

5. Efron B. Bootstrap methods: another look at the jackknife // Ann. Statist.—1979.—7, N 1.—P. 1—26.
6. Boos D. D., Monahan J. F. Bootstrap methods using prior information // Biometrika.—1986.—73, N 1.—P. 77—83.
7. GenBank (1986). Genetic sequence data bank, R. 44.0. BBN laboratories, USA.
8. Статистические закономерности в первичных структурах функциональных областей генома *Escherichia coli*. 3. Компьютерное распознавание кодирующих областей / М. Ю. Бородавский, Ю. А. Сприжницкий, Е. И. Голованов, А. А. Александров // Молекуляр. биология.—1986.—20, № 5.—С. 1390—1398.

Ин-т молекуляр. генетики АН СССР, Москва

Получено 06.07.88

## STATISTICAL SIGNIFICANCE OF THE OCCURRENCE OF SOME COMPLEX NUCLEOTIDE COMBINATIONS: COMPARISON OF THE DNA MODELS

G. M. Suboch, Yu. A. Sprizhitsky

Institute of Molecular Genetics, Academy of Sciences of USSR, Moscow

### Summary

A scheme for modeling of the DNA chain as a sequence of the nucleotide runs of different length is presented. The advantages of such a method and range of its application are discussed. A procedure is suggested to estimate statistical significance of occurrence of some complex sequence structures in DNA by the Monte-Carlo method. It uses a bootstrap algorithm and necessitates comparatively small number of calculations. Three different models, used to derive such estimations of the frequencies of homopurine-homopyrimidine mirror repeats in the DNA of phage  $\lambda$  and rodentia noncoding regions are compared.

УДК 577.27

**О. В. Рохлин, А. Солонин, Д. Вайс, А. Р. Ибрагимов,  
Е. Л. Арсеньева, Г. Т. Богачева**

## ЭКСПРЕССИЯ ЭПИТОПОВ С-ДОМЕНА L-ЦЕПЕЙ КАППА И ЛЯМБДА ТИПОВ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ ЧЕЛОВЕКА У БЕЛКОВ РАЗЛИЧНЫХ ВАРИАБЕЛЬНЫХ ПОДГРУПП

*С помощью моНАТ исследована экспрессия эпитопов С-домена L-цепей Ig человека каппа и лямбда типов различных V-подгрупп. Установлено, что уровень экспрессии данного эпитопа С-домена зависит от принадлежности L-цепи к той или иной подгруппе.*

**Введение.** Легкие цепи (L-цепи) иммуноглобулинов (Ig) человека подразделяются на два типа, обозначаемые каппа ( $\kappa$ ) и лямбда ( $\lambda$ ) [1]. Примерно 60 % Ig человека содержат L-цепи  $\kappa$ -типа, 40 % —  $\lambda$ . Строение постоянного (C) домена  $\kappa$ -цепей контролируется единственным геном [1], тогда как строение C-домена  $\lambda$ -цепей определяется девятью генами, часть из которых относится к категории псевдогенов [2, 3]. Строение вариабельных (V) доменов L-цепей определяется несколькими десятками генов, и их разнообразие увеличивается в процессе дифференцировки В-лимфоцитов за счет генных перестроек и соматических мутаций [1]. Как по особенностям первичной структуры, так и по иммунохимическим свойствам V-доменов  $\kappa$ -цепи можно разбить на четыре V-подгруппы, а  $\lambda$ -цепи — на шесть V-подгрупп [1]. В ряде лабораторий получены моноклональные антитела (моНАТ) к C-доменам  $\kappa$ - и  $\lambda$ -цепей [4, 5], однако экспрессия соответствующих антигенных детерминант (эпитопов) не изучена у индивидуальных белков различных V-подгрупп  $\kappa$ - и  $\lambda$ -цепей. Между тем существуют косвенные данные, указывающие на то, что V-домен способен влиять на активность определенных эпи-

топов, локализованных в С-домене [6]. Следовательно, необходимо установить, существует ли зависимость между экспрессией эпитопов С-домена L-цепей и их принадлежностью к той или иной V-подгруппе. Исследование этого вопроса имеет существенное значение по той причине, что моАТ используются для определения уровня Ig в норме и патологии, и в частности, выявление миеломных L-цепей является диагностическим тестом при злокачественных новообразованиях В-лимфоцитов.

В настоящей работе с помощью моАТ исследована экспрессия различных эпитопов С-домена у миеломных  $\kappa$ -цепей человека четырех вариабельных подгрупп и  $\lambda$ -цепей — трех V-подгрупп.

