



УДК 577.112.083.3

МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА  
К ИСКУССТВЕННОМУ ИММУНОГЕНУ, СПЕЦИФИЧЕСКИ  
ВЫЯВЛЯЮЩИЕ ФОСФОТИРОЗИНСОДЕРЖАЩИЕ БЕЛКИ

Шанютин А. В.\*, Рубикайте Б. И., Войтенко Н. Н.\*,  
Шидловская Е. А.\*, Гроховский С. Л., Жузе А. Л.,  
Фаворова О. О.

Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта  
Академии наук СССР, Москва;

\* Научно-исследовательский институт гематологии  
и переливания крови МЗ БССР, Минск

Как установлено в последнее время, фосфорилирование белков по гидроксильной группе остатка тирозина играет существенную роль в регуляции пролиферации клеток. Для идентификации белков, фосфорилированных по тирозину, получены моноклональные антитела (МКА) к искусственным иммуногенам, содержащим в качестве гаптена О-фосфотирозин (рТуг) или трипептид рТуг-Gly-Gly. Гаптены конъюгировали с белками-носителями (бычий сывороточный альбумин, иммуноглобулин человека, гемоцианин виноградной улитки). При иммунизации мышей конъюгатом рТуг-гемоцианин виноградной улитки получены МКА, высокоспецифичные к рТуг, но не реагирующие с О-фосфосерином, О-фосфотреонином и тирозином, а также с нуклеозид-5'-монофосфатами. Полученные антитела специфически реагируют с рТуг-содержащими белками в культуре клеток крыс (линия ХС), трансформированных вирусом саркомы Рауса.

Фосфорилирование белковых молекул по гидроксильной группе остатка тирозина (Туг), катализируемое специфическими Туг-протеинкиназами, тесно связано с регуляцией роста клеток. Действительно, при связывании клетками-мишенями таких белков, как эпидермальный, плазмоцитарный и инсулиноподобный факторы роста, инсулин, фактор, стимулирующий рост колоний, и, возможно, интерлейкины, их рецепторы приобретают Туг-протеинкиназную активность и сами быстро фосфорилируются по остаткам Туг [1–3]. Рецептор стероидного гормона эстрадиола также фосфорилируется по Туг [4].

Фосфорилирование остатков Туг в белках наблюдается при трансформации клеток. Туг-протеинкиназная активность выявлена у ряда онкобелков — продуктов трансформирующих генов ретровирусов (*v-src*, *v-abl*, *v-fps* и др.) и их клеточных гомологов; онкогенная трансформация клеток такими вирусами сопровождается 10–20-кратным возрастанием содержания О-фосфотирозина (рТуг) в белках [5].

Установлено, что Туг-протеинкиназная активность определенных рецепторов и онкобелков необходима для проявления их биологической активности [6–8]. Однако конкретные механизмы, обеспечивающие вовлечение фосфорилированных по Туг белков (рТуг-белков) в процессы роста и трансформации клеток, остаются неизвестными, несмотря на активную работу в этой области. Для решения этой проблемы нужен простой и универсальный способ идентификации и выделения рТуг-белков из сложных смесей клеточных компонентов.

С начала 80-х годов усилия многих лабораторий были направлены на получение рТуг-специфических антител, в основном поликлональных [9],

Сокращения: рТуг — О-фосфотирозин; рТуг-белки — белки, фосфорилированные по тирозину; КЛН — гемоцианин виноградной улитки; BSA — бычий сывороточный альбумин; THF — тетрагидрофуран; ЭСТ — эмбриональная сыворотка телят; МКА — моноклональные антитела; ИФА — иммуноферментный анализ; PBS — 0,05 М Na-фосфатный буфер (рН 7,5), содержащий 0,1 М NaCl.

наличие которых позволило бы выявлять как сами Туг-протеинкиназы, поскольку многие из них катализируют автофосфорилирование собственных остатков Туг, так и их белковые субстраты. За единственным исключением, когда антитела, специфичные для рТуг, были неожиданно получены при иммунизации кроликов фосфорилированным по Туг белком *v-abl* [10], все эти антитела относятся к группе антигаптенных, причем в качестве гаптена использовали как аналоги рТуг (*n*-азобензилфосфонат и *N*-бромоетил-*O*-фосфотирамин), так и сам рТуг, конъюгированные с разными белками-носителями [9]. В работах [11–13] описано получение антигаптенных моноклональных рТуг-специфических антител (МКА). Не все из этих МКА достаточно высокоаффинны и избирательны по отношению к рТуг, чтобы обеспечить специфическое извлечение рТуг-белков, присутствующих в клетке обычно в очень низких концентрациях, из смеси, содержащей множество белков, фосфорилированных по остаткам серина и треонина [14].

