 µl para verificar o estado do ARN. A esta alíquota foram adicionados 5 µl de tampão de amostra estéril (50% glicerol, 0,001 g azul de bromofenol, DEPC 0,1%) e procedeu-se à electroforese num gel de agarose a 1,5% contendo 1 µl de brometo de etídio (10 mg/ml), em tampão 1x TAE, durante 1-2 hs a 70-80 volts. Foi utilizado o equipamento da H.S.I. (Hoefer Scientific Instruments, USA), unidade "Max Submarine, Agarose Gel Unit, Model HE 99". Fez-se a precipitação do ARN com acetato de sódio 3 M (pH=5,3) usando 1/10 do volume da fase aquosa e 2 volumes de etanol, ou com 2 volumes de acetato de sódio 4,5 M. Colocou-se a -20°C durante a noite. Centrifugou-se durante 10 min a 14000 r.p.m. e removeu-se o sobrenadante. Deixou-se secar o sedimento e ressuspendeu-se em água destilada (cerca de 1/10 do volume da fase aquosa).

Isolamento de mARN poli(A)$^+$ - Dissolveu-se o ARN total em 2x tampão de ligação (20 mM Tris-HCl pH=7,5, 500 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,5% SDS), aqueceu-se 10 min, a 65°C e aplicou-se numa coluna de oligo dT-celulose previamente lavada com 0,1 M NaOH e com tampão de ligação (20 mM Tris-HCl pH=7,5, 500 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,5% SDS). A amostra correu a um fluxo de 1 ml/5 min e a coluna foi lavada com 10 ml de tampão de ligação. A fracção de mARN poli(A)$^+$ foi eluída com 5 ml de tampão de eluição (10 mM Tris-HCl pH=7,5, 1 mM EDTA, 0,5% SDS) e precipitada, ON, a -20°C, com 1/10 do volume de 3 M acetato de sódio e 2 volumes de etanol absoluto. Depois de centrifugada 10 min, a 14000 r.p.m. e lavada com etanol a 70%, o sedimento foi ressuspenso em água. Determinou-se a concentração da amostra a 260 nm e a pureza em gel de agarose a 1,5% contendo 1 µl de brometo de etídio (10 mg/ml), em tampão 1x TAE durante 1-2 hs a 70-80 volts. Foi utilizado o equipamento da H.S.I. (Hoefer Scientific Instruments, USA) unidade "Max Submarine, Agarose Gel Unit, Model HE 99".

Electroforese de ARN para Northern - O ARN total ou poliA$^+$ foram desnaturados com o glioxal. Preparou-se um gel a 1,5% contendo 10 mM Na_2HPO_4 pH=7. Fez-se a desnaturação das amostras (ARN e ADN padrão) em 0,8 M glioxal, 10 mM

Na_2HPO_4 (pH=7) e 50% DMSO a 37°C, durante 1 h. Colocaram-se as amostras em gelo e adicionou-se 5 µl de tampão da amostra (85% glicerol contendo 0,025% azul de bromofenol e 0,1% DEPC). Fez-se a electroforese a uma corrente de 80 volts, durante 2 a 3 horas. Foi utilizado o equipamento da H.S.I. (Hoefer Scientific Instruments, USA) unidade "Max Submarine, Agarose Gel Unit, Model HE 99". Após a electroforese separaram-se as amostras do padrão. O ADN padrão foi lavado em 0,4 M NaOH durante 30 min, corado na mesma solução adicionada de 0,5 µg/ml de brometo de etídio, durante 1 h, e descorado em água. Fez-se a transferência das amostras de ARN contidas no gel para membrana de "nylon", em 20x SSC, durante a noite. Após a transferência, fez-se a fixação do ARN durante 2 hs em estufa a 80°C. A pré-hibridização foi feita em solução de pré-hibridização (50% $HCONH_2$, 5x SET, 5x Denhardt's, 200 µg/ml de ADN de esperma de salmão desnaturado, 0,5% SDS, 2x "gel buffer") durante 1 a 2 hs, a 42°C. Marcou-se a sonda e adicionou-se à solução de pré-hibridização, ficando a incubar ON, a 42°C. Fizeram-se as lavagens em 2x SSC contendo 0,1% de SDS. Depois de secar a membrana de "nylon", procedeu-se à autoradiografia (Kodak) a -70°C, durante 5 a 10 dias.

Extracção de ADN genómico - Colheram-se 5 ml de sangue humano na presença de EDTA tripotássico e colocou-se num Falcon de 50 ml, ao qual se completou o volume com água. Misturou-se bem e centrifugou-se 30 min, a 3000 r.p.m., a 4°C. Rejeitou-se o sobrenadante e adicionou-se ao sedimento 25 ml de Triton-X100 gelado. Misturou-se no vortex e voltou-se a centrifugar 30 min, a 3000 r.p.m., a 4°C. Adicionou- se 3,5 ml de uma solução contendo 6 M guanidina-HCl, 250 µl de 7,5 M acetato de amónio, 500 µl de 20% Sarcosil e 100 µl proteinase K (10 mg/ml) e incubou-se a 60°C, durante 1 h e 30 min com agitação. Adicionou-se etanol a 95% gelado até perfazer um volume de 25 ml. Removeu-se o novelo de ADN com a ponta de uma pipeta e lavou-se com etanol a 70%. Centrifugou-se a 3000 r.p.m. e deixou-se a ressupender durante 48 hs em 1,5 ml de TE. Adicionou-se 1 volume de fenol, misturou-se cuidadosamente e centrifugou-se 2 min a 3000 r.p.m.. Transferiu-se a fase aquosa para novo tubo e extraíu-se com um volume de TE. Removeu-se a nova fase aquosa e extraíu-se com um volume de $CHCl_3$. A nova fase aquosa foi removida e adicionou-se 1/10 volume de 3 M acetato de sódio e 2,5 volumes de etanol absoluto gelado. Removeu-se o novelo de ADN precipitado e lavou-se com etanol a 70%. O ADN ficou a ressuspender em 50 µl de TE, ON, a 4°C. Verificou-se o estado do ADN em gel de agarose a 1% e a sua concentração foi determinada a 260 nm.

Extracção de ADN de células em cultura - Recolheram-se 10^9 células HEp-2, HeLa ou NIH em PBS e congelaram-se a -70°C, ON. Descongelaram-se as células rapidamente e centrifugaram-se 5 min a 3000 r.p.m.. O sedimento foi ressuspenso em 300 µl de STE, 3 µl de 10% NP40, 30 µl 10% SDS e 30 µl proteinase K (10 mg/ml) e incubado 2-3 hs, a 55°C. Adicionou-se um volume de Fenol/$CHCl_3$ e removeu-se a fase aquosa.

Extraíu-se com um volume de $CHCl_3$ e precipitou-se com 15 µl 5M NaCl e 800 µl de etanol absoluto. Depois da precipitação, por 30 min à temperatura ambiente, rejeitou-se o sobrenadante e lavou-se o sedimento com etanol a 70%. O ADN foi ressuspenso em 100 µl de TE. Verificou-se o estado do ADN em gel de agarose a 1%, em 1x TAE. A concentração foi determinada a 260 nm.

Electroforese do ADN para Southern - Procedeu-se à digestão de 10-15 µg de ADN genómico com várias enzimas de restrição, durante a noite, a 37°C. Adicionou-se 5 µl de BPB e aplicaram-se as amostras e o padrão (λ cortado com *Hind*III) num gel a 0,8% de agarose (20 x 20 cm) em 1x tampão TAE. Fez-se a corrida a 40 volts em 1x tampão TAE, durante 9 hs. Foi utilizado o equipamento da H.S.I. (Hoefer Scientific Instruments, USA) unidade "Max Submarine, Agarose Gel Unit, Model HE 99". Fotografou-se o gel e separou-se o padrão. Colocou-se o gel na solução de depurinação (HCl 0,2 M) durante 15 min, lavou-se com água e colocou-se 45 min na solução de desnaturação (1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH). Lavou-se em água e o gel foi colocado por 15 min na solução de neutralização (1 M Tris-HCl pH=7,4, 1,5 M NaCl). Procedeu-se à transferência das amostras, durante 16 hs para uma membrana de "nylon" em tampão 20x SSPE. Após a transferência o gel foi colocado 30 min em solução de neutralização (1 M Tris-HCl pH=7,4, 1,5 M NaCl). A fixação foi feita na estufa a 80°C por 2 hs. Fez-se a pré-hibridização na solução de pré-hibridização (5x SSPE, 5x Denhardt's, 0,5% SDS, 200 µg/ml de ADN de esperma de salmão) durante 3 hs, a 65°C. Marcou-se a sonda e adicionou-se à solução de pré-hibridização, ficando a incubar ON, a 65°C. Fizeram-se as lavagens em 2x SSPE contendo 0,1% de SDS por 20 min, a 65°C, e em 1x SSPE contendo 0,1% de SDS, durante 15 min, a 65°C. Procedeu-se à autoradiografia (Kodak) a -70°C por 3 a 5 dias.

Delecções unidireccionais do ADN com a Exonuclease III (ExoIII) - Foi utilizado o "kit" da Promega "Erase-a-Base® System". O ADN (5 µg) de cadeia dupla foi digerido com duas enzimas diferentes: uma que deixou a extremidade 5' livre e outra, que deixou a extremidade 3' protegida. Fez-se a extracção do ADN por adição de 1 volume de Fenol/$CHCl_3$ (1:1), misturou-se no vortex 1 min e centrifugou-se 5 min. Removeu-se a fase aquosa e adicionou-se 1 volume $CHCl_3$/Isoamílico (24:1), misturou-se no vortex por 1 min e centrifugou-se por 5 min. O ADN presente no novo sobrenadante foi precipitado com 1/10 de volume de 2 M NaCl e 2 volumes de etanol absoluto e colocado durante 10 min a -70°C. Depois de centrifugado por 5 min a 14000 r.p.m., lavou-se o sedimento com 1 ml de etanol a 70% e voltou-se a centrifugar. O sedimento depois de seco foi ressuspenso em 60 µl de tampão ExoIII (66 mM Tris-HCl pH=8, 0,66 mM $MgCl_2$). O ADN dissolvido em tampão de ExoIII foi aquecido à temperatura de 30°C e adicionaram-se 300-500 U de ExoIII (a esta temperatura a enzima remove em média 210 bp/min). Removeram-se alíquotas de 2,5 µl de 40 em 40 segundos e transferiram-se para tubos, colocados em gelo, contendo 7,5 µl de

"S1 nuclease mix" (60 U de S1 nuclease em 30 mM acetato de potássio pH=4,6, 250 mM NaCl, 1 mM $ZnSO_4$, 5% glicerol). Colocaram-se as amostras correspondentes aos diferentes tempos 30 min, à TA. Adicionou-se 1 µl de "S1 Stop buffer" (0,3 M Tris base, 0,05 M EDTA) e aqueceram-se as amostras durante 10 min, a 70°C. Retirou-se de cada uma das amostras uma alíquota de 2 µl e correu-se em gel de agarose a 1%. Aqueceram-se as amostras a 37°C e adicionou-se 1 µl de "Klenow mix" (3-5 U Klenow em 20 mM Tris-HCl pH=8, 100 mM $MgCl_2$). Ao fim de 3 min a 37°C, adicionou-se 1 µl de "dNTP mix" (0,125 mM de dATP, dCTP, dGTP e dTTP). Colocaram-se as amostras 5 min a 37°C. À temperatura ambiente adicionaram-se 40 µl de "ligase mix" (5U de T4 ADN ligase em 50 mM Tris-HCl pH=7,6, 10 mM $MgCl_2$, 1 mM ATP, 5% PEG, 10 mM DTT). Após 1 h à temperatura ambiente procedeu-se à transformação utilizando 10 µl da mistura da reacção, de cada um dos tempos, com 200 µl de células competentes. Fez-se o plaqueamento em placas de L-agar contendo 50 µg/ml de ampicilina. Após a incubação ON, extraíu-se o ADN recombinante e verificou-se a presença dos "inserts" com diferentes tamanhos, depois da digestão com a enzima de restrição correcta, em gel de agarose a 1% e em 1x TAE. Foi utilizado o equipamento da H.S.I. (Hoefer Scientific Instruments, USA) unidade "Max Submarine, Agarose Gel Unit, Model HE 99".

Sequenciação de ADN de cadeia dupla - A sequenciação do ADN foi feita de acordo com o método descrito por Sambrook et al. 1989. Utilizou-se o "Kit" de sequenciação "Sequenase® 2.0 version" (USB). Preparou-se o ADN [pBS (+/-) ou pBluescript II SK (+/-) contendo o "insert"] para sequenciar de forma a ter 3 µg de ADN num volume de 8 µl, ao qual se adicionaram 2 µl 2 M NaOH. Incubou-se 30 min a 37°C e adicionou-se 3 µl 3 M acetato de sódio, 7 µl de água e 60 µl de etanol a 100%. Fez-se a precipitação do DNA a -70°C durante 15 min. Centrifugou-se 10 min a 14000 r.p.m. e lavou-se o sedimento com 1 ml de etanol a 70%. Depois de centrifugar, o sedimento obtido foi seco e ressuspenso em 7 µl de água destilada. A hibridização do "primer" ao ADN padrão foi feita com a adição de 2 µl de "sequenase reaction buffer" (200 mM Tris-HCl pH=7,5, 100 mM Mg Cl_2, 250 mM NaCl) e 1,5 µl de "primer" (1,2 ng/µl), seguida de incubação de 20 min a 37°C e 10 min à temperatura ambiente. Usou-se como "primer" universal a sequência: 5'-AATACGACTCACTATAG-3' e como "primer" reverso a sequência: 5'-AACAGCTATGACCATG-3'. Para a reacção de marcação adicionou-se à mistura do "primer"-ADN padrão 1 µl 0,1 M DTT, 2 µl "labelling mix" (7,5 mM dGTP, 7,5 mM dCTP, 7,5 mM dTTP), diluído a 1:5, 1 ml [α-^{35}S]dATP (10 µCi/ml), 2 µl Sequenase (13 U/ml) diluída a 1:8 em "enzyme dilution buffer" (10 mM Tris-HCl pH=7,5, 5 mM DTT, 0,5 mg/ml BSA). Misturou-se bem e incubou-se 2-5 min à temperatura ambiente. As reacções de marcação foram feitas após adição de 3,5 µl da mistura de marcação a cada tubo contendo 2,5 µl do respectivo ddNTP "termination mix" [ddG (80

mM dGTP, 80 mM dATP, 80 mM dTTP, 8 mM ddGTP, 50 mM NaCl); ddA (80 mM dGTP, 80 mM dATP, 80 mM dTTP, 8 mM ddATP, 50 mM NaCl); ddT 80 mM dGTP, 80 mM dATP, 80 mM dTTP, 8 mM ddTTP, 50 mM NaCl); ddC (80 mM dGTP, 80 mM dATP, 80 mM dTTP, 8 mM ddCTP, 50 mM NaCl)] previamente aquecido a 37°C (pelo menos durante 1 min). Depois de uma incubação a 37°C durante 5 min, adicionaram-se 4 µl/tubo de "stop solution" (95% formamida, 20 mM EDTA, 0,05% azul de bromofenol, 0,05% xileno cianol FF). Desnaturaram-se as amostras durante 3 min a 90°C e aplicaram-se 3,5 µl de amostra por poço. Utilizaram-se geles de sequenciação (0,4 mm) com gradiente e sem gradiente. Na sequenciação com gradiente o gel foi composto por uma solução de acrilamida/ureia "bottom" (30 ml de solução de 40% acrilamida, 100 ml 5x TBE, 92 g ureia, 20 g sacarose, 10 mg de azul de bromofenol) e por uma solução de 6% acrilamida/ureia "top" (75 ml de solução de 40% acrilamida, 50 ml 5x TBE, 230 g ureia em 500 ml de água). Na sequenciação sem gradiente o gel foi preparado numa solução contendo 21 g de ureia, 6 ml de 10x TBE, 5 ml de 50% acrilamida Long Ranger (HydroLink, AT Biochem, Inc., USA), 25 µl TEMED, 250 µl 10% AMPS e o volume completado com água destilada até 50 ml. Aplicou-se uma corrente constante de 60 Watts em tampão 1x TBE e 0,6x TBE, respectivamente, para geles com gradiente e sem gradiente. Utilizou-se a unidade "Sequencing Gel Electrophoresis System" modelo S2 da BRL (Bethesda Research Laboratories, Life Technologies, Inc.). Fixou-se o gel em solução de 15% metanol e 5% ácido acético durante 30 min, apenas na sequenciação com gradiente. O gel depois de seco a 80°C, ficou a expôr durante 18 a 24 hs, à temperatura ambiente.

PCR ("polimerase chain reaction") - O PCR foi realizado com a enzima *AmpliTaq*ADN polimerase (Perkin-Elmer, Cetus). Os "primers" utilizados para a amplificação do ADN dos clones de λZAPII, obtidos no rastreio da biblioteca de cADN λZAPII, foram desenhados a partir do cADN XT-2 (vêr apêndice). Usou-se com "primer sense" a sequência: 5'-GCAGGTGGACGATAAGGATG-3' e como "primer anti-sense" a sequência 5'-GTTGCCATAAGTCATGTCTC-3'. A amplificação fez-se num volume final de 100 µl constituído por: 2 µl de ADN (10 a 100 ng), 2 µl de cada dNTPs (dATP, dCTP, dGTP e dTTP, Boeheringer Manheim) numa concentração final de 10 mM, 10 µl de 10x tampão de PCR [100 mM Tris-HCl pH=8,3, 500 mM KCl, 15 mM $MgCl_2$, 0,01% (p/v) gelatina, Perkin-Elmer, Cetus], 0,5 µM de cada "primer" e o volume foi completado com água destilada estéril. Condições da reacção: desnaturação prévia de 5 min a 97°C seguida de 34 ciclos constituídos por uma desnaturação (95°C - 30 seg), o "annealing" (30 seg a 50°C) e a síntese (3 min a 72°C). A adição de 0,5 µl de *AmpliTaq* ADN polimerase (5 U/µl) foi feita após a desnaturação prévia. A amplificação dos clones de λZAPII foi feita com o "primer" universal (5'-AATACGACTCACTATAG-3') e o "primer" reverso (5'-AACAGCTATGACCATG-3'), numa concentração final de 0,1 µM. O volume final da reacção foi de 100 µl e com os contituintes já referidos. As condições de reacção foram as

seguintes: desnaturação prévia de 5 min a 97°C seguida de 34 ciclos constituídos por uma desnaturação (94°C-15 seg), o "annealing" (30 seg a 60°C) e a síntese (2 min a 72°C). A adição de 0,5 µl de *AmpliTaq* ADN polimerase (5 U/µl) foi feita após a desnaturação prévia. Os produtos de PCR (20 µl) obtidos foram analisados em gel a 1% contendo 1 µl de brometo de etídio (10 mg/ml), em tampão 1x TAE, durante 1-2 hs, a 70-80 volts. Foi utilizado o equipamento da H.S.I. (Hoefer Scientific Instruments, USA), unidade "Max Submarine, Agarose Gel Unit, Model HE 99".

Transcrição *in vitro* - Foi utilizado o "kit" da Boehringer Mannheim. Os plasmídeos pSPT18 e pSPT19 contendo o "insert" foram linearizados, respectivamente, com *Sac*I e *Pst*I. A 1 µg (4 µl) de ADN linearizado foram adicionados 6 µl da mistura em partes iguais de nucleótidos (10 mmol/l de ATP, CTP e UTP), 1 µl GTP (10 mmol/l), 1 µl m^7GpppG (5 mM), 2 µl de tampão de transcrição (200 mM Tris-HCl pH=7,5, 30 mM $MgCl_2$, 10 mM espermidina, 0,05% albumina bovina sérica), 4 µl de água destilada e 2 µl de T7 ARN polimerase (10 U/ml em 50% (v/v) tampão de glicerol). A mistura da reacção foi incubada 1 h a 37°C. O ADN foi removido por incubação com 2 µl de DNase I livre de RNase [20 U/ml em 50% (v/v) tampão de glicerol)], durante 15 min, a 37°C. Analisou-se uma alíquota da mistura da reacção em gel de agarose a 1% em tampão 1x TAE, para confirmação da presença de ARN. O ARN foi precipitado com etanol absoluto, ON, a -20°C. Como controlo foi utilizado o ADN dos plasmídeos pSPT18 e pSPT19 cortado com *Eco*RI.

Tradução *in vitro* - Foi utilizado o "kit" de lisado de reticulócitos de coelho (Amersham, UK). A 4 µl do ARN obtido da transcrição *in vitro*, adicionaram-se 39 µl de lisado de reticulócitos de coelho e 7 µl de L-[^{35}S]metionina (Amersham, UK). A mistura de reacção foi incubada durante 1 h a 30°C. A hidrólise dos complexos de aminoacil-tARN foi feita a 37°C, durante 10 min. Como controlo utilizou-se o mARN de vírus do mosaico do tabaco (TMV) e o ARN obtido *in vitro* dos plasmídeos pSPT18 e pSPT19. Procedeu-se à imunoprecipitação, com o soro de coelho policlonal (Rb-7) e com o anticorpo monoclonal (mAb 402), e à electroforese em SDS-PAGE num gel a 10%. Depois de seco o gel ficou a expôr a -70°C (filme Kodak), durante 10 a 15 dias.

Microscopia electrónica - Sincronizaram-se as células HEp-2 com 0,4 µg/ml colquicina durante 16 hs. Recolheram-se as células e lavaram-se em PBS por duas vezes. A fixação foi feita em 0,3% gluteraldeído e 2% de formaldeído, por 1 h, a 4°C. Lavou-se em PBS (1 vez 10 min), PBS contendo 1 mM glicina (2 vezes 10 min) e PBS contendo 1% de azul de metileno (1 vez 10 min). A lavagem e desidratação foi feita em PBS (2 vezes 10 min), etanol a 50% (1 vez 10 min), etanol a 70% (1 vez 10 min), etanol a 90% (1 vez 10 min) e etanol a 100% (4 vezes 15 min). A inclusão foi feita ON em 100% LR White (resina

hidrofílica), seguida de 1 h com 100% LR White (novo) e a inclusão foi feita em cápsula fechada em 100% LR White (novo). A polimerização efectou-se ON, a 60°C. Fizeram-se cortes ultrafinos que foram colhidos em grelhas de malha apertada (400 "mesh") e cobertos por membrana de "formvar" ou "parlodion" reforçado por película fina de carvão. Para a imunocitoquímica, as grelhas foram lavadas 10 min em PBS e o bloqueio dos locais inespecíficos foi feito com PBS contendo 1% de BSA ultrapura (Sigma), durante 30 min. Os primeiros anticorpos foram diluídos a 1:5 (Rb-7) ou a 1:10 (mAb 402) em PBS contendo 1% BSA, 3% NaCl, 5% FCS e 0,05% Tween 80, durante 4 a 6 hs, à temperatura ambiente. Lavaram-se as grelhas 6 vezes 10 min em PBS contendo 1% BSA, 3% NaCl, 5% FCS e 0,05% Tween 80. Os segundos anticorpos, IgG de carneiro anti-ratinho (E•Y Labs, San Mated, CA) e IgG (H+L) de carneiro anti-coelho (Amersahm, UK) revestidos com ouro coloidal de 15 nm, foram diluídos a 1:20 em PBS contendo 1% BSA, 3% NaCl, 5% FCS e 0,05% Tween 80 e a incubação foi feita durante 1 h. Lavaram-se as grelhas 6 vezes 10 min em PBS contendo 1% BSA, 3% NaCl, 5% FCS e 0,05% Tween 80. A coloração foi feita com citrato de chumbo, durante 30 seg. O controlo das ligações inespecíficas foi feito com soros pré-imunes e com a adição apenas dos segundos anticorpos. As amostras foram analisadas no microscópio electrónico Zeiss (Carl Zeiss, EM 10C, West Germany).

RESULTADOS

Isolamento dos clones de cADN

Os anticorpos monoclonais de ratinho, mAb 58 e mAb 402, foram usados para fazer o rastreio da biblioteca de cADN de células HeLa S3 humanas em λgt11, em condições de expressão. A escolha destes anticorpos baseou-se no facto dos mesmos reconhecerem vários antigénios, fosforilados e desfosforilados, e nos diferentes padrões de imunofluorescência evidenciados nas células HEp-2 em mitose. O mAb 58 marca o material que se encontra à superfície dos cromossomas condensados, enquanto que o mAb 402 reconhece os cromossomas metafásicos.

O rastreio da biblioteca (600000 fagos) foi feito após a indução da expressão de proteínas de fusão na presença de membranas impregnadas com IPTG. O rastreio com o anticorpo monoclonal 58 não permitiu o isolamento de qualquer clone. O rastreio com o anticorpo monoclonal 402 possibilitou o isolamento de dois clones, que foram designados por XT-2 e XT-5.

O ADN de fago de cada clone foi isolado e digerido com a enzima de restrição *Eco*RI, por forma a determinar o tamanho do "insert" de cada cADN. A análise electroforética, em gel de agarose a 1%, de cada clone permitiu estimar o tamanho dos mesmos em cerca de 1,2 kb (Fig. 15). A subclonagem dos dois "inserts" em pBS (+/-) e posterior tratamento dos mesmos com várias enzimas de restrição, não mostrou qualquer variação nos padrões de restrição obtidos (Fig. 16). A hibridização cruzada, verificada por "dot blot", entre estes dois cADNs sugeria a existência do mesmo ADN em cada um dos clones isolados (Fig. 17). A identidade dos dois cADNs (XT-2 e XT-5) foi determinada por "Southern blot" utilizando como sonda o ADN do "insert" do clone XT-2. Esta análise confirmou a presença do mesmo tipo de ADN entre os dois clones dado que se verificou a hibridização dos dois ADNs com a sonda XT-2 (Fig. 18).

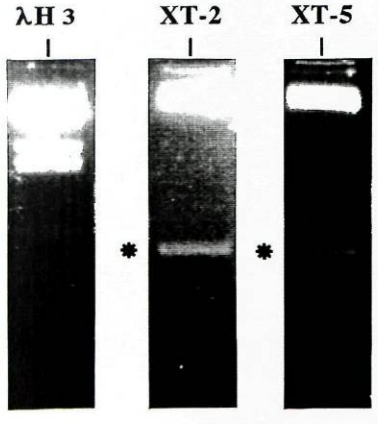


Figura 15 - ADN dos fagos XT-2 e XT-5 digerido com a enzima de restrição *Eco*RI e separado por electroforese em gel de agarose a 1%. Nos dois clones isolados verifica-se a presença de um "insert" com cerca de 1,2 kb (*).

RESULTADOS

Isolamento dos clones de cADN

Os anticorpos monoclonais de ratinho, mAb 58 e mAb 402, foram usados para fazer o rastreio da biblioteca de cADN de células HeLa S3 humanas em λgt11, em condições de expressão. A escolha destes anticorpos baseou-se no facto dos mesmos reconhecerem vários antigénios, fosforilados e desfosforilados, e nos diferentes padrões de imunofluorescência evidenciados nas células HEp-2 em mitose. O mAb 58 marca o material que se encontra à superfície dos cromossomas condensados, enquanto que o mAb 402 reconhece os cromossomas metafásicos.

O rastreio da biblioteca (600000 fagos) foi feito após a indução da expressão de proteínas de fusão na presença de membranas impregnadas com IPTG. O rastreio com o anticorpo monoclonal 58 não permitiu o isolamento de qualquer clone. O rastreio com o anticorpo monoclonal 402 possibilitou o isolamento de dois clones, que foram designados por XT-2 e XT-5.

O ADN de fago de cada clone foi isolado e digerido com a enzima de restrição *Eco*RI, por forma a determinar o tamanho do "insert" de cada cADN. A análise electroforética, em gel de agarose a 1%, de cada clone permitiu estimar o tamanho dos mesmos em cerca de 1,2 kb (Fig. 15). A subclonagem dos dois "inserts" em pBS (+/-) e posterior tratamento dos mesmos com várias enzimas de restrição, não mostrou qualquer variação nos padrões de restrição obtidos (Fig. 16). A hibridização cruzada, verificada por "dot blot", entre estes dois cADNs sugeria a existência do mesmo ADN em cada um dos clones isolados (Fig. 17). A identidade dos dois cADNs (XT-2 e XT-5) foi determinada por "Southern blot" utilizando como sonda o ADN do "insert" do clone XT-2. Esta análise confirmou a presença do mesmo tipo de ADN entre os dois clones dado que se verificou a hibridização dos dois ADNs com a sonda XT-2 (Fig. 18).

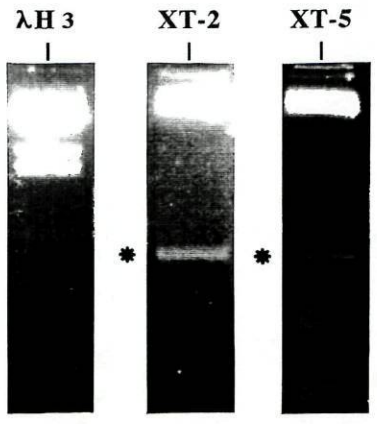


Figura 15 - ADN dos fagos XT-2 e XT-5 digerido com a enzima de restrição *Eco*RI e separado por electroforese em gel de agarose a 1%. Nos dois clones isolados verifica-se a presença de um "insert" com cerca de 1,2 kb (*).

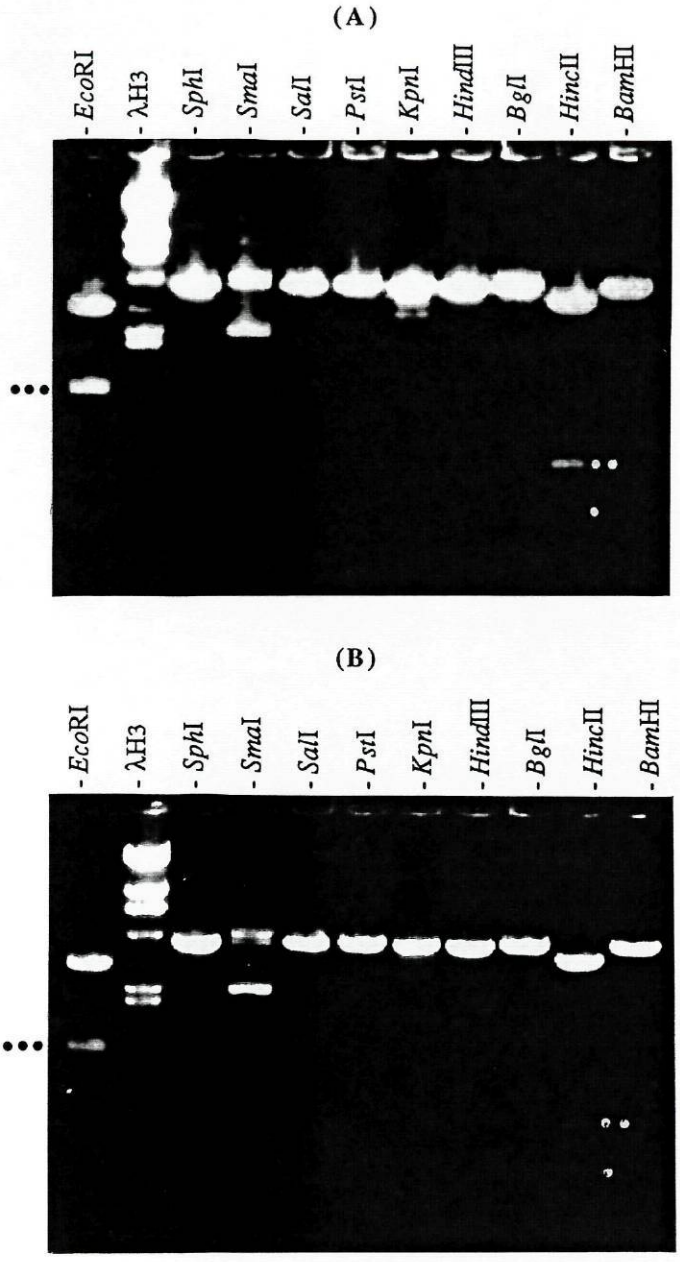


Figura 16 - ADN dos fagos XT-2 (**A**) e XT-5 (**B**) digerido com várias enzimas de restrição (*Eco*RI, *Sph*I, *Sma*I, *Sal*I, *Pst*I, *Kpn*I, *Hind*III, *Bgl*I, *Hinc*II e *Bam*HI) e separado por electroforese em gel de agarose a 1%. A digestão com *Eco*R I liberta um fragmento com cerca de 1,2 kb (***). A digestão com *Hinc*II liberta dois fragmentos com cerca de 450 bp (**) e 100 bp (*). As restantes enzimas de restrição não digeriram os cADNs dos fagos XT-2 e XT-5.

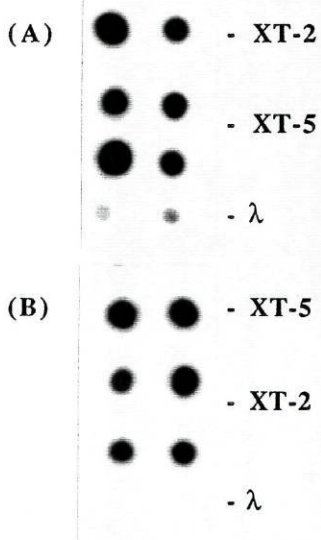


Figura 17 - "Dot blot" do ADN obtido dos vários positivos isolados das placas correspondentes aos clones XT-2 e XT-5. Usou-se com controlo negativo o ADN dos fago λ e como controlo positivo o ADN dos fagos XT-2 e XT-5. Utilizaram-se como sondas os ADNs dos "inserts" XT-2 (**A**) e XT-5 (**B**) marcados radioactivamente com [^{32}P].

Figura 18 - "Southern blot" dos "inserts" isolados do ADN dos fagos XT-5 (**A**) e XT-2 (**B**), após digestão com a enzima de restrição *Eco*RI e hibridização com o ADN do clone XT-2 marcado radioactivamente com [^{32}P].