**Материалы и методы.** Индивидуальные  $\kappa$ - и  $\lambda$ -цепи выделяли из мочи, а миеломные Ig — из сыворотки миеломных больных с помощью ионообменной хроматографии или электрофореза в пепиконовом блоке [7]. Для иммунизации использовали  $\kappa$ -цепи Rod, относящиеся к  $V_{\kappa}$  III подгруппе, и  $\lambda$ -цепи Ant, относящиеся к  $V_{\lambda}$  III подгруппе. Препараты L-цепей были иммунохимически типированы с помощью поликлональных антисывороток, полученных ранее [8, 9]. Для получения гибридом к  $\kappa$ -цепям мышам линии BALB/c трехмесячного возраста вводили при первой иммунизации внутривенно 200 мкг антигена  $\kappa$ -Rod без адьюванта, спустя 21 день проводили повторную иммунизацию. В случае  $\lambda$ -цепей мышей иммунизировали первично 100 мкг  $\lambda$ -цепей Ant, повторно — через шесть недель. Затем через три дня после второй иммунизации клетки селезенки брали для слияния с миеломными клетками мыши линии X63.Ag8.653 [10]. Слияние проводили по методу Келера и Мильштейна [11] с помощью полиэтиленгликоля, как описано ранее [12]. Для культивирования гибридом использовали среду RPMI-1640 («Flow», Англия), фетальную сыворотку крупного рогатого скота и пластиковую посуду той же фирмы. Первичный скрининг гибридомных клонов осуществляли с помощью радиоиммунологического анализа (РИА) [12]. С этой целью 2 мкг антигена сорбировали в лунках гибких полихлорвиниловых плат («Flow») в 100 мкл буферного раствора, содержащего 0,15 М NaCl, 0,01 М Na-фосфатных солей, pH 7,5. После часовой инкубации при комнатной температуре платы отмывали тем же буферным раствором с добавлением 0,05 % твин-20, в лунки вносили культуральную среду, инкубировали в течение 1 ч, отмывали и вносили в лунки кроличьи антитела к L-цепям Ig мыши, меченные  $^{125}\text{I}$ , с удельной активностью около  $10^6$  имп·мин $^{-1}$ ·мкг $^{-1}$  белка. В каждую лунку вносили по 0,2 мкг меченых антител. В случае  $\kappa$ -цепей проверены 344 первичные гибридомные популяции, из которых 48 оказались положительными. Клонировано 13 популяций. В случае  $\lambda$ -цепей проверена на продукцию антител 391 популяция, из них положительных — 45, клонировано 9. Все отобранные клоны наращивались в асцитной форме. Для получения глобулиновой фракции к асцитной жидкости добавляли 18 %  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , осадок растворяли и проводили диализ против буферного раствора, содержащего 0,15 М NaCl, 0,2 М  $\text{H}_2\text{BO}_3$ , pH 8,0. Как правило, на долю моАТ приходилось от 60 до 90 % белка. Для проведения иммуоферментного анализа (ИФА) препараты антигенов или антител конъюгировали с пероксидазой хрена («Sigma», США) с помощью гетеробифункционального агента SPDP («Pharmacia», США) [13]. ИФА проводили на тех же платах, что и РИА, и в том же буферном растворе. Для проявления ферментативной активности использовали ортофенилендиамин («Sigma»), реакцию останавливали добавлением 2 н. раствора  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Уровень реакции определяли с помощью ELISA-ридера MR 580 фирмы «Dynatech» (США) при длине волны 490 нм. Для ковалентной иммобилизации антигенов или антител на амниоцеллюлозе пользовались методом Гурвича [14].

**Результаты и обсуждение.** МоАТ к эпитопам С-домена  $\kappa$ -цепей Ig человека. Результаты, приведенные в табл. 1, показывают, что моАТ к  $\kappa$ -цепям можно разбить, по крайней мере, на три группы. К первой относятся моАТ 6E7, 10D9 и 3D5, одинаково хорошо взаимодействующие с изолированными  $\kappa$ -цепями и с интактными молекулами Ig. Ко второй группе относятся шесть препаратов моАТ, хорошо реагирующих с изолированными  $\kappa$ -цепями, но не взаимодействующих с интактными молекулами Ig. В третью группу входит единственный препарат моАТ — 9E7, реагирующий с частной идиотипической детерминантой V-домена  $\kappa$ -цепи Rod, использованной для иммунизации,

Таблица 1

Взаимодействие монАТ к  $\kappa$ -цепям Ig человека с различными препаратами L-цепей и Ig человека различных классов и подклассов  
Interaction of monAb against human Ig  $\kappa$ -chains with L-chains and human Ig of different isotypes

Антигены	Антитела									
	6E7	10D9	3D5	2D9	1B9	1E9	7C5	7C3	8F3	9E7
$\kappa$ III Rod	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
$\kappa$ III Mos	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—
$\kappa$ I Cro	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—
Нул нормальных L-цепей	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—
IgG 1 $\kappa$ : Bau*, Sche*, Hoch*	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—
IgG2 $\kappa$ : Os*, Ei, 236*, Gof	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—
IgG3 $\kappa$ : Rey*, Stu*	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—
IgG4 $\kappa$ : Stoe*, Spa*, Bru*, Bro, Gel	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—
Нормальный IgG**	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—
Нормальный IgA**	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—
IgM $\kappa$ : Bob, Gur, Sal, Kri	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—
IgG1 $\lambda$ : Dol	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
IgC2 $\lambda$ : Sant	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
$\lambda$ III Ant	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
$\lambda$ II Bai	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Примечание. В лунки полихлорвиниловых плат вносили по 0,5 мкг антигена в объеме 50 мкл, затем такое же количество монАТ мыши, и взаимодействие проявлялось с помощью меченых пероксидазой козлиных антител к L-цепям мыши (по 0,05 мкг в лунку), предварительно сорбированных на Ig человека. Знаком «+» обозначено наличие взаимодействия, знаком «—» — отсутствие. Большинство монАТ мыши относится к изотипу IgG1, за исключением двух монАТ — 10D9 и 3D5 IgM класса и 8F3 — IgC2b подкласса.