Цель настоящей работы — получение рТуг-специфических МКА, обладающих высоким средством и избирательностью по отношению к рТуг-белкам и пригодных для исследования процессов, связанных с ростом и трансформацией клеток. В качестве гаптена использовали собственно рТуг, а не его аналоги, поскольку это гарантировало большую аффинность и специфичность МКА, а сомнения в иммуногенности рТуг-содержащих конъюгатов, высказывавшиеся в связи с высокой фосфатазной активностью животных тканей, оказались необоснованными [9]. Для получения иммуногенов рТуг или трипептид рТуг-Gly-Gly ковалентно связывали с белками-носителями карбодимидным методом, обеспечивавшим при синтезе конъюгатов сохранение антигенности коротких пептидов [15].

В качестве исходных критериев специфичности МКА к рТуг мы выбрали следующие: 1) взаимодействие с рТуг вне зависимости от аминокислотного окружения (по данным ИФА с сорбированными антигенами, содержащими различные белки-носители); 2) отсутствие перекрестной реакции с *O*-фосфосерином и *O*-фосфотреонином, а также с тирозином и нуклеозид-5'-монофосфатами.

При иммунизации мышей конъюгатом рТуг-BSA были выявлены клоны-продуценты МКА, связывающиеся в ИФА с рТуг-BSA, но не с BSA (табл. 1). Однако при использовании для скрининга конъюгата рТуг с другим белком-носителем — иммуноглобулином человека (далее IgG) — ни для одного из полученных МКА не наблюдалось существенного превышения связывания в сравнении с IgG, обусловленного присутствием гаптена. Кроме того, преинкубация культуральной жидкости с рТуг (50 мкг на лунку) не подавляла связывания МКА с рТуг-BSA. Эти результаты свидетельствуют об узнавании МКА «сложной» антигенной детерминанты, включающей и рТуг, и участки структуры белка-носителя, т. е. о недостаточной специфичности полученных МКА к рТуг. Хотя BSA часто используется при приготовлении искусственных антигенов, возможно, что по крайней мере в случае такого небольшого гаптена, как рТуг, BSA является неподходящим белком-носителем.

Для преодоления трудностей, возникших при иммунизации с помощью рТуг-BSA, испробовали два подхода: 1) замену BSA в иммуногене на другой, менее иммуногенный белок-носитель — гемоцианин виноградной улитки (KLH); 2) введение между гаптенем и белком-носителем «спейсера», состоящего из дипептида Glu-Glu. рТуг-Gly-Glu был конъюгирован с KLH.

Результаты исследования специфичности некоторых МКА, полученных при иммунизации рТуг-Gly-Gly-KLH (табл. 2), свидетельствуют, что и в этом случае МКА узнают «сложную» антигенную детерминанту, на сей раз состоящую из рТуг и «спейсера». Однако участки структуры KLH не входят в состав детерминанты, так как трипептид рТуг-Gly-Gly реагирует с МКА, будучи конъюгированным и с BSA (табл. 2), и с IgG человека (не показано). Мы приходим к заключению, что KLH удовлетворяет всем требованиям, предъявляемым к белку-носителю в искусственном антигене, а введение спейсера Gly-Gly не дает в нашем случае никаких преимуществ для продукции рТуг-специфических МКА.

Взаимодействие МКА, полученных при иммунизации рТур- BSA,  
с сорбированными антигенами (по данным ИФА)

Шифр гибридомы	Связывание МКА с антигенами, $A_{492} \cdot 10^3$			
	BSA	рТур-BSA	IgG	рТур-IgG
Б-26	198	637	162	304
Б-27	50	407	154	341
Б-30	111	897	159	316
Б-31	106	789	149	304
Б-32	74	688	170	324
Б-40	102	855	155	295
Б-41	93	652	167	274
Б-42	74	674	173	286
Б-44	47	690	190	304
Б-45	196	835	165	234
Б-47	184	738	167	275
Б-48	120	825	152	252
Б-49	75	771	174	300
Б-53	62	831	195	240
Б-55	56	616	145	231

Таблица 2

Взаимодействие МКА, полученных при иммунизации рТур-Gly-Gly-KLN,  
с сорбированными антигенами (по данным ИФА)

Шифр гибридомы	Связывание МКА с антигенами, $A_{492} \cdot 10^3$		
	BSA	рТур-Gly-Gly-BSA	рТур-BSA
Г-3	158	685	179
Г-6	171	2328	189
Г-9	146	611	182
Г-10	209	2074	172
Г-11	72	1395	66
Г-12	116	889	115
Г-14	250	<b>2165</b>	411
Г-17	37	965	75
Г-18	408	2368	412
Г-21	292	2438	369
Г-22	93	1564	149
Г-23	473	2509	490
Г-24	575	2597	563

Таблица 3

Взаимодействие МКА, полученных при иммунизации рТур-KLN,  
с сорбированными антигенами (по данным ИФА)

Антигены	Культуральный супернатант (1 : 100), $A_{492} \cdot 10^3$	Очищенные МКА, $K_A^* \cdot M^{-1}$
BSA	68	—
рТур-BSA	865	$3 \cdot 10^9$
IgG	63	—
рТур-IgG	1367	$8 \cdot 10^9$

\* Константы средства измеряли неконкурентным методом [16].