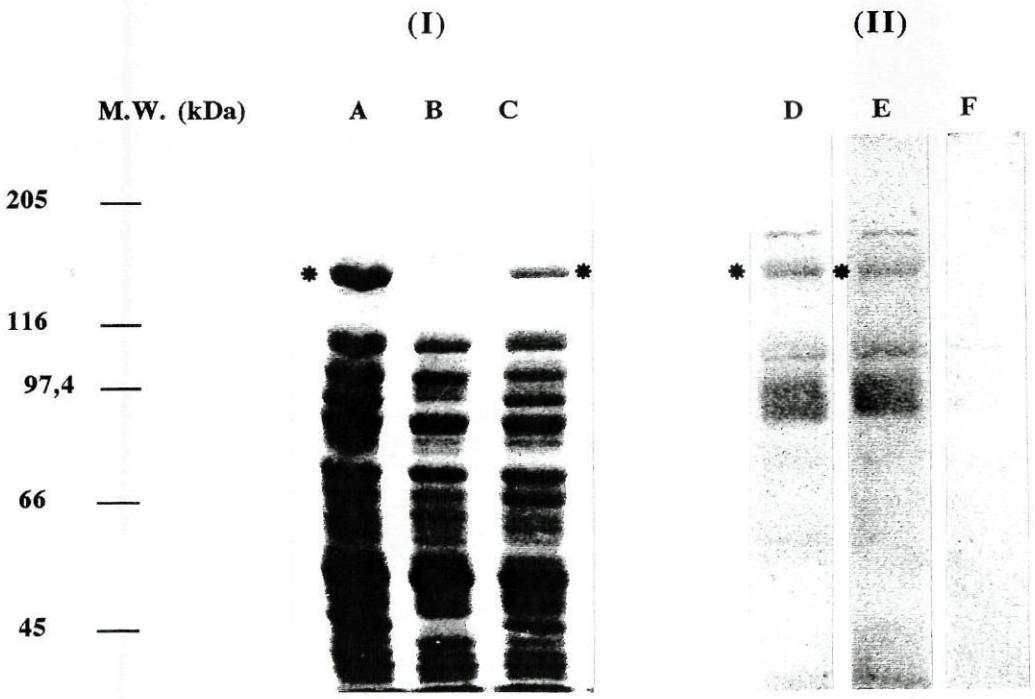


Figura 19 - (**I**) Gel de SDS-PAGE a 7,5%, corado com azul de Coomasssie, dos lisados proteicos dos lisogénios recombinantes correspondentes aos clones XT-2 (**A**) e XT-5 (**C**) que mostram a presença da β-galactosidase na forma de proteína de fusão e com um peso molecular aparente de 140 kDa (*). Como controlo negativo foi utilizado o lisado de um lisogénio não recombinante (**B**).

(**II**) - "Western blot" das mesmas amostras revelado com o mAb 402 que reconhece a proteína de fusão com um peso molecular aparente de 140 kDa (*) nos clones XT-2 (**D**) e XT-5 (**E**). Como controlo negativo foi utilizado o lisado de um lisogénio não recombinante (**F**). Foram usados como marcadores de peso molecular (Sigma): miosina (205 kDa), fosforilase b (97,4 kDa), albumina bovina (66 kDa) e ovalbumina (45 kDa).

Produção de lisogénios recombinantes

Os lisogénios recombinantes foram isolados por comparação do crescimento a 42°C e a 30°C, após a infecção de bactérias *E. coli* Y1089 com os fagos isolados no rastreio da biblioteca com o mAb 402. A presença de um repressor sensível à temperatura no bacteriófago λgt11 e nos seus derivados permite a expressão eficiente de lisogénios à temperatura de 30°C. Os lisogénios recombinantes (colónias termossensíveis) foram isolados de acordo com a presença e a ausência de crescimento, respectivamente, às temperaturas de 30°C e 42°C. Utilizou-se como controlo uma colónia de lisogénio não recombinante (termoresistente) que tem a capacidade de crescer tanto a 30°C como a 42°C.

A partir de colónias termossensíveis prepararam-se lisados proteicos dos lisogénios recombinantes, correspondentes aos clones XT-2 e XT-5. A presença do gene da β-galactosidase no vector de expressão λgt-11 e a inserção do "insert" no quadro de leitura correcto permite a expressão de uma proteína de fusão cujo terminal amino é constituído pela β-galactosidase e cujo terminal carboxílico contém a proteína expressa pelo cADN. A expressão da proteína de fusão, em níveis elevados, é feita após a remoção do repressor do operão da lactose pela adição de IPTG ao meio de cultura. As células foram lisadas por fervura e na presença de SDS (tampão SDS-lisogénios). Os lisados obtidos foram separados em gel de SDS-PAGE a 7,5%, transferidos para nitrocelulose e detectados com o mAb 402. As proteínas de fusão obtidas para os dois cADN mostraram, por "western blot", um peso molecular aparente de 150 kDa. Deste modo, o peso molecular aparente das proteínas codificadas pelos cADNs XT-2 e XT-5 foi estimado em cerca de 30 kDa, tendo em conta que o peso molecular aparente da β-galactosidase é de 116 kDa (Fig. 19).

A subclonagem do "insert" XT-2 no fagemídeo pMAL-cRI e a expressão da proteína de fusão neste vector permitiram obter um antigénio recombinante com um peso molecular aparente de 80 kDa (Fig. 20). A proteína de fusão obtida confirma a existência de um antigénio com cerca 30 kDa, uma vez que o peso molecular aparente da proteína "maltose binding" é de 44 kDa (Fig. 21). O vector plasmídico pMAL-cRI permite a expressão de uma proteína de fusão da "maltose binding protein" (MBP), que tem a vantagem de ser purificada, por cromatografia de afinidade em coluna de amilose, e posteriormente de ser clivada pelo factor Xa, o que possibilita o isolamento da proteína codificada pelo gene clonado.

A análise comparativa dos padrões de restrição obtidos após o tratamento dos clones XT-2 e XT-5 com várias enzimas de restrição, o reconhecimento de antigénios recombinantes, pelo mAb 402, com pesos moleculares aparentes iguais e a hibridização

cruzada entre os referidos clones em análise de "dot blot" e de "Southern blot" apontam para a existência do mesmo ADN nos clones isolados e analisados. Deste modo, os restantes ensaios foram efectuados no cADN designado por XT-2.

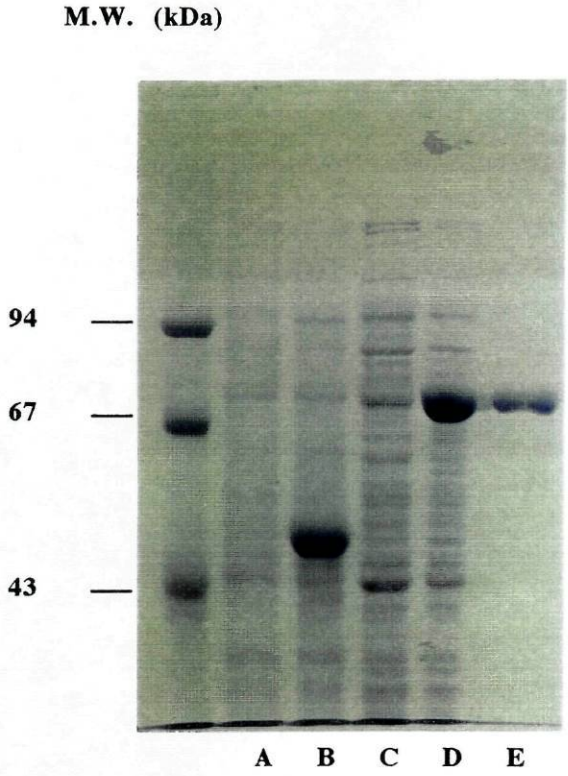


Figura 20 - Gel de SDS-PAGE a 15 %, corado com azul de Coomasssie, da proteína "maltose binding" em células não induzidas (**A**), da proteína "maltose binding" em células induzidas após a adição de IPTG (**B**), da proteína de fusão "maltose binding" em células não induzidas (**C**), da proteína de fusão "maltose binding" em células induzidas após a adição de IPTG (**D**) e proteína de fusão "maltose binding" purificada por cromatografia de afinidade em coluna de amilose (**E**). Foram usados como marcadores de peso molecular (Pharmacia): fosforilase b (94 kDa), BSA (67 kDa) e ovalbumina (43 kDa).

O cADN XT-2 foi utilizado como sonda para um novo rastreio da biblioteca de cADN de expressão humana de células HeLa S3 em λgt11. Foram encontrados mais dois positivos. O ADN de cada fago foi isolado e tratado com a enzima de restrição *Eco*RI. A análise electroforética, em gel de agarose a 1%, dos dois ADN digeridos mostrou que cada um dos "inserts" tinha um tamanho de 1,2 kb (Fig. 22). O tamanho dos cADNs e o reconhecimento dos mesmos pelo sonda do cADN XT-2 indicou que os positivos isolados neste rastreio correspondiam ao cADN inicialmente isolado, ou seja ao clone XT-2.

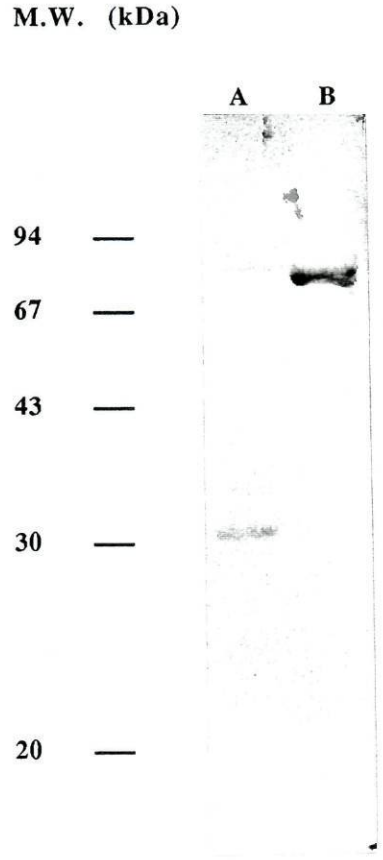


Figura 21 -Gel de SDS-PAGE a 15% corado com azul de Coomasssie: (**A**) - proteína de fusão "maltose binding", purificada por cromatografia de afinidade em coluna de amilose e clivada com o factor Xa. É evidenciada a presença de polipeptídeo, codificado pelo clone XT-2, com o peso molecular aparente de 30 kDa; (**B**) - proteína de fusão "maltose binding" purificada por cromatografia de afinidade em coluna de amilose e não clivada (80 kDa). Foram usados como marcadores de peso molecular (Pharmacia): fosforilase b (94 kDa), BSA (67 kDa), ovalbumina (43 kDa), anidrase carbónica (30 kDa) e α-lactoalbumina (20 kDa).

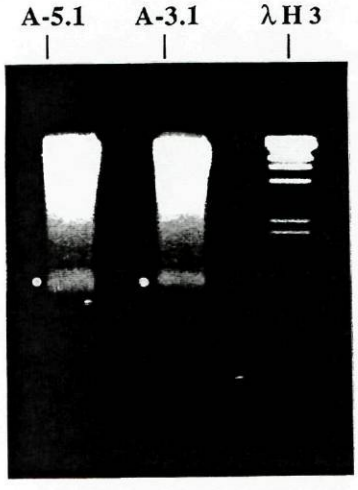


Figura 22 - ADN dos dois clones isolados (A-5.1 e A-3.1) com a sonda XT-2 marcada radioactivamente com [^{32}P], digeridos com a enzima de restrição *Eco*RI, separado em gel de agarose a 1% e que evidenciam a presença de "inserts" com cerca de 1,2 kb (*).

Produção do anticorpo policlonal

A subclonagem do "insert" XT-2 no fagemídeo pMAL-cRI teve por objectivo a expressão de uma proteína de fusão e a purificação da mesma por cromatografia de afinidade. Esta proteína de fusão purificada foi injectada num coelho para a produção de um anticorpo policlonal, de acordo com os métodos convencionais de imunização. O soro total do coelho foi imunopurificado em suporte sólido na presença da proteína de fusão produzida pelo pMAL-cRI e purificada por cromatografia de afinidade. O anticorpo policlonal imunopurificado foi designado por **Rb-7**.

Padrões de imunofluorescência exibidos por mAb 402 e Rb-7

As células humanas HEp-2 e HeLa são células epiteliais tumorais, respectivamente, do carcinoma da laringe e do carcinoma cervical. Estas células foram utilizadas para o estudo citológico dos antigénios reconhecidos pelos diferentes anticorpos testados. Como células tumorais que são, elas podem ser mantidas em cultura por tempo indefinido desde que lhes sejam proporcionadas, entre outros factores, as condições necessárias ao seu desenvolvimento (nutrientes, pressão osmótica, temperatura, pH, quantidade de O_2 e de CO_2). O aspecto morfológico destas células é variável e determinado pelas condições de crescimento. Assim, nas culturas em fase inicial de crescimento as células têm um aspecto alongado e não sobreposto (Fig. 23-I). À medida que as culturas se vão tornando confluentes, as células passam a ter uma forma arredondada e as características inerentes às propriedades de crescimento (perda de inibição de contacto, formação de "focus" ou agregados celulares, capacidade de invasão e sobreposição de crescimento) e genéticas (aneuplodia) dos tumores tornam-se mais evidentes (Fig. 23-II).

A determinação dos padrões característicos exibidos pelos anticorpos monoclonal (mAb 402) e policlonal (Rb-7) foi feita em células HEp-2 e HeLa não sincronizadas. As células foram fixadas, incubadas com os dois anticorpos e analisadas no microscópio laser confocal de varrimento MRC-600 (COMOS software, Bio Rad Labs).

A reactividade do anticorpo monoclonal 402 nas células em mitose mostrou-se restrita aos cromossomas condensados (Fig 24-I e 24 II). Nas células em interfase, os antigénios nucleares reconhecidos apresentavam uma distribuição granular sendo a reactividade deste anticorpo mais acentuada à volta dos nucléolos (Fig. 25). Nas células HeLa obtiveram-se os mesmos padrões de imunofluorescência (Fig. 26). Estes resultados estão de acordo com os

obtidos anteriormente no estudo dos padrões de imunofluorescência efectuado em microscopia óptica (Bronze-da-Rocha et al. 1992) e que estão descritos na caracterização dos anticorpos monoclonais.

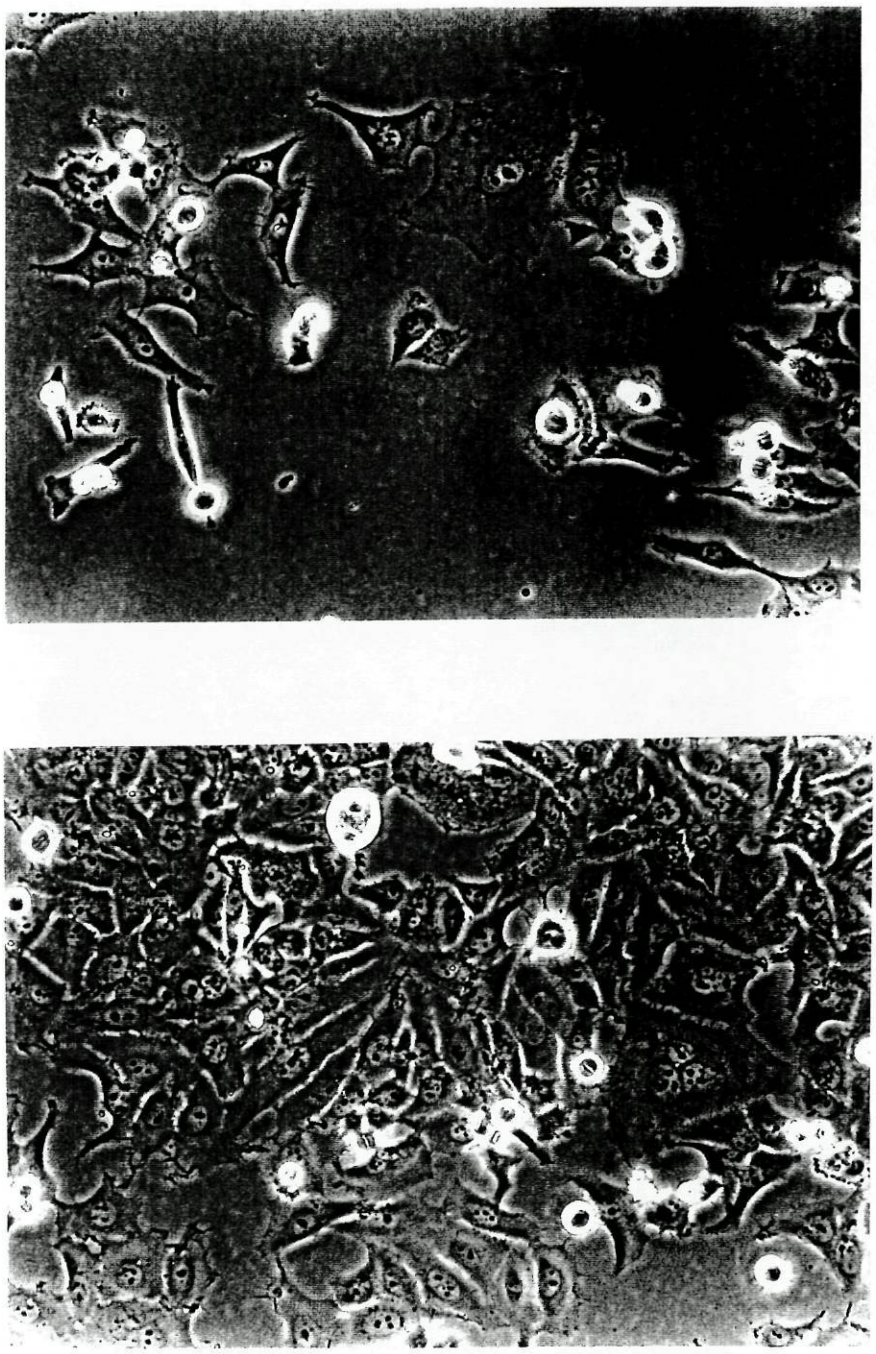


Figura 23 - (I) - Aspecto das células HEp-2 no microscópio de contraste de fase (30x) numa fase inicial de crescimento.

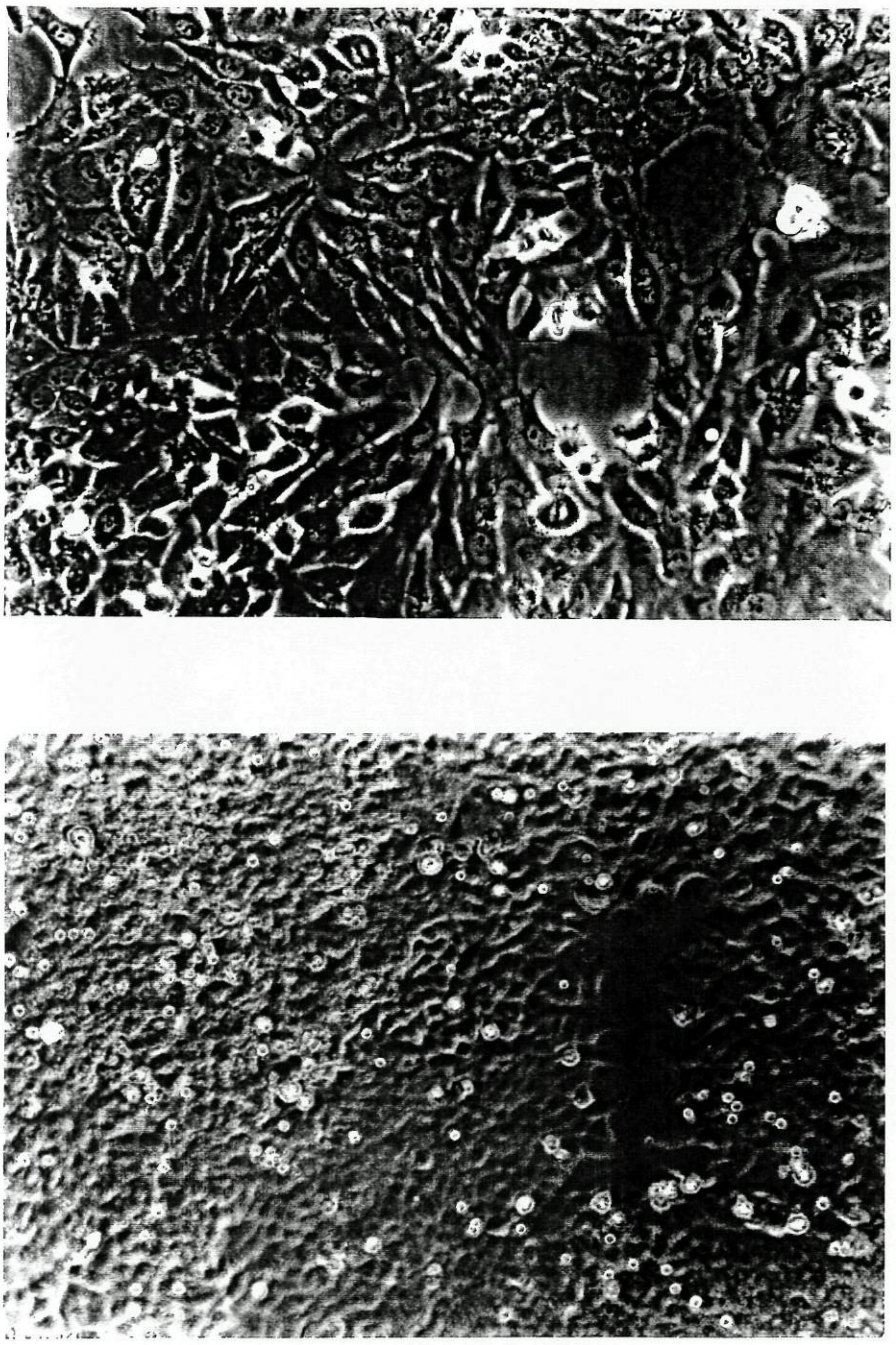


Figura 23 - (II) - Aspecto das células HEp-2 no microscópio de contraste de fase (30x) em culturas já confluentes.

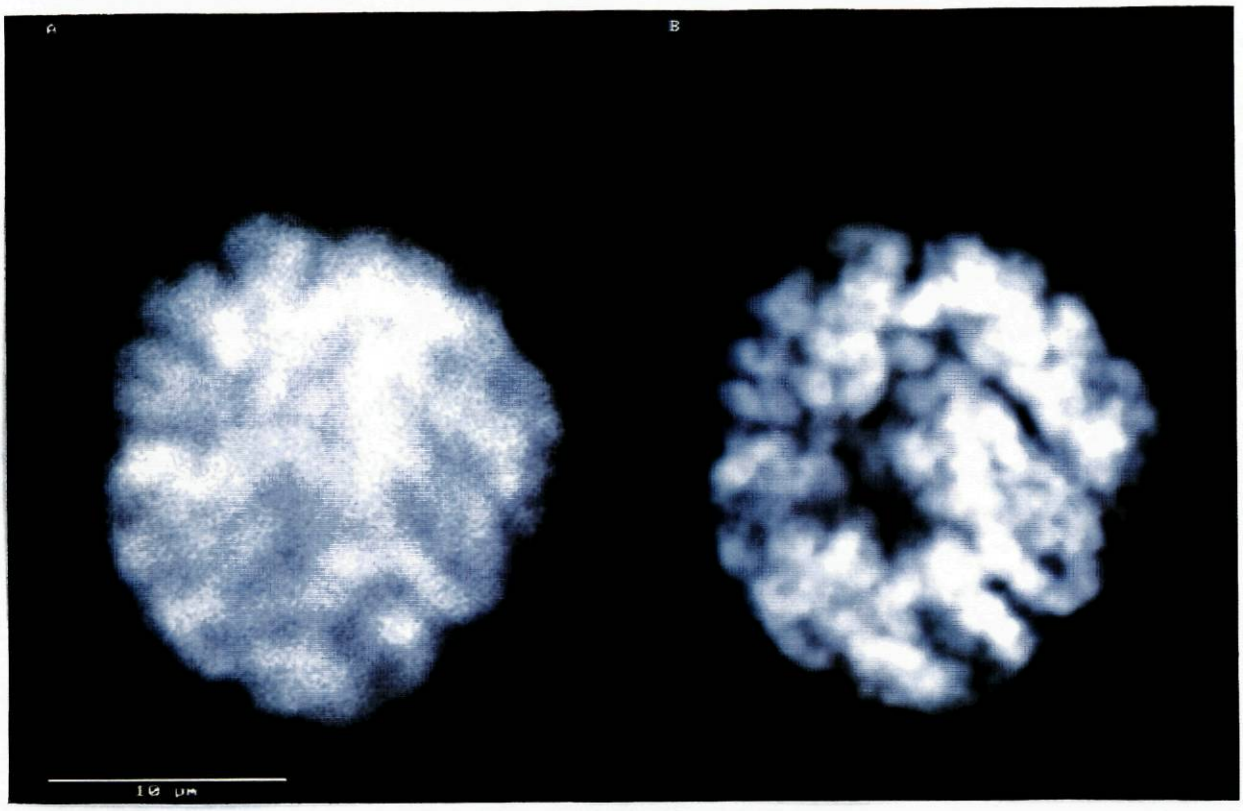


Figura 24-I - Células HEp-2 em profase: padrão de imunofluorescência do mAb 402 diluído a 1:50 (**A**) e a correspondente marcação do ADN com iodeto de propídio (**B**) no microscópio laser confocal.

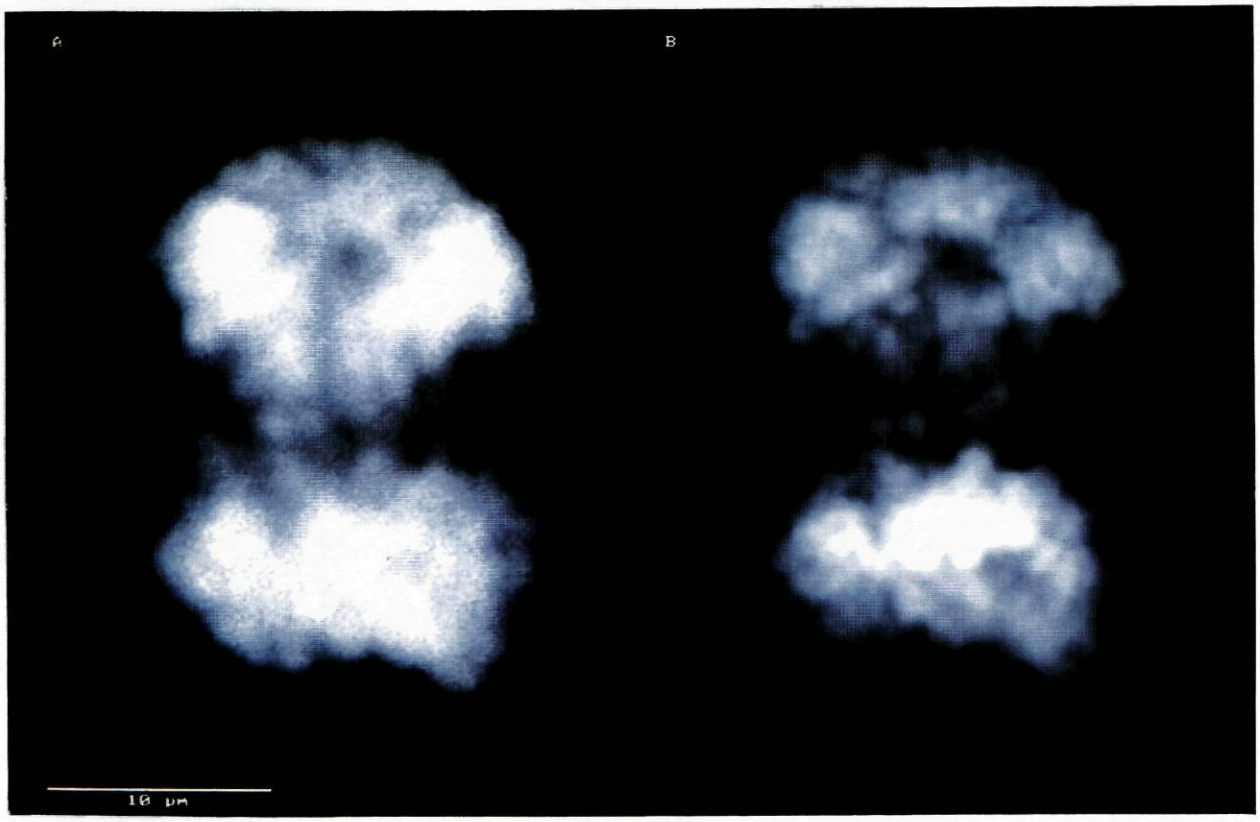


Figura 24-II - Células HEp-2 em anafase: padrão de imunoluorescência do mAb 402 diluído a 1:50 (**A**) e a correspondente marcação do ADN com iodeto de propídio (**B**) no microscópio laser confocal.

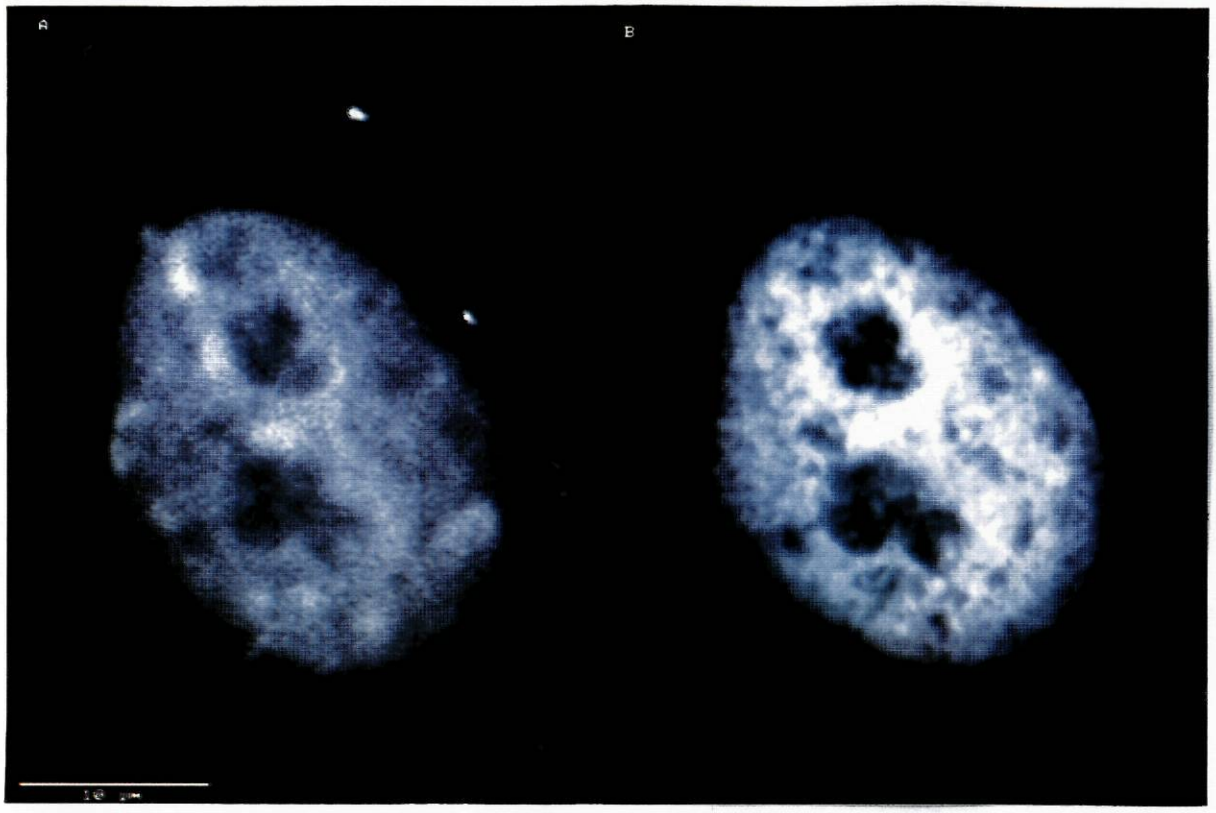


Figura 25 - Células HEp-2 em interfase: padrão de imunoluorescência do mAb 402 diluído a 1:50 (**A**) e a correspondente marcação do ADN com iodeto de propídio (**B**) no microscópio laser confocal.

A marcação obtida com o anticorpo policlonal imunopurificado foi muito semelhante à obtida com o mAb 402. Nas células em interfase, o anticorpo Rb-7 reconhece antigénios nucleares com um localização dispersa, embora com uma concentração mais evidente à volta dos nucléolos (Fig. 27). Nas células em mitose só os cromossomas condensados é que são marcados (Fig. 28, 29, 30 e 31). A marcação restrita aos cromossomas condensados também foi evidenciada nos fibroblastos de ratinho (células NIH) sincronizados com colquicina (Fig. 32). Estas modificações na distribuição celular que o antigénio reconhecido por estes anticorpos evidenciou nas células em interfase e em mitose sugere uma associação com o ciclo celular, mas não estabelece uma relação directa com o mesmo.

Por microscopia electrónica, verificou-se que qualquer um dos anticorpos reconhecia os cromossomas metafásicos em células HEp-2 sincronizadas com a colquicina, sem haver uma associação específica a estruturas características dos cromossomas condensados, como o cinetocoro ou os centrómeros, ou aos centrossomas (Fig 33 e 34).