\* Препараты получены от д-ра Ф. Шквазила, Ин-т клин. и эксперим. онкологии, Берн, Швейцария; \*\* препараты поставлены фирмой «Cappel», США. Остальные L-цепи и Ig выделены нами из сывороток mielомных больных, полученных от проф. Е. В. Чернохвостовой (МНИИЭМ им. Г. Н. Габричевского МЗ РСФСР).

Таблица 2

Конкурентное взаимодействие между мечеными и немечеными монАТ к  $\kappa$ -цепям при их реакции с иммуносорбентом  $\kappa$ -Rod  
Competitive sorption of labelled and unlabelled anti- $\kappa$  chain monAb's on immunosorbent  $\kappa$ -Rod

Немеченые монАТ	Меченые монАТ				
	6E7	3D5	1B9	1E9	2D9
6E7	++*	++	—***	—	—
10D9	++	++	—	—	—
3D5	—	++	—	—	—
2D9	—	—	—	—	++
1B9	—	++*	++	++	++
1E9	—	—	++	++	++
7C5	—	—	++	++	++
7C3	—	—	—	—	—
8F9	—	+	++	++	++

Примечание. Радиоиммунологический анализ антител с помощью иммуносорбентов подробно описан ранее [12]. Каждая порция иммуносорбента содержала 1 мкг  $\kappa$ -цепей Rod, ковалентно фиксированных на диацеллюлозе. К осадку сорбента вначале добавляли немеченые монАТ, инкубировали в течение 1 ч, отмывали и добавляли препарат меченых  $^{125}\text{I}$  монАТ. Количество немеченых монАТ, добавлявшихся к иммуносорбенту, было следующим (мкг): 0,02; 0,05; 0,1; 0,2; 0,5; 1,0; 10,0; 100,0. Удельная активность меченых монАТ составляла  $(1-2) \cdot 10^6$  имп·мин $^{-1}$ ·мкг $^{-1}$ . К каждой порции иммуносорбента прибавляли от 0,5 до 1 мкг меченых антител. При использовании одноименных монАТ реакция выходила на плато, начиная с добавления 1 мкг белка, торможение на уровне плато составляло 60—80%.

\*, \*\*, \*\*\* Торможение РИА 60—80; 30—60; <30% соответственно.

так как последующий анализ 40 индивидуальных мнеломных  $\kappa$ -цепей четырех различных V-подгрупп не выявил ни одной реагирующей цепи.

Дальнейшее определение специфичности монАТ проводили с помощью конкурентного взаимодействия с антигеном  $\kappa$ -Rod меченых и немеченых монАТ (табл. 2). Очевидно, что если меченые и немеченые монАТ взаимодействуют с одним и тем же эпитопом или с пространственно сближенными эпитопами, то в таком случае немеченое монАТ будет препятствовать присоединению к антигену меченых

