

## МИЕЛОМНЫЙ ИММУНОГЛОБУЛИН ЧЕЛОВЕКА ЧЕТВЕРТОГО ПОДКЛАССА (IgG4 MAM) СОДЕРЖИТ ФРАКЦИЮ С АСИММЕТРИЧНЫМИ СВОЙСТВАМИ C<sub>H</sub>2-ДОМЕНОВ\*

© 2015 В.М. Тищенко

*Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН,  
142290 Пущино Московской обл., ул. Институтская, 3;  
факс: +7(4967)33-0553, электронная почта: tischen@vega.protres.ru*

Поступила в редакцию 31.03.14  
После доработки 02.09.14

Метастабильная долгоживущая минорная фракция была обнаружена и охарактеризована у миеломного белка IgG4 MAM методами гидро- и термодинамики. У белков этой и основной фракций имеются различия в константе седиментации. Также уровень стабильности двух C<sub>H</sub>2-доменов у белка минорной фракции различается. Уникальные характеристики этих конформеров IgG4 MAM связаны с тем, что в процессе обмена тяжелыми цепями между молекулами IgG4 у части из них вместо двух канонических межцепевых дисульфидных связей Cys226–Cys226 и Cys229–Cys229 в центральной части «шарнирного участка», по-видимому, образуется лишь одна неканоническая связь Cys226–Cys229. Это приводит к асимметричной структуре у молекул IgG4 MAM.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** иммуноглобулин IgG4, C<sub>H</sub>2-домен, стабильность, углеводная компонента, дисульфидная связь.

Иммуноглобулины человека класса G, принадлежащие к четырем подклассам, являются высокомолекулярными структурами, состоящими из двух идентичных легких и двух идентичных тяжелых цепей (H<sub>2</sub>L<sub>2</sub>) [1–4]. Каждая легкая цепь свернута в два глобулярных домена, а каждая тяжелая цепь свернута в четыре глобулярных домена, причем в середине этой цепи (между C<sub>H</sub>1- и C<sub>H</sub>2-доменами) имеется участок с уникальной первичной последовательностью. N-Концевые половины H-цепей и L-цепи образуют две антигенсвязывающие Fab-субъединицы, а C-концевые половины H-цепей – одну Fc-субъ-

единицу [5, 6], ответственную за ряд эффекторных функций: взаимодействие с фактором системы комплемента C1q, белками A и G, а также многочисленными клеточными рецепторами [7, 8]. В интактной молекуле Fab- и Fc-субъединицы соединены вышеупомянутым так называемым «шарнирным» участком. Он может быть подразделен на три сегмента: жесткую и высокостабильную «сердцевину» (core hinge) [9–15], образованную двойной поли-L-пролиновой спиралью, перешитой дисульфидными связями, и гибкого верхнего (upper hinge) и нижнего (low hinge) сегментов. Два последних сегмента обеспечивают внутримолекулярную подвижность Fab- и Fc-субъединиц и гибкость всей молекулы Ig, что показано как методами рентгеноструктурного анализа [11, 12, 16, 17], так и деполяризации флуоресценции [18].

Однако в последнее десятилетие было показано, что, как минимум, некоторые подклассы IgG способны еще к одному, принципиально иному виду конформационной подвижности, которая связана с перегруппировками дисульфидных связей и приводит к образованию конформеров. Так, у IgG2 в результате внутримолекулярной перегруппировки этих связей образуются конформеры, у которых одна, а затем и вторая Fab-субъединицы оказываются сближен-

Принятые сокращения: IgG4 MAM – миеломный иммуноглобулин человека класса G, относящийся к четвертому подклассу и полученный из пациента MAM; H (L)-цепи – тяжелые (легкие) цепи; C<sub>H</sub>2(3) – константные домены, образующие Fc-субъединицу (фрагмент); V<sub>H</sub> – вариабельные домены тяжелой цепи; V<sub>L</sub> – вариабельные домены легкой цепи; Fv-субфрагмент – структура, образованная парой вариабельных доменов V<sub>L</sub>–V<sub>H</sub>; гомобифункциональный реагент DSS – дисукцинимидный эфир пробковой кислоты; гетеробифункциональный реагент SPDP – N-сукцинимидил 3-(2-пиридилдитио)пропионат; флуоресцентная метка FITC – флуоресцеин изотиоцианат; DTT – дитиотреитол; GuHCl – гуанидингидрохлорид.

\* Первоначально английский вариант рукописи был опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow), Papers in Press, BM14-081, 28.12.2014.

ными с Fc-субъединицей [19–22]. Как показано нами ранее [23], на первом этапе этот процесс приводит к образованию асимметричной структуры IgG2, и это проявляется, в частности в том, что C<sub>H</sub>2-домены различаются по термодинамическим свойствам.

Молекулы IgG4 согласно многочисленным данным также способны к перегруппировкам S–S-связей, но несколько иного характера. В ходе ее реализации первоначально происходит разрыв межцепочечных связей двух тяжелых цепей одной молекулы, а затем и обмен половины молекулы на аналогичную половину другой молекулы (так называемый механизм heavy-chain exchange или Fab-arm exchange) [24–27].

Возникает вполне естественный и закономерный вопрос о том, какие именно структурные изменения в молекулах IgG4 могут возникать в ходе подобных перегруппировок межцепочечных дисульфидных связей на отдельных этапах этой реакции, а также какими конформационными изменениями в конкретных доменах они будут сопровождаться. Для корректного ответа на эти вопросы прежде всего необходимо попытаться получить экспериментальные данные о наличии промежуточных стадий у этого процесса (быстрых кинетических или относительно долгоживущих метастабильных), а затем при положительном ответе охарактеризовать их. Оказалось, что IgG4 МАМ может находиться в промежуточном долгоживущем метастабильном состоянии, что позволило использовать для исследования комплексный подход, основанный на применении гидродинамических, оптических и калориметрических методов.

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Выделение, типирование миеломного IgG4, получение его Fab- и Fc-фрагментов и C<sub>H</sub>2-доменов.** Миеломный IgG4 МАМ был выделен из сыворотки крови большого множественной миеломой по стандартной методике, равно как и IgG кролика и козы [28–30]. Все процедуры проводились в максимально сжатые сроки при температуре 4°. Принадлежность IgG МАМ к четвертому подклассу, а его легкой цепи к λ-типу были подтверждены в тесте двойной иммунодиффузии в геле [31]. Количество межцепочечных дисульфидных связей и свободных SH-групп было определено с помощью <sup>14</sup>C-йодуксусной кислоты [32]. Fab- и Fc-фрагменты из этих антител были получены путем стандартного протеолиза с использованием папаина [28–30], а затем отделены от нерасщепившегося материала хроматографией на колонке с Sephadex и друг от друга

на колонке с Mono Q [33, 34]. Fv-субфрагменты из анти-Fab-фрагментов кролика и козы были получены методом низкотемпературного протеолиза пепсином, как описано ранее [35]. Образующие его V<sub>H</sub>- и V<sub>L</sub>-домены перешивались с помощью SPDP либо DSS по методикам, описанным ранее [36, 37]. Идентификацию Fc-фрагментов осуществляли иммуноэлектрофоретически, используя антисыворотки к легким и тяжелым цепям IgG, а также ко всем белкам сыворотки крови [38]. N-Концевые аминокислотные остатки тяжелых и легких цепей были определены с помощью дансилхлоридного метода [39], а их C-концевые остатки – с помощью карбокси-пептидазы [40], как в наших более ранних работах [41, 42]. Белок основной фракции препарата IgG4 МАМ (см. ниже) с частично восстановленными неселективным образом дисульфидными связями между H-цепями был получен и алкилирован по методике, описанной в работе Михаэлсен с соавт. [43], при 10 мМ концентрации DTT и 20 мМ концентрации йодацетамида либо <sup>14</sup>C йодуксусной кислотой. Тяжелые и легкие цепи разделялись с помощью гель-фильтрации белка с восстановленными дисульфидными связями в 6 М GuHCl.