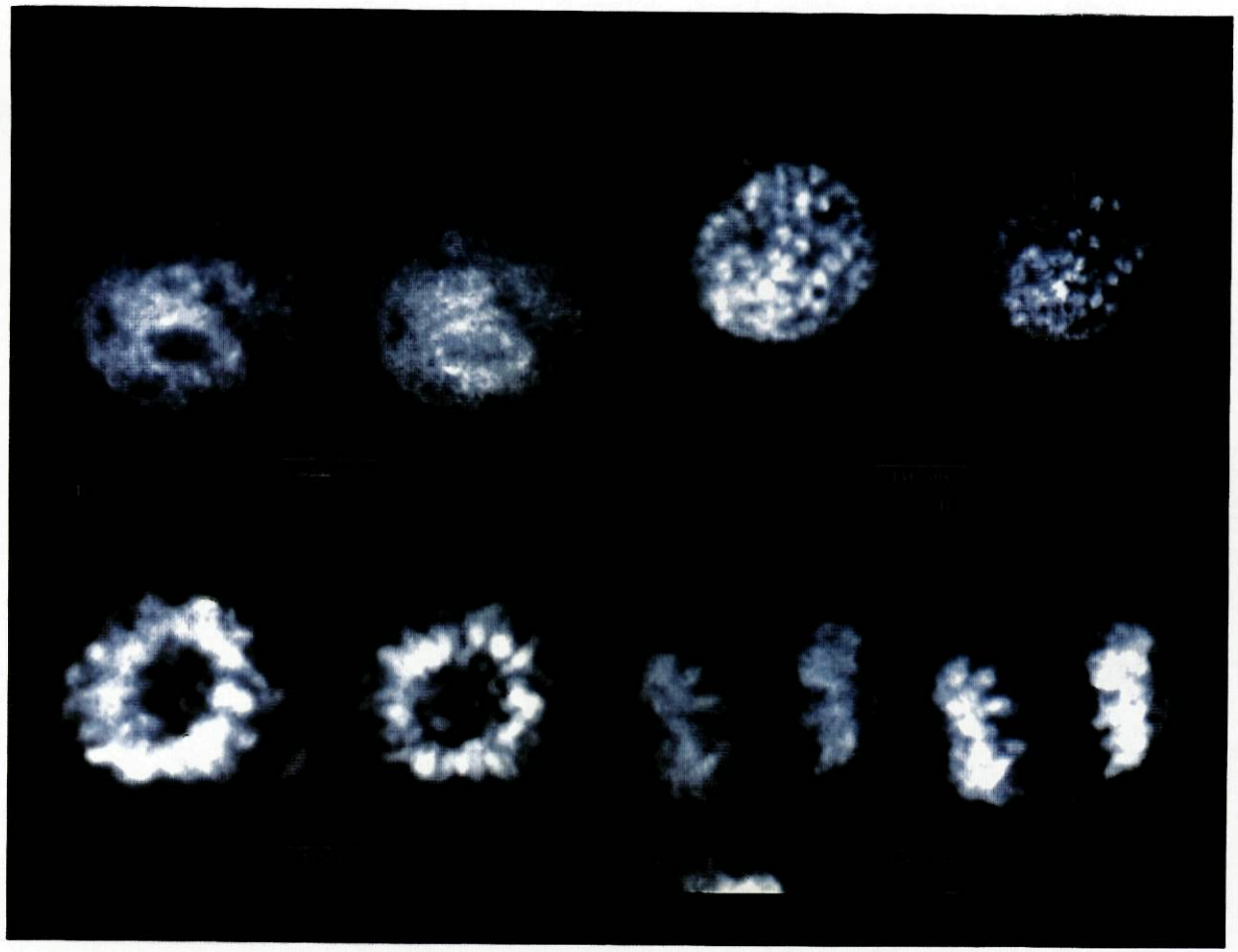


Figura 26 - Padrões de imunofluorescência do mAb 402 (diluído a 1:50) nas células HeLa em interfase (**A**), profase (**C**), metafase (**E**) e anafase (**G**), e as correspondentes marcações do ADN com iodeto de propídio (**B**, **D**, **F** e **H**) no microscópio laser confocal.

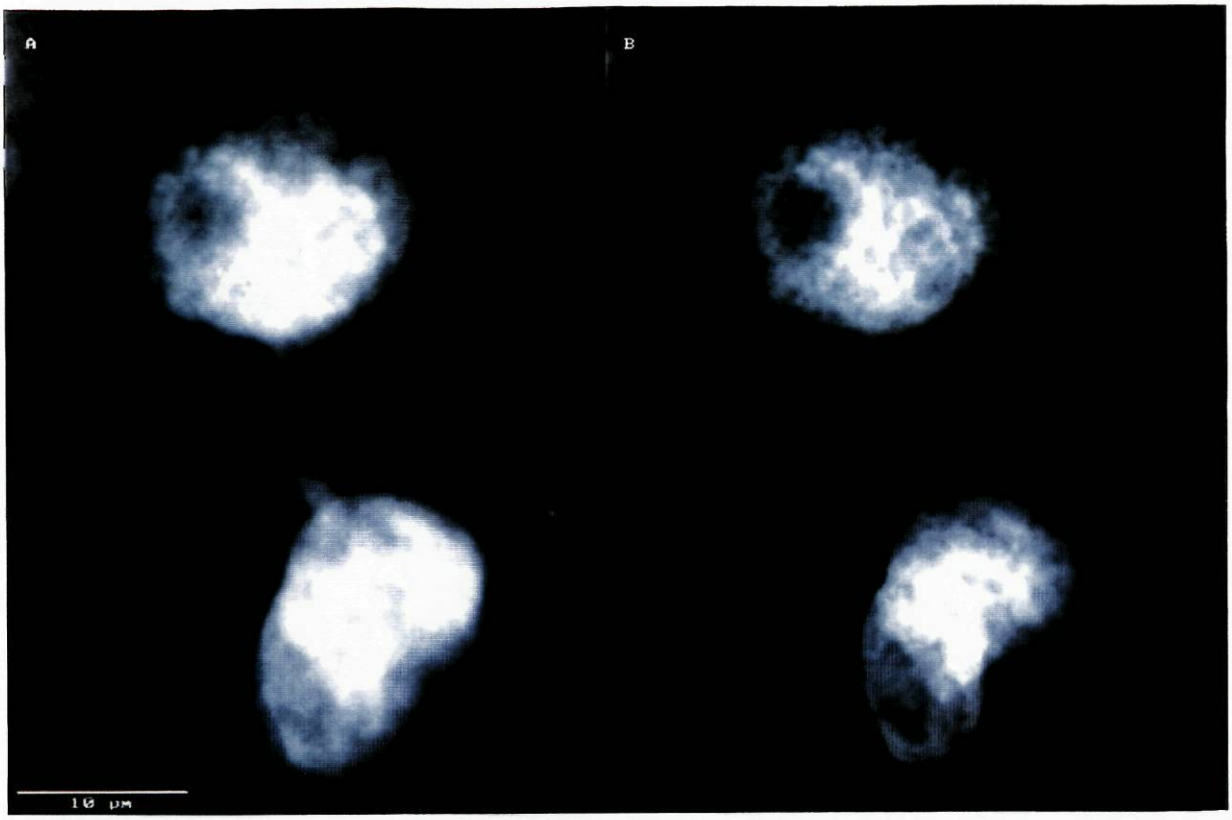


Figura 27 - Células HEp-2 em interfase: padrão de imunofluorescência do anticorpo policlonal Rb-7 diluído a 1:20 (**A**) e a correspondente marcação do ADN com iodeto de propídio (**B**) no microscópio laser confocal.

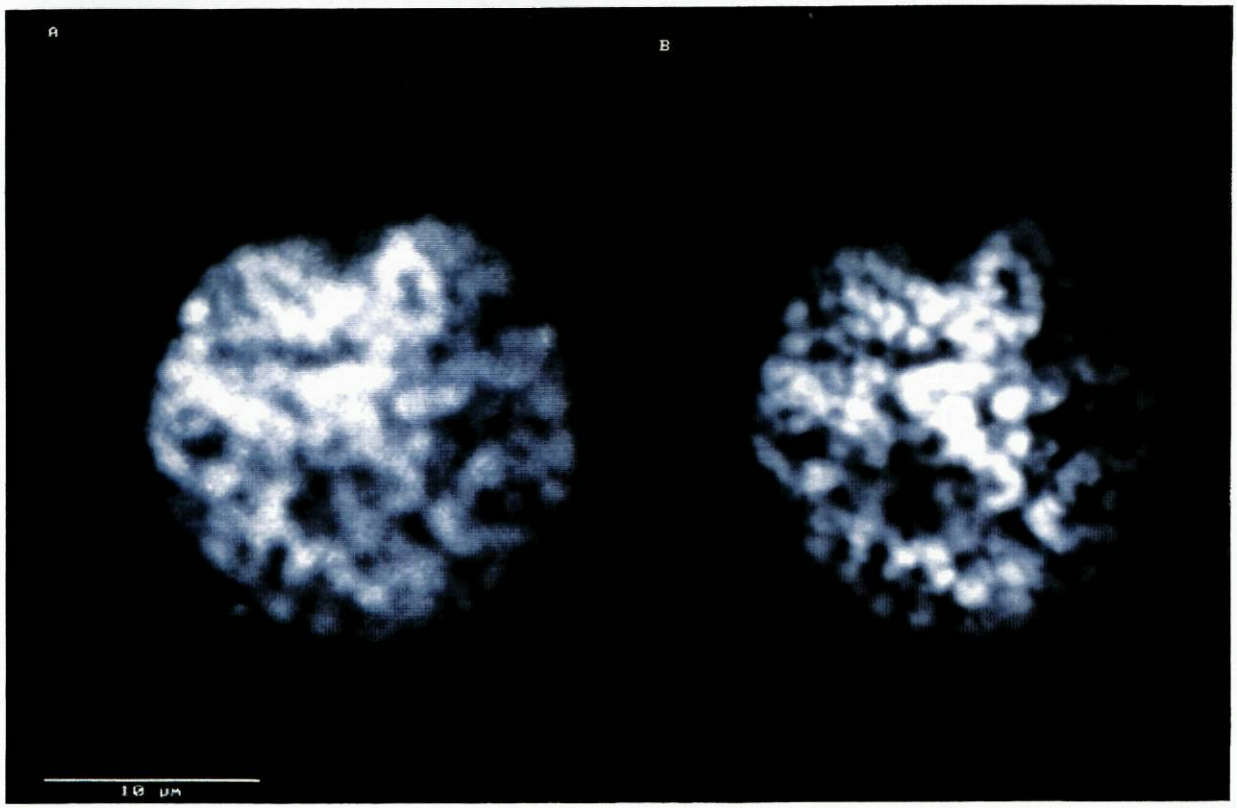


Figura 28 - Células HEp-2 em profase: padrão de imunofluorescência do anticorpo policlonal Rb-7 diluído a 1:20, diluído a 1:20 (**A**) e a correspondente marcação do ADN com iodeto de propídio (**B**) no microscópio laser confocal.

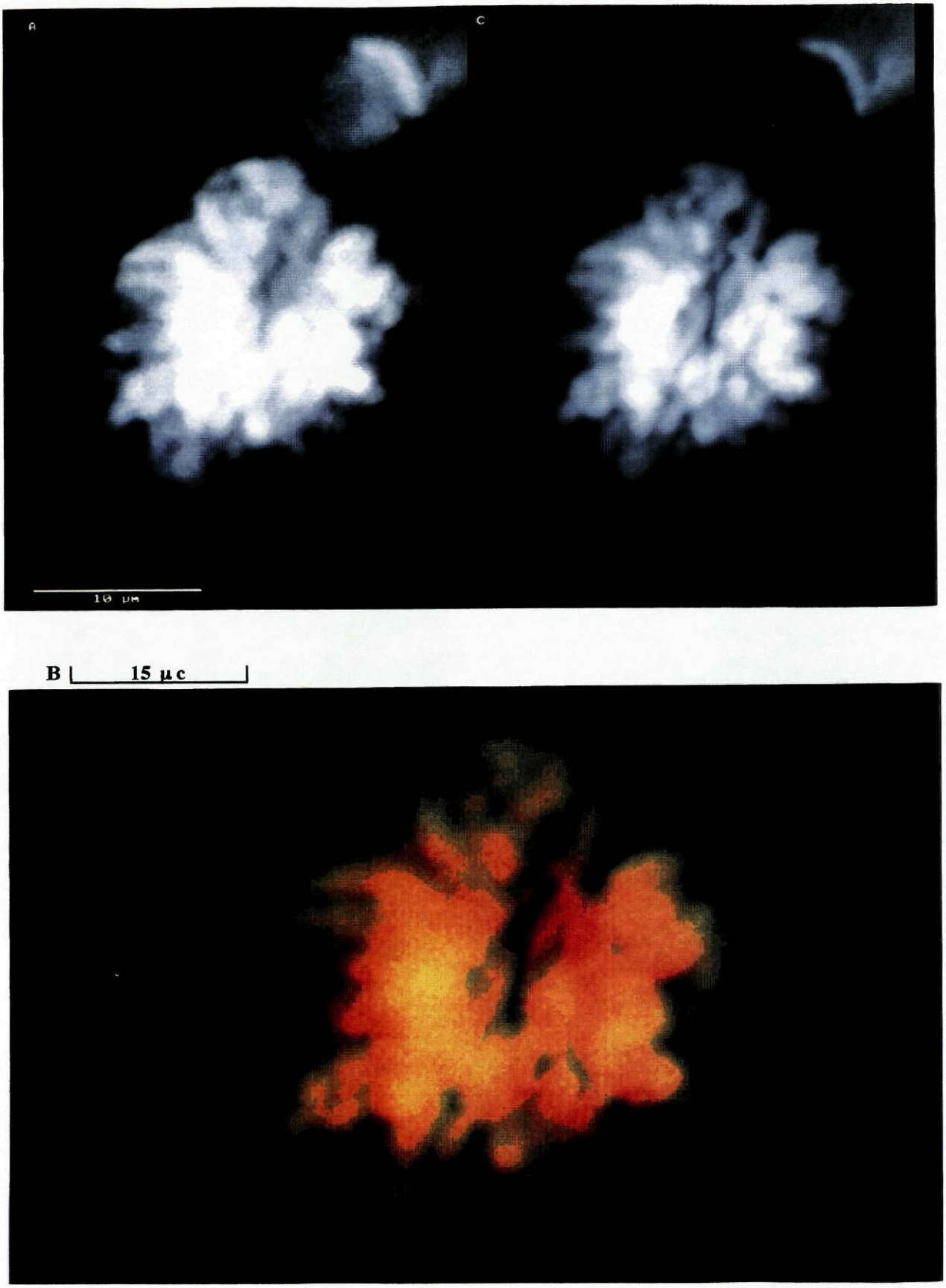


Figura 29 - Células HEp-2 em metafase: padrão de imunofluorescência do anticorpo policlonal Rb-7 diluído a 1:20 (**A**) e a correspondente marcação do ADN com iodeto de propídio (**C**). Em (**B**) imagem obtida por sobreposição das colorações do anticorpo policlonal Rb-7 (amarelo) e do ADN (verde). Preparações analisadas no microscópio laser confocal.

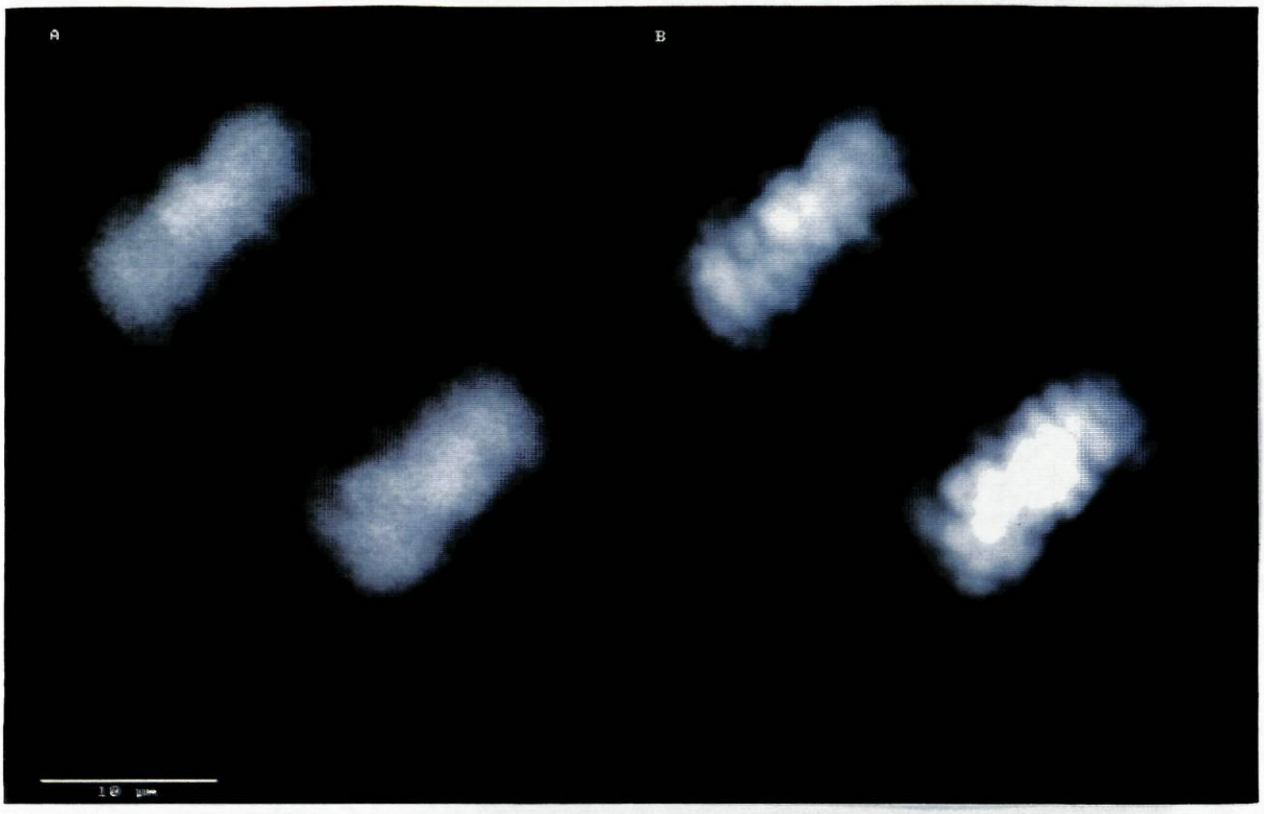


Figura 30 - Células HEp-2 em anafase: padrão de imunoluorescência do anticorpos policlonal Rb-7 diluído a 1:20 (**A**) e a correspondente marcação do ADN com iodeto de propídio (**B**) no microscópio laser confocal.

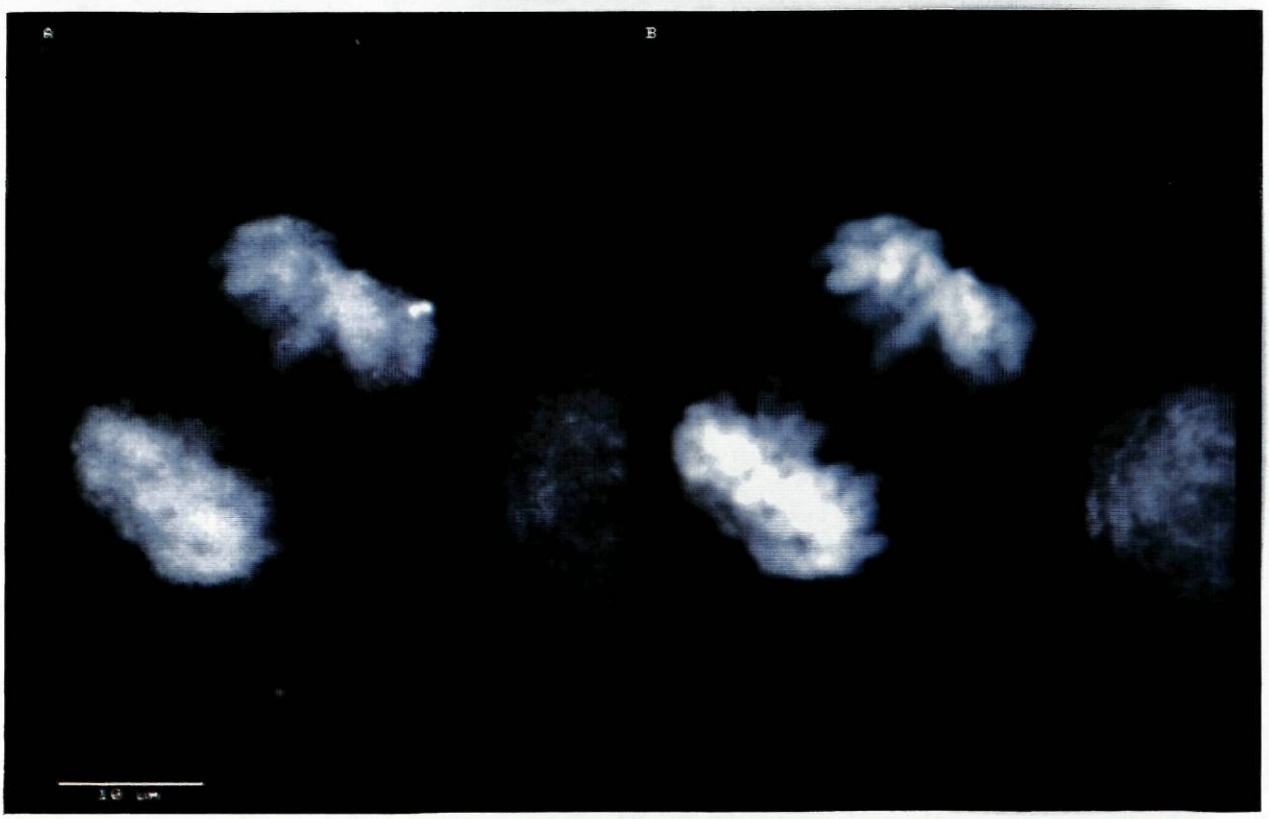
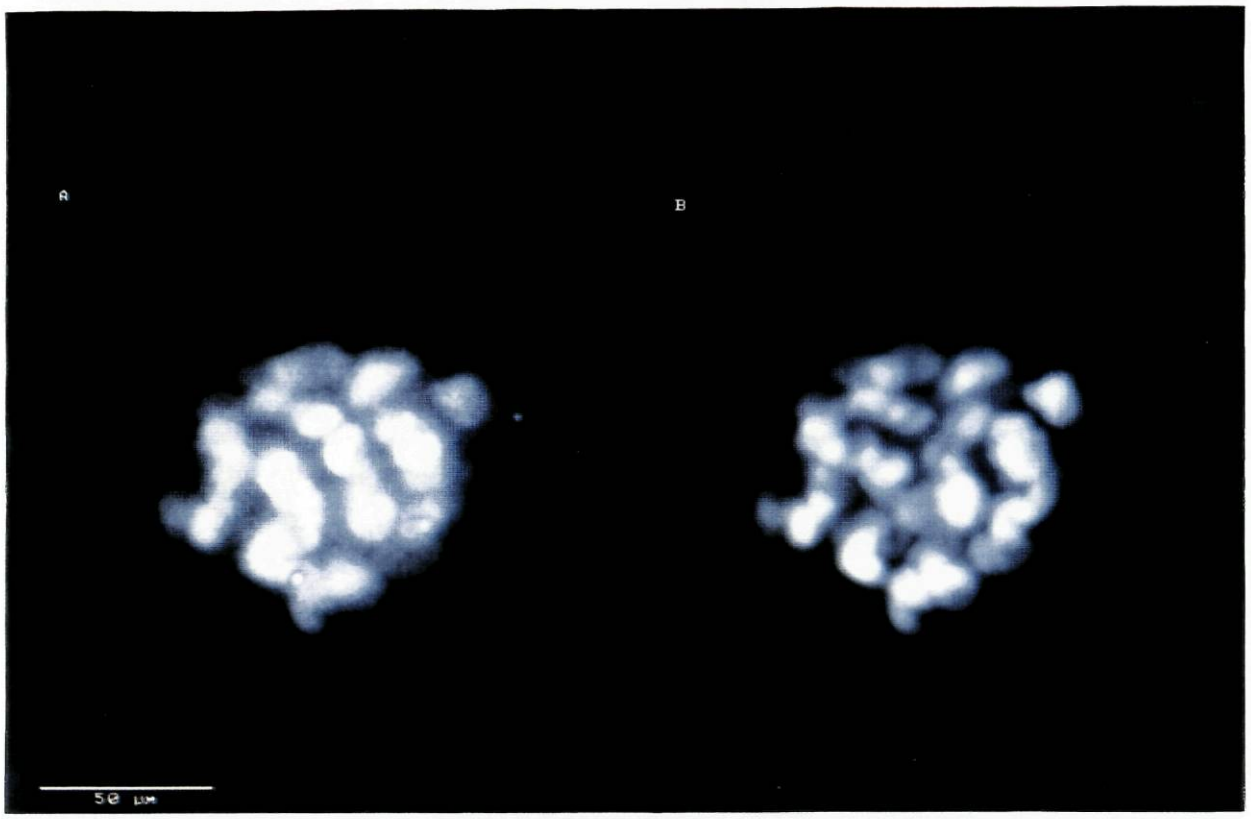


Figura 31 - Células HeLa em anafase: padrão de imunoluorescência do anticorpos policlonal Rb-7 diluído a 1:20 (**A**) e a correspondente marcação do ADN com iodeto de propídio (**B**) no microscópio laser confocal.



C | 100 µc |

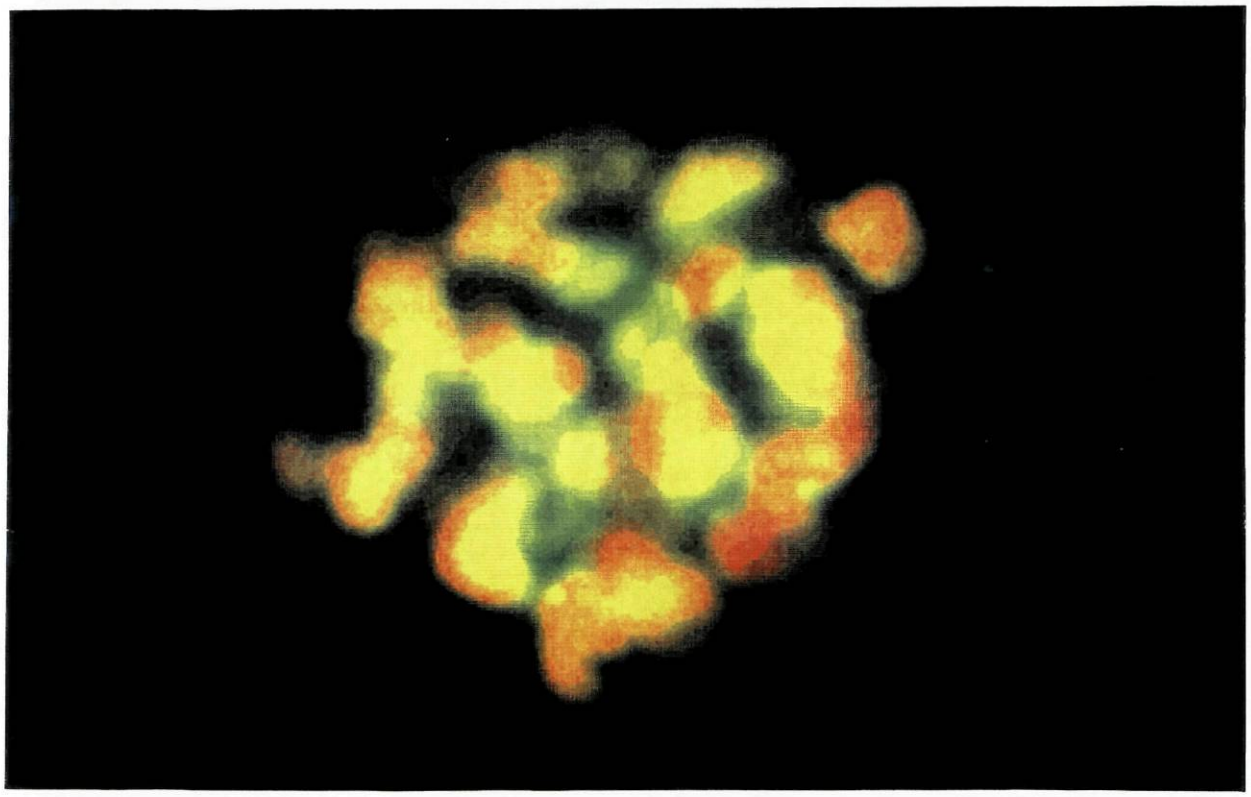


Figura 32 - Células NIH (fibroblastos de ratinho) sincronizados em metafase com colquicina: padrão de imunofluorescência do anticorpo policlonal Rb-7 diluído a 1:20 (**A**) e a correspondente marcação do ADN com iodeto de propídio (**B**). Em (**C**) imagem obtida por sobreposição das colorações do anticorpo policlonal Rb-7 (amarelo) e do ADN (verde). Preparações analisadas no microscópio laser confocal.

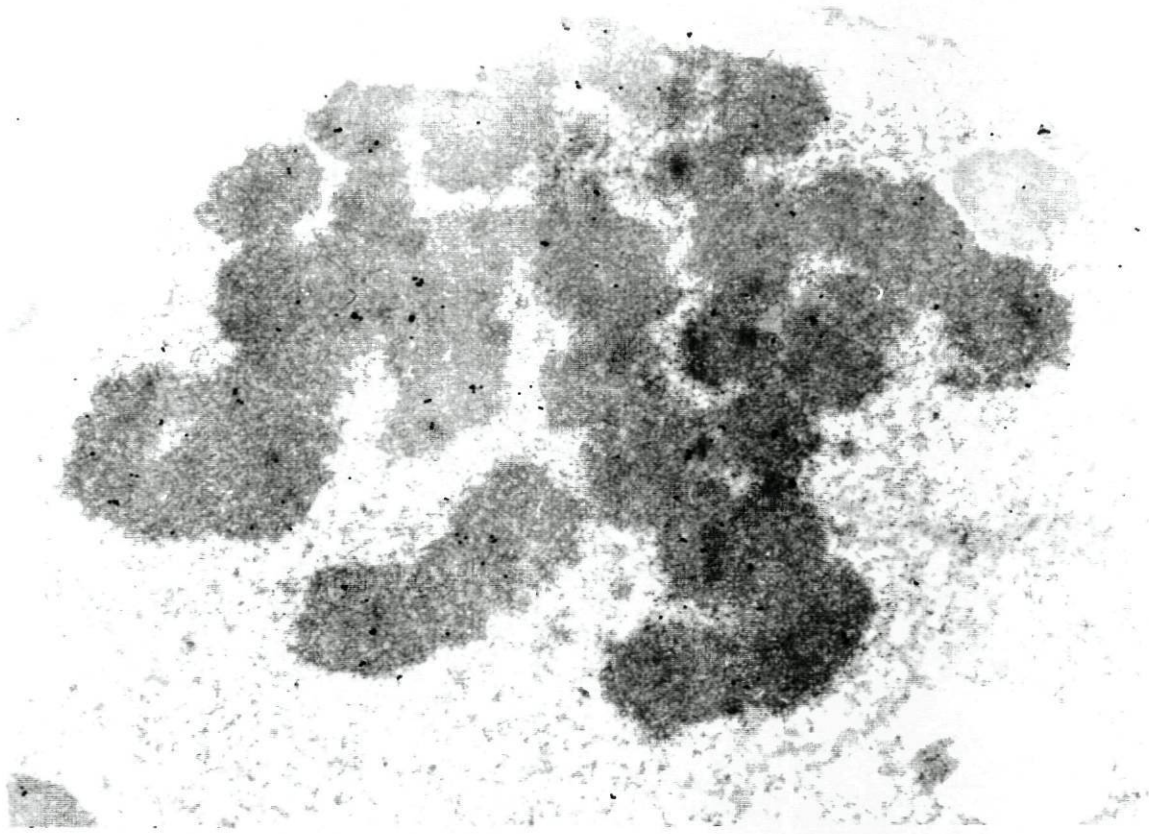


Figura 33 - Marcação com ouro do anticorpo monoclonal 402 em células HEp-2 (40000x) sincronizadas com colquicina e observadas ao microscópio electrónico.

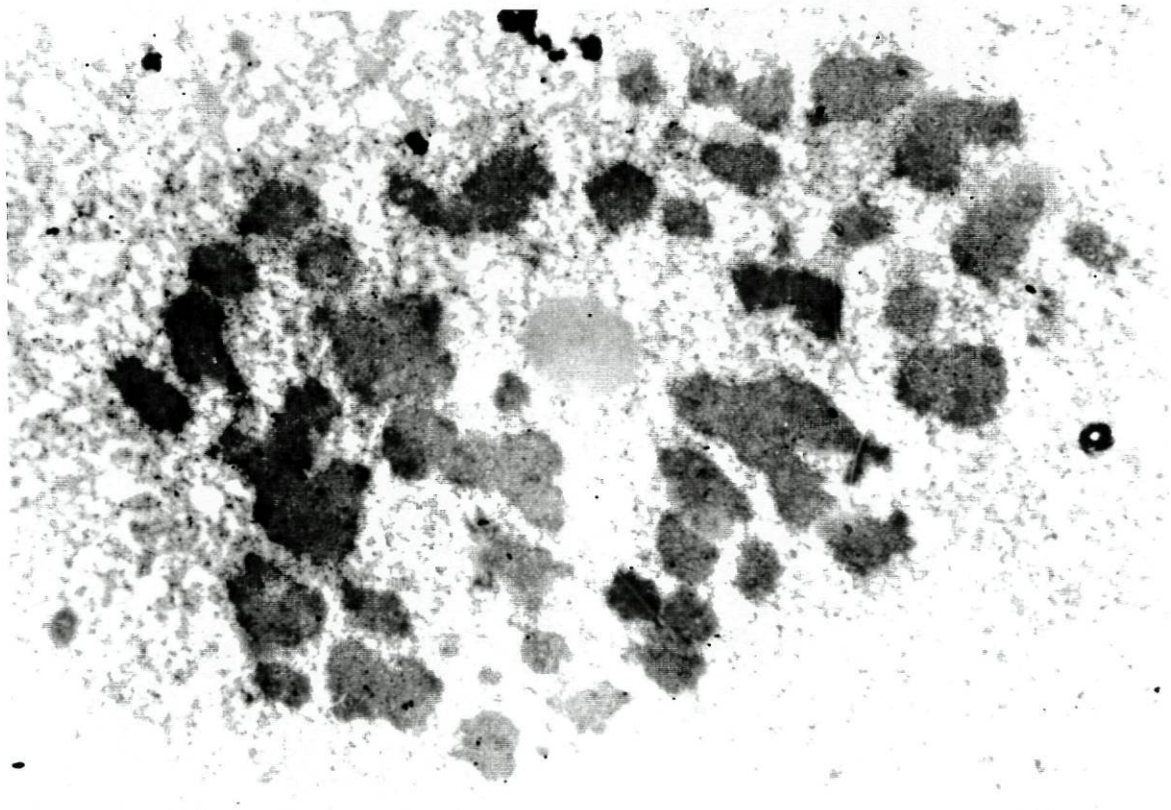


Figura 34 - Marcação com ouro do anticorpo policlonal Rb-7 em células HEp-2 (40000x) sincronizadas com colquicina e observadas ao microscópio electrónico.