Действительно, при иммунизации мышей конъюгатом рТур-KLN были получены МКА, способные узнавать рТур независимо от природы белка-носителя (табл. 3). Титры всех антигенных МКА оказались весьма высоки как в культуральной среде ( $4 \cdot 10^{-3}$ ), так и в асцитной жидкости ( $5 \cdot 10^{-5}$ ). Очистка МКА из асцитной жидкости на колонке с DEAE-Affi-Gel blue привела к выделению практически гомогенного иммуноглобулина (рис. 1), относящегося к IgG1-подклассу. Далее описываются свойства этих МКА.

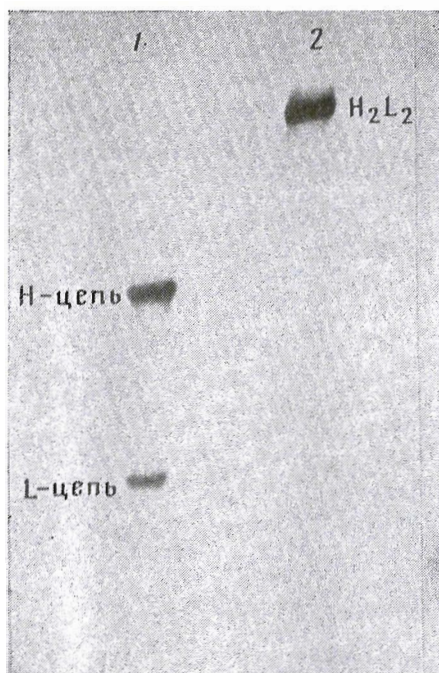


Рис. 1

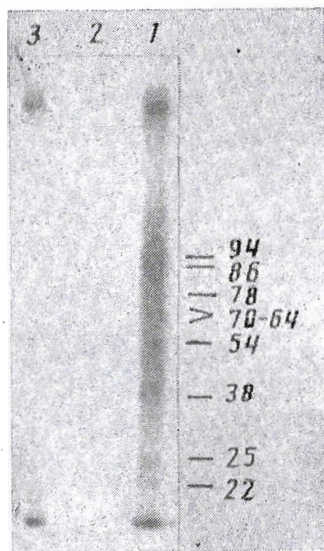


Рис. 3

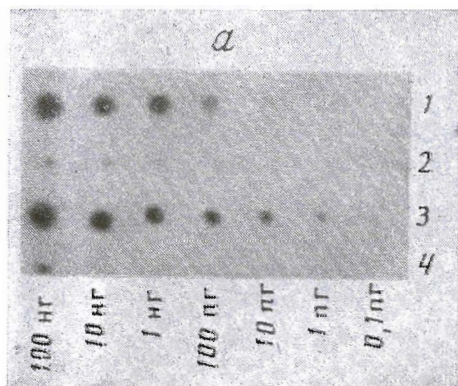


Рис. 2

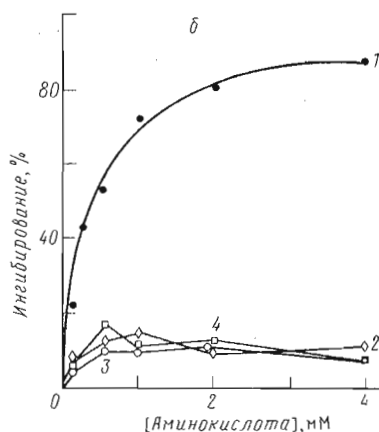


Рис. 1. Электрофорез в присутствии додецилсульфата Na в 7–22% ПААГ МКА, полученных при иммунизации рТуг-KLN: МКА, очищенные на DEAE Affi-Gel blue, обрабатывали буфером Лэммли с добавлением (1) и без добавления (2) 1% меркаптоэтанова. Гель окрашен Кумасси G-250

Рис. 2. Специфичность полученных МКА к рТуг: а – «дот»-анализ с различными антигенами: рТуг-BSA (1), BSA (2); рТуг-IgG (3); IgG (4). Внизу – количества наивесенного белка. б – влияние преинкубации с фосфоаминокислотами и Туг на связывание МКА с рТуг-BSA (2 мкг на лунку) при ИФА. Асцит в разведении 1:10<sup>5</sup> преинкубировали с рТуг (1), О-фосфосерином (2), О-фосфотреонином (3), Туг (4)