C<sub>H</sub>2-Домены были получены из папаиновых Fc-фрагментов IgG4 путем трипсинового гидролиза, как описано ранее [44, 45], однако, во-первых, инкубация до протеолиза проводилась не при pH 2,5, а при pH 2,8 [45–47]. Во-вторых, с целью стабилизации лабильной структуры этих доменов гидролиз проводился в присутствии Fab-фрагментов из антител кролика против C<sub>H</sub>2-доменов при соотношении C<sub>H</sub>2 : Fab 1 : 1 [47–49]. По завершении реакции комплекс C<sub>H</sub>2–Fab диссоциировали при pH 4,0 (10 мМ глициновый буфер), и два белка разделяли гель-фильтрацией при указанных условиях. Полученные таким образом фрагменты были гомогенны как по данным SDS-электрофореза [50], так и по данным двумерного иммуноэлектрофореза с применением коммерческих моно- и полиспецифических антисывороток по методике Лоурелл [51].

**Получение антител против интактного IgG4 МАМ, его Fab- и Fc-фрагментов и C<sub>H</sub>2-доменов.** Антитела против интактного IgG4 МАМ, его Fab- и Fc-фрагментов и C<sub>H</sub>2-доменов (как обычных, так и меченых флуоресцентной меткой) были получены путем иммунизации кролика и козы соответствующими белками, включая меченые [46]. Антитела против флуоресцентной метки были получены в результате иммунизации животных БСА, модифицированным FITC. Процедуры, связанные с аффинной хроматографией, выполнялись, как описано ранее [46].

**Получение IgG4 МАМ, селективно меченого флуоресцентной меткой по C<sub>H</sub>2- и C<sub>H</sub>3-доменам, а также гипермодифицированного белка.** Для селективной модификации белков флуоресцентной меткой FITC процедура осуществлялась в 200 мМ боратном буфере (рН 8,9), содержащем 150 мМ NaCl, в течение 12 ч при 4° при соотношении белок : метка 2 : 1 [46, 47, 49, 52]. Единственное отступление от использованной далее оригинальной методики [52] состояло в незначительном понижении рН раствора (с 9,1 до 8,9). При гипермодификации соотношение белок : метка составляло 1 : 4, а время было увеличено до 24 ч. Количество метки, включенной в Fc-фрагмент, определялось из отношения оптической плотности раствора при 495 и 470 нм [53]. Интактные белки IgG4 МАМ, у которых флуоресцентная метка была включена либо в C<sub>H</sub>2-, либо в C<sub>H</sub>3-домены, были выделены, как описано ранее [46, 47], в результате аффинной хроматографии с использованием иммобилизованных антител кролика. Гипермодифицированные образцы были получены в результате аффинной хроматографии с использованием антител против FITC-БСА. Все образцы белков готовились из тщательно дегазированных буферных растворов и хранились в атмосфере азота.

**Определение молекулярной массы.** Молекулярную массу интактного IgG4 и фрагментов определяли с помощью высокоскоростного (средневесовую массу  $M_w$ ) и низкоскоростного ( $z$ -среднюю массу  $M_z$ ) равновесного центрифугирования с использованием методов Ифантиса [54] и Ван-Холда—Болдуина [55] на скоростной аналитической ультрацентрифуге «Beckman Spinco» модель E («Beckman Coulter», США) и на ультрацентрифуге «МОМ» («МОМ», Венгрия) при 20°. Равновесное центрифугирование осуществлялось в случае как интактных иммуноглобулинов в водных буферных растворах, так и в присутствии 6 М GuHCl при неполном заполнении ячеек с тем, чтобы равновесие в ходе экспериментов было достигнуто за более короткое время. Как известно, время, необходимое для достижения равновесия в ячейке, пропорционально квадрату высоты слоя жидкости [56]. Это может быть критически важным для столь крупных молекул, как IgG4, когда они пребывают в метастабильном состоянии. Равновесие достигалось в течение 12–14 ч, в контрольном эксперименте время центрифугирования было увеличено до 24 ч.

Ошибка в определении молекулярных масс при частичном заполнении ячеек возрастает, поскольку для надежного анализа остается укороченный фрагмент кривой, который описывает смещение интерференционной полосы в за-

висимости от радиуса вращения. При экспериментах с C<sub>H</sub>2-доменами ячейки заполнялись полностью.

**Определение коэффициента седиментации.** Седиментация интактного IgG4 МАМ и его C<sub>H</sub>2-доменов изучалась на ультрацентрифуге «Beckman» (модель E) при скоростях вращения ротора 24 050 и 50 150 об/мин соответственно. Для регистрации использовалась либо шпирен-оптика при концентрации белка 2–9 мг/мл, либо двулучевая ультрафиолетовая система на длинах волн 230 и 278 нм при концентрациях белка 0,05–0,3 мг/мл. Коэффициенты седиментации определяли в 1 мМ буфере (фосфатном или глициновом) в присутствии 150 мМ NaCl (при необходимости добавляли 10 мМ DTT). Величину константы седиментации  $s_{20}^0$  определяли путем экстраполяции значений коэффициентов седиментации к нулевой концентрации.

**Исследования конформационных изменений в Fc-фрагментах методом флуоресцентной спектроскопии.** Исследования индуцируемых температурой конформационных изменений в белках проводили, измеряя интенсивность флуоресценции раствора в интервале 460–600 нм при длине волны возбуждения 450 нм на спектрофлуориметре Shimadzu RF-5301 PC («Shimadzu», Япония) с использованием термостатируемой ячейки. Рабочие концентрации исследуемых растворов находились в интервале 0,05–0,3 мг/мл. Скорость прогрева варьировалась в интервале 0,25–2 град/мин. Перед любыми экспериментами осуществляли гель-фильтрацию исследуемых образцов на колонках с ультрагелями AcA-34 или AcA-44 («LKB», Швеция), уравновешенных соответствующими буферными растворами. Полученные температурные зависимости флуоресценции анализировали по методу, описанному ранее [46, 49, 52, 57].

**Калориметрические измерения и расчет термодинамических данных.** Все эксперименты проводили на микрокалориметрах ДАСМ-4А с золотой капиллярной ячейкой объемом 1 мл и ДАСМ-4 с платиновой капиллярной спиралевидной ячейкой объемом 0,43 мл. Концентрацию белков в растворе изменяли в интервале 1–6 мг/мл. Измерения проводили со скоростями 0,25–2 град/мин. Калориметрические кривые были обработаны, как это описано в работе Привалова и Потехина [58].

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Миеломный IgG4 МАМ состоит из двух фракций с различными иммунологическими свойствами.** С помощью аффинной хроматографии на ко-

лонке с иммобилизованными антителами козы против IgG4 МАМ, уравновешенной 1 мМ фосфатным буфером (рН 7,0), данный белок можно разделить на две фракции. Основная фракция (около 90%) элюируется с колонки с помощью Fab- и Fc-фрагментов, а минорная (около 10%) может быть удалена при более жестких условиях (10 мМ глициновый буфер, рН 4,0). При хранении в течение пяти суток при физиологических условиях (1 мМ фосфатный буфер, рН 7,0, 20°) в обеих фракциях происходит новое расслоение на две фракции с прежним количественным соотношением. Необходимо, однако, отметить, что постепенно и еще более медленно (при используемых концентрациях 2–3 мг/мл) в крайне незначительных количествах накапливается и фракция, характеристики белка в которой отличаются как от основного, так и от минорного по такому параметру, как молекулярная масса.

**Фракции IgG4 МАМ образуются в результате обмена тяжелыми цепями.** К IgG4 МАМ основной фракции (2 мг/мл в 1 мМ фосфатном буфере, рН 7,0) было добавлено эквимольное количество этого же белка, гипермодифицированного FITC. В результате описанной выше процедуры гипермодификации каждая молекула белка содержала три флуоресцентные метки (в среднем). По истечении пяти суток инкубации было обнаружено, что свыше 85% IgG4 МАМ как основной, так и минорной фракций сорбируются на колонке с иммобилизованными антителами против FITC и, следовательно, модифицированы как минимум одной молекулой FITC. Более того, накопление минорной фракции проходило практически симбатно с ростом количества молекул, которые содержат хотя бы одну флуоресцентную метку.