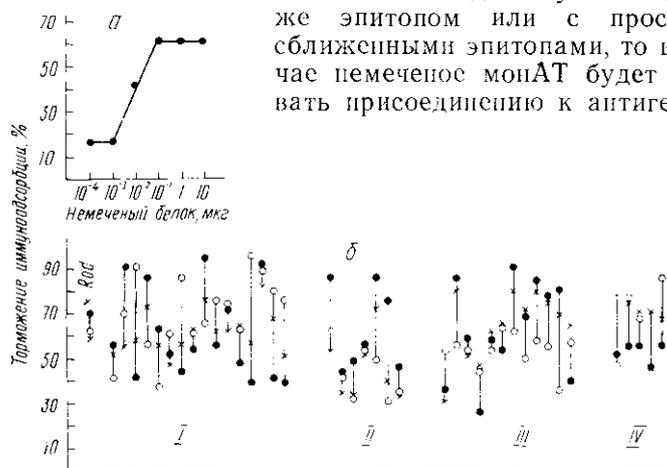


Рис. 1. Торможение иммуноадсорбции при взаимодействии монАТ 6Е7 с антигеном  $\kappa$ -Rod, меченным пероксидазой, с помощью немеченого белка  $\kappa$ -Rod (а) и то же при взаимодействии монАТ 7С3 (● — — ●), 6Е7 (○ — — ○) и 1В9 (× — — ×) с иммуногеном  $\kappa$ -Rod, меченным пероксидазой (б): а — монАТ наносили в лунку в объеме 50 мкл в количестве 0,1 мкг, инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре и после отмывки вносили немеченый тестируемый белок, инкубировали 1 ч, отмывали и добавляли меченный пероксидазой  $\kappa$ -Rod в количестве 0,05 мкг. После добавления проявляющего субстрата (ортофенилендиамин) определяли при длине волны 490 нм оптическую плотность, которая в отсутствие конкурирующего белка находилась в интервале между 1,0 и 1,5 единицами; б — для торможения использовали 40 различных мнеломных  $\kappa$ -цепей четырех V-подгрупп. На каждой вертикальной линии, соответствующей данной индивидуальной  $\kappa$ -цепи, соответствующими символами показан тот уровень торможения иммуноадсорбции, которого достигает на уровне плато реакции (5 мкг препарата) данная  $\kappa$ -цепь при взаимодействии с монАТ. Ниже перечислены шифры  $\kappa$ -цепей (на рисунке они даны слева направо), использованные в наших опытах: I подгруппа — Gal, Kel, Scu, King, Cro, Dru, BJ6, Hau, Mil, Ed, Wms, Joh, Lor, Rick, Lyle, Rob; II подгруппа — Nic, Zine, Can, Nim, Pat, Mon, Lay; III подгруппа — McKin, Qak, Shi, Loc, McCar, Bre, Cole, Mal, Mos, Reed, Ti; IV подгруппа — Burns, Kal, Len, Gol, Dun

Fig. 1. Inhibition of immunoadsorption during interaction between monAb 6E7 and peroxidase-labelled antigen  $\kappa$ -Rod using unlabelled protein  $\kappa$ -Rod (a) and the same during interaction of monAb 73C, 6E7 and 1B9 with peroxidase-labelled immunogen  $\kappa$ -Rod (b): a — 0.1  $\mu$ g of monAb in the volume of 50  $\mu$ l was adsorbed on plastic during 1 h at a room temperature, washed, and then unlabelled analyzed protein was added. After 1 h incubation and washing of unlabelled protein 0.05  $\mu$ g of peroxidase- $\kappa$ -Rod conjugate was added followed by incubation with developing reagent (orthophenylenediamine) and measurement of optical density at wavelength of 490 nm. In the absence of competitive protein optical density was as high as 1-1.5 optical units. b — Inhibition was performed using 40 different myeloma  $\kappa$ -chains belonging to 4 variable subgroups. Each vertical line corresponds to a certain  $\kappa$ -chain; special marks indicate plateau levels of inhibition (reached using 5  $\mu$ g of inhibitor) by its  $\kappa$ -chain. The inhibitor proteins used in the experiments are the following (from left to right): I subgroup — Gal, Kel, Scu, King, Cro, Dru, BJ6, Hau, Mil, Ed, Wms, Joh, Lor, Rick, Lyle, Rob; II subgroup — Nic, Zine, Can, Nim, Pat, Mon, Lay; III subgroup — McKin, Quak, Shi, Loc, McCar, Bre, Cole, Mal, Mos, Reed, Ti; IV subgroup — Burns, Kal, Len, Gol, Dun

монАТ. Из табл. 2 видно, что монАТ, реагирующие с изолированными  $\kappa$ -цепями, можно разбить на две группы: большинство монАТ входит в одну группу, а к другой группе принадлежит единственное монАТ 7С3, распознающее иной эпитоп, чем остальные монАТ.

Таким образом, монАТ к С-домену  $\kappa$ -цепей (т. е. все монАТ, за исключением 9Е7) распределяются по трем группам и для дальнейшей работы мы отобрали по одному монАТ из каждой группы соответст-

венно 6E7, 1B9 и 7C3. Эпитопы C-домена и  $\kappa$ -цепей мы в дальнейшем будем обозначать по шифрам моnAT.

Уровень экспрессии эпитопов C-домена у индивидуальных миеломных белков  $\kappa$ -типа мы исследовали с помощью реакции торможения иммуноадсорбции в системе ИФА. Для этого антиген  $\kappa$ -Rod был конъюгирован с пероксидазой хрена и использован в дальнейших опытах в качестве меченого антигена. Торможение иммуноадсорбции в этой систе-

Т а б л и ц а 3

Статистический анализ данных по взаимодействию трех моnAT с 40 препаратами миеломных  $\kappa$ -цепей четырех вариabельных подгрупп

Statistical analysis of interactions between 3 monAb's and 40 preparations of myeloma  $\kappa$  chains belonging to 4 variable subgroups

Вариabельная подгруппа	Число исследованных $\kappa$ -цепей	Средние арифметические значения торможения иммуноадсорбции (см. рис. 1, б) для моnAT		
		6E7*	7C3**	1B9***
I	16	71±9	61±11	61±5
II	7	45±11	63±17	45±13
III	12	53±5	63±14	66±9
IV	5	65±22	54±5	73±4

\* Различия достоверны при  $p < 0,01$  между I, II и I, III подгруппами и при  $p < 0,05$  — между II и IV подгруппами; \*\* достоверных различий между подгруппами нет; \*\*\* различия достоверны при  $p < 0,01$  между следующими подгруппами: I, II; I, IV; II, III и II, IV.

