

Пошук та характеристика антигенів меланоми за допомогою методу серологічної ідентифікації рекомбінантно експресованих антигенів

М. В. Роднін¹, І. О. Тихонкова¹, В. В. Філоненко¹, Л. Б. Дробот²,
Г. Х. Мацука¹, І. Т. Гут^{1, 3}

¹ Інститут молекулярної біології та генетики НАН України
Вул. Академіка Заболотного, 150, Київ, 03143, Україна

² Відділення регуляторних систем клітини Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України
Вул. Грушевського, 4, Львів, 79005, Україна

³ Інститут ракових досліджень Людвіга
WIP 8BT Велика Британія, Лондон, Ридингхауз, 91

При імуноскринінгу експресуючої кДНКової бібліотеки, одержаної з пухлини меланоми, аутологічною сироваткою виявлено 10 позитивних клонів. Ідентифіковано білки, які кодуються даними послідовностями. Один з клонів, який кодував фрагмент білка Ki-67, було прокльоновано та проекспресовано. Здійснено гетерологічний скринінг сироваток хворих різними типами раку проти отриманого рекомбінантного білка Ki-67. Встановлено, що в сироватках хворих на рак молочної залози та легень рівень аутоантитіл достовірно перевищував норму. Отримані дані можуть бути використані як для встановлення ролі згаданих білків у малігнізації тканин, так і для створення діагностикумів, також у терапевтичних цілях.

Вступ. Процес злоякісної трансформації тканин супроводжується експресією специфічних білків, які не виявляються в значних кількостях в аналогічних нормальних тканинах. Онкогени кодують білки, які в нормі беруть участь у поділі клітин та диференціації.

Продукти активованих онкогенів трансформують нормальні клітини в злоякісні. Активація онкогенів може відбуватися шляхом різних перетворень, включаючи ампліфікацію генів, мутації і транслокації. Загальним результатом цих процесів є поява білків, які вважаються пухлинспецифічними. Серед ідентифікованих на сьогоднішній день пухлинспецифічних білків виділяють такі основні групи:

— білки, які не експресуються в тканинах дорослого організму (за винятком у деяких випад-

ках сім'яників), проте виявляються в період ембріонального розвитку;

— білки, які гіперекспресуються в раковій пухлині по відношенню до нормальної тканини;

— мутантні форми білків, притаманних даній тканині, експресія яких відбувається на звичайному або підвищеному рівні. Найвивченішими представниками цієї групи є продукти онкогенів *c-myc*, *c-fos* і т. п. [1].

Ідентифікація подібних білків є цікавою не лише для дослідження причин і закономірностей малігнізації, але і з практичної точки зору.

Ці білки (або антитіла проти них) можна використовувати як основу для розроблення недорогих і нескладних тест-систем для ідентифікації наявності ракових клітин [2]. Крім того, в літературі описано випадки успішного застосування моноклональних антитіл проти пухлинспецифічних білків у терапевтичних цілях [3].

На сьогодні існують два основних підходи до ідентифікації пухлинспецифічних білків: біохіміч-

ний та генетичний [4]. Суть біохімічного методу полягає в отриманні фракції лімфоцитів з крові ракових хворих з наступною відмивкою з їхньої поверхні сорбованих білків або їхніх фрагментів (презентованих антигенів) розчином трифтороцтової кислоти. Одержані пептиди фракціонують за допомогою вискоєфективної рідинної хроматографії в градієнті концентрації ацетонітрилу. Фракції отриманих таким чином пептидів додають до «клітин-мішеней», які експресують ті самі алелі головного комплексу гістосумісності, що й ракові клітини, але не впізнаються і не лізуються цитотоксичними Т-лімфоцитами. Фракції пептидів, які сенсibilізують «клітини-мішені» до дії цитотоксичних лімфоцитів, вважають такими, що містять пухлиноспецифічні білки або їхні фрагменти. Подальші дослідження направлені на ідентифікацію та встановлення первинної структури даних антигенів. Складності такого підходу пов'язані з необхідністю одержання нефрагментованих молекул антигенів, інакше їхня ідентифікація на основі невеликих фрагментів може бути неоднозначною або хибною. Крім того, для виявлення антигенів необхідно є достатньо велика кількість крові хворих, що не завжди доступно.