Antigénios reconhecidos pelos anticorpos monoclonal e policlonal

A detecção das proteínas de fusão foi feita inicialmente, por "immunoblotting", com o anticorpo monoclonal 402. Desta análise verificou-se que as proteínas de fusão expressas pelo vectores de expressão λgt11 e pMAL-cRI apresentavam, respectivamente, 150 kDa e 80 kDa, o que apontou para a existência de um antigénio com um peso molecular aparente de 30 kDa.

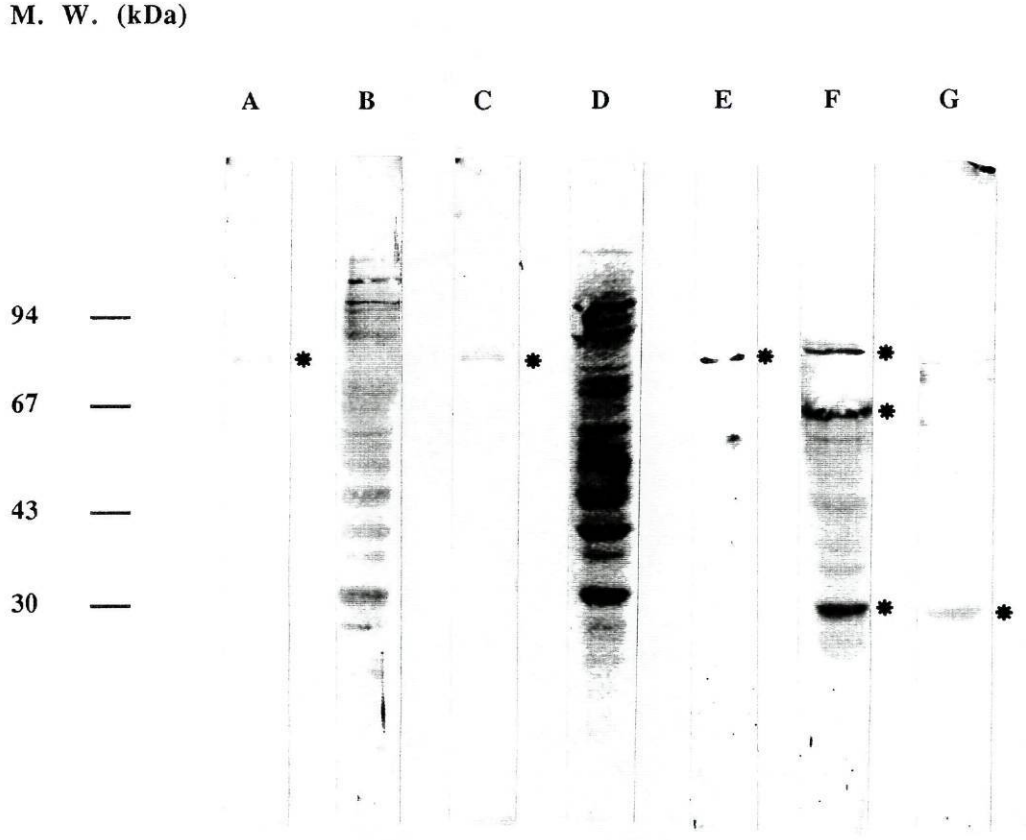


Figura 35 - "Immunoblotting" onde se mostra a reactividade do mAb 402 (diluído a 1:100), do soro total de coelho Rb-7 (diluído a 1:100) e do anticorpo policlonal de coelho imunopurificado rb-7 (diluído a 1:100), com a proteína de fusão e com os extractos proteicos totais de células HEp-2 (50 µg). A proteína de fusão é reconhecida pelos três anticorpos usados (**A**, **C** e **E**). A reactividade destes soros nos extractos proteicos totais de células HEp-2 é variável: o mAb 402 reconhece um antigénio com cerca de 30 kDa, para além do conjunto de polipeptídeos com pesos moleculares aparentes de 25 a 180 kDa (**B**); o soro total de coelho reconhece um conjunto de polipetídeos com pesos moleculares aparentes de 30 a 180 kDa (**D**); o soro de coelho imunopurificado rb-7, reconhece um três de polipeptídeos com pesos moleculares aparentes de 30 kDa, 60 kDa e 80 kDa (**F**). Usando o dobro da concentração dos extractos proteicos totais e uma diluição maior do soro de coelho imunopurificado Rb-7 (1:200) apenas o antigénio de 30 kDa é reconhecido (**G**). Gel de SDS-PAGE a 15%. Foram usados como marcadores de peso molecular (Pharmacia): fosforilase b (94 kDa), BSA (67 kDa), ovalbumina (43 kDa) e anidrase carbónica (30 kDa).

As proteínas de fusão e os extractos totais das células HEp-2 foram testados com o soro total de coelho e com anticorpo policlonal imunopurificado (Rb-7). O anticorpo Rb-7 reconhece as proteínas de fusão expressas pelos dois vectores de expressão. Relativamente aos extractos totais de células HEp-2, o anticorpo imunopurificado Rb-7 reconhece três antigénios com pesos moleculares aparentes de 30 kDa, 60 kDa e 80 kDa (Fig. 35). Porém, quando a quantidade de extractos aplicada é duplicada e o soro é usado numa diluição maior apenas a proteína de 30 kDa é reconhecida. A reactividade do anticorpo Rb-7 contrasta com a do mAb 402 e a do soro policlonal de coelho que reconhecem um conjunto de polipetídeos com pesos moleculares aparentes entre os 25 kDa e os 180 kDa (Fig. 35).

O tratamento da proteína de fusão com quantidades crescentes de fosfatase alcalina não produziu qualquer alteração no reconhecimento da mesma por parte dos anticorpos monoclonal e policlonal imunopurificado, o que está de acordo com o facto das bactérias não serem capazes de produzirem epítopos fosforilados. Apesar do mAb 402 reconhecer antigénios com epítopos fosforilados e de baixos pesos moleculares (30 e 35 kDa), não há evidência directa de que a proteína codificada pelo cADN XT-2 corresponda a um deles.

Análise por "Northern blot"

O ADN correspondente ao clone XT-2 foi marcado radioactivamente com [^{32}P] e usado como sonda para a determinação do tamanho do ARN total de células HEp-2 e do ARN poli-(A)$^+$ de células HeLa . O "Northern blot" evidenciou a hibridização da sonda com uma banda de 1,3 kb na preparação do ARN poli-(A)$^+$ de células HeLa (Fig. 36).

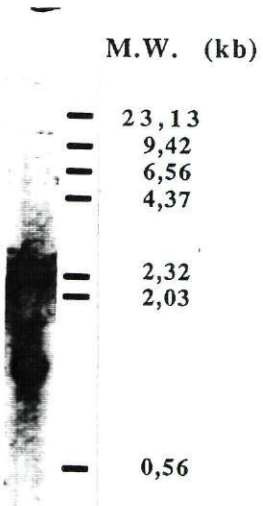


Figura 36 - "Northern blot" do ARN poli-(A)$^+$ de células HeLa hibridizado com a sonda do cADN XT-2 marcada radioactivamente com [^{32}P] em que se mostra a presença de transcrito de 1,3 kb.

Análise por "Southern blot"

As preparações de ADN genómico extraídas de sangue humano, de fibroblastos de ratinho (NIH) e de *Drosophila* foram digeridas com diferentes enzimas de restrição e analisadas por "Southern blot". O ADN correspondente ao clone XT-2 foi marcado radioactivamente com [^{32}P] e usado como sonda.

O ADN genómico humano foi digerido com as enzimas de restrição *Bam*HI, *Eco*RI e *Hind*III. A digestão *Bam*HI evidenciou a presença de um fragmento com 2,1 kb. No ADN digerido com *Eco*RI obtiveram-se dois fragmentos com 4,2 kb e 4,0 kb. A digestão com *Hind*III permitiu a detecção de um fragmento com 4,2 kb (Fig. 37). A confirmação da existência do gene correspondente ao cADN XT-2 no genoma humano e de células HEp-2 foi feita por PCR. Na presença dos "primers" "sense" e "anti-sense" desenhados a partir do cADN XT-2 já sequenciado nas duas cadeias, fez-se a amplificação dos dois ADNs e do cADN XT-2. Os produtos obtidos da reacção do PCR foram separados em gel de agarose a 1%. Verificou-se que nos dois ADNs genómicos, os produtos do PCR obtidos apresentavam um tamanho igual ao do produto do PCR do cADN XT-2, de cerca de 250 bp, e que hibridavam com a sonda do clone XT-2, por "Southern blot" (Fig. 38).

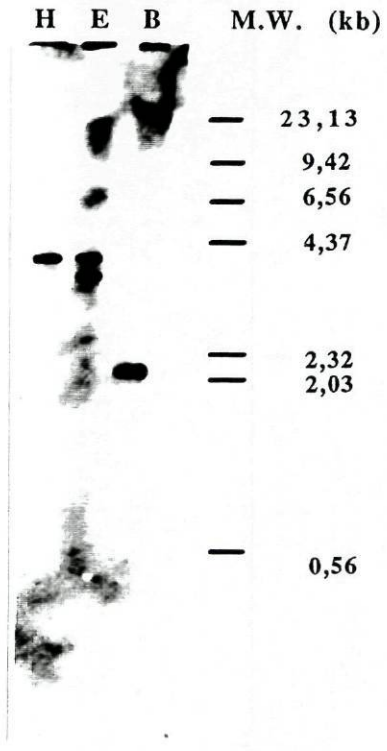


Figura 37 - "Southern blot" do ADN genómico humano onde se evidencia a presença de fragmentos com 2,1 kb na digestão com *Hind*III (**H**), com 4,2 kb e 4,0 kb na digestão *Eco*RI (**E**), e com 4,2 kb na digestão *Bam*HI (**B**). Utilizou-se como sonda o cADN XT-2 marcado radioactivamente com [^{32}P].

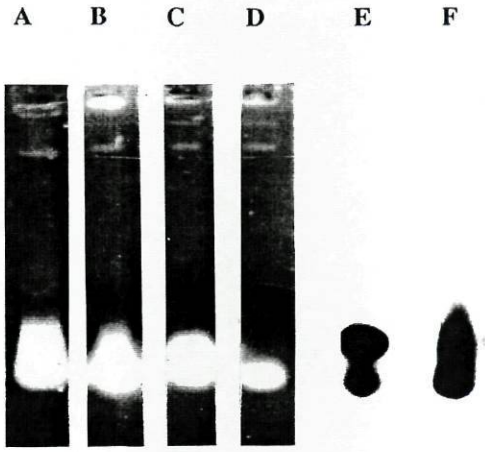


Figura 38 - "PCR" do ADN de células HEp-2 (**A**) e genómico humano (**B**), utilizando como "primers" as sequências internas do cADN XT-2: "anti-sense" e "sense". Foram usados como controlo positivo o ADN do clone XT-2 (**C**) e como controlo negativo a água (**D**). Os produtos de PCR obtidos tanto no controlo positivo como nos dois ADN genómicos mostraram a presença de um fragmento com cerca de 250 bp. Hibridização da sonda XT-2 marcada radioactivamente com [^{32}P] com os produtos de PCR correspondentes ao ADN das células HEp-2 (**E**) e do ADN genómico humano (**F**).

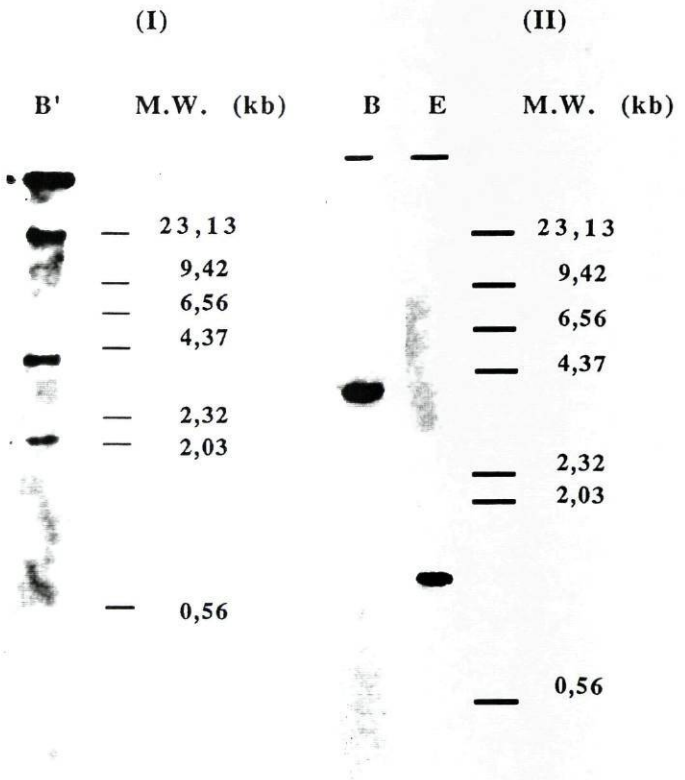


Figura 39 - "Southern blot" do ADN genómico de fibroblastos de ratinho digerido (**I**) com *Bam*HI que apresenta duas bandas com o 4,2 kb e 2,1 kb (**B'**) e do ADN genómico de *Drosophila* (**II**) onde se detecta uma banda com 1,4 kb na digestão com *Bam*HI (**B**) e outra de 4,2 kb no ADN na digestão com *Eco*RI (**E**). Utilizou-se como sonda o cADN XT-2 marcado radioactivamente com [^{32}P].

O ADN genómico de ratinho digerido com *Bam*HI foi detectado um fragmento com 2,1 kb ou seja, igual ao obtido no ADN genómico humano, e de outro com 4,2 kb, que poderá ter resultado de uma digestão incompleta do ADN (Fig. 39-I). O ADN genómico de *Drosophila* digerido com *Bam*HI evidenciou a presença de uma banda com 1,4 kb, enquanto que na digestão com *Eco*RI foi detectada uma banda com 4,2 kb (Fig. 39-II).

Sequenciação do ADN do clone XT-2

Para a sequenciação do clone XT-2, o cADN foi retirado do bacteriófago λ, após digestão com a enzima de restrição *Eco*RI, e subclonado nos fagemídeos pBS (+/-) e pBluescript II SK (+/-). A sequência completa de nucleótidos deste clone foi determinada nas duas cadeias de ADN usando o sistema de "Erase-a base" que permite a delecção unidirecional de bases numa das cadeias do ADN. Nestes vectores, o cADN foi digerido com duas enzimas de restrição por forma a ter as extremidades 3' e 5' salientes. As extremidades 3' salientes estão protegidas do ataque da Exonuclease III e por isso a digestão foi efectuada a partir da extremidade 5'. Esta enzima, à temperatura de 30°C, tem a capacidade de remover em média 210 bases/min.

O cADN inserido no fagemídeo pBS (+/-) foi digerido com as enzimas de restrição *Sph*I e *Bam*HI. O ADN obtido nos diferentes tempos após a actuação da Exonuclease III e da S1 nuclease foi religado, transformado e os clones obtidos sequenciados na presença do "primer" reverso. Os subclones designados por Pr, permitiram a sequenciação da cadeia do cADN da extremidade 5' para a extremidade 3'. Os subclones Pr-1 (1-240), Pr-2 (100-330), Pr-3 (280-560), Pr-4 (475-750), Pr-5 (630-860) e Pr-6, (840-1100) permitiram a leitura de 1100 nucleótidos. Os restantes nucleótidos foram sequenciados na presença do "primer" universal que faz a leitura da cadeia complementar do cADN (Fig. 40).

Para a sequenciação da cadeia do cADN da extremidade 3' para a extremidade 5', o cADN inserido no fagemídeo pBluescript II SK (+/-) foi digerido com as enzimas de restrição *Sac*I e *Bam*HI. Depois do "erase-a-base" os subclones selecionados foram designados por Kr. A sequenciação dos mesmos foi feita na presença do "primer" reverso, uma vez que o cADN foi inserido no pBluescript II SK (+/-) com uma orientação oposta à do pBS (+/-). A sequenciação dos subclones Kr-1 (1-250), Kr-2 (225-540), Kr-3 (190-590), Kr-4 (540-970) e Kr-5 (840-970) permitiram a leitura de 1160 nucleótidos. Os restantes nucleótidos foram sequenciados na presença do "primer" universal (Fig. 41).

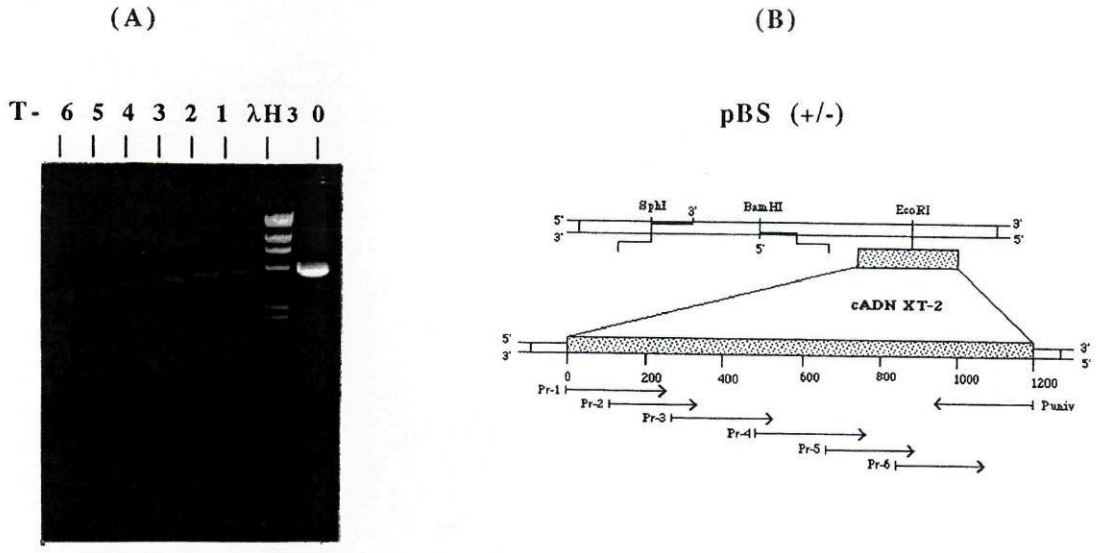


Figura 40 - (A) - "Erase-a base" do cADN XT-2 clonado no fagemídeo pBS (+/-) depois de linearizado com as enzimas de restrição *Sph*I e *Bam*HI e digerido com Exonuclease III à temperatura de 30°C. As amostras foram retiradas de 40 seg em 40 seg (T 0, 1, 2 , 3 , 4 , 5 , 6).

(B) - Estratégia utilizada para a sequenciação do cADN XT-2 no fagemídeo pBS (+/-). As delecções unidirecionais efectuadas pela Exonuclease III permitiram obter seis subclones designados por Pr. Os subclones Pr-1 (1-240), Pr-2 (100-330), Pr-3 (280-560), Pr-4 (475-750), Pr-5 (630-860) e Pr-6, (840-1100) permitiram a leitura de 1100 bases. Os restantes nucleótidos foram sequenciados com o "primer" universal.

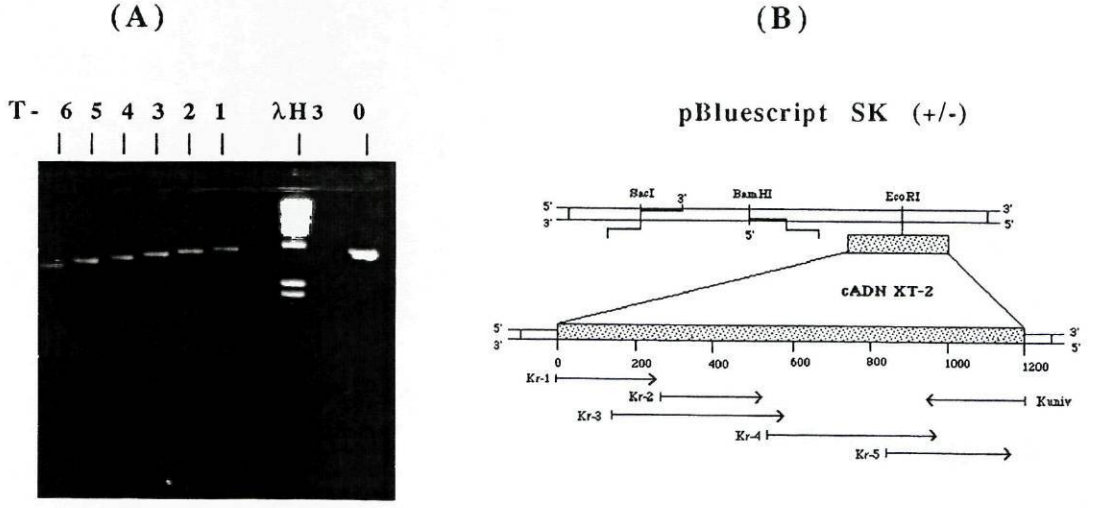


Figura 41 - (A) - "Erase-a base" do cADN XT-2 clonado no fagemídeo pBluescript SK (+/-), depois de linearizado com as enzimas de restrição *Sac*I e *Bam*HI e digerido com Exonuclease III à temperatura de 30°C. As amostras foram retiradas de 40 seg em 40 seg (T 0, 1, 2 , 3 , 4 , 5 , 6).

(B) - Estratégia utilizada para a sequenciação do cADN XT-2 no fagemídeo pBluescript SK (+/-). As delecções unidirecionais efectuadas pela Exonuclease III permitiram obter seis subclones designados por Kr. A sequenciação dos subclones Kr-1 (1-250), Kr-2 (225-540), Kr-3 (190-590), Kr-4 (540-970) e Kr-5 (840-970) permitiram a leitura de 1160 bases. Os restantes nucleótidos foram sequenciados na presença do "primer" universal.

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
AATTCGCTGGATTTTTAAGAGCGCGTTATTATTTAACGCACCGACAAAAGTATAGCCCTGAAACGTTTGAAGTGGCCTCATTCTTCTTAGATGATGTCAT

110 120 130 140 150 160 170 180 190 200
TGCGATGATGGTTAACCATAACTTTACCAGCTTCACGAGCAATGAACGGGCGGTCGTTAAGTTAAATGAAGTCATGCAAGCCGCATTGGTCAATAGTGAT

210 220 230 240 250 260 270 280 290 300
GATCGCGATTGGCGTTACTTTGTGATGCTTGTGCCAGTGCTTTATGACATGCAACAATTCTTGGTTAAAGAAGGTAGCATGAATGAACGCTTTGTGGCAC

310 320 330 340 350 360 370 380 390 400
AAGCACCGAAGTTTGACATTAACTTCTGGCGCATGATTATCACGGTGATGGCGATTAACTTCTTCAAGTGGCAAGGTAAAGATGTGGCTGAATTGATGAA

410 420 430 440 450 460 470 480 490 500
GACATCTTCTGCAATCGATGATTTGCAATTCAAGTTCTTGCAGGTGGACGATAAGGATGATCACTTTAACCTACCAGTCATTGCTGAGACGTTTAGAGGA

510 520 530 540 550 560 570 580 590 600
TTGTCACCAAAGATGAAGCCCTTAAAGGGCGCTGATTCAGTTGTTGCGCTTGAACCTAAGTTGACTGAAGCGCAAATTCAAGCTGAACTCGAATTTGCTG

610 620 630 640 650 660 670 680 690 700
ACAAGCGCTTGGCGCAATTCAAGGCGGCTTCTGTAAAAGATGTGGTCAGTGATAACGTGGTTAACATGTTACGTGGGTTCCATGAAGGATTGGCGACTGA

710 720 730 740 750 760 770 780 790 800
ATATCAAGCGACACATGACTTATGGCAACCAGCGATGTTTAATGCGTTAGCAACGGATAAGTTGTTTAATTATTGGTCACCGGCTTGGGATAACCTTGAT

810 820 830 840 850 860 870 880 890 900
GGCATTGGTGGTGAGGTGAAATCTTATCTCACTTTCTTGAGTCAAAAGCAAGATATTAGTGGCTTAAGTGAATTTGTGACAGGGACTGCTGGTATTGATC

910 920 930 940 950 960 970 980 990 1000
GCTACATTGATGTGGCAGCCTTGAATCATCTTCTTGAGCAAATGCCAGAAGATGTTTTGGCAGAACGTGCCTTATAAAAATAAGTAAAAAGGACAATCAC

1010 1020 1030 1040 1050 1060 1070 1080 1090 1100
TATTGAAATAGCGATTGTCCTTTTTATAATGTAATATGACGAATCGTACCAGGTAAAATGATGGTCATTTGATGGGTTTTGGGGGATTGGATTAAAATTT

1110 1120 1130 1140 1150 1160 1170 1180
CCCCATGTTGATTCTGATAAACATAGCCAGTAAAATTCGTCACTTCTTCAGATAGTAGTGACACATTGACT

Figura 42 - Sequência de nucleótidos do cADN XT-2. Estão sublinhados os codões de inicição (ATG) e de terminação (TAA) e o sinal de poliadenilação (ATTAAAA).

001	Met	Met	Val	Asn	His	Asn#	Phe	Thr	Ser	Phe	Thr*	Ser	Asn
014	Glu	Arg	Ala	Val	Val	Lys	Leu	Asn	Glu	Val	Met	Gln	Ala
027	Ala	Leu	Val	Asn	Ser	Asp	Asp	Arg	Asp	Trp	Arg	Tyr	Phe
040	Val	Met	Leu	Val	Pro	Val	Leu	Tyr	Asp	Met	Gln	Gln	Phe
053	Leu	Val	Lys	Glu	Gly	Ser*	Met	Asn	Glu	Arg	Phe	Val	Ala
066	Gln	Ala	Pro	Lys	Phe	Asp	Ile	Asn	Phe	Trp	Arg	Met	Ile
079	Ile	Thr	Val	Met	Ala	Ile	Asn	Phe	Phe	Lys	Trp	Gln	Gly
092	Lys	Asp	Val	Ala	Glu	Leu	Met	Lys	Thr	Ser	Ser*	Ala	Ile
105	Asp	Asp	Leu	Gln	Phe	Lys	Phe	Leu	Gln	Val	**Asp**	**Asp**	**Lys**
118	**Asp**	**Asp**	**His**	Phe	Asn	Leu	Pro	Val	Ile	Ala	Glu	Thr•	Phe
131	Arg	Gly	Leu	Ser•	Pro	Lys	Met	Lys	Pro	Leu	Lys	Gly	Ala
144	Asp	Ser	Val	Val	Ala	Leu	Glu	Pro	Lys	Leu	Thr	Glu	Ala
157	Gln	Ile	Gln	Ala	Glu	Leu	Glu	Phe	Ala	Asp	Lys	Arg	Leu
170	Ala	Gln	Phe	Lys	Ala	Ala	Ser*•	Val	Lys	Asp	Val	Val	Ser
183	Asp	Asn	Val	Val	Asn	Met	Leu	Arg	Gly	Phe	His	Glu	Gly
196	Leu	Ala	Thr	Glu	Tyr	Gln	Ala	Thr	His	Asp	Leu	Trp	Gln
209	Pro	Ala	Met	Phe	Asn	Ala	Leu	Ala	Thr•	Asp	Lys	Leu	Phe
222	Asn	Tyr	Trp	Ser	Pro	Ala	Trp	Asp	Asn	Leu	Asp	Gly	Ile
235	Gly	Gly	Glu	Val	Lys	Ser	Tyr	Leu	Thr	Phe	Leu	Ser•	Gln
248	Lys	Gln	Asp	Ile	Ser	Gly	Leu	Ser	Glu	Phe	Val	Thr	Gly
261	Thr	Ala	Gly	Ile	Asp	Arg	Tyr	Ile	Asp	Val	Ala	Ala	Leu
274	Asn	His	Leu	Leu	Glu	Gln	Met	Pro	Glu	Asp	Val	Leu	Ala
287	Glu	Arg	Ala	Leu									

Figura 43 - Sequência de aminoácidos codificada pelo quadro de leitura aberto do cADN XT-2. Estão assinalados os potenciais locais de: glicosilação (#), no resíduo 6; fosforilação pela caseína cinase II (*), nos resíduos 11, 58, 102 e 176; de fosforilação pela proteína cinase C (•), nos resíduos 129, 134, 176, 217 e 246; e de fosforilação da $p34^{cdc2}$ no resíduos 134 e 225 (sublinhados). A "bold" estão assinalados os aminoácidos que correspondem ao potencial local do determinante antigénico.

A sequência analisada mostrou ser constituída por 1171 nucleótidos. O quadro de leitura aberto maior é formado por 870 nucleótidos, tendo o codão de iniciação (ATG) na posição 105 e o codão de terminação (TAA) na posição 974. A montante da região codificante existe uma região não traduzida com 104 nucleótidos. Na região não traduzida da extremidade 3' o sinal de poliadenilação encontra-se na posição 1091. Porém, não foi detectada a cauda poli-$(A)^+$ neste cADN (Fig. 42).

A sequência de nucleótidos do cADN XT-2 com o maior quadro de leitura aberto codifica para um polipeptídeo com o peso molecular aprente de 32,981 kDa e é constituída por 290 aminoácidos (Fig. 43). Neste polipepídeo 23% dos aminoácidos que o compõem são carregados. Dentro destes, apenas foram detectados dois agregados de aminoácidos carregados que se situam entre os resíduos 32 a 35 e 115 a 119. A presença de 41 aminoácidos com carácter ácido (ácido aspártico e ácido glutâmico) e de 28 aminoácidos carregados positivamente (arginina e lisina) confere a esta proteína uma carga total negativa.

O ponto isoeléctrico previsto para esta proteína é de 4,56 e o da "maltose binding protein" é de 5,04. A determinação experimental do ponto isoelétrico do péptido codificado pelo cADN XT-2 foi feita após clivagem da proteína de fusão "maltose binding" com o factor-Xa. O pI obtido para a proteína XT-2 foi de 4,8 e para a "maltose binding protein" foi de 4,95. (Fig. 44).

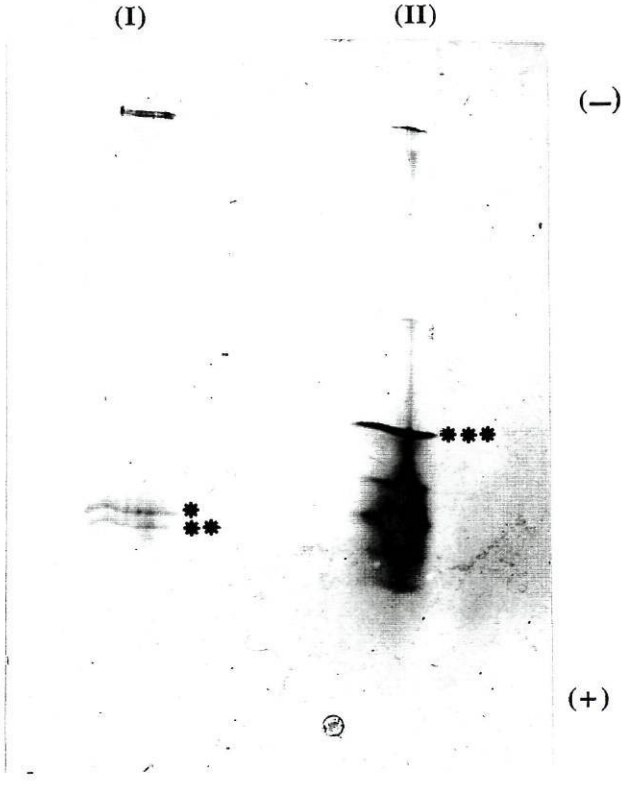


Figura 44 - Focagem isoeléctrica proteína de fusão clivada com o factor Xa (**I**): proteína "maltose binding", pI = 4.95 (*) e proteína codificada pelo cADN XT-2, pI = 4.8 (**). Como controlo (**II**) usou-se a transtirretina (TTR), pI = 5,4 na forma oxidada (***).

A estrutura secundária prevista para este polipeptídeo (de acordo com o método de Garnier) sugere a presença de várias regiões em α-hélice que se situam nos primeiros 18 aminoácidos do terminal amino, nas duas regiões que contêm os aminoácidos 148 a 177 e 190 a 219, e nos 21 aminoácidos contidos no terminal carboxílico. Esta conformação em α-hélice representa cerca de 67,5% da estrutura secundária da proteína. Os restantes aminoácidos apresentam uma configuração que se reparte por uma conformação estendida (20,0%), "coil" (8,2%) e "turn" (4,1%).

A região mais hidrofílica deste polipeptídeo é constituída por um conjunto de aminoácidos (Asp-Asp-Lys-Asp-Asp-His) que se situam entre os resíduos 115 a 120 (de acordo com o método de Hopp e Woods). Esta região foi considerada como o local mais provável para a localização do determinante antigénico deste polipeptídeo.

A sequência de aminoácidos prevista apresenta vários locais susceptíveis de modificações pós-tradução: um local de N-glicosilação (resíduo 6); cinco locais com alta probabilidade de fosforilação pela proteína cinase C (resíduos 129, 134, 176, 217 e 246); quatro potenciais locais de fosforilação para a caseína cinase II (resíduos 11, 58, 102 e 176); e dois locais susceptíveis de serem fosforilados pela cinase $p34^{cdc2}$ (resíduos 134 E 225). A figura 43 apresenta a sequência de aminoácidos codificada pelo quadro de leitura aberto do cADN XT-2 e os prováveis locais de de modificação pós-tradução.

A pesquisa efectuada no banco de dados (Fasta Scan PC Gene, Pearson et al. 1988) revelou que a sequência de nucleótidos presente no cADN XT-2 e da proteína codificada pelo mesmo não apresentam homologias significativas com as sequências de ADN e de aminoácidos eucariotas já existentes.