Рис. 3. Иммунопреципитация с помощью рТуг-специфических МКА белков, меченных <sup>32</sup>P в культуре клеток ХС (1), и их конкурентное вытеснение 10 мМ рТуг (2). В качестве контроля использовали МКА НТF-14 (3). Иммунопреципитаты анализировали электрофорезом в ПААГ (7–22%) и радиоавтографировали на пленке РМВ («Тасма») в течение ночи. Цифрами справа обозначены молекулярные массы фосфобелков (в кДа)

Определенные методом неконкурентного ИФА в твердой фазе [16] константы сродства ( $K_a$ ) МКА для искусственных антигенов (табл. 3) свидетельствуют о высоком сродстве к рТуг. Найденные значения кажущихся  $K_a$  лежат в диапазоне  $10^9$ – $10^{10}$   $M^{-1}$ , т. е. примерно на 3 порядка превышают значения для поликлональных рТуг-специфических антител, полученных при иммунизации конъюгатами азобензилфосфонат-КЛН [17] и рТуг-гаммаглобулин кур [18]. Данные «дот»-анализа (см. «Экспериментальную часть») подтверждают вывод о высоком сродстве МКА к рТуг. С помощью МКА удается выявить радиоиммунным методом до 0,1 нг рТуг-IgG, что соответствует чувствительности порядка  $10^{-16}$  моль рТуг (рис. 2, а). При использовании в качестве антигена рТуг-BSA чувствительность хотя и высока, но меньше на несколько порядков; следовательно, вывод о независимости связывания МКА от аминокислотного окружения гаптена в антигене носит неабсолютный характер. Следует, однако, подчеркнуть, что остатки рТуг, судя по полученным данным, являются критическими, по современной терминологии [19], для узнавания антигена полученными МКА.

Об избирательном сродстве МКА к рТуг свидетельствуют данные рис. 2, б. При конкурентном ИФА реакция МКА с рТуг-BSA на 85% блокировалась 4 мМ рТуг, но незначительно ингибировалась О-фосфосерином, О-фосфотреонином и нефосфорилированным Туг.

Известно, что рТуг-специфические антитела, в частности МКА, полученные при иммунизации азобензилфосфонатом [11], взаимодействуют с некоторыми нуклеозид-5'-монофосфатами. Мы убедились, что АМР, СМР, ГМР и УМР при концентрациях 4 мМ не ингибируют связывания МКА с рТуг-BSA. Эти результаты показывают, что полученные нами МКА специфичнее описанных в работах [11, 12] и по крайней мере не уступают полученным в работе [13].

Для оценки способности МКА «узнавать» природные рТуг-белки клетки крысиных фибробластов линии ХС трансформированные вирусом саркомы Рауса, метаболически метили  $[^{32}P]$  ортофосфатом в культуре и подвергали иммунопреципитации. Связанные молекулы анализировали методом электрофореза в ПААГ в присутствии додецилсульфата Na (рис. 3). МКА осаждают набор  $^{32}P$ -содержащих белков (дорожка 1), не осаждающихся контрольными антителами НТФ-14 (дорожка 3); преинкубация антител с рТуг подавляет связывание  $^{32}P$ -белков (дорожка 2). Эти данные свидетельствуют о специфическом взаимодействии полученных МКА с белками, фосфорилированными по Туг. Основные иммунореактивные фосфобелки характеризуются  $M$  94, 86, 54 и 38 кДа. Полосы, соответствующей Туг-специфической протеинкиназе рр60<sup>v-src</sup>, не выявлено, однако белок рр54 совпадает по подвижности с первым продуктом эндогенного протеолиза рр60<sup>v-src</sup>, фосфорилированным по Туг [20]. Еще два основных обнаруженных фосфобелка имеют близкую подвижность с белками, идентифицированными как субстраты рр60<sup>v-src</sup> – рр85 [21] и рр36 (см. [5]), а фосфобелок с подвижностью 94–95 кДа выявлен в реакциях с рТуг-специфическими антителами в трансформированных вирусом саркомы Рауса клетках в работе [12]. Кроме перечисленных, мы выявили фосфобелки с  $M$  78, 25 и 22 кДа, дублет 70–64 кДа и минорные полосы с подвижностью более 100 кДа.