Генетичний підхід базується на одержанні фрагментів геномної ДНК з ракових клітин і клонуванні їх у космідну бібліотеку. Одержаними космідами трансформують клітини, які не мають епітопів, що впізнаються цитотоксичними Т-лімфоцитами. Клоні, які після трансформації набувають здатності стимулювати пухлиноспецифічні Т-клітини, субклонують до виявлення одиничного клону, що має послідовність ДНК, яка кодує пухлиноспецифічний антиген або його фрагмент. При застосуванні цього підходу вдалося ідентифікувати мутантні онкогени, реактивовані ембріональні гени, а також тканинспецифічні білки. Однією з модифікацій генетичного підходу є визначення пухлиноспецифічних антигенів за допомогою антитіл, які впізнаються цитотоксичними Т-лімфоцитами. Найбільше розповсюдження набув метод SEREX (serological identification of antigens by recombinant expression cloning) [5].

Сутність даного методу полягає в тому, що для імуноскринінгу використовується кДНКова бібліотека, яку отримують шляхом зворотної транскрипції мРНК, одержаної з пухлини, і експресують за допомогою бактеріофага λ . Експресуючим вектором служить TriplEx, особливістю якого є наявність трьох рамок зчитування, що забезпечує присутність продукту, ідентичного природному білку або його фрагментові. Скринінг експресованих клонів відбувається за допомогою аутологічної сироватки

методом Вестерн-блотингу з наступним секвенуванням та ідентифікацією кДНКових вставок. Використання даного методу дозволило виявити ряд білків, які специфічно синтезуються в ракових пухлинах різної етіології [5, 6].

Меланома належить до найбільш злоякісних пухлин людини. Захворюваність нею в Україні на 1989 рік становила 3,0 випадки на 100 тис. населення. Несприятлива екологічна ситуація, зокрема радіаційна, зумовлює зростання захворюваності на меланому. Тому пошук та характеристика меланоспецифічних антигенів з подальшою можливістю використання їх як для діагностики ранніх стадій захворювання, так і для створення пептидоспецифічних вакцин набуває на сьогодні особливого значення.

Матеріали і методи. Для досліджень були використані тканина меланоми людини, а також сироватки хворих, отримані в Українському науководослідному центрі ендокринної хірургії і трансплантації під час хірургічних втручань.

Виділення препаратів сумарної і матричної РНК. Сумарну РНК виділяли із свіжозамороженої в рідкому азоті тканини меланоми модифікованим гуанідин-ізотіоціанатним методом [7]. мРНК очищали афінною хроматографією на оліго(dT) носії Dynabeads («Dyna», Велика Британія). Якість отриманих препаратів РНК оцінювали спектрофотометрично і електрофорезом в 1 %-му формальдегід-агарозному гелі. Очищені препарати мРНК до їхнього використання зберігали під етанолом при температурі -80°C .

Створення експресуючих бібліотек. Для синтезу кДНК брали 5 мкг очищених препаратів мРНК і набір для синтезу кДНК («Stratagene», США). Використовували праймер, що містив центр впізнавання для рестриктази *XbaI*: GAGA-GAGAGAGAGAGAGAAGTTCGACTCTAGA(T)₁₇. Ефективність синтезу, а також величину фрагментів кДНК (першої і другої ниток) перевіряли, включаючи в реакційну суміш [γ -P³²]dCTP з наступним електрофорезом в 1 %-му агарозному гелі.