ме показано на рис. 1, а. При анализе результатов реакции миеломных  $\kappa$ -цепей с моnAT (рис. 1, б) обращает на себя внимание тот факт, что эпитопы 6E7, 7C3 и 1B9 могут совершенно по-разному экспрессироваться у одного и того же белка. Для того чтобы выяснить закономерности экспрессии различных эпитопов C-домена  $\kappa$ -цепей у индивидуальных представителей четырех вариabельных подгрупп, мы подвергли результаты (рис. 1, б) статистической обработке, представленной в табл. 3, откуда видно, что у белков различных V-подгрупп имеются существенные отличия в уровне экспрессии эпитопов C-домена. Так, экспрессия эпитопа 6E7 среди  $\kappa$ -цепей I подгруппы достоверно выше (при уровне значимости ( $p$ ) меньше 0,01), чем у  $\kappa$ -цепей II и III подгрупп. Уровень экспрессии эпитопа 1B9 у белков II подгруппы достоверно ниже по сравнению с белками остальных вариabельных подгрупп. В то же время экспрессия эпитопа 7C3 находится примерно на одинаковом уровне у белков всех вариabельных подгрупп. Это означает, что выявленные различия между подгруппами для эпитопов 6E7 и 1B9 не связаны с денатурацией  $\kappa$ -цепей отдельных подгрупп, а касаются локальных различий в антигенной активности.

МоnAT к  $\lambda$ -цепям Ig человека. Из девяти препаратов моnAT, реагирующих с  $\lambda$ -цепями, четыре специфичны к C-домену, что было установлено при исследовании их взаимодействия с нормальными и миеломными Ig и L-цепями по той же методике, что и для  $\kappa$ -цепей (см. табл. 1).

Эпитопное картирование антител к C-домену  $\lambda$ -цепей, проведенное тем же методом, что и в случае  $\kappa$ -цепей, показало, что моnAT реагируют с тремя различными эпитопами C-домена (табл. 4), причем эпитоп 6B11, в основном, экспрессирован на изолированных L-цепях, т. е. локализован на внутренней поверхности C-домена. Для дальнейшей работы мы использовали моnAT 6D10, IG5G7 и 6B11 и исследовали экспрессию соответствующих эпитопов у индивидуальных миеломных белков  $\lambda$ -типа с помощью реакции торможения иммуноадсорбции. Для этого антиген  $\lambda$ -Ant был конъюгирован с пероксидазой хрена и исполь-

зован в качестве меченого антигена. Реакцию проводили так же, как и в случае  $\kappa$ -цепей (рис. 1, а).

Взаимодействие 60 миеломных  $\lambda$ -цепей с тремя различными моАТ показано на рис. 2, а результаты статистического анализа этого взаимодействия представлены в табл. 5. В случае  $\lambda$ -цепей выявлена та же закономерность, что и для  $\kappa$ -цепей, а именно: белки различных V-под-

Таблица 4

Конкурентное взаимодействие между мечеными и немечеными моАТ к  $\lambda$ -цепям при их реакции с иммуносорбентом  $\lambda$ -Ant  
Competitive interaction of labelled and unlabelled anti- $\lambda$  chain monAb's with  $\lambda$ -Ant immunoadsorbent

Немеченые моАТ	Меченые моАТ			Немеченые моАТ	Меченые моАТ		
	5B4	6D10	6B11		5B4	6D10	6B11
5B4	++*	++	+	1G5G7	+	—	—
6D10	++	++	+	6B11	+	+	++

Примечание. Реакцию ставили так же, как описано в табл. 2.

\* Обозначения те же, что в табл. 2.

группы достоверно отличаются по уровню экспрессии отдельных эпитопов C-домена  $\lambda$ -цепей.

L-цепи Ig содержат 210—220 аминокислотных остатков, организованных в два домена — N-концевой (вариабельный) и C-концевой (постоянный), примерно одинаковых по числу остатков и общей пространственной организации. Каждый домен имеет два слоя  $\beta$ -структуры — наружный, обращенный к раствору, и внутренний, аминокислотные остатки которого обеспечивают контакты между доменами L- и H-цепей. Антигенсвязывающий центр формируется в результате взаимодействия  $V_L$ - и  $V_H$ -доменов, а контакты между  $C_L$ - и  $C_H1$ -доменами приводят к образованию межцепочечной дисульфидной связи между L- и H-цепями. Взаимодействие доменов L- и H-цепей исследовано достаточно подробно [15], однако мало что известно о характере взаимодействия  $V_L$ - и  $C_L$ -доменов. Так, рентгеноструктурный анализ димеров  $\lambda$ -цепей человека Msg показал, что существует контакт между остатком 82 V-домена и 174 C-домена [16]. Установлено, что взаимодействие V-домена с H-цепью вызывает конформационные изменения в C-концевом районе C-домена [17]. Исследование спектра КД и кристаллизационных свойств  $\lambda$ -цепей Msg показало, что взаимодействие этого белка с бис(динитрофенил)лизином, происходящее за счет V-доменов, приводит к аллостерическим конформационным изменениям C-домена [18]. Изучение констант ассоциации ( $K_A$ ) при взаимодействии интактных H- и L-цепей по сравнению с изолированными доменами обнаружило, что высокоаффинное взаимодействие между H- и L-цепями с  $K_A$ , равной  $10^{10}$  M<sup>-1</sup>, складывается из относительно слабых взаимодействий между  $V_L$  и  $V_H$  и между  $C_L$  и  $C_H1$ ,  $K_A$  для которых составляет всего лишь около  $10^6$  M<sup>-1</sup> [19]. Отсюда следует, что должно существовать кооперативное взаимодействие между V- и C-доменами в пределах одной цепи. Имеются также косвенные иммунохимические данные о влиянии V-домена на антигенную активность детерминант, локализованных в C-домене: активность аллотипов C-домена L-цепей человека резко снижается в результате расщепления L-цепи на V- и C-домены [20].