Также отметим, что кинетика обмена тяжелыми цепями у белков основной фракции с частично восстановленными дисульфидными связями подробно не исследовалась. Однако можно прийти к заключению с помощью описанной выше процедуры, что хотя она немного ускоряется (максимум в 2 раза), но при этом остается достаточно медленной.

**Белки из обеих фракций находятся в состоянии мономера.** Наличие двух фракций IgG4 МАМ с относительно невысокой скоростью релаксации из одной фракции в другую позволяет изучить некоторые физико-химические параметры этого белка в каждом из состояний. Т.к. далее будут исследоваться лишь внутримолекулярные свойства белков, то необходимо убедиться, что представители двух фракций по меньшей мере при определенных условиях находятся в форме мономеров. Такая постановка вопроса является тем более актуальной, пос-

кольку, как уже отмечалось выше [24–27], молекулы IgG4 способны обмениваться своими половинками, что подразумевает наличие межмолекулярных контактов. Поэтому молекулярные массы белков обеих фракций были определены методами равновесного центрифугирования, в результате которых рассчитывались средневесовая молекулярная масса  $M_w$  и z-средняя масса  $M_z$  (таблица).

Видно, что средневесовая масса для белка из основной фракции равна  $M_w = 153 \pm 8$  кДа, а z-средняя масса  $M_z = 156 \pm 11$  кДа; для белка из второй фракции  $M_w = 154 \pm 8$  кДа,  $M_z = 159 \pm 11$  кДа. Поскольку  $M_w$  и  $M_z$  по-разному чувствительны к наличию агрегатов, то из полученных данных можно сделать следующие выводы. Во-первых, оба белка не различаются по молекулярной массе, во-вторых, оба находятся в форме мономера, что согласуется с данными, ранее полученными для нефракционированного IgG4 [29]. Кроме того, стандартным SDS-электрофорезом нефракционированного белка с восстановленными S–S-связями было показано наличие лишь двух четких полос, соответствующих тяжелой и легкой цепям [30]. Это указывает, по меньшей мере, на близость, если не полное совпадение молекулярных масс как тяжелой, так и легкой цепей у белков из двух фракций. Необходимо отметить и следующий момент. Сам механизм обмена между двумя половинками молекул IgG4 требует контакта между двумя молекулами. Практически совпадающие значения молекулярных масс при различных временах центрифугирования указывают, что равновесие мономер–димер у двух фракций сильно сдвинуто в сторону мономеров (таблица), а характерное время, связанное с образованием агрегатов, превышает несколько суток.

Также отметим, что умеренные концентрации DDT не влияют на величину молекулярной массы у белков из обеих фракций, хотя после восстановления единственной дисульфидной связи у IgG4 МАМ минорной фракции (см. ниже) этот белок является димером (HL + HL) без ковалентных связей, что приводит к его диссоциации в 6 М GuHCl. В нативных условиях наличие указанного димера обусловлено за счет исключительно интенсивных взаимодействий между C<sub>H3</sub>-доменами двух H-цепей [59–62] и, следовательно, очень низкой константой диссоциации этого димера. Поэтому при тех концентрациях белка, которые используются в последующих экспериментах, равновесие очень сильно сдвинуто в сторону димера.

N-Концевая часть тяжелых цепей у белков из обеих фракций заблокирована. В качестве N-концевого аминокислотного остатка у легких цепей

Характеристики белков двух фракций IgG4 МАМ

Белок, фрагмент	Мол. масса, кДа	Седиментация, S	Температура, град	Энтальпия, кДж моль <sup>-1</sup>	Количество SH-групп <sup>16</sup>
IgG4 МАМ <sup>1</sup>	153 ± 8 <sup>10</sup> 156 ± 11 <sup>11</sup>	6,5 ± 0,05			0,02
IgG4 МАМ <sup>2</sup>	154 ± 8 <sup>10</sup> 159 ± 11 <sup>11</sup>	6,3 ± 0,05	47,8 <sup>12</sup> ; 46,9 <sup>14</sup> 61,8 <sup>13</sup> ; 62,4 <sup>15</sup>	208 <sup>12</sup> ; 219 <sup>14</sup> 248 <sup>13</sup> ; 237 <sup>15</sup>	1,86
IgG4 МАМ <sup>3</sup>	155 ± 8 <sup>10</sup> 158 ± 1 <sup>11</sup>	6,3 ± 0,05			1,91
IgG4 МАМ <sup>4</sup>	76 ± 4 <sup>10</sup> 77 ± 6 <sup>11</sup>	5,3 ± 0,05			4,07
IgG4 МАМ <sup>5</sup>	151 ± 8 <sup>10</sup> 157 ± 11 <sup>11</sup>	6,2 ± 0,05	— — — —	— — —	0,03
IgG4 МАМ <sup>6</sup>	153 ± 8 <sup>10</sup> 158 ± 11 <sup>11</sup>	5,9 ± 0,05	— — — —	— —	1,81
C <sub>H</sub> 2-домен	14,7 ± 0,5 <sup>10</sup>	1,25 ± 0,02	— 46,6 <sup>14</sup>	— 207 <sup>14</sup>	0,01
IgG4 <sup>7</sup>	14,6 ± 0,7 <sup>11</sup>				
C <sub>H</sub> 2-домен	14,4 ± 0,5 <sup>10</sup>	1,20 ± 0,02	— 50,2 <sup>14</sup>	— 216 <sup>14</sup>	0,01
IgG4 <sup>8</sup>	14,5 ± 0,7 <sup>11</sup>				
Агрегаты	310–1200				1,03; 0,62;
IgG4 <sup>9</sup>					0,47

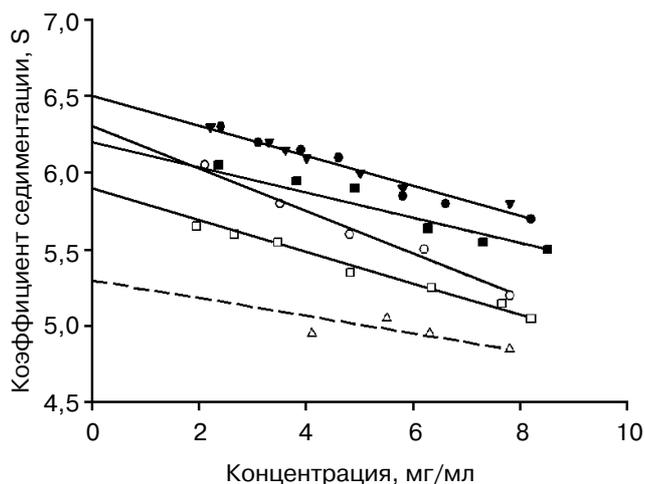
Примечание. <sup>1,2</sup> – основная и минорная фракция IgG4 МАМ при pH 7,0; <sup>3,4</sup> – основная и минорная фракция IgG4 МАМ при pH 7,0 и 10 mM DTT + 6 M GuHCl; <sup>5,6</sup> – основная и минорная фракция IgG4 МАМ при pH 4,0; <sup>7,8</sup> – фракция C<sub>H</sub>2-доменов с большим (меньшим) положительным зарядом; <sup>9</sup> – димер, тример, тетрамер по данным гель-фильтрации; <sup>10,11</sup> – средневесовая молекулярная масса и z-средняя молекулярная масса; <sup>12,13</sup> – температура и энтальпия для первого и второго элементарных переходов, определенные из калориметрических кривых; ошибки ± 0,5° и ± 12 кДж моль<sup>-1</sup>; <sup>14,15</sup> – температура и энтальпия для первого и второго элементарных переходов и для изолированных C<sub>H</sub>2-доменов, определенные из оптических кривых; ошибки ± 1,5° и ± 21 кДж моль<sup>-1</sup>; <sup>16</sup> – в расчете на мономер IgG (150 кДа).