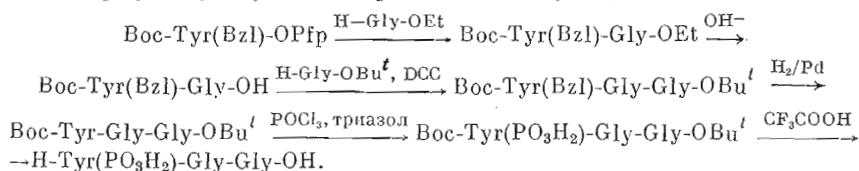
Таким образом, мы получили высокоаффинные антигаптенные МКА против рТуг. Они специфически реагируют с рТуг-белками в трансформированных клетках крыс (линия ХС), о чем свидетельствует ингибирование гаптенном иммунопреципитации, и выявляют достаточно большой набор рТуг-белков. Эти МКА, судя по полученным данным, пригодны для выявления и идентификации рТуг-белков в клетках, трансформированных различными вирусными онкогенами или стимулированных факторами роста, а также для препаративного выделения рТуг-содержащих белков из клеток и тканей. Есть все основания надеяться, что они окажутся полезным инструментом для исследования роли фосфорилирования Туг в регуляции пролиферации и трансформации клеток, а возможно, и для диагностики злокачественного перерождения.

Авторы благодарят Л. Л. Киселева, инициировавшего эту работу и проявлявшего к ней неизменный интерес, а также М. В. Резникова и В. С. Прасолова за культивирование клеток ХС.

### Экспериментальная часть

**Синтез гаптенов.** pTyr был синтезирован по методике [22], его гомогенность проверяли электрофоретически на пластинках (20×20 см) в тонком слое целлюлозы (Schleicher und Schüll G 1440) при pH 3,5 в системе уксусная кислота — пиридин — вода (50 : 5 : 945) в течение 1 ч 15 мин при 1000 В.

Пептид pTyr-Gly-Gly синтезирован по следующей схеме:



В синтезе (на 1-й стадии) использовали этиловый эфир [<sup>14</sup>C]глицина (7,5 мкКи/ммоль). Индивидуальность полученных соединений контролировали с помощью ТСХ на пластинках Silufol UV-254 (ЧССР) в системах: *n*-бутанол — уксусная кислота — вода (4 : 1 : 1); 1 М ацетат аммония (pH 7,6) — 96% этанол (3 : 7); хлороформ — абс. этанол (95 : 5). Температуру плавления определяли на приборе Voëtius (ГДР). Спектры <sup>1</sup>H-ЯМР снимали на ЯМР-спектрометре Varian XL-100 (США) при рабочей частоте 100 МГц в *d*<sub>6</sub>-диметилсульфоксиде, внутренний стандарт — Me<sub>4</sub>Si. Химические сдвиги приведены в миллионных долях; с — синглет, д — дублет, т — триплет, к — квадруплет, м — мультиплет.

1. *Boc-Tyr(Bzl)-Gly-OEt*. а) 10,0 г (27 ммоль) Boc-Tyr(Bzl)-OH (Serva) и 7,4 г (40 ммоль) пентафторфенола растворяли в 50 мл THF, охлаждали до -20°С, прибавляли раствор 5,8 г (28 ммоль) DCC в 20 мл THF и выдерживали 12 ч при -10°С. Осадок отфильтровывали, раствор упаривали и остаток перекристаллизовывали из смеси 30 мл EtOAc, 100 мл гексана и 50 мл пентана. Выход 13,4 г (93%), т. пл. 121–122°. ЯМР: 7,63 д, 1H (NH); 7,36 м, 5H (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>); 7,20 д+6,90 д, 4H (C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>); 5,06 с, 2H (CH<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>); 4,48 м, 1H (CH); 3,05 м, 2H (CH<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>); 1,37 с, 9H (Boc).

б) 1,4 г (10 ммоль) хлоргидрата этилового эфира глицина суспендировали в 30 мл THF, прибавляли 1,1 мл (10 ммоль) *N*-метилморфолина и 5,4 г (10 ммоль) Boc-Tyr(Bzl)-OPfp. Суспензию перемешивали 14 ч при 20°С, упаривали, остаток растворяли в смеси 50 мл этилацетата и 50 мл H<sub>2</sub>O, этилацетатный слой отделяли, промывали 2 раза 1 М лимонной кислотой, водой, 9% раствором бикарбоната натрия, высушивали над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, упаривали и перекристаллизовывали из смеси этилацетат — гексан. Выход 4,2 г (92%), т.пл. 131–133°С. ЯМР: 8,24 т, 1H (NH-CH<sub>2</sub>); 7,35 м, 5H (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>); 7,14 д+6,85 д, 4H (C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>); 6,74 д, 1H (Boc-NH); 5,05 с, 2H (CH<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>); 4,08 м, 3H (CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>+CH); 3,83 д, 2H (NHCH<sub>2</sub>); 2,80 м, 2H (CH<sub>2</sub>-CH); 1,30 с, 9H (Boc); 1,18 т, 3H (CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).