Для конструювання бібліотек використовували фрагменти кДНК розміром вище 0,5 тис. п. о., які екстрагували з 1 %-го агарозного геля за допомогою набору для екстракції ДНК («Qiagen», США). Синтезовані кДНК клонували в ДНК фага λ TriplEx («Clontech», США) за сайтами рестрикції *EcoRI* і *XbaI*. Рекombінантну ДНК пакували в фагові частинки за допомогою набору Gigapack Gold III у відповідності до рекомендацій виробника («Stratagene»). Для визначення титру отриманих первинних бібліотек клітини *Escherichia coli* штам

XL-1 Blue MRF' інфікували рекомбінантними фагами після відповідних серійних розведень. Рекомбінантні фаги виявляли за експресією повноцінної β -галактозидази у фагових бляшках за присутності IPTG та X-Gal («Sigma», США).

Афінна очистка сироваток. Для одержання сироватки використовували 10 мл крові хворих на меланому. Після видалення кров'яного згустка сироватку розводили в 100 разів фосфатно-сольовим буфером і інкубували послідовно з носіями, що містили ковалентно пришиті білки *E. coli* та бактеріофага λ Y1090 та BNN97, для видалення імуноглобулінів проти бактеріальних та фагових білків. Афінно очищені препарати сироваток зберігали при температурі 4 °C у присутності 0,02 % NaN_3 .

Скринінг експресуючих бібліотек. Для первинного скринінгу бактеріальні клітини штаму XL-1 Blue MRF інфікували фагами і висівали на чашки Петрі (150 мм) у концентрації $6 \cdot 10^3$ фагових частинок на чашку. Експресію рекомбінантних білків у фагових бляшках індукували додаванням 1 mM IPTG протягом ночі. Бактеріальні фагові білки з поверхні агарози на нітроцелюлозну мембрану переносили за стандартною методикою.

Для ідентифікації клонів, які експресують IgG людини, фільтри інкубували в присутності анти-IgG людини, міченими пероксидазою хрому (у розведенні 1:1000, «Sigma»). На другому етапі ті самі фільтри інкубували з афінно очищеними сироватками хворих у розведенні 1:100. Імунореактивні клони виявляли за допомогою анти-IgG людини, мічених лужною фосфатазою.

Для підтвердження того, що відібрані клони дійсно є позитивними, проводили вторинний скринінг на чашках Петрі розміром 100 мм за тією ж методикою.

Плазмідну ДНК з позитивних фагових клонів отримували методом рекомбінації *in vivo* в *E. coli* штаму XL-1 Blue MRF.

Аналіз позитивних клонів. Розміри вставок кДНК з позитивних клонів та їхні часткові карти рестрикції визначали рестрикційним аналізом і електрофорезом у 1 %-му агарозному гелі.

Секвенування рекомбінантних кДНК здійснювали за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) і автоматичного секвенатора ABI 373.

Банки даних EMBO, GenBank і dbEST використано для ідентифікації позитивних клонів, а також для їхнього аналізу.

Конструювання плазмідних векторів і експресія фрагмента Ki/-67. Фрагмент кДНК Ki-67 розміром 500 пар основ ампліфікували за допомогою ПЛР. Сенсовим праймером слугувала олігонуклеотидна послідовність (ATTGCTAGCCACCA-

CCACCACCACCACAAACTGGACCCAGCAGCA-AGTGTAAC), яка вміщувала сайт рестрикції ендонуклеази *Nhe* і розташовану безпосередньо за ініціюючим метіоном послідовність, яка кодує шість залишків гістидину. Антисенсовий праймер (CGG-GAATTCCTATAGAGCCTCAGCCTTTTCCTTAGG) містив центр впізнавання для рестриктази *EcoRI*, стоп-кодон і частину послідовності Ki-67 (9 амінокислотних залишків). Як матрицю використовували плазмиду *pUC19*, що містила фрагмент Ki-67. Ампліфікований фрагмент кДНК перетравлювали рестриктазами *Nhe* і *EcoRI* та клонували в експресуючий бактеріальний вектор *pET23d* («Novagen», США) у відповідні сайти. Первинну структуру клонованого фрагмента перевіряли рестрикційним аналізом і секвенуванням за допомогою автоматичного секвенатора ABI 347 (Велика Британія).