в обеих фракциях обнаружен Gly. В качестве C-концевого аминокислотного остатка у тяжелой цепи найден Gly, а у легкой цепи – Ser у белков из обеих фракций [9]. Эти данные, во-первых, подтверждают правильность отнесения белка МАМ к IgG4(λ) [29, 30], а также указывают на то, что наличие самих фракций не связано с частичной деградацией какой-либо из четырех полипептидных цепей, образующих интактную молекулу IgG4 МАМ.

**У белка минорной фракции присутствует одна SH-группа на одну N-цепь.** В белке минорной фракции присутствуют свободные SH-группы, наличие которых было подтверждено в результате его титрования <sup>14</sup>C йодуксусной кислотой [63, 64]. Согласно этим данным, у такого белка присутствует одна свободная SH-группа, которая находится именно в N-цепи в количестве

одной группы на цепь. Однозначно об этом свидетельствуют данные по гель-фильтрации в денатурирующих условиях IgG4 МАМ из указанной фракции, когда у белка восстановлены дисульфидные связи [32, 63, 64]. При этом было обнаружено, что радиоактивная метка находится только в тяжелой цепи, но отсутствует в легкой (см. таблицу, данные по гель-фильтрации не представлены). Также на это указывает следующий факт: при умеренных концентрациях восстанавливающих агентов, когда у белков мажорной фракции лишь частично восстанавливаются межцепевые дисульфидные связи, у белков минорной фракции эти связи полностью исчезают. Об этом свидетельствуют данные по ультрацентрифугированию в 6 M GuHCl.

**Определение константы седиментации IgG4 основной и минорной фракций.** Большое время



**Рис. 1.** Определение константы седиментации IgG4 MAM при pH 7,0 (10 мМ фосфатный буфер, 150 мМ NaCl) для белка основной (черный кружок) и минорной (светлый кружок) фракции, белка основной фракции с одной восстановленной дисульфидной связью (черный треугольник), белка минорной фракции с восстановленной дисульфидной связью (светлый треугольник); при pH 4,0 (50 мМ глициновый буфер, 150 мМ NaCl) для белка основной (черный квадрат) и минорной (светлый квадрат) фракции

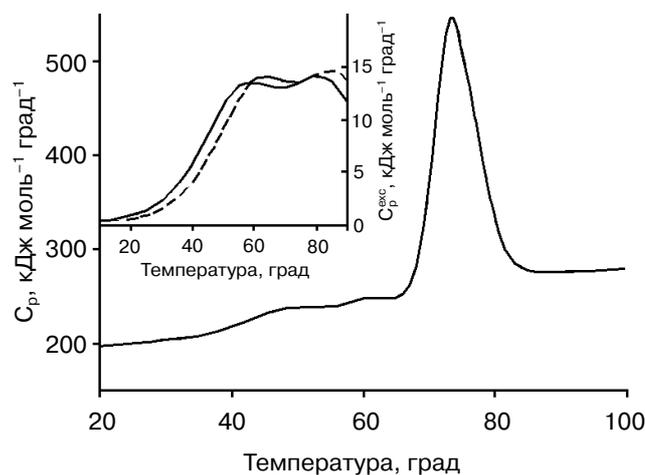
релаксации позволяет определить коэффициент седиментации интактных белков из двух фракций. На рис. 1 представлены соответствующие результаты. Видно, что белки из двух фракций характеризуются различными величинами константы седиментации  $s_{20}^0$ . Для белка, который принадлежит к основной фракции, эта величина составляет  $6,50 \pm 0,05$  S, что весьма близко к значению, которое было получено ранее для IgG4 в работах Грегори с соавт. [65] и Абе с соавт. [66]. Также видно, что при частичном неселективном восстановлении одной из двух дисульфидных связей между N-цепями не наблюдаются изменения гидродинамических параметров IgG4 MAM из мажорной фракции (рис. 1, таблица).

Для интактного белка из минорной фракции величина  $s_{20}^0$  незначительно, но вполне достоверно отличается и составляет  $6,3 \pm 0,05$  S. На достоверность различий указывает не только разница в величинах  $s_{20}^0$  для двух конформеров, но и намного более четкие различия в наклонах прямых, описывающих зависимость коэффициента седиментации от концентрации (коэффициент неидеальности  $k_s$  [67]), как это видно из рис. 1. Обращает на себя внимание, что различия в гидродинамических свойствах белков из двух фракций сохраняются также и при pH 4,0 (таблица). Это означает, что различия в свой-

ствах у конформеров в случае IgG4 MAM не связаны со свойством иммуноглобулинов находиться при физиологических условиях в метастабильном состоянии после предварительной инкубации белка в кислой области pH [44, 45, 68]. Как показано нами ранее [59, 62], это состояние может быть долгоживущим для ряда миеломных белков.

В случае принадлежности белка к минорной фракции добавление тех же концентраций DTT приводит к весьма значительным изменениям его гидродинамических параметров (рис. 1, таблица). Однако следует иметь в виду, что в данном случае константа седиментации  $s_{20}^0$  не имеет строгого значения, поскольку в этом случае мы имеем дело с нековалентным димером HL + HL. При этом равновесие у него сдвинуто в сторону димеризации и при достаточно низких концентрациях белка ввиду высокого сродства между C<sub>H</sub>3-доменами [7, 8, 12, 16, 46, 52].

**Калориметрические исследования IgG4 двух фракций.** Белки, представляющие фракции, различаются также и по термодинамическим характеристикам. Зависимость от температуры для молярной теплоемкости IgG4 MAM минорной фракции, которая получена из кривой плавления при pH 5,8, представлена на рис. 2. Данные условия были выбраны ввиду следующих причин. С одной стороны, желательно иметь результаты, полученные при условиях, максимально приближенных к физиологическим. С



**Рис. 2.** а – Температурная зависимость молярной парциальной теплоемкости IgG4 MAM; б – часть кривой зависимости избыточной молярной теплоемкости от температуры при отсутствии анти-C<sub>H</sub>2 Fab(Fv)-фрагментов (сплошная линия) и при наличии анти-C<sub>H</sub>2 Fab(Fv)-фрагментов в эквимольном количестве с C<sub>H</sub>2-доменами (пунктирная линия). Условия: 10 мМ фосфатный буфер (pH 5,8) при концентрации IgG4 20 μM мл<sup>-1</sup> (3 мг мл<sup>-1</sup>)

другой стороны, для полноценного термодинамического анализа требуются данные, полученные в равновесных условиях, которые только и дают возможность провести корректный термодинамический анализ и рассчитать все необходимые термодинамические функции. Однако следует подчеркнуть, что при повышении pH до 7,0 вид кривой плавления кардинально не меняется, что дает основания считать полученные ниже данные верными также и при физиологических условиях.

Обращает на себя внимание обстоятельство, что та часть кривой плавления IgG4 МАМ из минорной фракции, которая описывает процессы в области относительно низких температур, имеет весьма существенные особенности (рис. 2). Ранее на кривой теплопоглощения белка IgG4, который можно отнести к основной фракции, в этой области присутствовал лишь один пик теплопоглощения [40, 69], как это обычно и наблюдалось при плавлении целого ряда других интактных IgG и их Fc-фрагментов. При этом белки представляли не только различные подклассы IgG человека, но также были получены из различных животных [29, 30, 41, 46, 70, 71]. Т.е. это являлось достаточно общим правилом, отражавшим общий принцип структурной организации Fc-субъединиц в молекулах IgG. На аналогичной же кривой плавления белка минорной фракции в указанной области отчетливо видны два максимума, что указывает на присутствие в этом температурном интервале как минимум двух элементарных пиков теплопоглощения, каждый из которых отвечает плавлению одного кооперативного блока (домена).

Ранее было неоднократно показано для всех исследованных иммуноглобулинов, что процесс плавления в низкотемпературной области целиком обусловлен распадом кооперативной структуры двух C<sub>H</sub>2-доменов. При этом почти все полученные данные вполне однозначно свидетельствовали о плавлении двух идентичных и практически невзаимодействующих доменов. Лишь при изучении миеломного IgG2 МАТ на кривых плавления интактного белка в низкотемпературной области также удалось зафиксировать картину, аналогичную описанной выше для минорной фракции IgG4 МАМ [41, 47]. Т.е. на кривой плавления указанного белка присутствовало два отдельных пика теплопоглощения, соответствующих плавлению двух невзаимодействующих, но различающихся по термостабильности C<sub>H</sub>2-доменов. Примечательно при этом, что структура IgG2 МАТ согласно данным электронной микроскопии обладает четко выраженной асимметрией ввиду того, что к одному из C<sub>H</sub>2-доменов примыкает Fab-субъединица [23].