2. *Boc-Tyr(Bzl)-Gly-OH*. К раствору 4,0 г (8,8 ммоль) этилового эфира дипептида в 70 мл метанола добавляли 4 мл водного 4 н. NaOH, выдерживали 1 ч при 20°С, упаривали, остаток растворяли в 150 мл H<sub>2</sub>O, осадок отфильтровывали и к раствору прибавляли 20 мл 1 н. лимонной кислоты. Осадок отфильтровывали, промывали водой, высушивали и перекристаллизовывали из смеси этилацетат — гексан. Выход 2,8 г (73%), т.пл. 147–149°С. ЯМР: 8,11 т, 1H (NH-CH<sub>2</sub>); 7,35 м, 5H (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>); 7,14 д+6,85 д, 4H (C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>); 6,74 д, 1H (NH-CH); 5,04 с, 2H (CH<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>); 4,10 м, 1H (CHCO); 3,78 д, 2H (NH-CH<sub>2</sub>); 2,80 м, 2H (CH<sub>2</sub>-CH); 1,30 с, 9H (Boc).

3. *Boc-Tyr(Bzl)-Gly-Gly-OBu*<sup>t</sup>. а) Пентафторфениловый эфир дипептида получали из 2,7 г дипептида по методике, аналогичной «1а». Выход 3,6 г (97%), т.пл. 149–151°С.

б) *трет*-Бутиловый эфир трипептида получали из 1,5 г пентафторфенилового эфира дипептида и 0,7 г хлоргидрата трет-бутилового эфира глицина (Reanal) по методике, аналогичной «16». Выход 1,02 г (75%), т.пл. 125–129° С. ЯМР: 8,10 т+7,98 т, 2Н (NHCH<sub>2</sub>); 7,35 м, 5Н (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>); 7,13 д+ +6,84 м, 5Н (C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>+NHCH); 5,03 с, 2Н (CH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>); 4,09 м, 1Н (CH); 3,73 м, 4Н (CH<sub>2</sub>CO); 2,80 м, 2Н (CH<sub>2</sub>CH); 1,41 с, 9Н (Bu'); 1,30 с, 9Н (Вос).

4. *Вос-Tyr-Gly-Gly-OBu'*. 0,95 г (1,75 ммоль) защищенного трипептида гидрировали 7 ч в 20 мл метанола над палладиевой чернью. Катализатор отфильтровывали, раствор упаривали и остаток перекристаллизовывали из 20 мл этилацетата. Выход 0,75 г (95%), т.пл. 184–186° С. ЯМР: 9,05 с, 1Н (ОН); 8,10 т+7,97 т, 2Н (NHCH<sub>2</sub>); 6,97 д+6,58 д, 4Н (C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>); 6,83 д, 1Н (NHCH); 4,04 м, 1Н (CH); 3,80 м, 2Н (CH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>); 1,41 с, 9Н (Bu'); 1,30 с, 9Н (Вос).

5. *Вос-Tyr(PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>)-Gly-Gly-OBu'*. (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>N. К суспензии 1,0 г (14,5 ммоль) триазола в смеси 12 мл CH<sub>3</sub>CN и 2,03 мл триэтиламина по каплям прибавляли 0,44 мл (4,7 ммоль) POCl<sub>3</sub>. Через 30 мин осадок отфильтровывали и раствор прибавляли к раствору 0,66 г (1,46 ммоль) Вос-Tyr-Gly-Gly-OBu' в 5 мл пиридина. Через 2 ч раствор упаривали, к остатку прибавляли 20 мл воды, перемешивали 5 ч при 20° С, упаривали, остаток растворяли в метаноле и наносили на колонку (3×150 см) с сефадексом LH-20. Элюировали метанолом, отбирали фракции по 15 мл. Фракции 38–41 упаривали. Выход 0,42 г (44%). ЯМР: 8,16 т+8,01 т, 2Н (NHCH<sub>2</sub>); 7,00 м, 4Н (C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>); 7,85 д, 1Н (NHCH); 4,09 м, 1Н (CH); 3,74 м, 4Н (NHCH<sub>2</sub>), 2,94 м, 8Н ((CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>N<sup>+</sup>+CH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>); 1,40 с, 9Н (Bu'); 1,30 с, 9Н (Вос); 1,15 т, 9Н ((CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>N).