Експресію His-tag форми фрагмента Ki-67 здійснювали в бактеріальних клітинах лінії BL21DE3, трансформованих експресуючим вектором *pET23d/HispKi-67*. Експресію білка в трансформованих клітинах, які знаходилися в логарифмічній фазі росту, індукували 1 mM IPTG протягом 4 год при температурі 30 °C.

Афінна очистка His-tag злитого фрагмента Ki-67 з лізатів бактеріальних клітин. Після чотиригодинної індукції клітини осаджували центрифугуванням, промивали холодним PBS (фосфатно-сольовий розчин), ресуспендували в буфері для лізису, який містив 10 mM трис-HCl, pH 8,0, 50 mM NaCl та інгібітори протеїназ (1 mM PMSF, 0,2 % аprotинін, 5 mM бензамідин («Sigma»), і руйнували в ультразвуковому дезинтеграторі. Клітинний лізат центрифугували при 13000 g протягом 20 хв при 4 °C. До супернатанту додавали носій Talon («Clontech») і інкубували при температурі 4 °C протягом 2 год при перемішуванні. Далі носій двічі промивали буфером (10 mM трис-HCl, pH 8,0, 300 mM NaCl), після чого ще двічі — буфером, що містив додатково 5 mM імідазол. Елюцію білків, специфічно зв'язаних з сорбентом, проводили буфером, який містив 10 mM трис-HCl, pH 8,0, 300 mM NaCl та 400 mM імідазол.

Визначення імунореактивності сироваток хворих на різні типи раку та здорових донорів методом гетерогенного твердофазного імуоферментного аналізу (ELISA). Наявність та імунореактивність аутоантитіл проти фрагмента Ki-67 визначали методом ELISA. Аутоантиген вносили в PBS (5 мкг/мл в об'ємі 100 мкл) та інкубували протягом 12 год при температурі 4 °C. Вільні адсорбційні місця блокували 0,5 %-ю желатиною в PBS з додаванням 0,1 % Tween-20 (PBS-T) протягом

1 год при кімнатній температурі, після чого відмивали від незв'язаних антигенів 5—6 разів PBS-T.

Усі наступні операції проводили при кімнатній температурі. Після блокування вільних сайтів сорбції у комірці з антигеном додавали сироватку (розведення 1:100) в PBS-T, інкубували протягом 12 год при кімнатній температурі. Після 5—6-разового відмивання комірок PBS-T вносили біотинільовані антитіла проти IgG людини в PBS-T у розведенні відповідно до інструкції (1/10000), інкубували протягом 1 год, відмивали 5—6 разів PBS-T та інкубували ще 20 хв за тих же умов з авідином, кон'югованим з пероксидазою хрому.

Після 5—6-разового відмивання PBS-T результат реакції унаочнювали додаванням 0,1 мл на комірку розчину фарби ABTS (0,5 мкг/мл) у 50 мМ цитратному буфері, рН 5,0, та пероксиду водню (0,05 %). Реакцію зупиняли через 10 хв додаванням 0,05 мл на комірку стоп-буфера (0,15 % -й азид натрію в цитратному буфері). Кількісно результат реакції обчислювали після вимірювання поглинання при 405 нм на приладі «Multiscan» фірми «Titertek» (Велика Британія).

Статистичний аналіз. При оцінці достовірності відмінності показників використовували *t*-критерій Ст'юдента або *F*-критерій Фішера з пакетів статистичних програм Statistica 5.0 Excel 7.0. Значення $p < 0,05$ вважали показником достовірності.