Rastreio da biblioteca de cADN humana em λZAPII

O cADN XT-2 marcado radioactivamente com [^{32}P] foi usado como sonda para o rastreio de outra biblioteca humana, a biblioteca de expressão de cADNs humana em λZAPII, de modo a verificar se a sequência do cADN inialmente isolada estava ou não completa. Isolaram-se três positivos que foram designados por λZAP-3, λZAP-4 e λZAP-5. A confirmação destes positivos foi feita por PCR, na presença dos "primers" "sense" e "anti-sense". Foi obtido para cada um dos clones (ZAP-3, ZAP-4 e ZAP-5) um produto do PCR com o tamanho de 250 bp. (Fig. 45) que era reconhecido pela sonda do cADN XT-2 por "Southern blot" (Fig. 46).

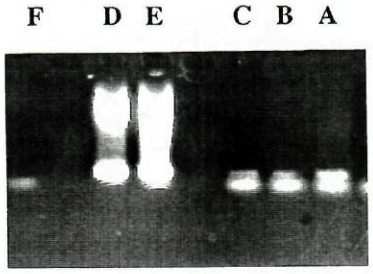


Figura 45 - PCR do ADN correspondente aos clones positivos ZAP-3 (**A**), ZAP-4 (**B**) e ZAP-5 (**C**) isolados no rastreio da biblioteca humana de cADN em λZAPII com a sonda do cADN XT-2 marcada radioactivamente com [^{32}P]. Usaram-se como "primers" as sequências internas "anti-sense" e "sense"do cADN XT-2. Foram usados como controlo positivo o ADN do clone XT-2 (**D** e **E**) e como controlo negativo a água (**F**). Os produtos de PCR obtidos tanto no controlo positivo como nos clones ZAP mostraram a presença de um fragmento com cerca de 250 bp.

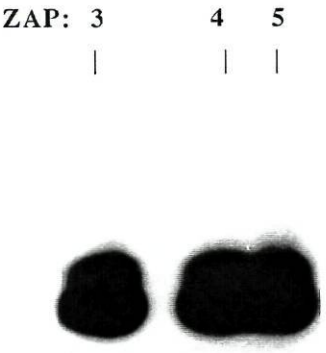


Figura 46 - "Southern blot" dos produtos do PCR obtidos nos clones **ZAP-3**, **ZAP-4** e **ZAP-5** hibridizados com a sonda do cADN XT-2 marcada radioactivamente com [^{32}P].

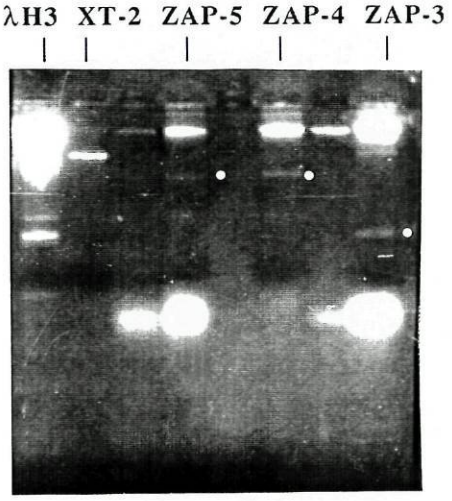


Figura 47 - Electroforese em gel de agarose a 1% do ADN dos clones positivos do rastreio da biblioteca de cADN em λZAPII (ZAP-3, ZAP-4 e ZAP-5) cortado com as enzimas de restrição *Xho*I e *Xba*I, e do XT-2 linearizado com *Xho*I. Os "inserts" correspondentes a cada um destes clones apresentam tamanhos com cerca de 0,7 kb (ZAP-3) e 1,5 kb (ZAP-4 e ZAP-5).

Para se determinar a sequência de nucleótidos dos "inserts" de cada cADN de λZAPII fez-se a subclonagem no fagemídeo pBluescript SK (+/-). O "insert" isolado do cADN λZAP-3 apresentava um tamanho com cerca de 0,7 kb, enquanto no λZAP-4 e no λZAP-5 os "inserts" tinham cerca de 1,8 kb (Fig. 47). O cADN de ZAP-3 depois de subclonado no

fagemídeo e digerido libertou um fragmento com cerca de 0,4 kb. A sequenciação mostrou que o fragmento de 0,4 kb de ZAP-3 correspondia à extremidade 3' do cADN XT-2, dado que a sequência obtida era constituída pelos nucleótidos 821 a 1171. Este resultado confirma o tamanho do fragmento subclonado (cerca de 0,4 kb), mas indica que o "insert" libertado do λZAP-3 foi parcialmente clonado. Apesar dos clones ZAP-4 e ZAP-5 terem sido amplificados com os "primers" internos do cADN XT-2 e os correspondentes produtos do PCR terem hibridado com a sonda do cADN XT-2, a determinação da sequência de nucleótidos das extremidades 5' e 3' (cerca de 400 bp) destes clones não mostraram qualquer tipo de homologia com a sequência de nucleótidos do cDNA XT-2. Estes resultados sugerem que os clones ZAP-4 e ZAP-5 podem ter uma pequena região interna homóloga ao cADN inicialmente isolado, mas que poderão corresponder a um gene ou genes diferentes.

Transcrição e tradução *in vitro*

A aplicação das técnicas de transcrição e de tradução *in vitro* teve por objectivo verificar se o ARN transcrito *in vitro* codificava para um polipeptídeo completo e se o mesmo era reconhecido, por imunoprecipitação, pelo autoanticorpo 402 e pelo anticorpo policlonal imunopurificado Rb-7.

A transcrição *in vitro* conduziu à formação de um ARN com o tamanho previsto, ou seja de 1,3 kb (Fig. 48). A tradução *in vitro* deste ARN produziu um polipeptídeo com cerca de 30 kDa (Fig. 49-I). Esta proteína foi reconhecida e imunoprecipitada com o mAb 402 e com o Rb-7 imunopurificado (Fig. 49-II). Estes resultados apontam para a existência de um cADN completo no clone XT-2.

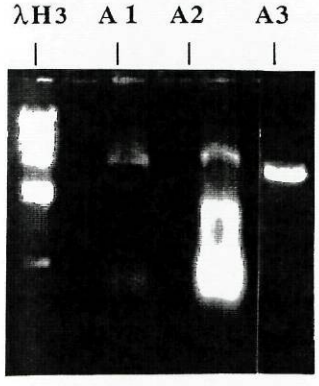


Figura 48 - Transcrição *in vitro*do pSPT-19.1 (cADN XT-2 subclonado no plasmídeo pSPT19) mostra um transcrito de 1,3 kb (**A2**) e dos controlo negativos pSPT-19 (**A1**) e pSPT 18.1 (**A3**). No vector pSPT 18.1 fez-se a clonagem do cADN XT-2 de forma a ser produzido ARN "anti-sense".

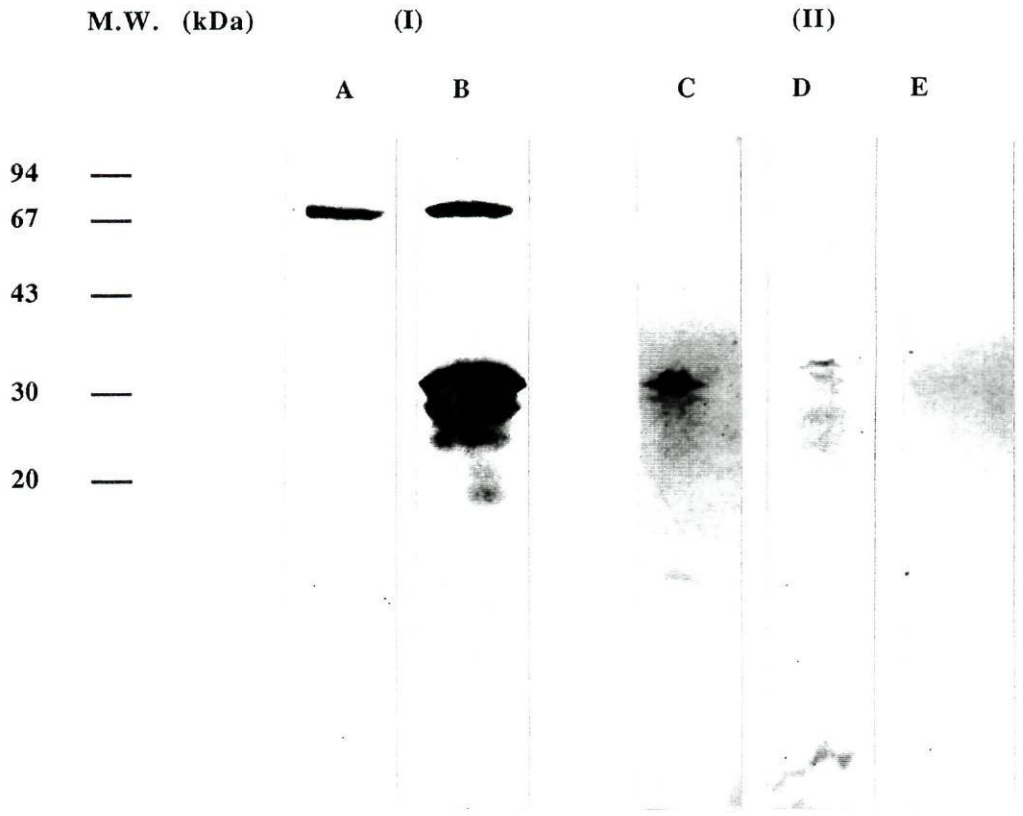


Figura 49 - **(I)** - Tradução *in vitro* dos transcritos obtidos dos vectores pSPT-19 (**A**) e pSPT-19.1 (**B**). No vector pSPT-19.1 foi traduzido um polipeptídeo com cerca de 30 kDa.
(II) - Imunoprecipitação do produto da tradução *in vitro* com os anticorpos mAb 402 (C), Rb-7 (**D**) e soro controlo (**E**).Os anticorpos monoclonal e policlonal imunoprecipitam um polipeptídeo com cerca de 30 kDa. Gel de SDS-PAGE a 15%. Foram usados como marcadores de peso molecular (Pharmacia): fosforilase b (94 kDa), BSA (67 kDa), ovalbumina (43 kDa), anidrase carbónica (30 kDa) e α-lactoalbumina (20 kDa).

Estudo preliminar da reactividade dos soros de doentes com lupus

Uma vez que o isolamento de um cADN humano foi feito utilizando um autoanticorpo produzido por um ratinho portador de LES, procurou-se verificar se a proteína codificada pelo cADN XT-2, embora na forma de proteína de fusão, era reconhecida pelos soros de doentes com lupus. Além disso, tentou-se relacionar o reconhecimento deste antigénio com o estado clínico do doente, tendo em conta factores associados ao estado activo da doença, à administração de medicamentos e à presença de anticorpos anti-ADNcd. A presença deste tipo de autoanticorpos é uma característica sérica da maioria mas não da totalidade dos doentes que desenvolvem o LES.

A reactividade de 10 (dez) soros de doentes com lupus face às preparações de extractos totais de células HEp-2 e da proteína de fusão purificada, expressa pelo vector pMAL-cRI, foi determinada por "immunoblotting" (Fig. 50). Deste estudo verificou-se que todos os soros de doentes com lupus reconhecem um conjunto de antigénios com pesos moleculares aparentes que variam entre os 25 kDa e 150 kDa. Contudo, a reactividade individual de cada um dos soros é característica ou seja, o perfil de polipeptídeos não é igual em todos eles. A proteína de fusão só foi reconhecida por dois destes soros (598 e 683). A figura 24 mostra a reactividade dos soros destes doentes com a proteína de fusão e com os extractos totais das células HEp-2.

Os parâmetros analisados não permitiram chegar a uma resposta conclusiva. Contribuiram para este resultado o facto do número de amostras analisado ser restrito e ainda a carência de informações de um dos dois soros que reconheceram a proteína de fusão, nomeadamente no que respeita à fase da doença e à administração de medicamentos (ver tabela 15).

Tabela 15 - Parâmetros analisados nos soros de doentes com LES.

Soro	Sexo	Doença activa	Anticorpos Anti-ADNcd	Terapêutica em curso
589*	Feminino	Não refere	Presentes	Não refere
1195	Feminino	Sim	Presentes	Sim
1207	Feminino	Sim	Presentes	Sim
1261	Feminino	Não refere	Ausentes	Sim
792	Feminino	Sim	Presentes	Sim
1245	Masculino	Não	Ausentes	Não
954	Feminino	Não	Ausentes	Sim
1309	Feminino	Não	Ausentes	Sim
734	Feminino	Sim	Presentes	Sim
683*	Feminino	Sim	Presentes	Sim

(*) - Soros que reconheceram com a proteína de fusão, por "immunoblotting".

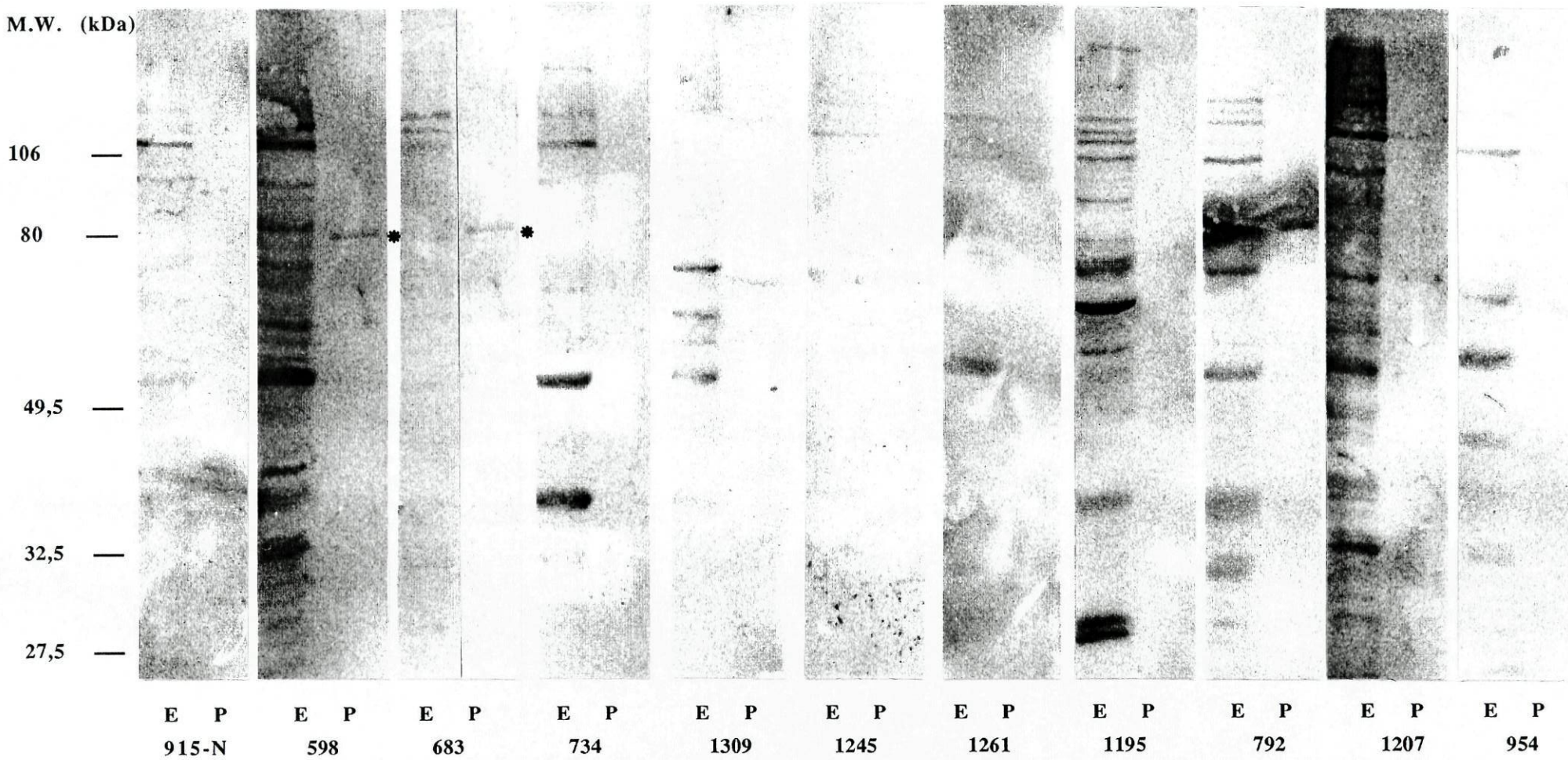


Figura 50 - "Immunoblotting" que evidencia a reactividade dos soros de doentes com lupus (diluídos a 1:100) em preparações de extractos proteicos totais de células HEp-2 (**E**) e da proteína de fusão "maltose binding" (**P**). A amostra 915-N é um soro controlo. O conjunto de antigénios reconhecidos pelos soros de LES apresenta pesos moleculares aparentes diversificados e com um padrão característico para cada amostra. A proteína de fusão expressa pelo vector pMAL-cRI só foi reconhecida por dois destes soros (598 e 683). Gel de SDS-PAGE a 15%. Foram usados como marcadores do peso molecular (BioRad): miosina (106 kDa), α-macroglobulina (80 kDa), ovalbumina (49,5 kDa), fosforilase b (32,5 kDa) e inibidor da tripsina de soja (27,5 kDa).

DISCUSSÃO

Os autoanticorpos dos soros de doentes com lupus reconhecem epítopos conservados e têm sido usados para a caracterização de autoantigénios envolvidos em processos celulares importantes, como a replicação e reparação dos ADN, o processamento de ARNs e o ciclo celular. Neste estudo, foram utilizados dois autoanticorpos de ratinho com lupus no rastreio de uma biblioteca de expressão de cADNs humana em λgt11. Os dois anticorpos reconhecem antigénios interfásicos e mitóticos nas células HEp-2 e HeLa, mas apresentam padrões de imunofluorescência distintos nas células em mitose. O mAb 58 reconhece o material que rodeia os cromossomas metafásicos, enquanto que o mAb 402 marca os cromossomas condensados. Na caracterização destes autoanticorpos foi demonstrado que eles reagem com múltiplos antigénios dos extractos totais de células HEP-2 e alguns deles têm epítopos fosforilados.

O rastreio com o mAb 58 não possibilitou o isolamento de qualquer cADN.

O autoanticorpo 402 permitiu o isolamento de dois cADNs, designados por XT-2 e XT-5. O tamanho dos "inserts" de cada cADN foi estimado em 1,2 kb. Foi demonstrada a identidade do ADN destes dois clones pela análise do mapa de restrição, pelo "Southern blot" e pelas proteínas de fusão correspondentes a cada um dos cADNs, que apresentavam o mesmo peso molecular. Deste modo, o estudo foi feito no cADN XT-2. A sequência deste cADN é constituída por 1171 nucleótidos e o quadro de leitura aberto de 870 nucleótidos prevê a existência de uma proteína com o peso molecular apararente de 32,981 kDa.

As proteínas de fusão com 140 kDa e 80 kDa expressas, respectivamente, pelos vectores λgt11 e pMAL-cRI, foram reconhecidas pelo anticorpo monoclonal 402 e pelo anticorpo policlonal Rb-7 imunopurificado, o que determina a presença de um polipeptídeo com um peso molecular aparente próximo dos 30 kDa. Estes dois anticorpos mostraram padrões de imunofluorescência iguais, tanto nas células em interfase como nas células em mitose. A reactividade destes anticorpos em células sincronizadas em metafase, analisada no microscópio electrónico, evidenciou o reconhecimento de antigénios associados aos cromossomas condensados, embora não tenha sido detectada uma associação particular a qualquer estrutura específica, como o centrómero, o cinetocoro ou os centrossomas. A identificação de moléculas associadas a estas regiões tem sido feita com soros autoimunes (Cooke et al. 1990; Yang et al. 1992a, b)

Contudo, os perfis de antigénios reconhecidos por estes dois anticorpos, nos extractos totais de células HEp-2, são muito diferentes. O mAb 402 reconhece um conjunto de

polipeptídeos com pesos moleculares que variam entre os 25 kDa e os 170 kDa. Embora os anticorpos monoclonais sejam dirigidos contra uma pequena região antigénica, a possibilidade dos mesmos detectarem antigénios com sequências homólogas a esse epítopo pode ser condicionada pela própria conformação que os antigénios adquirem. Esta característica pode avaliar o grau de homologia estrutural entre diferentes antigénios, mas também pode explicar a reactividade do mAb 402 com o conjunto de antigénios reconhecidos nos extractos totais de células HEp-2. Um soro policlonal, obtido por imunização repetida de um antigénio específico, possibilita a formação de anticorpos policlonais específicos e com grande afinidade para esse antigénio. O soro policlonal Rb-7, obtido após a imunização do coelho com o antigénio codificado pelo cADN XT-2, reconheceu um conjunto de polipeptídeos com pesos moleculares aparentes muito diversificados (25 a 180 kDa). Depois de imunopurificado, o soro policlonal de coelho reconhece três polipeptídeos com 30 kDa, 60 kDa e 80 kDa, embora a reactividade com o antigénio de 30 kDa seja mais intensa. Quando se utilizaram diluições maiores do anticorpo policlonal imunopurificado os polipeptídeos de 60 e 80 kDa deixaram de ser reconhecidos. Fica por definir a relação entre o antigénios de 30 kDa com os de 60 kDa e 80 kDa.

A sonda XT-2 detectou um ARN de 1,3 kb nas preparações de ARN total e poli-(A)+ ARN. O tamanho do ARN comparado com o tamanho da sequência de nucleótidos do clone XT-2 (1,2 kb) sugere que o cADN isolado pode corresponder a um gene completo. Os resultados obtidos na transcrição e tradução *in vitro* em conjunto com o reconhecimento e a imunoprecipitação da proteína sintetizada *in vitro* pelos anticorpos monoclonal e policlonal também apontam para a existência de um cADN completo.

No "Southern" do ADN genómico digerido com as enzimas de restrição *Eco*RI e *Hind*III foi detectado um fragmento de 4,2 kb, o que aponta para a existência de um intrão ou intrões neste gene. A presença do fragmento de 4,0 kb no ADN digerido com *Eco*RI poderá corresponder à existência de um local *Eco*RI no ADN genómico e, portanto, a banda com 4,2 kb pode traduzir uma digestão incompleta. A detecção de um fragmento com 2,1 kb no ADN digerido com *Bam*HI sugere a presença de um local *Bam*HI no ADN genómico. No ADN genómico de ratinho digerido com *Bam*HI, os dois fragmentos detectados com 4,2 kb e 2,1 kb podem ser o reflexo de uma digestão incompleta. No ADN genómico de mosca foram detectados dois fragmentos, um com 4,2 kb, na digestão com *Eco*RI, e outro com 1,4 kb, na digestão com *Bam*HI. Estes resultados sugerem a existência de um gene conservado em diferentes espécies, característica dos autoantigénios identificados com soros autoreactivos (Tan, 1994).

Tem-se verificado que alguns autoantigénios têm na sua constituição uma frequência

elevada de resíduos carregados, que poderão determinar a diversidade de reacções que caracterizam os autoanticorpos (Netter et al. 1990; Bini et al. 1990; Brendel et al. 1991). Os aminoácidos que constituem a proteína XT-2 conferem-lhe uma carga total negativa e na sequência desta proteína foram detectados dois segmentos de aminoácidos com resíduos carregados (32 a 35 e 115 a 119). O local com maior hidrofilia desta proteína, considerado como o potencial determinante antigénico, situa-se entre os aminoácidos 115 e 120 (Asp-Asp-Lys-Asp-Asp-His). Embora o mAb 402 reconheça antigénios com epítopos fosforilados, nenhum dos resíduos de aminoácidos indicados como prováveis constituintes do local antigénico é susceptível de ser fosforilado. A identificação do determinante antigénico e da estrutura tridimensional desta proteína poderá esclarecer a eventual contribuição dos grupos fosfato em relação à reactividade deste anticorpo, uma vez que as fosfoproteínas com que o mAb 402 reage deixam de ser reconhecidas após o tratamento com a fosfatase alcalina.

O ponto isoelétrico da proteína XT-2 foi determinado depois da proteína de fusão ter sido cortada com o factor Xa. Deste modo, os aminoácidos codificados pela região a montante do codão AUG são traduzidos na proteína de fusão. A variação no valor do ponto isoelétrico previsto para a proteína XT-2 (4,56) e o determinado experimentalmente (4,8) pode estar directamente relacionado com o facto destes aminoácidos adicionais interferirem na carga total da proteína. A acidez desta proteína, com um ponto isoeléctrico inferior a 5, sugere a capacidade de uma possível interacção com proteínas básicas associadas ao cromossomas metafásicos, nomeadamente às histonas. A proteína CENP-B, detectada com soros de CREST, também tem um ponto isoeléctrico próximo de 5 e a interacção da CENP-B com as proteínas associadas aos microtúbulos tem sido atribuída à presença de uma pequena região com um domínio acídico (Masumoto et al. 1989; Cooke et al. 1990; Balczon, 1993).

A análise no computador identificou vários locais susceptíveis de modificação pós-tradução. Foi assinalado um possível local de N-glicosilação através do reconhecimento de uma sequência específica (Asn-X-Thr). A nível do retículo endoplasmático as sequências Asn-X-Thr e Asn-X-Ser (em que o X pode ser qualquer aminoácido excepto a prolina) correspondem aos locais onde são adicionados oligossacarídeos. Esta adição é catalisada por uma enzima que se situa na superfície interna do RE. Nos mamíferos a glicosilação de proteínas citosólicas e nucleares é feita no citosol através da adição de N-acetilglucosamina aos grupos hidroxilo das serinas e treoninas. É um processo pouco comum e ocorre com proteínas do poro da membrana e alguns factores de transcrição (Darnell et al. 1990). Uma vez que a localização da proteína codificada pelo cADN XT-2 é nuclear, a identificação

destes local de modificação pós-tradução parece resultar apenas do reconhecimento da sequência específica Asn-X-Thr.

A proteína XT-2 apresenta vários locais de modificações pós-tradução dos quais se salientam os potencias locais de fosforilação pela proteína cinase C, pela caseína cinase II e pela cinase $p34^{cdc2}$. A relação com o ciclo celular, determinada nos padrões de imunofluorescência característicos dos soros monoclonal e policlonal, e os locais susceptíveis de fosforilação pela cinase $p34^{cdc2}$ sugerem uma possível função desta proteína no decorrer do ciclo celular. Vários autoantigénios já descritos correspondem a proteínas que são fosforiladas ou susceptíveis de serem fosforiladas (Reimer et al. 1986; Gottlieb et al. 1989a, b; Minota et al. 1991; Yeo et al. 1994; Imai et al. 1994). Recentemente foi evidenciado que a proteína RMSA-1 apresenta três locais de fosforilação para a cinase do *cdc2* e está associada a mais três antigénios fosforilados com 31 kDa, 67 kDa e 200 kDa. O bloqueio desta proteína com a electroporação do anticorpo que permitiu a sua identificação em fibroblastos de ratinho afecta a formação do fuso mitótico, o que sugere uma função essencial desta proteína na progressão do ciclo celular (Yeo et al. 1994a). Nos insectos, este soro autoimune permitiu a detecção de uma proteína, com 31 kDa, associada com os cromossoma mitóticos e meióticos (Yeo et al. 1994b). Para além da relação deste antigénio com o ciclo celular, a sua presença em espécies tão distintas demonstra a capacidade dos autoanticorpos reconhecerem moléculas altamente conservadas (Tan; 1989; Yeo et al. 1994b) e para além disso muitos dos autoepítopos identificados corresponderem a domínios funcionais importantes (Tan; 1989; Balczon, 1993). Contudo, a determinação da função da proteína XT-2 a nível do ciclo celular terá ainda de ser avaliada.

A sequência de nucleótidos do gene isolado (cADN XT-2) e a sequência de aminoácidos da proteína codificada pelo mesmo foi comparada com as sequências de ácidos nucleicos e de proteínas eucariotas já existentes no banco de dados, mas não foi detectada uma homologia significativa entre estas e as sequências de nucleótidos e de aminoácidos cADN XT-2.

O anticorpo monoclonal usado para o rastreio inicial da biblioteca de expressão humana de cADNs foi obtido de células de hibridoma de um ratinho da espécie MRL/*lpr*. Nestes ratinhos a linfoproliferação e a produção aumentada de autoanticorpos é muito semelhante à encontrada no lupus eritematoso sistémico humano (Steinberg et al. 1990; Cohen et al. 1991). Ao longo deste estudo foi possível verificar e confirmar que os autoanticorpos de ratinho reconhecem epítopos comuns em espécies diferentes e que a natureza dos antigénios com que reagem é muito diversificada. Como este autoanticorpo permitiu isolar um cADN humano, procurou-se verificar se a proteína codificada pelo cADN XT-2 também era reconhecida pelo soro de doentes com lupus. Obtiveram-se resultados

positivos em dois dos dez soros testados. Adicionalmente, verificou-se que estes soros reconhecem variados antigénios nos extractos totais de células HEp-2 e que o perfil de antigénios varia muito de soro para soro. Embora o número de amostras analisadas não seja significativo, este resultado não deixa de ser interessante, se considerarmos que este autoantigénio pode vir a ser utilizado como marcador de diagnóstico de algumas formas de lupus. Contudo, a sua utilização neste sentido requer a análise de um maior número de amostras (tanto de soros de doentes com lupus como de pessoas saudáveis), uma informação mais pormenorizada dos doentes, especialmente no diz respeito ao seu estado clínico, e o estudo do efeito da medicação.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo demonstrou que os hibridomas obtidos através da fusão de células do baço de ratinhos com lupus eritematoso sistémico e de células de mieloma reagem com preparações de ADN e preparações proteicas de células humanas, o que confirma a reactividade cruzada exibida por outros autoanticorpos já estudados. A caracterização parcial dos hibridomas produzidos neste estudo evidenciou o reconhecimento de vários polipeptídeos com diferentes pesos moleculares e para além disso mostrou a reactividade dos mesmos com antigénios que assumem padrões de imunofluorescência característicos nas células HEp-2 em interfase e em mitose. O "stock" de autoanticorpos obtido nestas fusões será alvo de um estudo mais profundo de modo a que se possam selecionar aqueles que se mostrem potencialmente interessantes para o isolamento de autoantigénios associados ao ciclo celular e/ou à regulação da proliferação celular e para análise da reactividade dos anticorpos produzidos nos doentes com lupus.

A caracterização do conjunto de anticorpos monoclonais produzidos por ratinhos com SLE e inicialmente selecionados pela capacidade de reacção com preparações de ADN foi feita por técnicas de imunofluorescência, "immunoblotting" e imunoprecipitação. Os diferentes padrões de imunofluorescência que estes mAbs revelaram através do reconhecimento de antigénios citoplasmáticos e nucleares que têm uma distribuição ou reorganização particular à medida que as células se encontram em interfase ou em mitose, apontam para o envolvimento destes antigénios no ciclo celular. Contudo, a identificação destes antigénios como potenciais proteínas associadas à progressão do ciclo celular requer o isolamento dos genes que as codificam, assim como a sua análise estrutural e funcional. Foi evidenciado por técnicas de "immunoblotting" e imunoprecipitação que estes mAbs reconhecem antigénios com pesos moleculares aparentes que variam entre os 25 kDa e os 210 kDa (Bronze-da-Rocha et al. 1992). Alguns destes antigénios correspondem a proteínas com epítopos fosforilados. Embora sem evidência directa, estes resultados sugerem que a reactividade destes mAbs com moléculas tão diferentes, como o ADN e/ou proteínas associadas e as proteínas fosforiladas, eventualmente resultará do reconhecimento dos grupos fosfato que existem nestes antigénios. Contudo, muitos dos polipeptídeos imunoprecipitados pelos mesmos autoanticorpos não apresentam determinantes antigénicos fosforilados. Deste modo, o isolamento dos genes que codificam para estes antigénios, a determinação da sua estrutura terciária, o mapeamento de epítopos e a utilização de péptidos sintéticos que facilitem a análise da sua conformação poderão contribuir para o

esclarecimento das reacções cruzadas evidenciadas pelos mAbs caracterizados.

O rastreio de uma biblioteca de expressão de cADNs humana com o mAb 402 permitiu o isolamento de um cADN com cerca de 1,2 kb que codifica para um antigénio com um peso molecular aparente próximo dos 30 kDa. Este polipeptídeo é reconhecido pelo anticorpo monoclonal 402 e pelo anticorpo policlonal Rb-7. Por imunofluorescência, os dois anticorpos apresentam um padrão de reactividade semelhante, reconhecendo nas células em interfase antigénios nucleares com uma distribuição granular e mais intensa à volta dos nucléolos, enquanto que nas células em metafase a marcação é restrita aos cromossomas condensados. Esta associação aos cromossomas metafásicos também foi evidenciada por microscopia electrónica em células sincronizadas com a colquicina. A detecção de um mARN com cerca de 1,3 kb e os ensaios de imunoprecitação realizados com o produto da tradução *in vitro* apontam para a existência de um gene completo no cADN isolado. A sequência de nucleótidos do cADN XT-2 e a correspondente sequência de aminoácidos quando comparadas com outras já existentes não revelou a presença de homologias significativas, o que indica que foi isolada uma nova proteína. Os locais de modificação pós-tradução previstos na sequência de nucleótidos do cADN XT-2 são essencialmente constituídos por potenciais locais de fosforilação. A redistribuição celular dos antigénios reconhecidos pelos anticorpos monoclonal e policlonal nas células em interfase e mitose em conjunto com os potenciais locais de fosforilação encontrados na sequência deste gene sugerem que este antigénio possa estar envolvido na progressão do ciclo celular, tal como já foi descrito para outros autoantigénios.