Таким образом, литературные данные указывают на то, что между V- и C-доменами L-цепи существует определенное взаимодействие, и этот вывод основан на двух группах экспериментальных фактов: 1) изолированный C-домен, полученный с помощью протеолитического расщепления L-цепи, имеет иные конформационные свойства по сравне-

нию с интактной *L*-цепью; 2) в результате взаимодействия *V*-домена *L*-цепи с *H*-цепью или с лигандом наблюдаются аллостерические конформационные изменения в *C*-домене.

В нашей работе конформационное состояние *C*-домена оценивалось по антигенной активности отдельных эпитопов. Хорошо известно, что антигенная активность данного эпитопа является отражением конформационного состояния того участка белка, где можно говорить о каких-то локальных конформационных изменениях. Мы исследовали

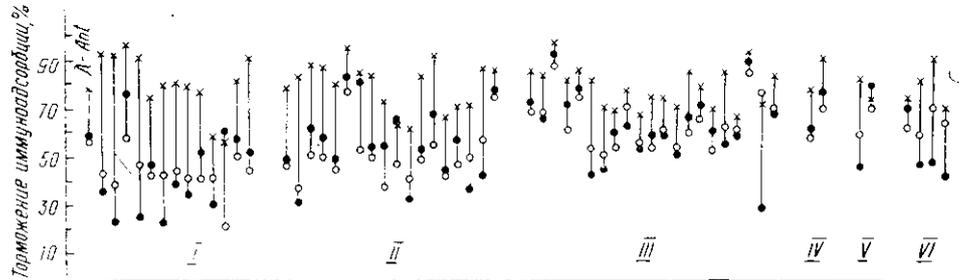


Рис. 2. Торможение иммуоадсорбции при взаимодействии моноАТ 1G5G7 (●), 6D10 (○) и 6B11 (×) с иммуногеном  $\lambda$ -Ant, меченным пероксидазой. Методика описана в подпункте к рис. 1. Ниже перечислены шифры  $\lambda$ -цепей, использованных в наших опытах: I подгруппа: Wise, Van, Cox, She, Slo, Hud, Bed, San, Max, Cut, Atk, Car, Loc; II подгруппа: Goan, Wal, Pie, Bos, Mor, Eve, Nei, Sla, Smi, Cot, Hag, Lev, Fain, Bar, Bro, Bur, Hill, Win; III подгруппа: Tex, Ree, Bau, Clem, Kro, Rhea, Dun, Coh, Kir, Cor, Witt, Dox, Wms, Peck, Mor, Nan, Cla, Dell, Kern, Hil, Del; IV подгруппа: Sh, Whi; V подгруппа: Meg, Bo; VI подгруппа: Gar, Sut, The, Mor

Fig. 2. Inhibition of interaction of monAb's 1G5G7 (●), 6D10 (○) and B611 (×) with the peroxidase-labelled immunogen  $\lambda$ -Ant. Reaction was performed as described in the legend of Fig. 1. The myeloma chains used are the following: I subgroup — Wise, Van, Cox, She, Slo, Hud, Bed, San, Max, Cut, Atk, Car, Loc; II subgroup — Goan, Wal, Pie, Bos, Mor, Eve, Nei, Sla, Smi, Cot, Hag, Lev, Fain, Bar, Bro, Bur, Hill, Win; III subgroup — Tex, Ree, Bau, Clem, Kro, Rhea, Dun, Coh, Kir, Cor, Witt, Dox, Wms, Peck, Mor, Nan, Cla, Dell, Kern, Hil, Del; IV subgroup — Sh, Whi; V subgroup — Meg, Bo; VI subgroup — Gar, Sut, The, Mor

активность трех разных эпитопов *C*-домена  $\kappa$ - и  $\lambda$ -цепей у миеломных белков различных вариабельных подгрупп и установили принципиально новый факт, а именно: антигенная активность определенных участков *C*-домена зависит от строения вариабельного домена *L*-цепи. Это означает, что в зависимости от структуры *V*-домена могут происходить локальные конформационные изменения в *C*-домене.