Для того чтобы не по аналогии, а напрямую однозначно интерпретировать интересующую нас низкотемпературную часть калориметрической кривой плавления IgG4 МАМ, использовались два независимых подхода. Первый подход, ранее уже неоднократно апробированный при изучении других IgG [46, 47, 52], основан на селективном введении флуоресцентной метки в определенные домены. Данный подход был использован и в настоящей работе.

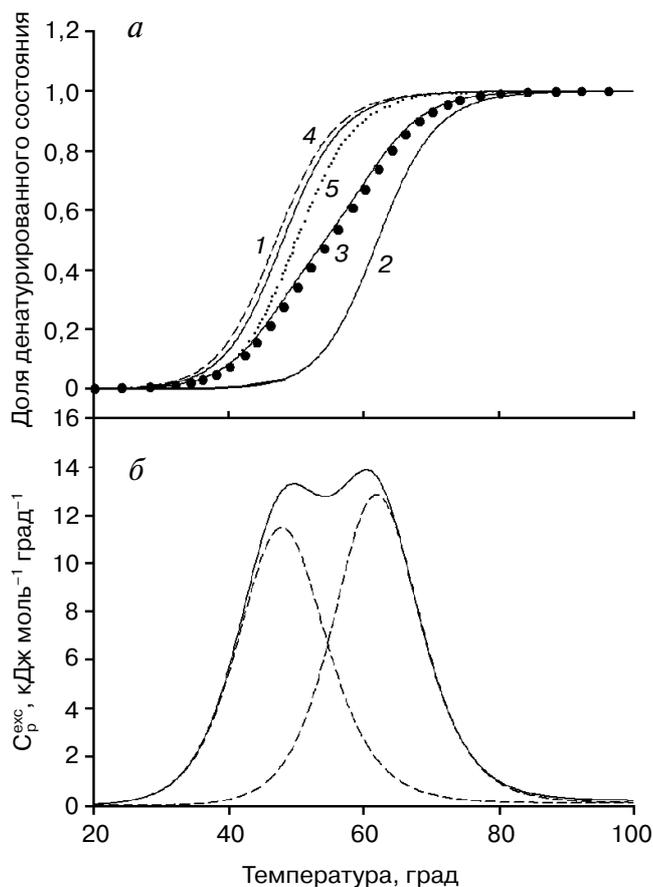
Как видно из данных, представленных на рис. 3 и в таблице, при этом были получены такие результаты, которые подтверждают предположения о том, что низкотемпературные пики на кривой плавления минорной фракции IgG4 МАМ связаны с распадом структуры двух C<sub>H</sub>2-доменов (рис. 2). Кроме того, полученные результаты позволяют удовлетворительно разложить кривую перехода (изменение доли денатурированного состояния, вычисленного на основании экспериментальной оптической кривой плавления) на два перехода, постулируя их количество (рис. 3, а, кривые 1, 2). Естественно, что все термодинамические параметры для указанных переходов, которые можно рассчитать на основании оптических кривых, особенно энтальпия их плавления, определяются с весьма значительной погрешностью. Однако на данном этапе крайне важно, что полученные данные совершенно определенно свидетельствуют о том, что плавление C<sub>H</sub>2-доменов происходит как по оптическим, так и по калориметрическим данным в совпадающем температурном интервале, как это видно из сопоставления соответствующих интервалов на рис. 3, а и б.

Кроме того, для анализа кривой плавления минорной фракции IgG4 МАМ был применен также и новый подход, который связан с использованием антител (точнее, их Fab-фрагментов либо Fv-субфрагментов) против различных участков интактного белка. Использовались Fab-фрагменты (Fv-субфрагменты) против C<sub>H</sub>2- и C<sub>H</sub>3-доменов, а также против Fab-субъединиц. Часть полученных результатов представлена на рис. 2, б, и из этих данных следует, что на калориметрической кривой плавления изменения наблюдались в низкотемпературной области тогда и только тогда, когда использовались Fab-фрагменты (Fv-субфрагменты) против C<sub>H</sub>2-доменов. Видно, что наблюдаются изменения в положении максимумов обоих пиков в низкотемпературном интервале. При этом изменения на калориметрической кривой плавления в области более высоких температур фиксировались тогда и только тогда, когда использовались анти-Fab(Fv)-фрагменты против Fab-субъединиц либо против C<sub>H</sub>3-доменов (данные не представлены).

Качественные данные о том, что оптическая кривая плавления IgG4 МАМ отражает распад именно двух кооперативных блоков, образованных двумя независимыми  $C_{H2}$ -доменами, также полностью подтверждаются более строгим термодинамическим анализом кривых избыточного теплопоглощения [58, 72]. Результаты представлены на рис. 3, б и в таблице. Видно, что имеется именно два элементарных перехода, которые соответствуют плавлению двух различающихся кооперативных блоков. Результаты не со-

ответствуют модели молекулы в растворе, основанной на совокупности термодинамических и структурных данных для IgG (Fc-фрагментам), согласно которой два  $C_{H2}$ -домена являются не взаимодействующими и идентичными по характеристикам. Последнее возможно лишь в случае, когда не только сами домены тождественны по составу белковой матрицы, а углеводные компоненты имеют близкий состав, но и Fc-субъединица (фрагмент) имеет симметричную структуру и окружение [11, 12, 73, 74].

Поэтому результаты можно объяснить просто, учитывая, что термостабильность  $C_{H2}$ -доменов определяется не только структурой самой глобулы, но и углеводной компонентой, которой у всех IgG модифицирован консервативный Asn297 [71].  $C_{H2}$ -Домены были выделены из тех интактных белков, которые принадлежали к минорной фракции, разделены на колонке с Mono Q [75] на две новые субфракции, кривые плавления которых были получены при регистрировании изменений интенсивности флуоресценции (рис. 3, а). Согласно этим данным, термостабильность  $C_{H2}$ -доменов из субфракций лишь немного различается (таблица).



**Рис. 3.** а — Изменение доли денатурированного состояния  $C_{H2}$ -доменов у IgG4 МАМ минорной фракции, определенное на основе данных по изменению интенсивности флуоресценции для интактного белка (черные круги) и результаты разложения на элементарные переходы, соответствующие плавлению каждого из двух  $C_{H2}$ -доменов (кривые 1 и 2). Кривая 3 является суммой кривых 1 и 2. Кривые 4 (пунктирная линия) и 5 (точки) соответствуют плавлению двух изолированных  $C_{H2}$ -доменов, полученных из IgG4 МАМ минорной фракции; б — температурная зависимость избыточного теплопоглощения при плавлении  $C_{H2}$ -доменов (сплошная линия) и результаты ее разложения на элементарные переходы, соответствующие плавлению каждого из указанных двух доменов (пунктирная линия)

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Основываясь на представленных выше данных, можно вполне однозначно констатировать как появление конформеров у молекул IgG4 МАМ, отличающихся по свойствам от стандартного IgG4, так и предложить структуру этих конформеров. Согласно результатам, которые были получены в экспериментах с использованием гипермодифицированного белка, минорная фракция образуется в результате обмена тяжелыми цепями (вместе с примыкающими легкими цепями) двух молекул IgG4 МАМ. Наиболее разумное предположение о механизме обмена тяжелых цепей заключается в том, что на промежуточном этапе происходит размыкание межцепочечных связей Cys226—Cys226, Cys229—Cys229 и образование внутрицепочечных связей Cys226—Cys229 [26]. Затем исходный белок, лишенный ковалентных связей между двумя своими половинами, диссоциирует, и процесс новой димеризации происходит с мономером НL другого белка, образованного подобным же образом. Формирование новой молекулы IgG4 завершается образованием двух канонических связей между тяжелыми цепями. Представленные нами данные по центрифугированию белка из минорной фракции в денатурирующих условиях (6 М GuHCl), но без восстанавливающих дисульфидные связи реагентов вполне однозначно

свидетельствуют о том, что он сохраняет с помощью дисульфидных связей форму тетрамера  $H_2L_2$ . Вместе с тем данные по титрованию белка минорной фракции позволяют констатировать появление одной свободной SH-группы именно в тяжелой цепи. Это приводит к однозначному заключению, что из двух межцепевых дисульфидных связей сохраняется лишь одна.