O estabelecimento de uma relação directa entre o gene isolado e o ciclo celular requer o estudo das modificações pós-tradução da proteína codificada pelo cADN XT-2 e da possível associação a outras proteínas já conhecidas e directamente relacionadas com o ciclo celular (ciclinas, Cdks, Ckis, etc.). Com este objectivo proceder-se-á à determinação dos locais de fosforilação e à identificação das respectivas cinases. O envolvimento deste antigénio nas diferentes fases do ciclo celular será determinado por estudos de transfecção com ARN "anti-sense" ou com a electroporação dos anticorpos monoclonal e policlonal *in vivo* em culturas celulares de células HEp-2 e HeLa. A expressão de formas truncadas da proteína nas células em cultura permitirá a determinação dos seus domínios funcionais. A avaliação da função desta proteína poderá ser complementada com estudos no ratinho e na *Drosophila*, uma vez que o gene isolado foi detectado nestas espécies.

A identificação de um gene humano com um anticorpo monoclonal de ratinho que desenvolve espontaneamente um síndrome autoimune muito semelhante ao lupus humano e a caraterização da proteína codificada pelo mesmo poderá ajudar a esclarecer a complexidade

desta doença, nomeadamente no que diz respeito aos factores que parecem estar associados à etiologia do lupus. Neste sentido e em conformidade com a análise preliminar já efectuada com vários soros de doentes com lupus, o autoantigénio isolado servirá para a análise da reactividade de um maior número de soros destes doentes e eventualmente para a quantificação de determinados anticorpos. Pretende-se com este estudo verificar se esta proteína pode ou não servir como marcador de diagnóstico de determinadas formas de lupus ou para o rastreio de novos autoanticorpos com especificidade semelhante, tanto nos soros de doentes com lupus como nos soros controlo.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

Abuaf, N., Johanet, C., Chretien, P., Absalon, B. I., Homberg, J. C. & Buri, J. F. (1990). Detection of autoantibodies to Sm antigen in systemic lupus erythematosus by immunodiffusion, ELISA and immunoblotting: variability of incidence related to assays and ethnic origen of patients. Eur. J. Clin. Invest. **20**, 354-359.

Adachi, Y., Luke, M. & Laemmly, U. K. (1991). Chromosome assembly in vitro: topoisomerase II is required for condensation. Cell **64**, 137-148.

Adlakha, R. C., Sahasrabuddhe, C. G., Wright, D. A., Lindsey, W. F. & Rao, P. N. (1982). Localization of mitotic factors on metaphase chromosomes. J. Cell Sci. **54**, 193-206.

Alarcón-Segovia, D. (1989). Pathogenesis of systemic lupus erythematosus - possible participation of antiphospholipid antibodies. Isr. J. Med. Sci. **25**, 669-674.

Alarcón-Segovia, D. & Cabral, A. R. (1994) Antiphospholipid antibodies. Where do they come from? Where do they go? J. Rheumatol. **21**, 982-989.

Amon, A., Irniger, S. & Nasmyth, K. (1994). Closing the cell cycle circle in Yeast: G2 cyclin proteolysis initiated at mitosis persists until the activation of G1 cyclins in the next cycle. Cell **77**, 1037-1050.

Andrade, L. E. C., Chan, E. K. L., Raska, I., Peebles, C. L., Roos, G. & Tan, E. M. (1991). Human autoantibody to a novel protein of the nuclear coiled body: immunological characterization and cDNA cloning of p80-coilin. J. Exp. Med **173**, 1407-1419.

Arnett, F. C. (1992). Genetic aspects of human lupus. Clin. Immunol. Immunopathol. **63**, 4-6.

Bailly, E., Dorée, M., Nurse, P. & Bornens, M. (1989). $p34^{cdc2}$ is located in both nucleus and cytoplasm; part is centrosomally associated at G2/M and enters vesicles at anaphase. EMBO J. **8**, 3985-3995.

Balczon, R. & West, K. (1991). The identification of mammalian centrosomal antigens using human autoimmune anticentrosome antisera. Cell Motility Cytosk. **20**, 121-135.

Balczon, R. (1993). Autoantibodies as probes in cell and molecular biology. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **204**, 138-154.

Black, C. M., Chabot, B. & Steitz, J. A. (1985). U2 as well as U1 small nuclear ribonucleoproteins are involved in premenssenger RNA splicing. Cell **42**, 737-750.

Blaschek, M., Muller, S. & Youinou, P. (1993). Anti-"dividing cell antigen" autoantibody: a novel antinuclear antibody pattern related to histones in systemic lupus erythematosus. J. Clin. Immunol. **13**, 329-338.

Beach, D., Durkacz, B. & Nurse, P. (1982). Functionally homologous cell cycle control genes in budding and fission yeast. Nature **300**, 706-709.

Belmont, L. D., Hyman, A. A., Sawin, K. E. & Mitchison, T. J. (1990). Real-time visualization of cell cycle-dependent changes in microtubule dynamics in cytoplasmic extracts. Cell **62**, 579-589.

Ben-Chetrit, E., Chan, E. K. L., Sullivan, K. F. & Tan, E. M. (1990). A 52-kD protein is a novel component of the SS-A/Ro antigen particle. J. Exp. Med. **167**, 1560-1571.

Bini, P., Chu, J., Okolo, C. & Elkon, K. (1990). Analysis of autoantibodies to recombinant La (SS-B) peptides in systemic lupus erythematosus and primary Sjögren's syndrome. J. Clin. Invest. **85**, 325-333.

Blencowe, B. J., Carmo-Fonseca, M., Behrens, S., Lührmann, R. & Lamond, A. I. (1993). Interaction of the human autoantigen p150 with splicing snRNPs. J. Cell Sci. **105**, 685-698.

Blow, J. J. (1989). DNA replication and its control. Current Opinion Cell Biol. **1**, 263-267.

Booher, R. N., Alfa, C. E., Hyams, J. S. & Beach, D. (1987a). The fission yeast cdc2/cdc13/suc1 protein kinase: regulation of catalytic activity and nuclear localization. Cell **58**, 485-497.

Booher, R. & Beach, D. (1987b). Interaction between *cdc13*$^+$ and *cdc2*$^+$ in the control of the mitosis in fission yeast; dissociation of the G_1 and G_2 roles of the *cdc2*$^+$ protein kinase. EMBO J. **6**, 3441-3447.

Bossu, P., Singer, G. G., Andres, P., Ettinger, R., Marshak-Rothstein, A. & Abbas, A. K. (1993). Mature $CD4^+$ T lymphocytes from MRL/lpr mice are resistant to receptor-mediated tolerance and apoptosis. J. Immunol. **151**, 7233-7239.

Brendel, V., Dohlman, J., Blaisdell, E. & Karlin, S. (1991). Very long charge runs in systemic lupus erythematosus-associated autoantigens. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **88**, 1536-1540.

Brinkman, K., Termaat, R. M., de Jong, J., van den Brink, H. G., Berden, J. H. M. & Smeenk, R. J. T. (1989). Cross-reactive binding patterns of monoclonal antibodies to DNA are often caused by DNA/anti-DNA immune complexes. Res. Immmunol. **140**, 595-612.

Bronze-da-Rocha, E., Machado, C., Staines, N.A. & Sunkel, C.E. (1992). Systemic lupus erythematosus murine monoclonal DNA-binding antibodies recognize cytoplasmic and nuclear phosphorylated antigens that display cell cycle redistribution in HEp-2 cells. Immunology **77**, 582-591.

Campbell, R. D. & Milner, C. M (1993). MHC genes in autoimmunity. Curr. Opinion Immunol. **5**, 887-893.

Cande, W. Z. & Hogan, C. J. (1989). The mechanism of anaphase spindle elongation. Bioessays **11**, 5-9.

Casciola-Rosen, L. A., Anhalt, G. & Rosen, A. (1994). Autoantigens target in systemic lupus erythematosus are clustered in two populations of surface structures on apoptotic keratinocytes. J. Exp. Med. **179**, 1317-1330.

Casiano, C. A., Landberg, G., Ochs, R. L. & Tan, A. M. (1993). Autoantibodies to a novel cell cycle-regulated protein that acumulates in the nuclear matrix during S phase and is localized in the kinetochores and splindle midzone during mitosis. J. Cell Sci. **106**, 1045-1056.

Cervera, R., Khamashta, M. A., Font, J., Sebastiani, G. D., Gil, A., Lavilla, P., Doménech, I., Aydintug, A. O., Jedryka-Góral, A., Rámon, E., Galeazzi, M., Haga, H-J., Hughes, G. R. V. & The European Working Party on Systemic Lupus Erythematosus (1993). Systemic lupus erythematosus: clinical and immunologic patterns of disease expression in a cohort of 1,000 patients. Medicine **72**, 113-124.

Chan, E. K. L. & Tan, E. M. (1989). Epitopic targets for autoantibodies in systemic lupus erythematosus and Sjögren's syndrome. Current Opinion Rheumatol. **1**, 376-381.

Chou, C., Wang, J., Knuth, M. W. & Reeves, W. H. (1992). Role of a major autoepitope in forming tha DNA binding site of the p70 (Ku) antigen. J. Exp. Med. **175**, 1677-1684.

Christofori, G. & Keller, W. (1988). 3' cleavage and polyadenylation of mRNA precursors in vitro requires a poly(A) polymerase, a cleavage factor, and a snRNP. Cell **54**, 875-889.

Clarke, , P. R., Hoffmann, I., Draetta, G. & Karsenti, E. (1993). Dephosphorylation of cdc25-C by a type-2A protein phosphatese: specific regulation during cell cycle in *Xenopus* egg extracts. Mol. Cell Biol. **4**, 397-411.

Cohen, P. L. & Eisenberg, R. A. (1991). *Lpr* and *gld*: single gene models of systemic autoimmunity and lymphoproliferative disease. Annu. Rev. Immunol. **9**, 234-269.

Compton, D. A., Szilak, I. & Cleveland, D. W. (1992). Primary structure of NuMA, an intranuclear protein that defines a novel pathway for segregation of proteins at mitosis. J. Cell Biol. **116**, 1395-1408.

Cooke, C. A., Heck, M. M. & Earnshaw, W. C. (1987). The inner centromere protein (INCENP) antigens: movement from inner centromere to midbody during mitosis. J. Cell Biol. **105**, 2053-2067.

Cooke, C. A., Bernat, R. L. & Earnshaw, W. C. (1990). CENP-B: a major human centromere protein located benearth the kinetochore. J. Cell Biol. **110**, 1475-1488.

Darnell, J., Lodish, H. & Baltimore, D. (1990). *Molecular Cell Biology.* 2^{sd} Edition. Scientific American Books, Inc., New York.

Davis, F. M., Tsao, T. Y., Fowler, S. K. & Rao, P. N. (1983). Monoclonal antibodies to mitotic cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **80**, 2926-2930.

Deapen, D., Escalante, A., Weinrib, L., Horwitz, D., Bachman, B., Roy-Burman, P., Walker, A. & Mack, T. M. (1992). A revised estimate of twin concordance in systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum. **35**, 311-318.

Dinsmore, J. H. & Sloboda, R. D. (1988). Calcium and calmodulin-dependent phosphorylation of a 62 Kd protein induces microtubule depolymerization in sea urchin mitotic apparatuses. Cell **53**, 769-780.

Draetta, G. & Beach, D. (1988a). Activation os *cdc2*$^{+}$ during mitosis in human cells: cell cycle-dependent phosphorylation and subunit rearrangement. Cell **54**, 17-26.

Draetta, G., Piwnica-Worms, H., Morrison, D., Druker, B., Roberts, T. & Beach, D. (1988b). Human cdc2 protein kinase is a major cell-cycle regulated tyrosine kinase substrate. Nature **336**, 738-744.

Draetta, G., Luca, F., Westendorf, J., Brizuela, L., Ruderman, J. & Beach, D. (1989). cdc2 protein kinase is complexed with both cyclin A and B: evidence for proteolytic inactivation of MPF. Cell **56**, 829-838.

Drake, C. G. & Brian, L. K. (1992). Genetic and immunological mechanisms inthe pathogenesis of systemic lupus erythematosus. Curr. Opinion Immunol. **4**, 733-740.

Drappa, J., Brot, N. & Elkon, K. B. (1993). The Fas protein is expressed at high levels on CD4^{+}CD8^{+} thymocytes and activated mature lymphocytes in normal mice but not in the lupus-prone strain, MRL *lpr/lpr*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **90**, 10340-10344.

Earnshaw, W. C., Sullivan, K. F., Machlin, P. S., Cooke, C. A., Kaiser, D. A., Pollard, T. D., Rothfield, N. F. & Cleveland, D. W. (1987). Molecular cloning of cDNA for CENP-B, the major human centromere autoantigen. J. Cell Biol. **104**, 817-829.

Earnshaw, W. C. & Bernat, R. L. (1991a). Chromosomal passengers: toward an integrated view of mitosis. Chromosoma **100**, 139-146.

Earnshaw, W. C. & Cooke, C. A (1991b). Analysis of the distribution of the INCENPS throughout mitosis reveals the existence of a pathway of structural changes in the chromosomes during metaphase and early events in the cleavage furrow formation. J. Cell Sci. **98**, 443-461.

Eilat, D. (1985). Cross-reactions of anti-DNA antibodies and the central dogma of lupus nephritis. Immunol. Today **6**, 123-127.

Emlen, W., Niebur, A. & Kadera, R. (1994). Accelarated in vitro apoptosis of lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus. J. Immunol. **152**, 3685-3691.

Evans, T., Rosenthal, E. T., Youngblom, J., Distel, D. & Hunt, T. (1983). Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. Cell **33**, 389-396.

Fairman, M. P. (1990). DNA polimerase d/PCNA: actions and interactions. J. Cell Sci. **95**. 1-4.

Félix, M., Labbé, J., Dorée, M., Hunt, T. & Karsenti, E. (1990). Triggering of cyclin degradation in interphase extracts of amphibian eggs by cdc2 kinase. Nature **346**, 379-382.

Gatenby, P. A. (1991). The role of complement in the aetiopathogenesis of systemic lupus erythematosus. Autoimmunity **11**, 61-66.

Gautier, J., Minshull, J., Lohka, M., Glotzer, M., Hunt, T. & Maller, J. (1990). Cyclin is a component of maturation-promoting factor from Xenopus. Cell **60**, 487-494.

Gautier, T., Dauphin-Villemant, C., André, C., Masson, C., Arnoult, J. & Hernandez-Verdun, D. (1992). Identification and characterization of a new set of nucleolar ribonucleoproteins which line the chromosomes during mitosis. Exp. Cell Res. **200**, 5-15.

Gerhart, J., Wu, M. & Kirschner, M. (1984). Cell cycle dynamics of an M-phase-specific cytoplasmic factor in *Xenopus laevis* oocytes and eggs. J. Cell Biol. **98**, 1247-1255.

Giloh, H. & Sedat, J. W. (1982). Fluorescence microscopy: reduced photobleaching of rhodamine and fluorescein protein conjugates by n-propylgallate. Science **217**, 1252-1255.

Glotzer, M., Murray, A. W. & Kirschner, M. W. (1991). Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. Nature **349**, 132-138.

Gould, K. L. & Nurse, P. (1989). Tyrosine phosphorylation of the fission yeast *cdc2*$^{+}$ protein kinase regulates entry into mitosis. Nature **342**, 39-45.

Gottlieb, E. & Steitz, J. A. (1989a). The RNA binding protein La influences both the accuracy and the efficiency of RNA polymerase III transcription *in vitro*. EMBO J. **8**, 841-850.

Gottlieb, E. & Steitz, J. A. (1989b). Function of the mammalian La protein: evidence for its action in transcription termination by RNA polymerase III. EMBO J. **8**, 851-861.

Guldner, H.-H., Szostecki, C., Vosberg, H.-P., lakomek, H.-J., Penner, E. & Baitz, F.-A (1986). Scl 70 autoantibodies from scleroderma patients recognize a 95 kDa protein identified as DNA topoisomerase I. Chromosoma **94**, 132-138.

Harley, J. B. & Scofield, R. H. (1991). Systemic lupus erythematosus: RNA-protein autoantigens, models of disease heterogeneity, and theories of etiology. J. Clin. Immunol. **11**, 297-316.

Harlow, E. & Lane, D. (1988). *Antibodies - A Laboratory Manual.* 1st Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Hartung, K., Coldewey, R., Lang, F. K. B., Specker, C., Schendel, D., Schneider, P., Seuchter, S., Stangel, W., Albert, E. & Deicher, H. (1991). Hetero- and homozygoty of MHC class II gene products in systemic lupus erythematosus. Tissue Antigens **38**, 165-168.

Hartwell, L. H. & Unger, M. W. (1977). Unequal division in *Saccharomyces cerevisiae* and its implications for the control of the cell division. J. Cell Biol. **75**, 422-435.

Hartwell, L. H. & Weinert, T. A. (1989). Checkpoints: controls that ensure the order of the cell cycle events. Science **246**, 629-634.

Hashimoto, C. & Steitz, J. A. (1983). Sequential association of nucleolar 7-2 RNA with two different autoantigens. J. Bol. Chem. **258**, 1379-1383.

Heald, R. & McKeon, F. (1990). Mutations of phosphorylation sites in lamin A that prevent nuclear lamina disassembly in mitosis. Cell **61**, 579-589.

Heichman, K. A. & Roberts, J. M. (1994). Rules to replicate by. Cell **79**, 557-562.

Hernandez-Verdun, D. & Gautier, T. (1994). The chromosome periphery during mitosis. Bioessays **16**, 179-185.

Higashiura, M., Shimizu, Y., Tanimoto, M., Morita, T. & Yagura, T. (1992). Immunolocalization of Ku-proteins (p80/p70): localization of the p70 to nucleoli and the periphery of both interphase nuclei and metaphase chromosomes. Exp. Cell Res. **201**, 444-451.

Hockenbery, D. M., Oltvai, Z. N., Yin, X.-M., Milliman, C. L. & Korsmeyer, J. (1993). Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. Cell **75**, 241-251.

Holloway, S. L., Glotzer, M., King, R. W. & Murray, A. W. (1993). Anaphase is initiated by proteolysis rather than by inactivation of maturation-promoting factor. Cell **73**, 1393-1402.

Hunter, T. & Pines, J. (1994). Cyclins and cancer II: cyclin D and CDK inhibitors come of age. Cell **79**, 573-582.

Imai, H., Dritzler, M. J., Neri, R, Bombardieri, S., Tan, E. M. & Chan, E. K. L. (1994). Immunocytochemical characterization of human NOR-90 (upstream binding factor) and associated antigens reactive with autoimmune sera. Molecular Biol. Reports **19**, 115-124.

Isenberg, D. A. & Staines, N. A. (1990). DNA antibody idiotypes: an analysis of their role in health and disease. J. Autoimmunity **3**, 1-18.

Isenberg, D. A., Ehrenstein, M. R., Longhurst, C. & Kalsi, J. K. (1994). The origin, sequence, structure, and consequences of developing anti-DNA antibodies. Arthritis Rheum. **37**, 169-180.

Itoh, N., Yonehara, S., Ishii, A., Yonehara, M., Mizushima, S., Sameshima, M., Hase, A., Seto, Y. & Nagata, S. (1991). The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. Cell **66**, 233-243.

Itoh, N., Tsujimoto, Y. & Nagata, S. (1993). Effect of bcl-2 on Fas antigen-mediated cell death. J. Immunol. **151**, 621-627.

Izumi, T., Walker, D. H. & Maller, J. L. (1992). Periodic changes in phosphorylation of the *Xenopus* cdc25 phosphatase regulate its activity. Mol. Biol. Cell **3**, 927-939.

Jackson, A. A. (1991). Structure-function relationships in eukaryotic nuclei. Bioessays **13**, 1-10.

Joshi, H. C., Palacios, M. J., McNamara, L. & Cleveland, D. W. (1992). γ-tubulin is a centrosomal protein required for cell cycle-dependent microtubule nucleation. Nature **356**, 80-83.

Karsenti, E., Bravo, R. & Kirschner, M. (1987). Phosphorylation changes associated with the early cell cycle in *Xenopus* eggs. Develop. Biol. **119**, 442-453.

Kato, J.-Y., Matsushime, H., Hiebert, S. W., Ewen, M. E. & Sherr, C. J. (1993). Direct binding of cyclin D to the retinoblastoma gene product (pRb) and pRb phosphorylation by the cyclin D-dependent kinase CDK4. Genes Dev. **7**, 331-342.

Kemp, M. E., Atkinson, J. P., Skanes, V. M., Levine, R. P. & Chaplin, D. D. (1987). Deletion of C4A genes in patients with systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum. **30**, 1015-1022.

King, R. W., Jackson, P. K. & Kirschner, M. W. (1994). Mitosis in transition. Cell **79**, 563-571.

Klinman, D. M., Banks, S., Hartman, A. & Steinberg, A. D. (1988). Natural murine autoantibodies and conventional antibodies exhibit similar degrees of antigenic cross-reactivity. J. Clin. Invest. **82**, 652-657.

Klinman, D. M., Shirai, A., Conover, J. & Steinberg, A. D. (1994). Cross-reactivity of IgG anti-DNA-secreting B cells in patients with systemic lupus erythematosus. Eur. J. Immunol. **24**, 53-58.

Kochanski, R. S. & Borisy, G. G. (1990). Mode of centriole duplication and distribution. J. Cell Biol. **110**, 1599-1605.

Kooy, J., Toh, B-H., Pettitt, J. M., Erlich, R. & Gleeson, P.A. (1992). Human autoantibodies as reagents to conserved golgi components. J. Biol. Chem. **267**, 20255-20263.

Krieg, P. A. & Melton, D. A (1984). Formation of the 3' end of histone mRNA by post-transcriptional processing. Nature **308**, 203-206.

Kuang, J., Ashorn, C. L., Gonzalez-Kuyvenhoven, M. & Penkala, J. E. (1994). cdc25 is one of the MPM-2 antigens involved in the activation of maturation-promoting factor. Mol Cell biol. **5**, 135-145.

Labbé, J. C., Picard, A., Peaucellier, G., Cavadore, J. C., Nurse, P. & Dorée, M. (1989a). Purification of MPF from starfish: identification as the H1 histone kinase $p34^{cdc2}$ and a possible mechanism for its periodic activation. Cell **57**, 253-263.

Labbé, J. C., Capony, J., Caput, D., Cavadore, J. C., Derancourt, J.,Kaghad, M., Lelias, J. Picard, A. & Dorée, M. (1989b). MPF from starfish oocytes at the first meiotic metaphase is a heterodimer containing one molecule of cdc2 and one molecule of cyclin B. EMBO J. **8**, 3053-3058.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural protein during assembly of the head of bacteriophage T4. Nature **227**, 680-685

Lake, R., Morgan, A. & Staines N. (1987). Production of monoclonal antibodies. Soc. Appl. Microbiol. Tech. Series **24**, 1-19.

Landberg, G., Tan, E. M. & Roos, G. (1990). Flow cytometric multiparameter analysis of proliferating cell nuclear antigen/cyclin and Ki-67 antigen: a new view of the cell cycle. Exp. Cell Res. **187**, 111-118.

Lassoued, K., Guilly, M., Danon, F., Andre, C., Dhumeaux, D., Clauvel, J., Brouet, J., Seligmann & M., Courvalin, J. (1988). Antinuclear autoantibodies specific for the lamins. Characterization and clinical significance. Ann. Inter. Med. **108**, 829-833.

Lee, M. G. & Nurse, P. (1987). Complementation used to clone a human homologue of the fission yeast cell cycle control gene *cdc2*. Nature **327**, 31-35.

Lehmeier, T., Foulaki, K. & Lührmann, R. (1990). Evidence for three distinct D proteins, which react differentially with anti-Sm autoantibodies, in the cores of the major snRNPs U1, U2, U4/U6 and U5. Nucleic Acids Res. **18**, 6475-6484.

Lerner, M. R., Boyle, J. A., Mount, S. M., Wolin, S. L. & Steitz, J. A. (1980). Are snRNPs involved in splicing ?. Nature **283**, 220-224.

Li, L. & Yeh, N. (1992). Cell cycle-dependent migration of the DNA-binding protein Ku80 into nucleoli. Exp. Cell Res. **199**, 262-269.

Lischwe, M. A., Ochs, R. L., Reddy, R., Cook, R. G., Yeoman, L. C., Tan, E. M., Reichlin, M. & Bush, H. (1985). Purification and partial characterization of a nucleolar scleroderma antigen (Mr = 34,000; pI, 8.5) rich in N^G,N^G-dimethil arginine. J. Biol Chem **260**, 14304-14310.

Lohka, M. & Maller, J. L. (1985). Induction of nuclear envelope breakdown, chromosome condensation, and spindle formation in cell-free extracts. J. Cell Biol. **101**, 518-523.

Lorca, T., Labbé, J.-C., Devault, A., Fesquet, D., Strausfeld, U., Nilsson, J., Nygren, P.-A., Uhlen, M., Cavadore, J.-C. & Dorée, M. (1992). Cyclin A-cdc2 kinase does not trigger but delays cyclin degration in interphase extracts of amphibian eggs. J. Cell Sci. **102**, 55-62.

Mackay , A. M., Eckley, D. M., Chue, C. & Earnshaw, W. C. (1993). Molecular analysis of the INCENPs (Inner Centromere Proteins): separate domains are required for the association with microtubules during interphase and with the central spindle during anaphase. J. Cell Biol. **123**, 373-385.

Masumoto, H., Masukata, H., Muro, Y., Nozaki, N. & Okasaki, T. (1989). A human centromere antigen (CENP-B) interacts with a short specific sequence in alphoid DNA, a human centromeric satellite. J. Cell Biol. **109**, 1963-1973.

Mathews, M. B., Bernsteins, R. M., Franza, B. R. & Garrels, J. I. (1984). Identity of the proliferating cell nuclear antigen and cyclin. Nature **309**, 374-376.

Matsuzaki, Y., Pannetien, C., Kanagawa, O., Gachelin, G. & Nakauchi, H. (1992). Evidence for the existence of two parallel differentiation pathways in the thymus of MRL *lpr/lpr* mice. J. Immunol. **149**, 1069-1074.

Merino, R., Iwamoto, M., Fossati, L., & Izui, S. (1993). Polyclonal B cell activation arises from different mechanisms in lupus-prone (NZB x NZW)F1 and MRL/Mpj-*lpr*/*lpr* mice. J. Immunol. **151**, 6509-6516.

Miake-Lye, R., Newport, J. & Kirschner, M. (1983). Maturation-promoting factor induces nuclear vesicle breakdown in cicloheximide-arrested embryos of *Xenopus laevis*. J. Cell Sci. **97**, 81-91.

Mitchison, T. & Kirschner, M. (1984a). Microtubule assembly nucleated by isolated centrosomes. Nature **312**, 232-237.

Mitchison, T. & Kirschner, M, (1984b). Dinamic instability of microtubule growth. Nature **312**, 237-242.

Minota, S., Jarjour, W. N., Suzuki, N., Nojima, Y., Roubey, R. A. S., Mimura, T., Yamada, A., Hosoya, T., Fumimaro, T. & Winfield, J. B. (1991). Autoantibodies to nucleolin in systemic lupus erythematosus and other diseases. J Immunol. **146**, 2249-2252.

Minshull, J., Blow, J. J. & Hunt, T. (1989a). Translation of cyclin mRNA is necessary for extracts of activated Xenopus eggs to enter mitosis. Cell **56**, 947-956.

Miyachi, K., Takano, S., Mimori, T., Yamagata, H., Mita, S., Matsuoka, Y., Irimajiri, S., tani, K., Akizuki, M. & Homma, M. (1991). A novel autoantibody reactive with a 48 kDa tRNA associated protein in patients with scleroderma. J. Rheumatol. **18**, 373-378.

Mohan, C., Adams, S., Stanik, V. & Datta, S. (1993). Nucleosome: a major immunogen for pathogenic autoantibody-inducing T cells of lupus. J. Exp. Med. **177**, 1367-1381.

Morgan, A., Buchanan, R. R. C., Lew, A. M., Oslen, I. & Staines, N. A. (1985a). Five groups of antigenic determinants on DNA identified by monoclonal antibodies from (NZB x NZW) F1 and MRL/Mp-*lpr*/*lpr* mice. Immunology **55**, 75-83.

Morgan, A., Isenberg, D. A., Naparstek, Y., Rauch, J., Duggan, D., Khiroya, R., Staines, N. A. & Schattner, A. (1985b). Shared idiotypes are expressed on mouse and human anti-DNA autoantibodies. Immunology **56**, 393-399.

Morla, A. O., Draetta, G., Beach, D. & Wang, Y. J. (1989). Reversible tyrosine phosphorylation of cdc2: dephosphorylation accompanies activation during entry into mitosis. Cell **58**, 193-203.

Morimoto, C., Reinherz, E. L., Distaos, J. A., Steineberg, A. D. & Schlossmann, S. F. (1984). Relationship between systemic lupus erythematosus T cell subsets, anti-T cell antibodies, and T cell functions. J. Clin. Invest. **74**, 689-700.

Motokura, T., Bloom, T., Kim, H. G., Jüppner, H., Ruderman, J. V., Kronenberg, H. M. & Arnold, A. (1991). A novel cyclin encoded by a *bcl1*-linked candidate oncogene. Nature **350**, 512-515.

Mount, S. M., Petterson, I., Hinterberger, M., Karmas, A. & Steitz, J. A. (1983). The U1 small nuclear RNA-protein complex selectively binds a 5' splice site in vitro. Cell **33**, 509-518.

Mowry, K. L. & Steitz, J. A. (1987). Identification of the human U7 snRNP as one of several factors involved in the 3' end maturation of histone premessenger RNA's. Science **238**, 1682-1687.

Murakami, M., Tsubata, T., Okamoto, M., Shimizu, A., Kumagai, S., Imura, H. & Honjo, T. (1992). Antigen-induced apoptotic death of Ly-1 B cells responsible for autoimmune disease in transgenic mice. Nature **357**, 77-80.

Murray, A. W., Solomon, M. J. & Kirschner, M. W. (1989a). The role of cyclins synthesis and degradation in the control of maturation promoting factor activity. Nature **339**, 280-286.

Murray, A. W. (1989b). The cell cycle as a *cdc2* cycle. Nature **342**, 14-15.

Murray, A. & Hunt, T. (1993). *The cell cycle - an introduction.* 1st edition. W. H. Freeman and Company, U.S.A..

Netter, H. J., Will, H., Szostecki, C. & Guldner, H. H. (1991). Repetitive P68-autoantigen specific epitopes recognized by human anti-(U1) small nuclear ribonucleoprotein autoantibodies. J. Autoimmunity **4**, 651-663.

Newport, J. & Kirschner, M. W. (1984). Regulation of the cell cycle during early Xenopus development. Cell **37**, 731-742.

Nurse, P. (1975). Genetic control of size at cell division in yeast. Nature **256**, 547-551.

Ochs, R. L., Lischwe, M. A., Spohn, W. H. & Bush, H. (1985). Fibrillarin: a new protein of the nucleolus identified by autoimmune sera. Biol. Cell **54**, 123-134.

Ogas, J., Andrews, B. J. & Herskowitz, I. (1991). Transcriptional activation of CLN1, CLN2, and a putative new G1 cyclin (HSC26) by SWI4, a positive regulator of G1-specific transcription. Cell **66**, 1015-1026.

Okano, Y & Medsger, T. A. (1991). Newly identified U4/U6 snRNP-binding proteins by serum autoantibodies from patients with systemic sclerosis. J. Immunol. **146**, 535-542.

Okano, Y & Medsger, T. A. (1992). Novel human autoantibodies reactive with 5'-terminal trimethylguanosine cap structures of U small nuclear RNA. J. Immunol. **149**, 1093-1098.

Pagano, M., Pepperkok, R. Verde, F., Ansorge, W. & Draetta, G. (1992). Cyclin A is required at two points in the human cell cycle. EMBO J. **11**, 961-971.

Pearson, W. R. & Lipman, D. J. (1988). Improved tool for biological sequence comparison. Proc. Natl. Acd. Sci. U.S.A. **85**. 2444-2450.

Peter, M., Nakagawa, J., Dorée, M., Labbé, J. C. & Nigg, E. A. (1990a). Identification of major nucleolar proteins as candidate mitotic substrates of cdc2 kinase. Cell **60**, 791-801.

Peter, M., Nakagawa, J., Dorée, M., Labbé, J. C. & Nigg, E. A. (1990b). In vitro disassembly of the nuclear lamina and M-phase specific phosphorylation of lamins by cdc2 kinase. Cell **61**, 591-602.

Peter, M. & Herskowitz, I. (1994). Joining the complex: cyclin-dependent kinase inhibitor proteins and the cell cycle. Cell **79**, 181-184.

Pisetsky, D. S., Grudier, J. P. & Gilkeson, G. S. (1990). A role for immunogenic DNA in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum. **33**, 153-159.

Polyak, K., Kato, J.-Y., Solomon, M. J., Sherr, C. J., Massague, J., Roberts, J. M. & Koff, A. (1994). $p27^{kip1}$, a cyclin-Cdk inhibitor, links transforming growth factor-β and contact inhibition to cell cycle arrest. Genes Dev. **8**, 9-22.

Prelich, G., Tan, C.-K., Kostura, M., Mathews, M. B., So, A. G., Downey, K. M. & Stillman (1987). Functional identity of proliferating cell nuclear antigen and a DNA polimerase-δ auxiliary protein. Nature **326**, 517-520.

Provost, T. T., Arnett, F. C. & Reichlin, M. (1983). Homozygous C2 deficiency, lupus erythematosus, and anti-Ro (SSA) antibodies. Arthritis Rheum. **26**, 12791282.

Rao, P. N., Zhao, J., Ganju, R. K. & Ashorn, C. L. (1989). Monoclonal antibody against the centrosome. J. Cell Sci. **93**, 63-69.

Rattner, J. B., Wang, T., Mack, G., Fritzler, M. J. , Martin, L. & Valencia, D. (1992). MSA-36: a chromosomal and mitotic spindle-associated protein. Chromosoma **101**, 625-633.

Reddy, R. Tan, E. M., Henning, D., Nohga, K. & Busch, H. (1983). Detection of a nucleolar 7-2 ribonucleoprotein and a cytoplasmic 8-2 ribonucleoprotein with autoantibodies from patients with scleroderma. J. Biol. Chem. **258**, 1383-1386.

Reeves, W. H., Chaudhary, N., Salerno, A. & Blobel, G. (1987). Lamin B autoantibodies in sera of certain patients with systemic lupus erythematosus. J. Exp. Med. **165**, 750-762.