Эти изменения у  $\kappa$ -цепей затрагивали как наружную, так и внутреннюю поверхности *C*-домена. Действительно, для  $\kappa$ -цепей второй *V*-подгруппы отмечена пониженная активность эпитопов 6E7 и 1B9. Эпитоп 6E7 локализован на наружной поверхности *C*-домена, тогда как 1B9 — на внутренней. Но в то же время конформационные изменения у белков этой подгруппы затрагивают не весь *C*-домен, а отдельные его участки, так как экспрессия эпитопа 7C3 остается неизменной. Естественно, что выявленные различия не связаны с особенностями использованных моноАТ: те же моноАТ реагируют совершенно по-другому с *C*-доменом белков других *V*-подгрупп.

Несколько иные результаты получены при исследовании  $\lambda$ -цепей. В этом случае выявлена пониженная экспрессия эпитопа 1G5G7 белков I подгруппы и эпитопа 6D10 у белков I и II подгрупп. Оба эти эпитопа локализованы на наружной поверхности *C*-домена  $\lambda$ -цепей. В то же время эпитоп 6B11, локализованный на внутренней поверхности *C*-домена, экспрессируется на одинаково высоком уровне у  $\lambda$ -цепей всех подгрупп. Интерпретация результатов, полученных при исследовании  $\lambda$ -цепей, затруднена тем обстоятельством, что для  $\lambda$ -цепей известно несколько изоформ *C*-доменов, и мы не знаем изотипической принадлежности всех исследованных нами препаратов. Возможно, в процессе перестройки генов  $\lambda$ -цепей происходит избирательное объединение *V*-генов данной

подгруппы с определенным С-геном, и пониженная экспрессия данного эпитопа характерна для определенного изотипа С-домена, а не является результатом взаимодействия V- и С-доменов λ-цепи.

В отличие от λ-цепей результаты исследования κ-цепей можно интерпретировать однозначно. Строение κ-цепей Ig человека контролируется единственным геном и поэтому структура С-домена одинакова у белков всех V-подгрупп. Следовательно, зависимость экспрессии эпи-

Таблица 5

Статистический анализ данных по взаимодействию монАТ с 52 препаратами миеломных λ-цепей трех V-подгрупп

Statistical analysis of interactions between monAb's and 52 preparations of myeloma λ chains belonging to 3 V subgroups

V-подгруппа	Число исследованных λ-цепей	Средние арифметические значения торможения иммуноадсорбции (см. рис. 2) для монАТ		
		1G5G7*	6D10**	6B11***
I	13	43±9	44±5	79±6
II	18	57±8	53±6	81±5
III	21	64±7	65±5	80±4

\* Различия достоверны при  $p < 0,05$  между I, II подгруппами, при  $p < 0,001$  между I, III подгруппами; между II и III достоверных различий нет; \*\* различия достоверны при  $p < 0,05$  между I, II подгруппами, при  $p < 0,001$  между I, III и II, III подгруппами; \*\*\* достоверных различий между подгруппами нет.

топа С-домена от принадлежности данной κ-цепи к той или иной V-подгруппе можно объяснить тем, что структурные различия между V-доменами различных V-подгрупп отражаются на конформационном состоянии С-домена κ-цепей. Пониженная экспрессия данного эпитопа у κ-цепей определенной V-подгруппы никогда не сопровождалась снижением активности всех исследованных эпитопов. Это свидетельствует о том, что в результате взаимодействия V- и С-доменов происходят локальные конформационные изменения С-домена.

Выявленная закономерность имеет прямое практическое приложение: количественное определение содержания L-цепей можно проводить только с помощью монАТ, которые в равной мере взаимодействуют с белками различных V-подгрупп или же следует использовать такое сочетание разных монАТ, которое обеспечит выявление любой L-цепи вне зависимости от ее принадлежности к той или иной V-подгруппе.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Solomon A. Light chain immunoglobulins: structural-genetic correlates // Blood.— 1986.—68, N 3.— P. 603—610.
2. Clustered arrangement of immunoglobulin constant region genes in man / P. A. Hietter, G. F. Hollis, S. J. Korsmeyer et al. // Nature.— 1981.—294, N 5837.— P. 536—539.
3. Identification of three new Ig λ-like genes in man / H. Chang, E. Dmitrovsky, P. A. Hietter et al. // J. Exp. Med.— 1986.—163, N 2.— P. 425—435.
4. Detection of free κ chains in human serum and urine using pairs of monoclonal antibodies reacting with C<sub>κ</sub> epitopes not available on whole immunoglobulins / N. R. Ling, J. Lowe, D. Hardie et al. // Clin. Exp. Immunol.— 1983.—52, N 1.— P. 234—240.
5. Cross-reactive variable region associated epitopes of human gG1 paraprotein detected by a monoclonal antibody panel / L. C. Walker, S. Dhut, W. M. Gregory, J. A. Habeshaw // Immunology.— 1987.—61, N 3.— P. 247—254.
6. Solomon A. Bence Jones proteins and light chains of immunoglobulins. 14. Conformational dependency and molecular localization of the kappa and lambda antigenic determinants // Scand. J. Immunol.— 1976.—5, N 6.— P. 685—695.
7. Solomon A. Light chains of immunoglobulins // Meth. Enzymol.— 1985.—116.— P. 101—121.