Возникает естественный вопрос о том, какая из двух межцепевых дисульфидных связей реализуется в его структуре. Для ответа на него можно получить соответствующие пептиды из «шарнирного» участка IgG4 МАМ минорной фракции, в которых локализованы указанные связи, и определить, какие именно остатки Cys модифицированы  $^{14}C$  йодуксусной кислотой.

Имеется, однако, и иная возможность сделать определенный вывод относительно этой задачи. Ранее уже было показано, что частичное восстановление (и последующее алкилирование) межцепевых дисульфидных связей у миеломного IgG4 не приводит к изменению такого параметра как гидродинамический объем, который характеризует общую конфигурацию белковых молекул [43]. Согласно более точному определению конфигурации молекул основной фракции IgG4 МАМ как с интактными, так и с частично восстановленными межцепевыми дисульфидными связями можно прийти к заключению, что остается практически неизменной не только константа седиментации  $s_{20}^0$  у двух белков, но и наклон, определяющий концентрационную зависимость коэффициентов седиментации  $s$ . Это следует из данных, полученных нами в результате ультрацентрифугирования и представленных в таблице. Совершенно иная картина наблюдается при центрифугировании IgG4 МАМ, принадлежащего к минорной фракции. Как константа седиментации  $s_{20}^0$  этого белка, так и соответствующий наклон имеют достоверные отличия (таблица).

Поскольку у IgG4 имеются всего две межцепевые дисульфидные связи между H-цепями, то у белков основной фракции при их частичном восстановлении сохраняется либо связь между двумя Cys226, либо между двумя Cys229 тяжелых цепей (и это не приводит к изменению гидродинамических параметров), то остается сделать вполне логическое предположение. Оно заключается в том, что у белков минорной фракции единственная дисульфидная связь реализуется не между каноническими парами Cys226–Cys226 либо Cys229–Cys229, а между Cys226 и Cys229 соседних H-цепей. Это и приводит к заметному изменению конформации всей молекулы (ее конфигурации), что проявля-

ется, в частности, в заметном падении константы седиментации  $s_{20}^0$  (таблица).

Образование такой неканонической связи с высокой вероятностью может сопровождаться также весьма заметными изменениями других характеристик макромолекулы IgG4 МАМ минорной фракции, таких как подвижность Fab-субъединиц, скорость расщепления «шарнирного» участка с измененной конформацией под действием протеолитических ферментов и др. Указанные свойства являются предметом исследования следующей стадии.

В настоящей же работе показано, что вероятное образование неканонической дисульфидной связи у IgG4 МАМ приводит к тому, что состояние двух  $C_H2$ -доменов в составе Fc-субъединицы весьма существенно различается по термостабильности. Поскольку наблюдаемый значительный эффект фиксируется лишь для указанных доменов в составе интактного белка минорной фракции, но не в случае изолированных  $C_H2$ -доменов, то остается полагать, что он обусловлен общей асимметрией молекулы. Она может возникнуть, когда Fab-субъединицы по-разному расположены относительно Fc-субъединицы. Ранее подобная ситуация наблюдалась нами для IgG2 с использованием различных методов, в частности метода электронной микроскопии [23]. Для IgG4 также показано наличие асимметрии у молекул данного подкласса [69]. Важным представляется то обстоятельство, что наличие подобной асимметричной структуры, описанной с использованием ряда методов, позволяет утверждать, что активность IgG4, отличная от активности у других подклассов, может быть обусловлена не только стерическими препятствиями со стороны Fab-субъединиц [7, 8]. Показано, что состояние одного из  $C_H2$ -доменов меняется, а это может повлечь за собой изменение его родства к целому ряду лигандов, важных для реализации иммунологических реакций. Во всяком случае, подобная картина, по-видимому, имеет место у IgG2, исследованных нами более подробно [23, 29, 30, 41, 47, 76].