Результати і обговорення. Для створення експресуючої кДНКової бібліотеки використовували тканину меланоми, отриману під час операції. Сумарну РНК із свіжомороженої тканини виділяли модифікованим гуанідин-ізотіоціанатним ме-

тодом [7]. Вихід сумарної РНК з 600 мг тканини складав приблизно 10 мг, а кількість мРНК, одержаної шляхом афінної хроматографії на полі(dT) — приблизно 1 % тотальної РНК.

Якість препаратів мРНК перевіряли спектрофотометрією і електрофорезом в 1 %-му формальдегід-агарозному гелі. Співвідношення E_{260}/E_{280} для одержаного препарату мРНК ($\approx 2,0$) свідчить про його високу чистоту. Для створення експресуючих бібліотек використовували ДНК фага λ TriplEx, характерною ознакою якої є здатність забезпечувати трансляцію кДНК у трьох рамках зчитування. Вказана особливість у три рази підвищує ймовірність одержання позитивних клонів у процесі скринування бібліотек у порівнянні з ДНК фагів λ gt11 і λ Zap. В результаті було створено експресуючу бібліотеку, що характеризується низьким рівнем нерекомбінантних клонів (1 %), у той час як кількість первинних фагів складає $0,8 \cdot 10^6$.

Для зниження неспецифічного зв'язування в процесі скринування сироватки хворих афінно очищали на колонках з іммобілізованими білками *E. coli* та бактеріофага λ Y1090 і BNN97. Це дало змогу позбавитися від імуноглобулінів, специфічних до бактеріальних та фагових білків.

Важливим етапом у скринуванні бібліотек була ідентифікація клонів, що експресують IgG людини. Для цього використовували анти-IgG людини, мічені пероксидазою хрому. Виявлені в такий спосіб позитивні клони відмічали і не враховували в процесі наступного аналізу. Всього згаданих клонів було знайдено близько 8000. Первинний скринінг бібліотеки виявив 33 позитивних клони. Повторний скринінг ізольованих клонів показав, що лише 10 з

Ідентифікація позитивних клонів з тканини меланоми

Клон	Реактивність	Вставка, тис. п. о.	Код	Ідентичність/гомологія
Mel1	+	0,4	gbAA496332	мРНК репресорного білка D30612
Mel2	++++	0,7	gbD86959	мРНК KIAA0201 (гомолог HSP)
Mel3	+	1,45	gbX55039	СENP-B аутоантиген центромери
Mel4	++++	0,5	gbX65551/50	Ki-67 ядерний антиген
Mel5	+	1,4	gbX55039	СENP-B аутоантиген центромери
Mel6	+++	1,4	gbX55039	СENP-B аутоантиген центромери
Mel7	+++	0,9	gbX55039	СENP-B аутоантиген центромери
Mel8	+++	1,0	gbX65551/50	Ki-67 ядерний антиген
Mel9	++++	0,5	gbX65551/50	Ki-67 ядерний антиген
Mel10	++++	1,0	gbX65551/50	Ki-67 ядерний антиген



Електрофореграма очищення рекомбінантного білка Ki-67 з лізатів бактеріальних клітин BL23DE3, трансформованих експресуючим вектором *pET23d/HisMe9*: 1 — маркери; 2 — очищений рекомбінантний білок; 3 — бактеріальний лізат після індукції білкового синтезу

них дійсно розпізнавалися аутологічними сироватками. ДНК отриманих позитивних фагів було перетворено в плазмідну ДНК методом гомологічної рекомбінації *in vivo* згідно з рекомендаціями виробника («Clontech»). Розмір вставок кДНК перевіряли рестрикційним аналізом очищених плазмід. Перед секвенуванням для кожного з позитивних клонів отримано часткові рестрикційні карти. Усі клони було секвеновано з 5'- і 3'-кінців з використанням специфічних Triplex праймерів. Нуклеотидні послідовності для кожного з клонів аналізували за допомогою баз даних EMBO, GenBank і dbEST. Результати проведеного аналізу представлено в таблиці.