Reichlin, M., Harley, J. B. & Lockshin, M. D. (1992). Serologic studies of monozygotic twins with systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum. **35**, 457-464.

Reimer, G., Scheer, U., Peters, J.-M. & Tan, E. M. (1986). Immunolocalization and partial characterization of nucleolar autoantigen (PM.Scl) associated with polymyositis/scleroderma overlap syndromes. J. Immunol. **137**, 3802-3808.

Reimer, G., Rose, K. M., Scheer, U. & Tan, E. M. (1987). Autoantibody to RNA polymerase I in scleroderma sera. J. Clin. Invest. **79**, 65-72.

Reveille, J. D., Macleod, M. J., Whittington, K. & Arnett, F. C. (1991). Specific amino acid residues in the second hypervariable region of HLA-DQA1 and DQB1 chain genes promote the RO (SS-A)/LA (SS-B) autoantibody response. J. Immunol. **146**, 3871-3876.

Riabowol, K., Draetta, G., Brizuela, L., Vandre, D. & Beach, D. (1989). The cdc2 kinase complex is a nuclear protein for mitosis in mammalian cells. Cell **57**, 393-401.

Richardson, H. E., Wittenberg, C., Cross, F. & Reed, S. I. (1989). An essential G_1 function for cyclin-like proteins in yeast. Cell **59**, 1127-1133.

Rodionov, V. I., Gelfand, V. I & Borisy, G. G. (1993). Kinesin-like molecules involved in spindle formation. J. Cell Sci. **106**, 1179-1188.

Rodriguez-Sanchez, J. L., Gelpi, C., Juarez, C. & Hardin, J. A. (1987). Anti-NOR 90. A new autoantibody in scleroderma that recognizes a 90-kDa component of the nucleolus-organizing region of chromatin. J. Immunol. **139**, 2579-2584.

Roitt, I. M., Hutchings, P. R., Dawe, K. I., Sumar, N., Bodman, K. B. & Cooke, A. (1992). The forces driving autoimmune disease. J. Autoimmunity **5**, 11-26.

Roos, G. Landberg, G., Huff, J. P., Houghten, R., Takasaki, Y. & Tan, E. M. (1993). Analysis of the epitopes of proliferating cell nuclear antigen recognized by monoclonal antibodies. Lab. Invest. **68**, 204-210.

Russel, P. & Nurse, P. (1986). *cdc25+* functions as an inducer in the mitotic control of fission yeast. Cell **45**, 145-153.

Russel, P. & Nurse, P. (1987a). Negative regulation of mitosis by *wee1*+, a gene encoding a protein kinase homolog. Cell **49**, 559-567.

Russel, P. & Nurse, P. (1987b). The mitotic inducer *nim1*+ functions in a regulatory network of protein kinase homologs controlling the initiation of mitosis. Cell **49**, 569-576.

Sager, P. R., Rothfield, N. L., Oliver, J. M. & Berlin, R. D. (1986). A novel mitotic spindle pole component that originates from cytoplasm during prophase. J Cell Biol. **103**, 1863-1872.

Saitoh, H., Tonkiel, J., Cooke, C. A., Ratrie III, H., Maurer, M., Rothfield, N. F. & Earnshaw, W. C. (1992). CENP-C, an autoantigen in scleroderma, is a component of the human inner kinetochore plate. Cell **70**, 115-125.

Saitoh, Y. & Laemmli, U. K. (1994). Metaphase chromosome structure: bands arise from a differential folding path of the highly AT-rich scaffold. Cell **76**, 609-622.

Sakane, T., Steinberg, A.D., Reeves, J. P. & Green, I. (1979). Studies in immune functions of patients with systemic lupus erythematosus. J. Clin. Invest. **64**, 1260-1269.

Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning - A laboratory manual.* 2^{sd} edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, U.S.A..

Satterwhite, L.L., Lohka, M. J., Wilson, K. L., Scherson, T. Y., Cisek, L. J., Corden, J. L. & Pollard, T. D. (1992). Phosphorylation of myosin-II regulatory light chain by cyclin-p34^{cdc2}: a mechanism for timing cytokinesis. J. Cell Biol. **118**, 595-605.

Saunders, W. S., Cooke, C- A. & Earnshaw, W. C. (1991). Compartmentalization within the nucleus: discovery of a novel subnuclear region. J. Cell Biol. **115**, 919-931.

Schattner, A. (1994). Lymphokines in autoimmunity - a critical review. Clin. Immunol. Immunopathol. **70**, 177-189.

Schwarz, J. K., Devoto, S. H., Smith, E. J., Chellappan, S. P., Jakoi, L. & Nevins, J. R. (1993). Interactions osthe p107 and Rb proteins with E2F during the cell proliferation response, EMBO. J. **12**, 1013-1020.

Scofield, R. H., Dickey, W. D., Jackson, K. W., James, J. A. & Harley, J. B. (1991). A common autoepitope near the carboxyl terminus of the 60-kD Ro ribonucleoprotein: sequence similar with viral protein. J. Clin. Immunol. **11**, 378-388.

Segal, R., Globerson, A., Zinger, H. & Mozes, E. (1992). Induction of experimental systemic lupus erythematosus (SLE) in mice with severe combined immunodeficiency (SCID). Clin. Exp. Immunol. **89**, 239-243.

Senécal, J. & Raymond, Y. (1991). Autoantibodies to DNA, lamins, and pore complex proteins produce distinct peripheral fluorescent antinuclear antibodies in Hep-2 substrate. Arthritis Rheum. **34**, 249-251.

Serrano, M., Hannon, G. J. & Beach, D. (1993). A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. Nature **336**, 704-707.

Shero, J. H., Bordwell, B., Rothfield, N. F. & Earnshaw, W. C. (1986). High titers of autoantibodies to topoisomerase I (Scl-70) in sera from scleroderma patients. Science **231**, 737-740.

Sherr, C. J. (1994). G1 phase progression: cycling on cue. Cell **79**, 551-555.

Shlomchik, M., Mascelli, M., Shan, H., Radic, M. Z., Pisetsky, D., Marshak-Rothstein, A. & Weigert, M. (1990). Anti-DNA antibodies from autoimmune mice arise by clonal expansion and somatic mutation. J. Exp. Med. **171**, 265-297.

Shoenfeld, Y., Rauch, J., Massicotte, H., Datta, S. K., André-Schwartz, J., Stollar, D. & Schwartz, R. S. (1983a). Polyspecificity of monoclonal autoantibodies produced by human-human hybridomas. N. Eng. J. Med. **308**, 414-420.

Shoenfeld, Y., Isenberg, D. A., Rauch, J., Madaio, M. P., Stollar, B. D. & Schwartz, R. S. (1983b). Idiotypic cross-reactions of monoclonal human lupus autoantibodies. J. Exp. Med. **158**, 718-730.

Shulman, M., Wilde, C. D. & Köhler, G. (1978). A better cell line for making hybridomas secreting specific antibodies. Nature **276**, 269-270.

Simerly, C., Balczon, R., Brinkley, B. R. & Schatten, G. (1990). Microinjected kinetochore antibodies interfere with chromosome movement in meiotic and mitotic mouse oocytes. J. Cell Biol. **111**, 1491-1504.

Slor, H., Shafrir, S., Isenberg, D. A., Granados, J., Alarcón-Segovia, D. & Shoenfield, Y. (1989). The genetics of autoimmunity: the familial tendency of systemic lupus erythematosus. Isr. J. Med. Sci. **25**, 678-682.

Sobel, E. S., Katagiri, T. & Katagiri, K. (1991). An intrinsic B cell defect is required for the production of autoantibodies in the *lpr* model of systemic autoimmunity. J. Exp. Med. **173**, 1441-1449.

Sobel, E. S., Cohen, P. L. & Eisenberg, R. A (1993). *lpr* T cells are necessary for autoantibody production in *lpr* mice. J. Immunol. **151**, 4160-4167.

Soulard, M., Barque, J., Valle, V. D., Hernadez-Verdun, D., Masson, C., Danon, F. & Larsen, C. (1991). A novel 43 kDa glycoprotein is detected in the nucleus of mammalian cells by autoantibodies from dogs with autoimmune disorders. Exp. Cell Res. **193**, 59-71.

Steinberg, A. D., Krieg, A. M., Gourley, M. F. & Klinman, D. M. (1990). Theorical and experimental approaches to generalized autoimmunity. Immunol. Rev. **118**, 129-163.

Steinberg, A. D., Gourley, M. F., Klinman, D. M., Tsokos, G. C., Scott, D. E. & Krieg, A. M. (1991). Systemic lupus erythematosus. Ann. Intern. Med. **115**, 548-559.

Stearns, T. & Kirschner, M. (1994). In vitro reconstitution of centrosome assembly and function: the central role of γ-tubulin. Cell **76**, 623-637.

Stollar. B. D. (1994). Molecular analysis of anti-DNA antibodies. FASEB J. **8**,337-342.

Stott, D. I. (1990). Lessons about autoantibody specificity in systemic lupus erythematosus from animal models. Clin. Exp. Immunol. **81**, 1-4.

Suda, T., Takahashi, T., Golstein, P. & Nagata, S. (1993). Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. Cell **75**, 1169-1178.

Suda, T.& Nagata, S. (1994). Purification and charaterization of the Fas-ligand that induces apoptosis. J. Exp. Med. **179**, 873-879.

Sunkel, C. E. (1993). The mitotic apparatus and chromosomes. Methods of Immunological Analysis - Cells and Tissues, vol III, 451-462.

Sunkel, C. E., Gomes, R., Sampaio, P., Perdigão, J. & González, C. (1995). γ-Tubulin is required for the structure and function of microtubule organizing center in *Drosophila* neuroblasts. EMBO J. **14**, 28-36.

Suwa, A., Hirakata, M., Takeda, Y., Jesch, S., Mimori, T. & Hardin, J. (1994). DNA-dependent protein kinase (Ku protein-p350 complex) assembles on double-stranded DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **91**, 6904-6908.

Swedlow, J. R., Sedat, J. W. & Agard, D. A. (1993). Multiple chromosomal populations of topoisomerase II detected in vivo by time lapse, three dimensional wide-field microscopy. Cell **73**, 97-108.

Taagepera, S., Rao, P. N., Drake, F. H. & Gorbsky, G. J. (1993). DNA topoisomerase IIa is the major chromosome protein regognized by the mitotic phosphoprotein antibody MPM-2. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **90**, 8407-8411.

Takasaki, Y., Fishwild, D. & Tan, E. M. (1984). Characterization of proliferating cell nuclear antigen recognized by autoantibodies in lupus sera. J. Exp. Med. **159**, 981-992.

Talal, N., Garry, R. F., Schur, P. H., Alexander, S., Dauphinée, M. J., Livas, I. H., Ballester, A., Takei, M. & Dang, H. (1990). A conserved idiotype and antibodies to retroviral proteins in systemic lupus erythematosus. J. Clin. Invest. **85**, 1866-1871.

Talal, N. (1993). Lessons from autoimmunity. Ann. New York Acad. Sci. **690**, 19-23.

Tan, E. M., Cohen, A. S., Fries, J. F., Masi, A. T., McShane, D. J., Rothfield, N. F., Schaller, J. G., Talal, N. & Winchester, R. J. (1982). The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum. **25**, 1271-1277.

Tan, E. M., Chan, E. K. L., Sullivan, K. F. & Rubin, R. L. (1988). Antinuclear antibodies (ANAs): diagnostically specific immune markers and clues toward the understanding of systemic autoimmunity. Clin. Immunol. Immunophatol. **47**, 121-141.

Tan, E. M. (1989). Antinuclear antibodies: diagnostic markers for autoimmune diseases and probes for cell biology. Advances Immmunol. **44**, 93-151.

Tan, E. M. (1994). Autoimmunity and apoptosis. J. Exp. Med. **179**, 1083-1086.

Tang, T. K., Tnag, C. C., Chao, Y.-J. & Wu, C.-W. (1994). Nuclear mitotic apparatus protein (NuMA): spindle association, nuclear targeting and differential subcellular localization of various NuMA isoforms. J. Cell Sci. **107**, 1389-1402.

Tillman, D. M., Jou, N.-T., Hill, R. J. & Marion, T. N. (1992). Both IgM and IgG anti-DNA antibodies are the products of clonally selective B cell stimulation in (NZB x NZW) F1 mice. J. Exp. Med. **176**, 761-779.

Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **76**, 4350-4354.

Tyc, K. & Steitz, J. A. (1989). U3, U8 and U13 comprise a new class of mammalian snRNPs localized in the cell nucleolus. EMBO J. **8**, 3113-3119.

Twomey, B. M., Dhilllon, V. B., McCallum, S., Isenberg, D. A. & Latchman, D. S. (1993). Elevated levels of the 90kD heat shock protein in patients with systemic lupus erythematosus are dependent upon enhanced transcription of the hsp90β gene. J. Autoimmun. **6**, 485-506.

Vandre, D. D., Davis, F. M., Rao, P. N. & Borisy, G. G. (1984). Phosphoproteins are components of mitotic microtubule organizing centers. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **81**, 4439-4443.

Vandré, D. D. & Borisy, G. G. (1989). Anaphase onset and dephosphorylation of mitotic phosphoproteins occur concomitantly. J. Cell Sci. **94**, 245-258.

Vandré, D. D., Centonze, V. E., Peloquin, J., Tombes, R. M. & Borisy, G. G. (1991). Proteins of the mammalian mitotic spindle: phosphorylation/dephosphorylation of MAP-4 during mitosis. J. Cell Sci. **98**, 577-588.

Veis, D. J., Sorenson, C. M., Shutter, J. R. & Korsmeyer, S. J. (1993). Bcl-2-deficient mice demonstrate fulminant lymphoid apoptosis, polycystic kidneys, and hypopigmented hair. Cell **75**, 228-240.

Vigers, G. P. A. & Lohka, M. J. (1991). A distinct vesicle population targets membranes and pore complex to the nuclear envelope in *Xenopus* eggs. J. Cell Biol. **112**, 545-556.

Xie, K., Lambie, E. J. & Snyder, M. (1993). Nuclear dots antigens may specify transcriptional domains in the nucleus. Mol. Cel. Biol. **13**, 6170-6179.

Xiong, Y., Hannon, G., Zhang, H., Casso, D., Kobayashi, R. & Beach, D. (1993). p21 is an universal inhibitor of cyclin kinases. Nature **366**, 701-704.

Yang, C. H., Lambie, E. J. & Snyder, M. (1992a). NuMA: an unusually long coiled-coil related protein in the mammalian nucleus. J. Cell Biol. **116**, 1303-1317.

Yang, C. H. & Snyder, M. (1992b). The nuclear-mitotic apparatus protein is important in the establishment and maintenance of the bipolar mitotic spindle apparatus. Mol. Biol. Cell **3**, 1259-1267.

Yao, Z., Kimura, A., Hartung, K., Haas, P. J., Volgger, A., Brünnler, G., Bönisch, J., Albert, E. D. & SLE study group members (1993). Polymorphism of the *DQA1* promotor region (*QAP*) and *DRB1*, *QAP*, *DQA1*, *DQB1* haplotypes in systemic lupus erythematosus. Immunogenetics **38**, 421-429.

Yen, T. J., Compton, D. A., Wise, D., Zinkowski, R. P., Brinkley, B. R., Earnshaw, W. C. & Cleveland, D. W. (1991). CENP-E, a novel human centromere-associated protein required for progression from metaphase to anaphase. EMBO J. **10**, 1245-1254.

Yen, T. J., Li, G., Schaar, B. T., Szilak, I. & Cleveland, D. W. (1992). CENP-E is a putative kinetochore motor that accumulates just before mitosis. Nature **359**, 536-539.

Yeo, J.-P., Alderuccio, F. & Toh, B.-H. (1994a). A new chromosomal protein essential for mitotic spindle assembly. Nature **367**, 288-291.

Yeo, J.-P., Forer, A. & Toh, B.-H. (1994b). A homologue of the human regulator of mitotic spindle assembly protein (RMSA-1) is present in crane fly and is associated with meiotic chromosomes. J. Cell Sci. **107**, 1845-1851.

Wang, J., Satoh, M., Pierani, A., Schmitt, J., Chou, C.-H., Stunnenberg, H. G., Roeder, R. G. & Reeves, W. H. (1994). Assembly and DNA binding of recombinant Ku (p70/p80) autoantigen defined by a novel monoclonal antibody specific for p70/p80 heterodimers. J. Cell Sci. **107**, 3223-3233.

Ward, M. M., Deborah, V. D. & Pisetsky, D. S. (1991). Serum immunoglobulin levels in systemic lupus erythematosus: the effects of age, sex, race and disease duration. J. Rheumathol. **18**, 540-544.

Watts, R. A., Ravirajan, C. T., Staines, N. A. & Isenberg, D. A. (1990). A human fetal monoclonal DNA-binding antibody shares idiotypes with fetal and adult murine monoclonal DNA-binding antibodies. Immunology **69**, 348-354.

Watts, R. A., Ravirajan, C. T., Wilkinson, L. S., Williams, W., Griffiths, M., Butcher, D., Horsfall, A. T., Staines, N. A. & Isenberg, D. A. (1991). Detection of human and murine common idiotypes of DNA antibodies in tissues and sera of patients with autoimmune diseases. Clin. Exp. Immunol. **83**, 267-273.

Watanabe-Fukunaga, R., Brannan, C. I., Copeland, N. G., Jenkins, N. A. & Nagata, S. (1992). Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis. Nature **356**, 314-317.

Watanabe, D., Suda, T., Hashimoto, H. & Nagata, S. (1995). Constitutive activation of the Fas ligand gene in mouse lymphoproliferative disorders. EMBO J. **14**, 12-18

Wesierska-Gadek, J., Penner, E., Lindner, H., Hitchman, E. & Sauermann, G. (1990). Autoantibodies against different histone H1 subtypes in systemic lupus erythematosus sera. Arthritis Rheum. **33**, 1273-1278.

Wittenberg, C. & Reed, S. I. (1988). Control of the yeast cell cycle is associated with assembly/disassembly of the Cdc28 protein kinase complex. Cell **54**, 1061-1072.

Wolfe, S. L. (1993). *Molecular and celular biology*, 1st edition. Wadsworth Publishing Company, Belmont, California.

Wolin, S. L. & Steitz, J. A. (1984). The Ro small cytoplasmic ribonucleoproteins: identification of the antigenic protein and its binding sites on the Ro RNAs. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **81**, 1996-2000.

Wood, E. R. & Earnshaw, W. (1990). Mitotic chromatin condensation in vitro using somatic cell extracts and nuclei with variable levels of endogenous topoisomerase II. J. Cell Biol. **111**, 2839-2850.

Zheng, Y., Jung, M. K. & Oakey, B. R. (1991). γ-tubulin is present in Drosophila melanogaster and Homo sapiens and is associated with the centrosome. Cell **65**, 817-823.

Zhou, T., Bluethmann, H., Eldridge, J., Berry, K. & Mountz, J. D. (1993). Origin of $CD4^-CD8^-B220^+$ T cells in MRL-*lpr/lpr* mice. J. Immunol. **150**, 3651-3667.

Zettenberg, A & Larsson, O. (1985). Kinetic analysis of regulatory events in G_1 leading to proliferation or quiescence of Swiss 3T3 cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **82**, 5365-5369.

APÊNDICE

APÊNDICE

1 - ESTIRPES BACTERIANAS

Foram utilizadas várias estirpes bacterianas que apresentam genótipos característicos e condições de cultura próprias que permitiram a sua utilização em ensaios específicos. Na tabela I são apresentados os genótipos, condições de cultura e funções das diferentes estirpes usadas. A tabela II refere os marcadores genéticos característicos das estirpes de *E. coli* usadas.

2 -MEIOS DE CULTURA UTILIZADOS PARA O CRESCIMENTO DE BACTÉRIAS E INFECÇÃO POR BACTERIÓFAGOS

Meio de LB (Luria-Bertani) - é um meio líquido que permite o crescimento de diferentes estirpes bacterianas.

Composição:		
	Bacto-triptona	10 g
	Bacto-extracto de levedura	5 g
	NaCl	10 g

Completar o volume com água destilada até 1 litro. Ajustar o pH a 7,0 com NaOH 5 M. Autoclavar 20 min a 121°C.

Meio de LB contendo ampicilina - meio líquido de selecção que permite o crescimento de estirpes bacterianas que sejam resistentes à ampicilina.

Meio de L-agar - meio sólido que permite o crescimento de bactérias e dos bacteriógfagos que são visualizados, respectivamente, pela formação de colónias e de placas fágicas .

Composição:		
	Bacto-triptona	10 g
	Bacto-extracto de levedura	5 g
	NaCl	10 g
	Agar	5 g

Completar o volume até 1 litro com água destilada. Ajustar o pH a 7,0 com NaOH 5 M. Autoclavar 20 min a 121°C.

Meio de L-agar contendo ampicilina - meio de selecção que permite o crescimento de estirpes bacterianas que sejam resistentes à ampicilina.

Tabela I - Estirpes de *E. coli* utilizadas: respectivos genótipos, condições de cultura e funções

E. Coli	Genótipo	Condições de Cultura	Funções
DH5α	*sup*E44 Δ*lac*U169 (Ø80 *lacZ*ΔM15) *rec*A1 *end*A1 *gyr*A96 *thi*-1 *hsd*R17 *rel*A1 F⁻	Meio de LB / 37°C com agitação	transformação dos produtos do "erase-a-base" obtidos a partir da sequências de interesse
JM101	*supE thi* Δ(*lac-proAB*) F' (*traD*36 *proAB*+ *lacI*^{q} *lac*ΔM15)	Meio de LB / 37°C com agitação / 50 μg/ml ampicilina	crescimento do fagemídeo pBS (+/-) para posterior o isolamento do ADN plasmídico
TB1	*ara hsdR* Δ(*lac-proAB*) *rpsL* Ø80 *lacZ*ΔM15	Meio de LB / 37°C com agitação	crescimento do vector pMAL™-cRI para posterior transformação, a expressão e purificação da proteína de fusão resultante da clonagem de genes neste vector
TG2	*supE hsd*Δ5 *thi* Δ(*lac-proAB*) Δ(*srl-recA*)306::Tn*10*(*tet*^{r})	Meio de LB / 37°C com agitação	crescimento dos fagemídeos pBluescript II SK (+/-) e pBS (+/-) recombinantes, para posterior sequênciação do ADN recombinante isolado; transformação dos produtos do "erase-a-base"
XL1-Blue	*supE*44 *hsdR*17 *recA endA*1 *gyrA*46 *thi* *lac*⁻ F' [*proAB*+ *lacI*^{q} *lacZ*ΔM15 Tn*10*(tet^r)] *relA*1	Meio de LB / 37°C com agitação	crescimento dos fagemídeos pBluescript II SK (+/-) e pBS (+/-) recombinantes ou não, para posterior sequenciação do ADN recombinante isolado, propagação e o rastreio com sonda da biblioteca de cADN em λZAPII
Y1089	*araD*139 Δ*lac*U169 *proA*+ Δ*lon rpsL* *hfl*A150[*chr*::Tn*10*(tet^r)] pMC9	Meio de LB / 37°C com agitação / 50 μg/ml ampicilina / 10 mM $MgSO_4$ / 0,2% maltose	produção de proteínas obtidas dos lisogénios recombinantes de λgt11
Y1090 ***hsdR***	*supF hsdR araD*139 Δ*lon* Δ*lac*U169 *rpsL trpC*22::Tn*10*(tet^r) pMC9	Meio de LB / 37°C com agitação / 50 μg/ml ampicilina / 10 mM $MgSO_4$ / 0,2% maltose	propagação e o rastreio imunológico da biblioteca de cADN em λgt11

Tabela II - Marcadores genéticos de estirpes de *E. coli*

Símbolo	Efeito
ara	incapacidade de utilização da arabinose
Δ	indica a delecção de genes que se seguem a este sinal
Δ*lon*	delecção na protease *lon* / reduz a capacidade de proteólise das proteínas de fusão expressas
*end*A	endonuclease I específica do ADN / mutação que melhora a produção e qualidade do ADN plasmídico de "minipreps"
*gyr*A	sub-unidade A da ADN girase / a presença da mutação *gyr*A96 confere resistência ao ácido nalidíxico
*hfl*A150	alta frequência de lisogenia/ mutação que aumenta a lisogenia dos fago λ portador de um gene repressor (cI) normal
*hsd*R	gene bacteriano que codifica para a sub-unidade da enzima *Eco*K (enzima de restrição do tipo I) que é reponsável pelo corte do ADN / as estirpes *hsd*R metilam o ADN mas não o cortam
*lac*I	repressor do operão *lac* / mutantes *lac*I^q produzem em excesso a proteína repressora
*lac*Z	β-galactosidase; utilização da lactose / as células com mutações *lac*Z produzem colónias brancas na presença de X-gal
*lac*ZΔM15	delecção específica no N-terminal que permite a α-complementação do segmento presente no fagemídeo pBluescript e no vector λZAPII e a formação de uma proteína *lac*Z funcional
*pro*AB	mutantes que requerem prolina para crescerem num meio mínimo
*rec*A	gene essencial na recombinação pois promove a transferência de cadeias entre moléculas de ADN / a mutação elimina a recombinação e a estirpe fica sensível a luz U.V.
*rel*A	fenótipo relaxado / permite a síntese de ARN na ausência de síntese proteica
*rps*L (*str*A)	mutação na proteína 12S da sub-unidade 30S ribossomal / mutações que determinam a resistência das células à estreptomicina
*sup*E	supressor das mutações *amber* (UAG) / alguns fagos requerem a mutação neste gene crescerem
*sup*F	supressor das mutações *amber* (UAG) / alguns fagos requerem a mutação neste gene crescerem
thi-1	mutantes que requerem a vitamina B1 (tiamina) para crescerem num meio mínimo
*tra*D36	mutação que inactiva a transferência do episssoma F'
*trp*C22	mutantes que requerem triptofano para crescerem num meio mínimo
tet^r	resistência à tetraciclina
Tn*10*	transposão que codifica para a resistência à tetraciclina
F'	estirpes que possui o episssoma F' característico
F$^-$	estirpes que não possuem o episssoma F'
pMC9	plasmídeo que codifica para o lacI^q

Meio de L-agar contendo ampicilina, IPTG e X-gal - meio de selecção que permite o crescimento de estirpes bacterianas e bacteriófagos que possuem vectores resistentes à ampicilina; permite também a diferenciação entre vectores recombinantes e não recombinantes através, respectivamente, da formação de colónias ou placas brancas e de colónias ou placas azuis. Os vectores que contêm o gene *lacZ*, com a sequência reguladora que codifica para a formação dos 146 aminoácidos do gene da β-galactosidase, constituem colónias azuis na presença de IPTG e do substrato cromogénico X-gal, após a α-complementação entre as estirpes hospedeiras *lac*$^-$ e os vectores presentes nas mesmas. A inserção do ADN no local de clonagem impede a α-complementação e a identificação de bactérias ou bacteriófagos recombinantes é facilmente detectada presença de uma coloração branca.

Top-agarose - meio sólido que permite o crescimento e a visualização das placas fágicas resultantes da infecção dos bacteriófagos numa cultura bacteriana.

Composição:

Agarose	0,7 g
$MgSO_4$, $7H_2O$	10 mM

Completar o volume até 100 ml com LB. Autoclavar 20 min a 121°C.

Ampicilina 50 μg/ml - permite a selecção de vectores que contenham gene que codifica para a resistência a este antibiótico.

Composição (solução stock - 50 mg/ml)

Ampicilina	500 mg
H_2O	10 ml

Esterilizar por filtração. Dividir em alíquotas de 1 ml e conservar a -20°C.

IPTG (isopropil-β-D-tiogalactosídeo) - indutor do gene da β-galactosidase.

Composição (solução stock - 10 mM)

IPTG	2,383 g

Dissolver em 100 ml de água destilada. Esterilizar por filtração. Dividir em alíquotas de 1 ml e conservar a -20°C.

$MgSO_4$ -a adição de sufato de magnésio, numa concentração final de 10 mM, ao meio onde se faz o crescimento da estirpe bacteriana, facilita a adorção do bacteriófago aos receptores da bactéria.

Composição (solução stock - 1 M)

$MgSO_4$, $7H_2O$	12,324 g

Dissolver em 50 ml de água destilada. Esterilizar por filtração.

Maltose - a maltose induz a expressão do gene *lamB* que codifica para os receptores da membrana externa da *E. coli* e que são normalmente utilizados para o transporte da maltose para dentro da célula. O bacteriófago λ infecta a batéria por adsorção a estes receptores. A adição de maltose, numa concentração final de 0,2% , é feita ao meio onde se faz o crescimento da estirpe bacteriana que posteriormente vai ser infectada e plaqueada com o fago λ.

Composição (solução stock - 20%)

Maltose 2 g

Dissolver em 100 ml de água destilada. Esterilizar por filtração.

X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactosídeo) - substracto cromogénico que permite a diferenciação entre placas fágicas e colónias de bactérias de vectores recombinantes e não recombinantes através do aparecimento, respectivamente, de uma coloração branca e azul.

Composição (solução stock - 200 mg/ml)

X-gal 2 g

Dissolver em 10 ml de dimetilformamida e conservar a -20°C.

3 - VECTORES

3.1- Fagemídeo pBluescript II SK (+/-)

O fagemídeo pBluescript II SK (+/-) é um vector de clonagem com 2961 bp derivado do pUC19 (figura VIII). A designação SK indica que o "polylinker" está orientado de modo a que a transcrição de *lacZ* se processa de *Sac*I para *Kpn*I. A cadeia de cima é designada por cadeia (+) e a cadeia de baixo é designada por cadeia (-). A figura I tem a representação do esquema deste vector e da respectiva sequência no local de clonagem múltiplo.

3.2- Fagemídeo pBS (+/-)

O fagemídeo pBS (+/-) é um vector de clonagem com 3201 bp derivado do pUC19. A cadeia de cima é designada por cadeia (+) e a cadeia de baixo é designada por cadeia (-). A figura II tem a representação do esquema deste vector e da respectiva sequência no local de clonagem múltiplo.

Notas:

Origem f1(+): origem de replicação do fago filamentoso f1 que permite a recuperação da cadeia "sense" do gene *lacZ* quando a estirpe hospedeira contendo o fagemídeo pBluescript II é co-infectada com um fago "helper".

Origem f1(-): origem de replicação do fago filamentoso f1 que permite a recuperação da cadeia "anti-sense" do gene *lacZ* quando a estirpe hospedeira contendo o fagemídeo pBluescript II é co-infectada com um fago "helper".

Origem ColE1: origem de replicação do plasmídeo usada na ausência de um fago "helper".

***LacZ*:** corresponde à porção do gene *lacZ* que permite a α-complementação para a selecção azul/branca dos fagemídeos recombinantes. O promotor indutível situado a montante do gene *lacZ* permite a expressão de proteínas de fusão com o produto do gene da β-galactosidase.

MCS: local de clonagem múltiplo flanqueado pelos promotores T3 e T7 .

Ampicilina: gene que codifica para a resistência à ampicilina no vector.

3.3 – Vector λgt11

O vector λgt11 (λ*lac*5 Δ*shn*dIIIλ2-3 *sr*Iλ3° cI*ts*857 *sr*Iλ4° *nin*5 srIλ5° *Sam*100) é uma bacteriófago de expressão com 43700 bp utilizado para o rastreio imunológico de bibliotecas. Os fragmentos de ADN a serem clonados podem ter um tamanho até 7,2 kb. A clonagem é feita no único local de restrição para a *Eco*RI situado no gene *lacZ*, o que permite a expressão de uma proteína de fusão contendo a β-galactosidase. A propagação e rastreio são feitos em hospedeiros *supF*. Num hospedeiro não supressor a mutação *Sam*100 inibe a lise a permite a acumulação intracelular da proteína de fusão desejada. O bacteriófago possui os genes *red* e *gam* e por isso pode crescer num hospedeiro *recA*$^-$. O repressor sensível à temperatura permite controlar a replicação do fago e produção de proteínas de fusão. A figura III tem a representação do esquema deste vector e da respectiva sequência no único local de clonagem. Na tabela III estão referidos os marcadores genéticos característicos dos vectores derivados do bacteriófago λ.

3.4 – Vector λZAPII

O bacteriófago λZAPII (λ*sbh*Iλ1° *chi*A131 < T *amp* ColE1 *ori lacZ'* promotor T3-"polylinker"-promotor T7 promotor I > *sr*Iλ3° cI*ts*857 *sr*Iλ4° *nin*5 *sr*Iλ5°) é um vector de clonagem com 40.820 bp, com vários locais de clonagem (*Sac*I, *Not*I, *Xba*I, *Spe*I, *Eco*RI, *Xho*I) onde se podem inserir fragmentos até 10 kb. A sua estrutura engloba sequências que podem ser retiradas *in vivo* e convertidas no vector plasmídico Bluescript SK (M13-). O ADN clonado é removido na presença dos bacteriófagos "helper" f1 e M13 e dos sinais necessários para excisão [de iniciação (I) e de terminação (T)] fornecidos pelo

λZAPII. Este vector também permite a sequenciação de ADN e ARN, assim como a síntese de ARNs específicos a partir dos promotores SP6 e T7. O "polylinker" está localizado na porção do terminal amino do *lacZ* o que permite a identificação de fagos recombinantes, na presença de IPTG e X-gal, através da formação de placas brancas em vez de placas azuis, nos hospedeiros *lac*$^-$. O vector Bluescript SK (M13-) tem: 2960 bp; os locais *Sac*I e *Kpn*I situados imediatamente a jusante, respectivamente, dos promotores T3 e T7 do bacteriófago; e os local de clonagem múltiplos estão em orientação oposta. A figura IV e V têm a representação do esquema e das respectivas sequências no local de clonagem múltiplo dos vectores λZAPII (figura IV) e Bluescript SK (M13-) (figura V). Na tabela III estão referidos os marcadores genéticos característicos dos vectores derivados do bacteriófago λ.