Автор выражает благодарность С.А. Потехину, В.В. Филимонову за обсуждение данных по термодинамике, Дж. Вэйну (Великобритания) за помощь при получении данных по центрифугированию, А.В. Куликову за помощь при определении N- и C-концевых остатков.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (гранты 11-04-00064а, 14-04-01682а и 07-04-12199-офи).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Rutishauser, U., Cunningham, B.A., Bennett, C., Konigsberg, W.H., and Edelman, G.M. (1968) Amino acid sequence of the Fc region of a human gamma G-immunoglobulin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **61**, 1414–1421.
- Edelman, G.M., Cunningham, B.A., Gall, W.E., Gottlieb, P.D., Rutishauser, U., and Waxdal, M.J. (1969) The covalent structure of an entire gammaG immunoglobulin molecule, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **63**, 78–85.
- Gottlieb, P.D., Cunningham, B.A., Rutishauser, U., and Edelman, G.M. (1970) The covalent structure of a human gamma G-immunoglobulin. VI. Amino acid sequence of the light chain, *Biochemistry*, **9**, 3155–3161.
- Edelman, G.M. (1970) The covalent structure of a human gamma G-immunoglobulin. XI. Functional implications, *Biochemistry*, **9**, 3197–3205.
- Porter, R.R. (1959) The hydrolysis of rabbit  $\gamma$ -globulin and antibodies with crystalline papain, *Biochem. J.*, **73**, 119–126.
- Noelken, M.E., Nelson, C.A., Buckley, C.E. 3rd., and Tanford, C. (1965) Gross conformation of rabbit 7S gamma-immunoglobulin and its papain-cleaved fragments, *J. Biol. Chem.*, **240**, 218–224.
- Burton, D.R. (1985) Immunoglobulin G: functional sites, *Mol. Immunol.*, **22**, 161–206.
- Burton, D.R., and Woof, J.M. (1992) Human antibody effector function, *Adv. Immunol.*, **51**, 1–84.
- Kabat, E.A., Wu, T.T., Reid-Miller, M., Perry, H.M., and Gottesman, K. (1987) *Sequences of proteins of immunological interest*, 4th ed., National Institutes of Health, Bethesda, Md.
- Michaelsen, T.E., Natvig, J.B., and Sletten, K. (1974) Isolation of a fragment, Fh, corresponding to the hinge region of human IgG3, *Scand. J. Immunol.*, **3**, 491–498.
- Marquart, M., Deisenhofer, J., Huber, R., and Palm, W. (1980) Crystallographic refinement and atomic models of the intact immunoglobulin molecule Kol and its antigen-binding fragment at 3.0 Å and 1.9 Å resolution, *J. Mol. Biol.*, **141**, 369–391.
- Harris, L.J., Larson, S.B., Hasel, K.W., Day, J., Greenwood, A., and McPherson, A. (1992) The three-dimensional structure of an intact monoclonal antibody for canine lymphoma, *Nature*, **360**, 369–372.
- Tischenko, V.M. (1999) Fh fragment from IgG3 Kuc exist in compact and rod-like shape. In *Abstract of XI<sup>th</sup> International Conference on Small-Angle Scattering*, Brookhaven National Laboratory, p. 93.
- Тищенко В.М. (2000) Три состояния рFh фрагмента («шарнирной» области) миеломного IgG3 Kuc человека с нативоподобным содержанием вторичной структуры, *Биохимия*, **65**, 1450–1454.
- Тищенко В.М. (2011) Необычные термодинамические свойства компактной формы рFh фрагмента («шарнирной» области) IgG3 Kuc и Sur, *Молекуляр. биология*, **45**, 1055–1064.
- Harris, L.J., Skaletsky, E., and McPherson, A. (1998) Crystallographic structure of an intact IgG1 monoclonal antibody, *J. Mol. Biol.*, **275**, 861–872.
- Saphire, E.O., Stanfield, R.L., Crispin, M.D., Parren, P.W., Rudd, P.M., Dwek, R.A., Burton, D.R., and Wilson, I.A. (2002) Contrasting IgG structures reveal extreme asymmetry and flexibility, *J. Mol. Biol.*, **319**, 9–18.
- Dangl, J.L., Wensel, T.G., Morrison, S.L., Stryer, L., Herzenberg, L.A., and Oi, V.T. (1988) Segmental flexibility and complement fixation of genetically engineered chimeric human, rabbit and mouse antibodies, *EMBO J.*, **7**, 1989–1994.
- Wypych, J., Li, M., Guo, A., Zhang, Z., Martinez, T., Allen, M.J., Fodor, S., Kelner, D.N., Flynn, G.C., Liu, Y.D., Bondarenko, P.V., Ricci, M.S., Dillon, T.M., and Balland, A. (2008) Structural and functional characterization of disulfide isoforms of the human IgG2 subclass, *J. Biol. Chem.*, **283**, 16194–16205.
- Martinez, T., Guo, A., Allen, M.J., Han, M., Pace, D., Jones, J., Gillespie, R., Ketchum, R.R., Zhang, Y., and Balland, A. (2008) Disulfide connectivity of human immunoglobulin G2 structural isoforms, *Biochemistry*, **47**, 7496–7508.
- Allen, M.J., Guo, A., Martinez, T., Han, M., Flynn, G.C., Wypych, J., Liu, Y.D., Shen, W.D., Dillon, T.M., Vezina, C., and Balland, A. (2009) Interchain disulfide bonding in human IgG2 antibodies probed by site-directed mutagenesis, *Biochemistry*, **48**, 3755–3766.
- Lightle, S., Aykent, S., Lacher, N., Mitaksov, V., Wells, K., Zobel, J., and Oliphant, T. (2010) Mutations within a human IgG2 antibody form distinct and homogeneous disulfide isomers but do not affect Fc gamma receptor or C1q binding, *Prot. Sci.*, **19**, 753–762.
- Ryazantsev, S., Tischenko, V., Nguyen, C., Abramov, V., and Zav'yalov, V. (2013) Three-dimensional structure of the human myeloma IgG2, *PLoS One*, **8**, e64076.
- Schuurman, J., Perdok, G.J., Gorter, A.D., and Aalberse, R.C. (2001) The inter-heavy chain disulfide bonds of IgG4 are in equilibrium with intra-chain disulfide bonds, *Mol. Immunol.*, **38**, 1–8.
- Aalberse, R.C., and Schuurman, J. (2002) IgG4 breaking the rules, *Immunology*, **105**, 9–19.
- Rispens, T., Ooijevaar-de Heer, P., Bende, O., and Aalberse, R.C. (2011) Mechanism of immunoglobulin G4 Fab-arm exchange, *J. Am. Chem. Soc.*, **133**, 10302–10311.
- Sedykh, M.A., Buneva, V.N., and Nevinsky, G.A. (2013) Polyreactivity of natural antibodies: exchange by HL-fragments, *Biochemistry (Moscow)*, **78**, 1305–1320.
- Frangione, B., Franklin, E.C., Fudenberg, H.H., and Koshland, M.E. (1966) Structural studies of human gamma-G-myeloma proteins of different antigenic subgroups and genetic specificities, *J. Exp. Med.*, **124**, 715–732.
- Zav'yalov, V.P., Abramov, V.M., Ivannikov, A.I., Loseva, O.I., Dudich, I.V., Dudich, E.I., Tischenko, V.M., Khechinashvili, N.N., Franek, F., Medgyesi, G., Zavodszky, P., and Jatón, J.C. (1981) Correspondence between structure and function of immunoglobulin G subclasses, *Haematologia*, **14**, 85–94.
- Денесюк А.И., Тищенко В.М., Абрамов В.М., Завьялов В.П. (1983) Теоретическое и экспериментальное исследование конформации «шарнирных» участков в подклассе иммуноглобулинов G человека, *Молекуляр. биология*, **17**, 1262–1271.
- Navalkar, R.G., Norlin, M., and Ouchterlony, O. (1965) *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, **28**, 250–260.
- Michaelsen, T., and Natvig, J.B. (1974) Unusual molecular properties of human IgG3 proteins due to an extended hinge region, *J. Biol. Chem.*, **249**, 2778–2785.
- Rispens, T., Ooievaar-De Heer, P., Vermeulen, E., Schuurman, J., van der Neut Kofschoten, M., and Aalberse, R.C. (2009) Human IgG4 binds to IgG4 and conformationally altered IgG1 via Fc-Fc interactions, *J. Immunol.*, **182**, 4275–4281.
- Gilhespy-Muskett, A.M., Partridge, J., Jefferis, R., and Homans, S.W. (1994) A novel <sup>13</sup>C isotopic labelling strategy for probing the structure and dynamics of glycan chains in situ on glycoproteins, *Glycobiology*, **4**, 485–489.
- Zav'yalov, V.P., and Tishchenko, V.M. (1991) Mechanisms of generation of antibody diversity as a cause for natural