Цікавим було те, що чотири позитивних клони кодували фрагменти одного й того ж білка — Ki-67. Цей білок з'являється в ядрі будь-якої клітини наприкінці G_1 фази клітинного циклу, і його кількість досягає максимуму в мітозі, після чого антиген швидко деградує (або втрачає антигенну детермінанту), період напівжиття складає менше години. Антитіла проти Ki-67 досить часто використовують для встановлення мітотичного індексу при діагностиці трансформованих тканин. Структура цього білка є досить характерною: центральна частина містить 16 тандемних повторів по 122 амінокислотних залишки із ступенем гомології 70 %, кожен з яких містить висококонсервативну послідовність (22 амінокислотних залишки), ступінь гомології 90 % [8]. Саме ці ділянки і служать

мішенню, на якій виробляється більша частина моноклональних антитіл [9]. Можлива роль Ki-67 в ядрі — це зв'язування з хроматином, що полегшує процеси транскрипції. На користь цього свідчать дані щодо високої основості згаданого білка. Враховуючи вищевикладене, один з клонів (Mel9) розміром 0,5 тис. п. о., який кодує фрагмент Ki-67, було клоновано в експресуючий бактеріальний вектор *pET23d*, напрацьований у клітинах *E. coli* штаму BL21DE3 у вигляді His-tag злитого білка і виділений з лізатів клітин афінною хроматографією на Talon сефарозі. Чистоту отриманого продукту перевіряли електрофоретично у 12 %-му поліакриламідному гелі (рисунок).

Наступним етапом характеристики виділеного антигена стало дослідження рівня антитіл проти рекомбінантного білка в сироватках хворих різними типами раку. У досліді використано 61 сироватку, серед яких 21 сироватка хворих на рак молочної залози, 13 — на рак легень, 11 — товстого кишечника, 7 — тонкого кишечника та 9 здорових донорів, гетерологічний скринінг. Рівень циркулюючих антитіл (од. опт. густини) у сироватках (розведення 1:100) хворих різними типами раку ($M \pm m$) проти рекомбінантного білка Ki-67 перевіряли методом ELISA:

Норма ($n = 9$)	$0,215 \pm 0,025$
Рак легень ($n = 13$)	$0,392 \pm 0,042^*$
Рак молочної залози ($n = 21$)	$0,463 \pm 0,096^*$
Рак товстого кишечника ($n = 11$)	$0,182 \pm 0,066$
Рак прямої кишки ($n = 7$)	$0,303 \pm 0,095$

Тестування показало достовірне збільшення рівня аутоантитіл проти фрагмента Ki-67 у групах хворих на рак молочної залози та рак легень по відношенню до здорових донорів (відмічено зірочкою). В групах хворих на рак кишечника та прямої кишки достовірного збільшення не спостерігалось.

Порівнюючи рівень аутоантитіл у групах хворих різними типами раку між собою, було виявлено достовірне його перевищення в групах з раком молочної залози та легень стосовно раку товстого кишечника (див. вище).

Отримані результати можуть бути використані при створенні нових засобів для диференціальної діагностики злоякісних новоутворень, при розробленні препаратів для імунотерапії та пептидоспецифічних вакцин на основі білка Ki-67.

Робота частково профінансована грантом від Королівського наукового товариства Великої Британії (Royal Society Joint Project Grant, 1997) та грантом INTAS (INTAS, Open Call 97, N 890). Дослідження виконані в рамках співробітництва за

програмою SEREX між Інститутом ракових досліджень Людвіга (Лондон) і Інститутом молекулярної біології і генетики НАН України (Київ). Автори висловлюють щире подяку проф. М. Вортерфільду (Інститут ракових досліджень Людвіга) за підтримку і сприяння у виконанні даної роботи.