3.5 - Vector pMALcRI

O vector pMALcRI (*lacI* P_{tac} *malE*Δ2-26-fx-*lacZα* Amp^r) é um vector de expressão com 6133 bp. É utilizado para a expressão e purificação de proteínas de fusão. A delecção apresentada na sequência sinal permite a expressão da proteína de fusão no citoplasma. A montante do "polylinker" existe uma sequência que codifica para o local de reconhecimento de uma protease específica, o factor Xa. A clivagem da proteína de fusão com o factor Xa deixa os resíduos do terminal amino na proteína de interesse. O local de restrição *Eco*RI com o mesmo quadro de leitura que o fago λgt11 permite a clonagem de fragmentos a montante do local do factor Xa. O gene clonado é inserido a jusante do gene *malE*, que codifica para "maltose-binding protein" (MPB), e daí resulta a expressão proteína de fusão-MPB. O promotor induzível P_{tac} está posicionado de forma transcrever o gene de fusão *malE-lacZα*. O gene *lacI* codifica para o repressor Lac, que inactiva a transcrição a partir do P_{tac} na ausência de IPTG. A sequência de interesse a ser clonada é inserida no "polylinker" que se situa entre o genes *malE* e *lacZα*, o que interrompe a fusão *malE-lacZα* e permite a α-complementação na estirpe hospedeira (*E.coli* TB1), que pode ser detectada através da selecção azul/branca na presença de X-gal. A figura VI tem a representação do esquema deste vector e da respectiva sequência no local de clonagem múltiplo.

3.6 - Vectores pSPT18 pSPT19

Os vectores de clonagem pSPT18 pSPT19 são vectores de transcrição com 3104 bp e diferem entre si na orientação da região do "polylinker". Os promotores para as RNA polimerases de SP6 e T7 estão nas extremidades do "polylinker" e transcrevem as sequências de ADN a jusante, respectivamente, dos promotores SP6 e T7. As RNA

polimerases SP6 e T7 utilizam o ADN clonado como molde e sintetizam o ARN complementar na presença de Mg^{2+}, de ribonucleosídos trifosfatados e da espermidina (estimula a actividade da enzima) para posterior tradução *in vivo* ou *in vitro*. A figura VII tem a representação do esquema destes vectores e da respectiva sequência no local de clonagem múltiplo.

Tabela III - Marcadores genéticos usados nos vectores derivados do bateriofago λ

Símbolo	Descrição
amber	mutação que origina o codão de terminação UAG
b	região do genoma do bateriófago λ que contém o local de *att*. Mutações neste local reduzem, mas não eliminam, o empacotamento endógeno das moléculas de ADN de λ dos extractos das células induzidas
*chi*A 131	local específico, de octanucleótidos, que promove a recombinação direccional do bacteriófago λ
c1*ts*857	mutação termossensível que torna o produto do gene *c*I termolábil
λ*lac*5	substituição da região *lac* da *E. coli*
gam	o gene *gam* codifica para um inibidor da exonuclease *rec*BC da *E. coli* e permite a transição eficiente da replicação tipo olho (θ) para a replicação em círculos rolantes. O produto deste gene é importante para o crescimento do bacteriófago λ em estirpes $recA^-$ e $recA^+$ que são lisogénicas para o bacteriófago P2
*nin*5	delecção que remove o local de terminação de transcrição t_{r2} e por isso torna o atraso da transcrição inicial independente do produto do gene *N*
red (*exo bet*)	os genes *exo* e *bet* localizam-se na região *red* do bacteriófago λ. Os produtos destes genes estão envolvidos na recombinação da forma-θ da replicação do ADN para a forma de círculos rolantes e são importantes para o crescimento do bacteriófago λ em estirpes $recA^-$ e $recA^+$ que são lisogénicas para o bacteriófago P2
*Sam*100	mutações *amber* no gene envolvido na lise da membrana celular da bactéria. Estas mutações são suprimidas pelo gene *sup*F (mas não pelo gene *sup*E). A ausência do produto do gene do *S* na estirpe selvagem conduz a uma acumulação intracelular das partículas infecciosas dos bacteriófago
λ*sbh*Iλ1°	substituição na região 1 do local no bacteriófago λ
Δ*shn*dIIIλ2-3	delecção de 2,3 kb da segunda para a terceira região do local *Hind*III no bacteriófago λ que remove parte da região *b*
*sr*Iλ3°	alterações nos locais de restrição presentes no genoma inicial do bacteriófago λ,
*sr*Iλ4°	resultantes das mutações, delecções ou inserções requeridas para a construção
*sr*Iλ5°	dos derivados do bacteriófago λ

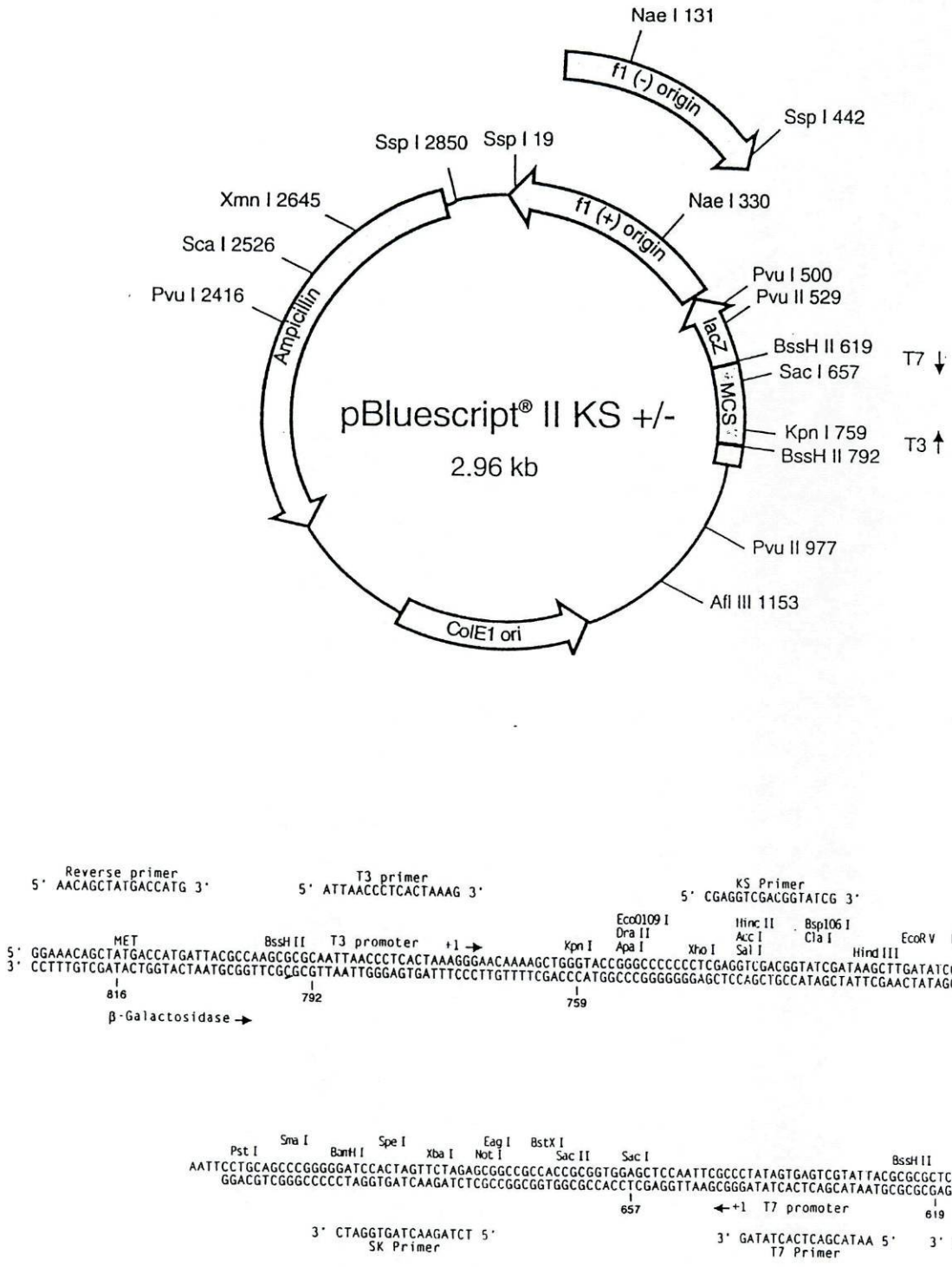
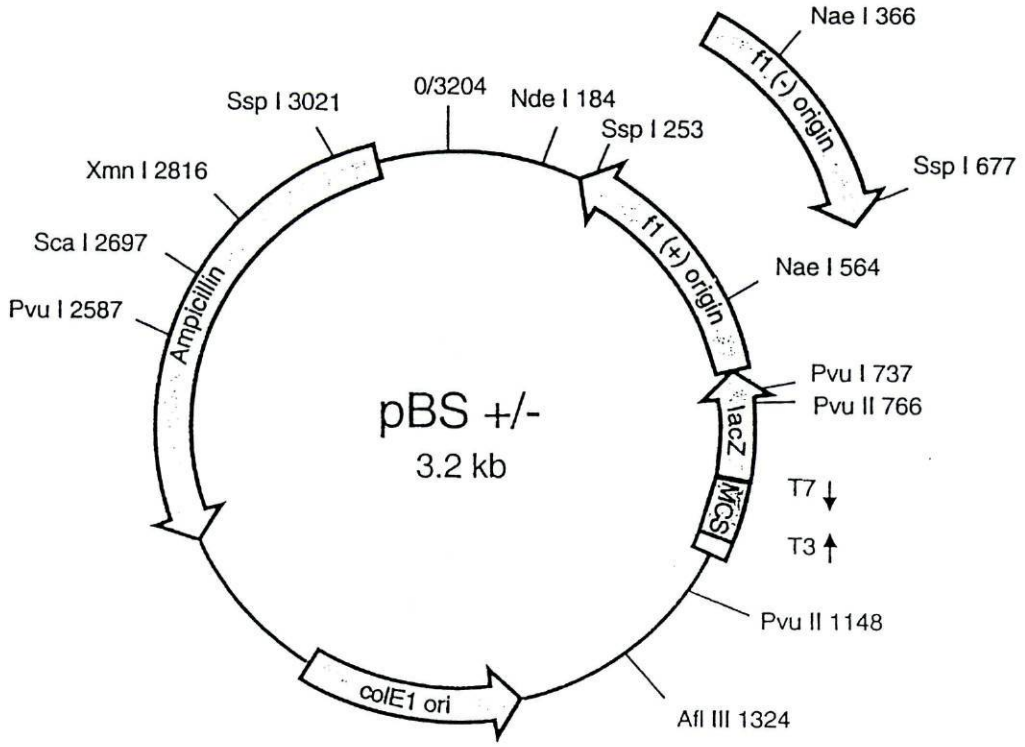


Figura I - Representação esquemática do fagemídeo pBluescript II SK (+/-) e da respectiva sequência do local de clonagem múltiplo.



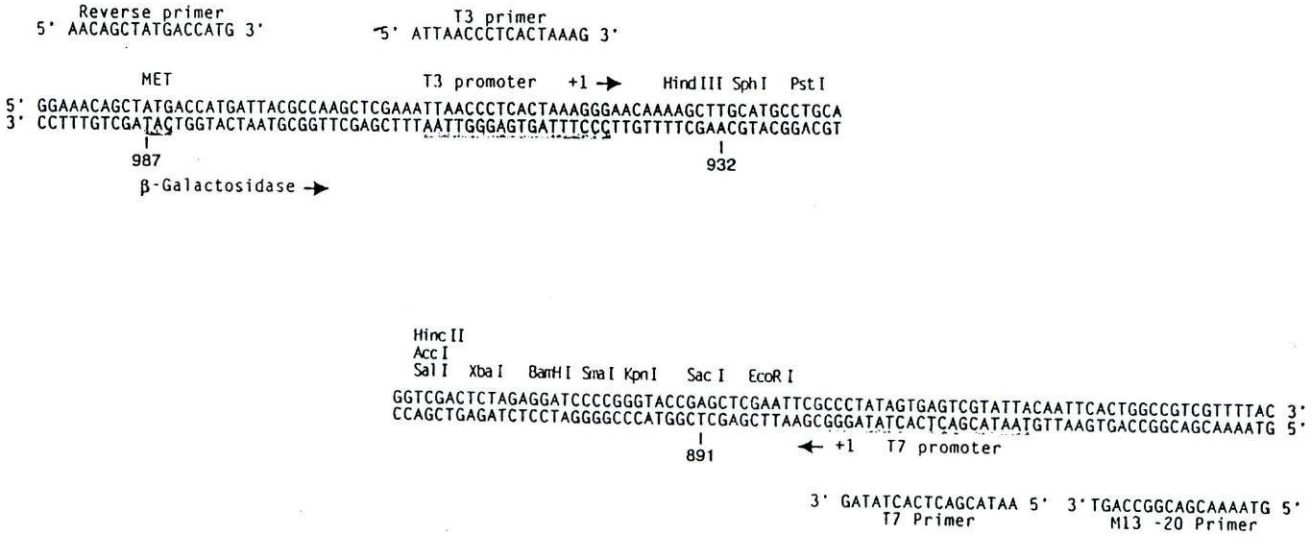
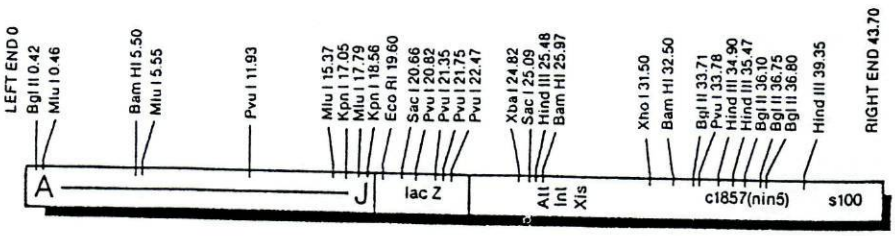


Figura II - Representação esquemática do fagemídeo pBS (+/-) e da respectiva sequência do local de clonagem múltiplo.

Lambda gt11

43,700 bp



Sequência de nucleótidos à volta do local de clonagem *Eco*RI

```
5'                                                          Eco RI
..... GGT•GGC•GAC•GAC•TCC•TGG•AGC•CCG•TCA•GTA•TCG•GCG•GAA•TTC•
..... CCA•CCG•CTG•CTG•AGG•ACC•TCG•GGC•AGT•CAT•AGC•CGC•CTT•AAG•

CAG•CTG•AGC•GCC•GGT•CGC•TAC•CAT•TAC•CAG•TTG•GTC•TGG•TGT•CAA•
GTG•GTC•GAC•TCG•CGG•CCA•GCG•ATG•GTA•ATG•GTC•AAC•CAG•ACC•ACA•

CAA•A..... 3'
GTT•T.....
```

Figura III - Representação esquemática do vector λgt11 e da respectiva sequência do único local de clonagem.

Lambda ZAP® II

40,820 bp

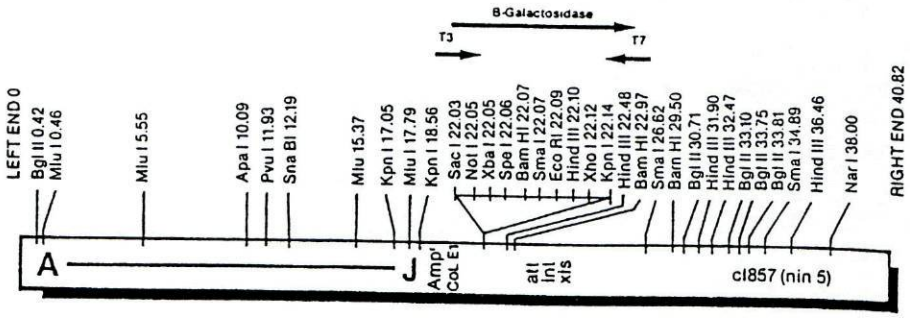


Figura IV - Representação esquemática do vector λZAPII e do local de clonagem múltiplo .

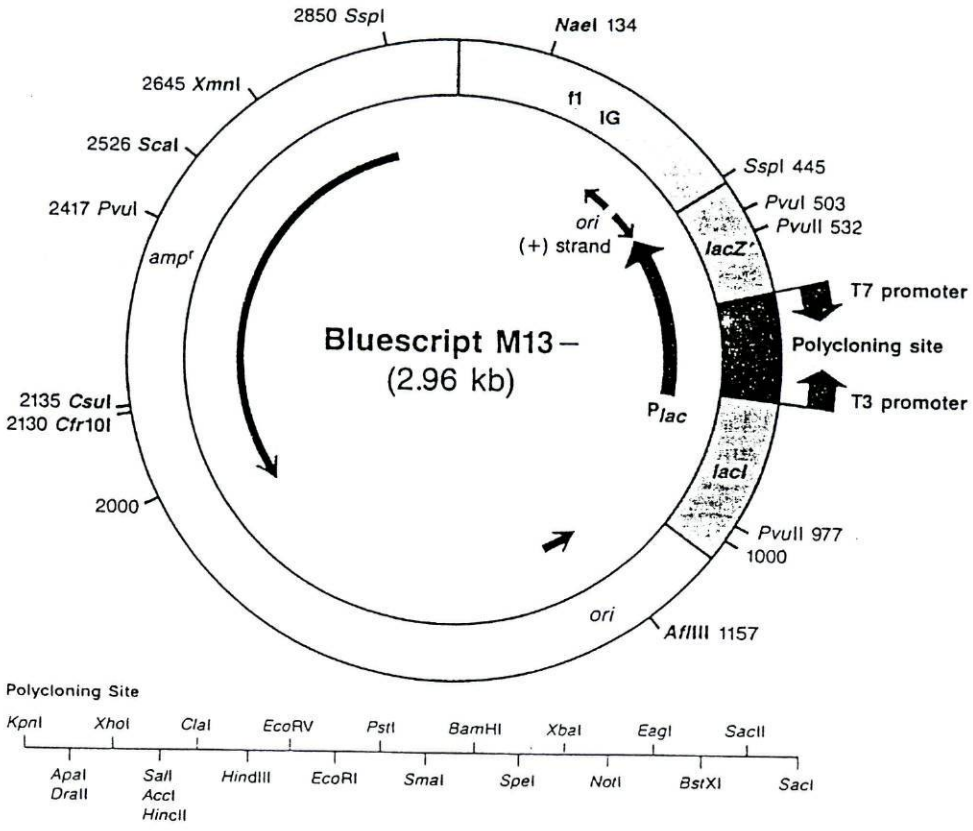
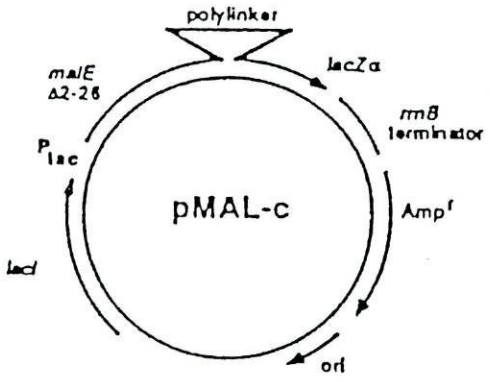


Figura IV - Representação esquemática do vector Bluescript SK (m13-) e da sequência do local de clonagem múltiplo.



pMAL-cRI
Polylinker:

malE_ TCG AGC TCG GTA CCG TCC TCT CTC GTG ATC GAG GGA AGG ATT TCA GAA TTC
Sac I Kpn I EcoRI
Ile Glu Gly Arg Ile
Factor Xa cleavage site

GGA TCC TCT AGA GTC GAC CTG CAG GCA AGC TTG— lacZα
BamHI Xba I Sal I Pst I HInd III

Figura VI - Representação esquemática do vector pMALcRI e da respectiva sequência do local de clonagem múltiplo.

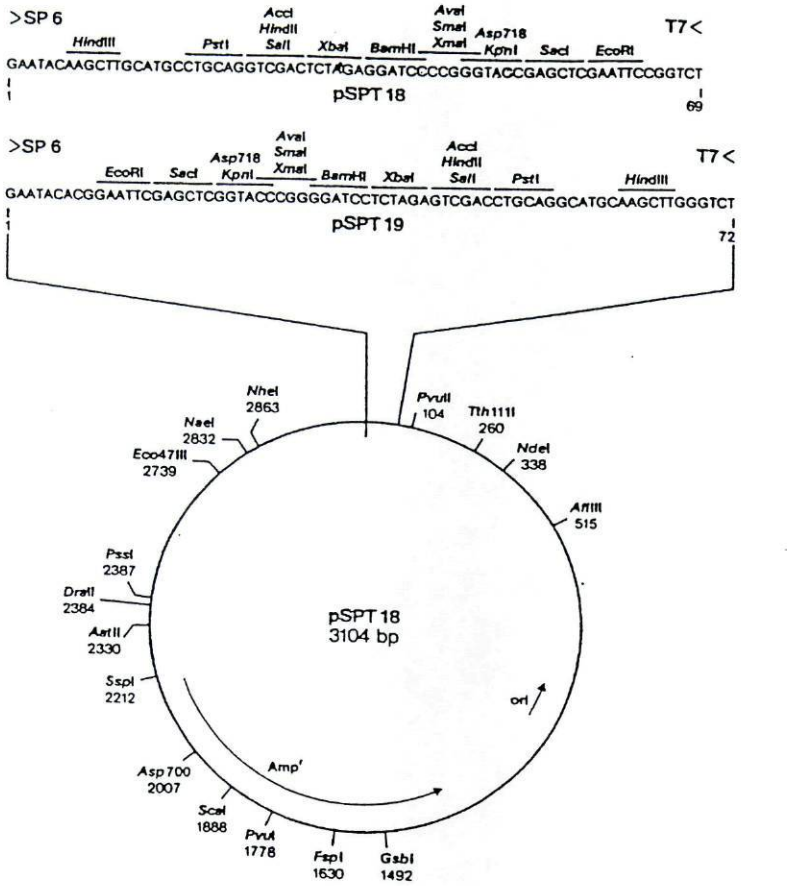


Figura VII - Representação esquemática do vectores pSPT18 e pSPT19 e das respectivas sequências do local de clonagem múltiplo.

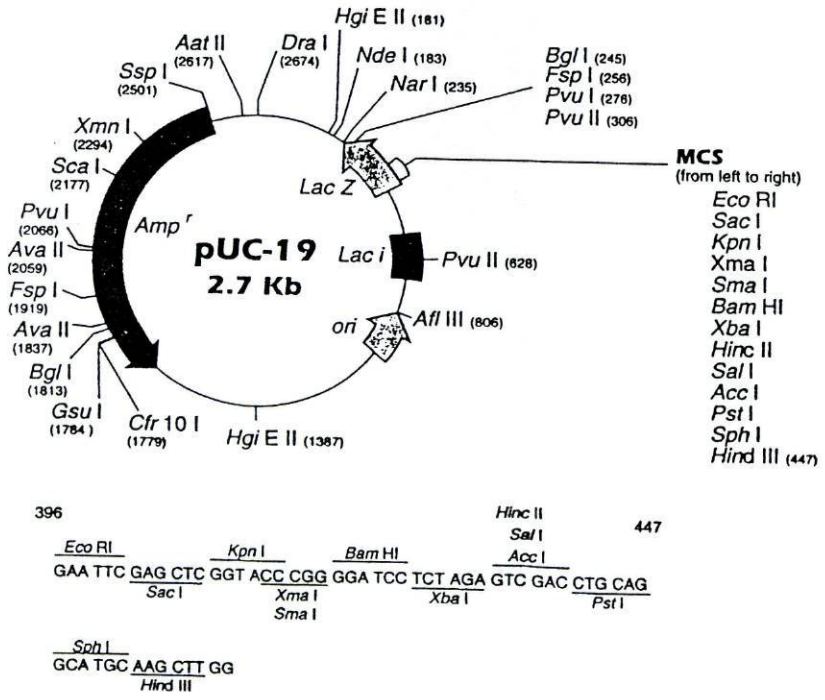


Figura VIII - Representação esquemática do vector pUC19 e da respectiva sequência do local de clonagem múltiplo.

4 - Determinação espectofotométrica da concentração de ácidos nucleicos

A quantificação do ADN e do ARN é feita no comprimentos de onda de 260 nm (U.V.). A razão das densidade óptica a 260 nm e 280 nm (OD_{260}/OD_{280}) fornece uma estimativa do grau de pureza do ácido nucleico. Nas preparações puras de ADN e ARN o valor do quociente OD_{260}/OD_{280} é, respectivamente, de 1,8 e 2,0. Contaminações resultantes da presença de fenol ou de proteínas diminuem significativamente o razão OD_{260}/OD_{280}. A densidade óptica foi determinada no "SHIMAZU-UV-260" (Shimazu Corporation, Japan).

A concentração do ADN de cadeia dupla, do ADN de cadeia simples e do ARN de cadeia simples é feita a 260 nm e as unidades de conversão são as seguintes:

1 unidade de A_{260} de ADNcd = 50 μg/ml

1 unidade de A_{260} de ADNcs = 33 μg/ml

1 unidade de A_{260} de ARNcs = 40 μg/ml

Para quantidades de ADN muito pequenas a quantificação pode ser estimada através da fluorescência nos U.V. emitida pelas moléculas de brometo de etídio que se intercalam na estrutura do ADN (ver tabela V).

5 - Constantes físicas dos nucleótidos trifosfatados

Na tabela IV são apresentadas as constantes físicas dos desoxinucleótidos e nucleótidos e trifosfatados.

Tabela IV - Constantes físicas dos nucleótidos trifosfatados

Composto	M.W.	λ max pH=7,0	Absorvância a λ max de uma solução 1 M a pH=7,0
ATP	507.2	259	15400
CTP	483,2	271	9000
GTP	523,2	253	13700
UTP	484,2	262	10000
dATP	491,2	259	15200
dCTP	467,2	271	9300
dGTP	507,2	253	13700
dTTP	482,2	267	9600
dUTP	484,2	262	10000

Fórmula de conversão:

$$\frac{\text{Absorvância determinada a } \lambda \text{ max}}{\text{Absorvância a } \lambda \text{ max para a solução a 1 M}} = \text{concentração molar do ácido nucleico}$$

6 - Marcadores para ácidos nucleicos e proteínas

6.1 - Marcadores de ácidos nucleicos

A determinação do tamanho dos segmentos de ADN foi feita na presença de marcadores de tamanho conhecidos obtidos após digestão do ADN do fago λ com a enzima de restrição *Hind*III. Na tabela V são apresentados os vários fragmentos resultantes da digestão do fago λ com a enzima *Hind*III (λ-*Hind*III) e a concentração dos mesmos, por estimativa, após a aplicação de 2 μg de de ADN de λ-*Hind*III.

Tabela V - Tamanho dos fragmentos do λ-*Hind*III (kb) e respectiva concentração (μg)

λ-*Hind*III	[ADN]/banda
23,130 kb	0,95 μg
9,416 kb	0,20 μg
6,557 kb	0,14 μg
4.371 kb	0,10 μg
2,322 kb	0,05 μg
2,027 kb	0,04 μg
0,564 kb	0,01 μg
0,125 kb	

6.2 - Marcadores de peso molecular (M.W.)

Foram utilizados marcadores de elevado (HMW) e de baixo (LMW) peso molecular aparente (MW) de diferentes marcas cujo tamanho, expresso em kDa, é descrito na tabela VI.

Tabela VI - Identificação e tamanho (kDa) dos marcadores HMW e LMW.

	HMW (kDa)			LMW (kDa)	
	Sigma	Pharmacia		Pharmacia	BioRad
Miosina	205	212	Fosforilase b	94	106
α-macroglobulina	—	170	BSA	67	80
β-galactosidase	116	116	Ovalbumina	43	49.5
Fosforilase b	97,4	—	Anidrase carbónica	30	32.5
Transferrina	—	76	Inibidor da tripsina de soja	—	27,5
BSA	66	—	α-Lactoalbumina	20	
Desidrogenase glutâmica	—	53	Lisozima	—	18,5
Ovalbumina	45				
Anidrase carbónica	29				

7 - Oligonucleótidos

A sequenciação e a amplificação no PCR necessitaram de "primers" cujas sequências e características são apresentadas:

"Primer" universal:

- sequência: 5'-AATACGACTCACTATAG-3' (17 nucleótidos)
- posição: 600-616 em pBluescript II SK (+/-)
  980-995 em pBS (+/-)
- Tm: 48°C
- função: sequenciação em pBluescript II SK (+/-) e pBS (+/-) dos cADNs isolados de λgt11 e λZAPII e dos produtos do "erase-a-base"

"Primer" reverso:

- sequência: 5'-AACAGCTATGACCATG-3' (16 nucleótidos)
- posição: 809-824 em pBluescript II SK (+/-)
  837-852 em pBS (+/-)
- Tm: 46°C
- função: sequenciação em pBluescript II SK (+/-) e pBS (+/-) dos cADNs isolados de λgt11 e λZAPII e dos produtos do "erase-a-base"

"Primer anti-sense":

- sequência: 5'-GCAGGTGGACGATAAGGATG-3 (20 nucleótidos)
- posição: 440-459 no cADN XT-2
- Tm: 62°C
- função: amplificação dos cADNs isolados de λZAPII e do ADN genómico humano e de células HEp-2

"Primer sense":

- sequência: 5'-GTTGCCATAAGTCATGTCTC-3' (20 nucleótidos)
- posição: 710-729 no cADN XT-2
- Tm: 58°C
- função: amplificação dos cADNs isolados de λZAPII e do ADN genómico humano e de células HEp-2

8 - Abreviaturas e peso molecular dos aminoácidos

Tabela VII - Abreviaturas e peso molecular (Daltons) dos aminoácidos

Aminoácido	Abreviatura	Símbolo	Peso molecular
Ácido aspártico	Asp	D	133
Ácido glutâmico	Glu	E	147
Alanina	Ala	A	89
Arginina	Arg	R	174
Asn ou Asp	Asx	B	___
Asparagina	Asn	N	132
Cisteína	Cys	C	121
Fenilalanina	Phe	F	165
Glicina	Gly	G	75
Glutamina	Gln	Q	146
Gln ou Glu	Glx	Z	___
Histidina	His	H	155
Isoleucina	Ile	I	131
Leucina	Leu	L	131
Lisina	Lys	K	146
Metionina	Met	M	149
Prolina	Pro	P	115
Serina	Ser	S	105
Tirosina	Tyr	Y	181
Treonina	Thr	T	119
Triptofano	Trp	W	204
Valina	Val	V	117

9 - Código genético

Tabela VIII - Código genético

1ª Posição (5')	2ª Posição U	2ª Posição C	2ª Posição A	2ª Posição G	3ª Posição (3')
U	UUU Phe	UCU Ser	UAU Tyr	UGU Cys	U
	UUC Phe	UCC Ser	UAC Tyr	UGC Cys	C
	UUA Leu	UCA Ser	**UAA** Stop	**UGA** Stop	A
	UUG Leu	UCG Ser	**UAG** Stop	UGG Trp	G
C	CUU Leu	CCU Pro	CAU His	CGU Arg	U
	CUC Leu	CCC Pro	CAC His	CGC Arg	C
	CUA Leu	CCA Pro	CAA Gln	CGA Arg	A
	CUG Leu	CCG Pro	CAG Gln	CGG Arg	G
A	AUU Ile	ACU Thr	AAU Asn	AGU Ser	U
	AUC Ile	ACC Thr	AAC Asn	AGC Ser	C
	AUA Ile	ACA Thr	AAA Lys	AGA Arg	A
	AUG Met	ACG Thr	AAG Lys	AGG Arg	G
G	GUU Val	GCU Ala	GAU Asp	GGU Gly	U
	GUC Val	GCC Ala	GAC Asp	GGC Gly	C
	GUA Val	GCA Ala	GAA Glu	GGA Gly	A
	GUG Val	GCG Ala	GAG Glu	GGG Gly	G

Os codões de terminação estão a "bold".

10 - Tampões e soluções

Acrilamida - gel de separação 30% Acrilamida
0,8% Bis-acrilamida

Esterilizar por filtração.

Acrilamida - gel "stacking"

30% Acrilamida
1,6% Bis-acrilamida

Esterilizar por filtração.

100x Denhardt's

2% (p/v) BSA (fracçãoV)
2% (p/v) Ficoll (tipo 400)
2% (p/v) PV P

Esterilizar por filtração.

20x "gel buffer"

0,36 M Na_2HPO_4
0,04 M NaH_2PO_4

PBS

8 g NaCl
0,2 g KCl
1,44 g Na_2HPO_4
0,24 g KH_2PO_4

Completar o volume até um litro de água e ajustar o pH=8,0. Autoclavar 20 min a 121°C.

20x SET

3 M NaCl,
0,6 M Tris-HCl pH=8
40 mM EDTA

20x SSC

175,3 g NaCl
88,2 g Citrato de sódio

Completar o volume até um litro de água e ajustar o pH=7,0. Autoclavar 20 min a 121°C.

20x SSPE

175,3 g NaCl
27,6 g NaH_2PO_4
7,4 g EDTA

Completar o volume até um litro de água e ajustar o pH=7,4. Autoclavar 20 min a 121°C.

50x TAE

242 g Tris-base
57,1 ml Ácido acético glacial
100 ml EDTA 0,5 M

Completar o volume até um litro de água e ajustar o pH=8,0.

Tampão BPB

1x TAE
10 % Ficol
0,2% SDS
0,025% Azul de bromofenol

10x Tampão de electroforese	30,3 g Tris base 143,0 g Glicina 10,0 g SDS
Completar o volume até um litro de água e ajustar o pH= 8,5.	
10x Tampão de transferência	30,2 g Tris base (0,25 M) 143,38 g Glicina (1,91 M)
Completar o volume até um litro de água e ajustar o pH= 8,3.	
Tampão λ	5 mM Tris-HCl pH=7,5 100 mM NaCl 7,5 mM $MgSO_4$ 5% gelatina
10x TBE	108 g Tris-base 55 g Ácido bórico 40 ml 0,5 M EDTA
Completar o volume até um litro de água e ajustar o pH=8,0.	
TE (pH=8,0)	10 mM Tris-HCl (pH=8,0) 1 mM EDTA (pH=8,0)
1,5 M Tris pH= 8,8	9,08 g Tris base
Completar o volume até 50 ml de água e ajustar o pH=8,8.	
0,5 M Tris pH= 6,8	3,03 g Tris base
Completar o volume até 50 ml de água e ajustar o pH=6,8.	