- selection homoiothermal animals in the process of evolution, *Scand. J. Immunol.*, **33**, 755–762.
36. Тищенко В.М. (2001) Состояние «шарнирной» области влияет на взаимодействие IgG3 человека с системой комплемента, *Биохимия*, **66**, 1671–1675.
  37. Близиюков О.П., Козьмин Л.Д., Высотская Л.Л., Голенков А.К., Тищенко В.М., Самойлович М.П., Климович В.П. (2005) Легкие цепи иммуноглобулинов человека образуют фибриллы амилоида и гранулярные агрегаты в растворе, *Биохимия*, **70**, 556–567.
  38. Grabar, P., and Williams, C.A. (1953) Method permitting the combined study of the electrophoretic and the immunochemical properties of protein mixtures; application to blood serum, *Biochim. Biophys. Acta*, **10**, 193–194.
  39. Walker, J.M. (1994) The dansyl method for identifying N-terminal amino acids, *Methods Mol. Biol.*, **32**, 321–328.
  40. Hartley, B.S. (1970) Strategy and tactics in protein chemistry, *Biochem. J.*, **119**, 805–812.
  41. Тищенко В.М. (2014) Корреляция между макро- и микростабильностью C<sub>H</sub>2-доменов IgG2 человека и их биологической активностью. I. Анализ калориметрических и оптических кривых плавления, *Молекуляр. биология*, **48**, 480–490.
  42. Тищенко В.М. (2002) Изучение доменной структуры Cаf1M *Yersinia pestis*. Структура и роль отдельных доменов, *Биофизика*, **47**, 228–235.
  43. Michaelsen, T.E., Naess, L.M., and Aase, A. (1993) Human IgG3 is decreased and IgG1, IgG2 and IgG4 are unchanged in molecular size by mild reduction and reoxidation without any major change in effector functions, *Mol. Immunol.*, **30**, 35–45.
  44. Ellerson, J.R., Yasmeen, D., Painter, R.H., and Dorrington, K.J. (1972) A fragment corresponding to the C(H)2 region of immunoglobulin G (IgG) with complement fixing activity, *FEBS Lett.*, **24**, 318–322.
  45. Ellerson, J.R., Yasmeen, D., Painter, R.H., and Dorrington, K.J. (1976) Structure and function of immunoglobulin domains. III. Isolation and characterization of a fragment corresponding to the C<sub>γ</sub>2 homology region of human immunoglobulin G1, *J. Immunol.*, **116**, 510–517.
  46. Tischenko, V.M., Abramov, V.M., and Zav'yalov, V.P. (1998) Investigation of the cooperative structure of Fc fragments from myeloma immunoglobulin G, *Biochemistry*, **37**, 5576–5581.
  47. Тимченко М.А., Тищенко В.М. (2013) Дестабилизация C<sub>H</sub>2-доменов в интактных IgG2 человека сопровождается уменьшением их способности ингибировать фактор C1 системы комплемента, *Биохимия*, **78**, 759–766.
  48. Тищенко В.М., Христофоров В.С., Близиюков О.П. (2009) Термодинамические и гидродинамические исследования белков Бенс-Джонса, *Молекуляр. биология*, **43**, 148–156.
  49. Tischenko, V.M. (2000) Metastable state of the Fc fragment, *J. Therm. Anal. Cal.*, **62**, 63–68.
  50. Weber, K., and Osborn, M. (1969) The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, *J. Biol. Chem.*, **244**, 4406–4412.
  51. Laurell, C.B. (1965) Antigen-antibody cross-electrophoresis, *Anal. Biochem.*, **10**, 358–361.
  52. Tischenko, V.M., and Zav'yalov, V.P. (2002) Long-term metastable conformation of human Fc gamma subunit, *Immunol. Lett.*, **84**, 241–245.
  53. Mercola, D.A., Morris, J.W., and Arquilla, E.R. (1972) Use of resonance interaction in the study of the chain folding of insulin in solution, *Biochemistry*, **11**, 3860–3874.
  54. Yphantis, D.A. (1964) Equilibrium ultracentrifugation of dilute solutions, *Biochemistry*, **3**, 297–317.
  55. Van Holde, K.E., Baldwin, R.L. (1958) New approach for molecular weight determination, *J. Phys. Chem.*, **62**, 734–743.
  56. Боуэн Т. (1973) *Введение в ультрацентрифугирование*, Мир, Москва.
  57. Тищенко В.М. (2000) Исследование доменной структуры шаперона Cаf1M *Yersinia pestis*, *Молекуляр. биология*, **34**, 116–122.
  58. Privalov, P.L., and Potekhin, S.A. (1986) Scanning microcalorimetry in studying temperature-induced changes in proteins, *Meth. Enzymol.*, **131**, 4–51.
  59. Labrijn, A.F., Rispens, T., Meesters, J., Rose, R.J., den Bleker, T.H., Loverix, S., van den Bremer, E.T., Neijssen, J., Vink, T., Lasters, I., Aalberse, R.C., Heck, A.J., van de Winkel, J.G., Schuurman, J., and Parren, P.W. (2011) Species-specific determinants in the IgG CH3 domain enable Fab-arm exchange by affecting the noncovalent CH3-CH3 interaction strength, *J. Immunol.*, **187**, 3238–3246.
  60. Davies, A.M., Rispens, T., den Bleker, T.H., McDonnell, J.M., Gould, H.J., Aalberse, R.C., and Sutton, B.J. (2013) Crystal structure of the human IgG4 C(H)3 dimer reveals the role of Arg409 in the mechanism of Fab-arm exchange, *Mol. Immunol.*, **54**, 1–7.
  61. Davies, A.M., Rispens, T., Ooijevaar-de Heer, P., Gould, H.J., Jefferis, R., Aalberse, R.C., and Sutton, B.J. (2014) Structural determinants of unique properties of human IgG4-Fc, *J. Mol. Biol.*, **426**, 630–644.
  62. Rispens, T., Davies, A.M., Ooijevaar-de Heer, P., Absalah, S., Bende, O., Sutton, B.J., Vidarsson, G., and Aalberse, R.C. (2014) Dynamics of inter-heavy chain interactions in human immunoglobulin G (IgG) subclasses studied by kinetic Fab arm exchange, *J. Biol. Chem.*, **289**, 6098–6109.
  63. Michaelsen, T.E., and Natvig, J.B. (1972) The hinge region of IgG3, an extended part of the molecule, *FEBS Lett.*, **28**, 121–124.
  64. Michaelsen, T.E., Frangione, B., and Franklin, E.C. (1977) Primary structure of the «hinge» region of human IgG3, *J. Biol. Chem.*, **252**, 883–889.
  65. Gregory, L., Davis, K.G., Sheth, B., Boyd, J., Jefferis, R., Nave, C., and Burton, D.R. (1987) The solution conformations of the subclasses of human IgG deduced from sedimentation and small angle X-ray scattering studies, *Mol. Immunol.*, **24**, 821–829.
  66. Abe, Y., Gor, J., Bracewell, D.G., Perkins, S.J., and Dalby, P.A. (2010) Masking of the Fc region in human IgG4 by constrained X-ray scattering modelling: implications for antibody function and therapy, *Biochem. J.*, **432**, 101–111.
  67. Schachman, H.K. (1959) *Ultracentrifugation in biochemistry*, Academic Press Inc., N.Y. – London.
  68. Connell, G.E., and Porter, R.R. (1971) A new enzymic fragment (Fab<sub>c</sub>) of rabbit immunoglobulin G, *Biochem. J.*, **124**, 53P.
  69. Tischenko, V.M., Ryazantsev, S.N., and Zav'yalov, V.P. (2014) Three-dimensional structure of the human myeloma IgG4, *Immunol. Lett.*, in press.
  70. Tischenko, V.M., Zav'yalov, V.P., Medgyesi, G.A., Potekhin, S.A., and Privalov, P.L. (1982) A thermodynamic study of cooperative structures in rabbit immunoglobulin G, *Eur. J. Biochem.*, **126**, 517–521.
  71. Tishchenko, V.M., Lund, L., Goodall, M., and Jefferis, R. (1998) Cooperative structures within glycosylated and aglycosylated mouse IgG2b, in *Bio-calorimetry, applications of calorimetry in the biological sciences* (Labbury, J.E., and Chowhry, B.Z., eds), Wiley, London, pp. 267–275.
  72. Tischenko, V.M., Ichtchenko, A.M., Andreyev, C.V., and Kajava, A.V. (1993) Thermodynamic studies of the collagen-like region of human subcomponent C1q. A water-containing structural model, *J. Mol. Biol.*, **234**, 654–660.
  73. Padlan, E.F. (1990) X-ray diffraction studies of antibody constant region, in *Fc receptor and the action of antibodies*

- (Metzger, H., ed.), Amer. Soc. for Microbiol., Washington, D.C., pp. 12–30.
74. Girardi, E., Holdom, M.D., Davies, A.M., Sutton, B.J., and Beavil, A.J. (2009) The crystal structure of rabbit IgG-Fc, *Biochem. J.*, **417**, 77–83.
75. Min, S., Yan, F., Zhang, Y., Ye, X., Zhong, M., Cao, J., Zou, H., and Chen, J. (2014) Characterization of a novel hemolytic activity of human IgG fractions arising from diversity in protein and oligosaccharide components, *PLoS One*, **9**, e85711.
76. Тищенко В.М. (2014) Корреляция между макро- и микростабильностью  $C_{H2}$  доменов и их биологической активностью. II. Расчет термодинамических функций, характеризующих стабильность доменов, *Молекуляр. биология*, **48**, 842–849.

## HUMAN MYELOMA IMMUNOGLOBULINS OF THE FOURTH SUBCLASS (IgG4 MAM) CONTAIN A FRACTION WITH DIFFERENT PROPERTIES OF $C_{H2}$ DOMAINS

V. M. Tischenko

*Institute of Theoretical and Experimental Biophysics,  
Russian Academy of Sciences, ul. Institutskaya 3, Pushchino  
142290, Moscow region, Russia; fax: +7(4967)33-0553,  
E-mail: tischen@vega.protres.ru*

Received March 31, 2014  
Revision received September 02, 2014

A long-lived metastable minor fraction has been detected and characterized in myeloma protein IgG4 MAM by hydrodynamic and thermodynamic methods. There are differences in sedimentation constant of the minor and major protein fractions. The level of stability of the two  $S_{H2}$  domains in the minor protein fraction varies. The unique characteristics of these conformers of IgG4 MAM are due to the fact that in the process of exchange between the heavy chains of molecules of IgG4 in some of them instead of two canonical interchain disulfide bonds Cys226–Cys226 and Cys229–Cys229 in the central part of the «hinge region» there is apparently formed only one noncanonical bond Cys226–Cys229. This leads to asymmetric structure of the IgG4 MAM molecules.

*Key words:* immunoglobulin IgG4,  $S_{H2}$  domain, stability, carbohydrate moiety, disulfide bond