6. *H-Tyr(PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>)-Gly-Gly-OH*. (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>N. К 0,35 г (0,64 ммоль) защищенного трипептида прибавляли 5 мл CF<sub>3</sub>COOH, выдерживали 1 ч при 20° С, упаривали, остаток несколько раз упаривали с хлороформом, растворяли в метаноле и разделяли на колонке с сефадексом LH-20 аналогично опыту 5. Фракции 34–40 упаривали, остаток растворяли в воде и лиофилизировали. Выход 0,28 г (89%). ЯМР: 8,77 т+8,14 т, 2Н (NHCH<sub>2</sub>); 7,00 м, 4Н (C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>); 7,83 м, 1Н (NHCH); 4,05–3,59 м, 5Н (CH+NHCH<sub>2</sub>); 3,00 м, 8Н ((CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>N+CH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>); 1,17 т, 9Н ((CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>N).

*Получение конъюгатов с белками-носителями.* pTyr или pTyr-Gly-Gly конъюгировали с белками-носителями BSA, KLH или IgG как описано в работе [15]. 3 мг гаптена инкубировали с 4,6 мг водорастворимого 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодимидом (ECDI) (Sigma) 15 мин при 0° С в минимальном количестве дистиллированной воды/HCl (рН 3,0). Выбранное молярное отношение pTyr–ECDI (1 : 2) обеспечивало наилучшую активацию pTyr. Затем добавляли при 0° С 9 мг белка-носителя, суспендированного в 0,3 мл воды, и доводили рН до 9 добавлением (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Смесь перемешивали 3 ч при 20° С и диализовали против воды. Концентрацию белка определяли по методике [23]. Количество ковалентно пришитого pTyr определяли по содержанию фосфата в конъюгате с помощью микрометода [24]. В качестве контроля использовали белок-носитель, в качестве стандарта – pTyr и АМР. Содержание pTyr составляло, в зависимости от препарата, от 6 до 16 моль на 1 моль BSA, от 10 до 26 – на 1 моль IgG и от 30 до 50 – на 100 кДа KLH. Конъюгаты с pTyr-Gly-Gly содержали, по данным радиоактивности, сходные количества гаптена на моль белков-носителей.

*Иммунизация мышей и получение гибридом.* Мышей линии BALB/c иммунизировали внутрибрюшинным введением 50 мкг (в расчете на белок) конъюгатов гаптена с белками в 0,15 М NaCl в смеси с равным объемом полного адьюванта Фрейнда (по 0,15 мл). Иммунизацию повторяли через 3 нед тем же количеством антигена с неполным адьювантом Фрейнда. За 3 сут до слияния вводили 100 мкг конъюгата внутрибрюшинно в 0,5 мл 0,15 М NaCl. Гибридизацию 5·10<sup>7</sup> клеток селезенки иммунных

мышей и  $1,2 \cdot 10^7$  клеток миеломы мыши X63-Ag8-653 [25] проводили в течение 1,5 мин в 50% растворе полиэтиленгликоля *M*, 4000, содержащего 5% диметилсульфоксида [26]. После гибридизации и отмывки клеток от полиэтиленгликоля клетки высевали в 96-луночные панели по  $1 \cdot 10^5$  спленоцитов в лунку. Для культивирования и селекции гибридом использовали среду с добавлением 10% эмбриональной сыворотки телят (ЭСТ),  $10^{-4}$  М гипоксантина,  $4 \cdot 10^{-7}$  М аминоптерина и  $1,6 \cdot 10^{-5}$  М тимидина.

Гибриды-продуценты клонировали один раз методом конечных разведений, высевали по 1 клетке в лунку, содержащую  $4 \cdot 10^4$  клеток селезенки.

*Получение асцитной жидкости и очистка МКА.* Для выращивания гибридом в асцитной форме клетки вводили внутривентриально мышам BALB/c, обработанным пристаном\*, в количестве  $2,5 \cdot 10^6$  клеток на мышь. Асцит созревал на 12–14-е сут. 2,5 мл асцита, центрифугированного 5 мин при 1000 g для удаления клеток, разводили до 15 мл 0,02 М трис-НСl-буфером, pH 7,2, фильтровали через микропористые капроновые фильтры (0,2 мкм, экспериментальная лаборатория р/к «Хийу Калур», Таллинн, ЭССР) и очищали на колонке DEAE Affi-Gel blue (Bio-Rad), как описано в работе [27]. Колонку промывали несколькими объемами того же буфера и иммуноглобулиновую фракцию элюировали в градиенте концентрации NaCl (0–100 мМ; 200 мл, скорость 40 мл/ч). Собирали фракции по 2 мл, иммуноглобулиновые фракции объединяли и хранили при 4° С в присутствии 0,02% NaN<sub>3</sub>.