Н. В. Роднін, И. А. Тихонкова, В. В. Филоненко, Л. Б. Дробот, Г. Х. Мацука, И. Т. Гут

Поиск и характеристика антигенов меланомы с помощью метода серологической идентификации рекомбинантно экспрессированных антигенов

Резюме

При иммуноскрининге экспрессирующей кДНК библиотеки, полученной из опухоли меланомы, аутологической сывороткой выявлены 10 позитивных клонов. Идентифицированы белки, кодируемые этими последовательностями. Один из клонов, кодирующий фрагмент белка Ki-67, был проклонирован и проэкспрессирован. Осуществлен гетерологический скрининг сывороток больных разными типами рака против полученного рекомбинантного белка Ki-67. Выявлено, что в сыворотках больных раком молочной железы и легких уровень аутоантител достоверно превышает норму. Полученные данные могут быть использованы как для выяснения роли упомянутых белков в малигнизации тканей, так и для создания диагностикомов, а также в терапевтических целях.

M. V. Rodnin, I. O. Tykhonkova, V. V. Filonenko, L. B. Drobot, G. Kh. Matsuka, I. T. Gout

Search and characterization of melanoma antigens with the use of serological identification of antigens by recombinant expression cloning

Summary

Ten positive clones have been identified during immunoscreening of expressing cDNA libraries by autologous sera. One of the clones encoded for a fragment of Ki-67 protein have been subcloned and the protein expressed in bacteria. Heterologous screening of recombinant Ki-67 protein by allogenic sera have been performed. Statistical analysis indicated significant difference in the level of

autoantibodies in cancer sera in comparison with normal ones. The data obtained can be useful for the understanding of the malignance processes, and for the diagnostic and therapeutic purposes as well

ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. Parmiani G. Tumor immunity as autoimmunity: tumor antigens include normal self proteins which stimulate anergic peripheral T cells // *Immunol. Today*.—1993.—14, N 11.—P. 536—538.
2. Pardoll D. M. New strategies for enhancing the immunogenicity of tumors // *Curr. Opin. Immunol.*—1993.—5.—P. 719—725.
3. Robbins P. F., Kawakami Y. Human tumor antigens recognized by T cells // *Curr. Opin. Immunol.*—1996.—8.—P. 628—636.
4. Brichard V., Van Pel A., Wolfel T., Wolfel C., Plaen E., Lethe B., Coulie P., Boon T. The tyrosinase gene codes for an antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas // *J. Exp. Med.*—1993.—177.—P. 489—495.
5. Sahin U., Tureci Q., Schmitt H., Cochlovius B., Johannes T., Schmits R., Stenner F., Luo G., Schobert I., Pfreundschuh M. Human neoplasms elicit multiple immune responses in the autologous host // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*.—1995.—92.—P. 11810—11813.
6. Chen Y., Scanlan M. J., Sahin U., Tureci Q., Gure A., Tsang S., Williamson B., Stockert E., Pfreundschuh M., Old L. A testicular antigen aberrantly expressed in human cancers detected by autologous antibody screening // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*.—1997.—94.—P. 1914—1918.
7. Chomczynski P., Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction // *Anal. Biochem.*—1987.—162.—P. 156—159.
8. Schluter C., Duchrow M., Wohlenberg C., Wohlenberg C., Becker M., Goran K., Flad H., Gerdes J. The cell proliferation-associated antigen of antibody Ki-67: a very large, ubiquitous nuclear protein with numerous repeated elements, representing a new kind of cell cycle-maintaining proteins // *Cell Biol.*—1993.—123.—P. 513—522.
9. Kubbutat M. H. G., Key G., Duchrow M., Schluter C., Flad H., Gerdes J. Epitope analysis of antibodies recognising the cell proliferation associated nuclear protein previously defined by the antibody Ki-67 (Ki-67 protein) // *J. Clin. Pathol.*—1994.—47.—P. 524—528.

УДК 577.29

Надійшла до редакції 15.12.98