8. Human kappa light chain subgroup analysis with synthetic peptide-induced antisera / G. J. Silverman, D. A. Carson, A. Solomon, S. Fong // *J. Immunol. Meth.*—1986.—**95**, N 2.—P. 249—257.
9. Solomon A., Weiss D. T. Serologically defined V region subgroups of human light chains // *J. Immunol.*—1987.—**139**, N 3.—P. 824—830.
10. A new mouse myeloma cell line that has lost immunoglobulin expression, but permits the construction of antibody-secreting / J. F. Kearney, A. Radbruch, B. Liesegang, K. Rajewsky // *Ibid.*—1979.—**123**, N 4.—P. 1548—1550.
11. Kohler G., Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity // *Nature.*—1975.—**256**, N 5508.—P. 495—497.
12. Monoclonal antibodies against common and Igk-1a allotypic determinants of rat immunoglobulin kappa chain constant domain / V. V. Cherepakhin, A. V. Chervonsky, A. V. Filatov, O. V. Rokhlin // *Immunol. Lett.*—1985.—**10**, N 2.—P. 217—221.
13. Carlsson J., Drevin H., Axen R. Protein thiolation and reversible protein-protein conjugation // *Biochem. J.*—1978.—**173**, N 3.—P. 723—737.
14. Гурвич А. Е., Кузовлева О. Б., Туманова А. Е. Получение белково-целлюлозных комплексов (иммуносорбентов) в форме суспензий, способных связывать большие количества антител // *Биохимия.*—1961.—**26**, № 4.—С. 803—811.
15. Alzari P. M., Jascombe M. B., Poljak R. J. Three-dimensional structure of antibodies // *Annu. Rev. Immunol.*—1988.—**6**—P. 555—580.
16. Structure of a  $\lambda$ -type Bence-Jones protein at 3,5 Å resolution / M. Schiffer, R. L. Girling, K. R. Ely, A. B. Edmundson // *Biochemistry.*—1973.—**12**, N 23.—P. 4620—4631.
17. Non-covalent association of heavy and light chains of human immunoglobulin G: studies using light chain labelled with a fluorescent probe / I. Alexandru, D. I. Kells, K. J. Dorrington, M. Klein // *Mol. Immunol.*—1980.—**17**, N 7.—P. 1351—1363.
18. Edmundson A. B., Ely K. R., Herron J. A search for site-filling ligands in the Mcg Bence-Jones dimer: crystal binding studies of fluorescent compounds // *Ibid.*—1984.—**21**, N 7.—P. 561—576.
19. Equilibrium and kinetic aspects of the interaction of isolated, variable and constant domains of light chain with the Fd' fragment of immunoglobulin G / M. Klein, C. Kortan, D. I. Kells, K. J. Dorrington // *Biochemistry.*—1979.—**18**, N 8.—P. 1473—1481.
20. Solomon A., McLaughlin C. L., Steinberg A. G. Bence Jones proteins and light chains of immunoglobulins. 3. *In vivo* antigenicity: a genetic expression with serologic dependency on the intact kappa chain molecule // *Immunochemistry.*—1970.—**7**, N 8.—P. 709—715.

Всероссийский кардиологический научный центр АМН СССР, Москва  
Мед. центр ун-та Теннесси, Ноксвилл, США

Получено 04.11.88

#### CONSTANT DOMAIN EPITOPE EXPRESSION OF HUMAN IMMUNOGLOBULIN L CHAINS OF THE KAPPA AND LAMBDA TYPE IN PROTEINS OF DIFFERENT VARIABLE SUBGROUPS

O. V. Rokhlin, A. Solomon\*, D. Vasse\*, A. R. Ibragimov, F. L. Arsenieva, G. T. Bogacheva

All-Union Cardiological Research Centre,  
Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow  
Department of Medicine, University of Tennessee, Knoxville, Tennessee, USA \*

#### Summary

Monoclonal antibodies against three different  $\kappa$ -chain constant domain epitopes and three different human Ig  $\lambda$ -chain C-domain epitopes have been prepared. Some of the epitopes are expressed both in intact Ig molecules and in isolated L-chains, whereas other epitopes are found only in isolated L-chains. The expression of these epitopes has been studied in 40 various myeloma  $\kappa$ -chain preparations belonging to four different variable subgroups, and in 52  $\lambda$ -chain preparations of three V subgroups. The expression level in the above epitope of C domain is shown to depend on the variable subgroups of L-chains. This implies the existence of certain interactions between V and C domains promoting the alteration in the level of C domain epitope expression. These studies indicate that interactions of structurally distinct V domains with the C domain probably lead to local conformational changes of the C domain.