*Иммуноферментный анализ (ИФА).* По 1–5 мкг конъюгатов рТуг с белком сорбировали 16 ч в лунках 96-ячеечных микроплат в 50 мкл 0,1 М карбоанатного буфера, pH 9,6, при 4° С. После 5-кратной отмывки дистиллированной водой в лунки вносили 50 мкл культурального супернатанта гибридом, инкубировали 2 ч при 20° С, вновь отмывали, добавляли кроличьи антитела к иммуноглобулинам мыши, конъюгированные с пероксидазой хрена (Miles), в разведении 1 : 2500 и оставляли на 1 ч при 20° С. После отмывок в лунки платы вносили раствор гидрохлорида *o*-фенилендиамина (Sigma) (0,6 мг/мл) в цитратно-фосфатном буфере, pH 4,7, содержащем 0,03% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Реакцию останавливали через 10 мин добавлением 100 мкл 1 М серной кислоты, поглощение измеряли на спектрофотометре Titertek Uniscan (Flow Lab, Англия) при длине волны 492 нм.

*«Дот»-анализ.* Конъюгаты рТуг-BSA, рТуг-IgG и неконъюгированные BSA и IgG в объеме 2 мкл наносили на листы нитроцеллюлозы (Schleicher and Schüll, BA85), инкубировали ее 1 ч при 20° С в PBS, содержащем 0,1% Твин 20, затем 1 ч при 37° С в том же растворе, содержащем иммуноглобулиновую фракцию асцита (3 мкг/мл). Нитроцеллюлозу трижды отмывали раствором 0,5% Твина 20 в PBS и обрабатывали 1 ч при 20° С <sup>125</sup>I-мечеными кроличьими антителами против IgG мыши (Calbiochem) ( $0,5 \cdot 10^6$  имп·мин<sup>-1</sup>·мл<sup>-1</sup> в растворе 0,1% Твина 20 в PBS). Антитела иодировали с использованием хлорамина Т [28]. Нитроцеллюлозу отмывали 5 раз раствором 0,5% Твина в PBS и радиоавтографировали на пленке РМВ (Тасма) с экраном ЭУ4-1 при -70° С.

*Иммунопреципитация.* Культивируемые клетки XC (клетки крыс Wistar, трансформированные RSV, шт. Прага С) [29] были получены из лаборатории молекулярной биологии вирусов НИИ канцерогенеза ВОИЦ АМН СССР. Клетки растили в среде DMEM (Flow Lab) с добавлением 10% ЭСТ. Для метаболического мечения клетки ( $1 \cdot 10^6/90$ -мм чашку Петри) культивировали 15 ч в бесфосфорной MEM-среде (Flow Lab), содержащей 10% диализованной ЭСТ, и затем добавляли 2,2 мл среды MEM, содержащей 700 мкКи/мл [<sup>32</sup>P] ортофосфата (5000 Ки/ммоль). После 6 ч инкубации клетки собирали, промывали трижды PBS и лизировали в 0,5 мл RIPA-буфера (20 мМ трис-НСl, pH 7,2; 1 мМ EDTA, 1% Нонидет Р40, 1% дезоксихолат Na, 1% додецилсульфат Na, 0,15 М NaCl, 2,5 мМ фенилметансульфонилфторид, лейпептин, пепстатин, химостатин, по 2 мкг/мл каждого, и апротинин (100 калликреин-ингибиторных единиц/мл). Лизаты осветляли центрифугированием при 10 000 g в течение 30 мин при 4° С

\* Пристан – 2,6,10,14-тетраметилпентадекан (Janssen Chimica, Бельгия).



и надосадочную жидкость использовали для иммунопреципитации с рТуг-специфическими антителами из иммуноглобулиновой фракции, полученной при осаждении асцитной жидкости мышей 50% сульфатом аммония. Для удаления белков, неспецифически взаимодействующих с иммуноглобулинами, 4 мкл лизата преинкубировали 1 ч при 0° С с 10 мкг асцитной иммуноглобулиновой фракции МКА НТФ-14 против трансферрина [30], любезно предоставленных В. Виклицким (Институт молекулярной генетики ЧСАН, Прага), добавляли 20 мкл 10% суспензии иммунопреципитана (BRL) и после инкубации в течение 1,5 ч при 0° С осадок отбрасывали. К надосадочной жидкости добавляли 10 мкг рТуг-специфических МКА (либо тех же МКА, преинкубированных с 150 мкг рТуг, либо МКА НТФ-14) и инкубировали 1 ч при 0° С. Иммунопреципитат сорбировали при перемешивании на иммунопреципитине (20 мкл 10% суспензии) в течение 1 ч при 20° С, промывали 3 раза по 1 мл RIPA-буфера, элюировали 30 мкл буфера Лэммли и подвергали электрофорезу в градиенте пористости 7–22% ПААГ в присутствии додецилсульфата Na [31].

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Heldin C. H., Westermarck B.* // Cell. 1984. V. 37. № 1. P. 9–20.
2. *Sherr C. J., Rettenmier C. W., Sacca R.* // Cell. 1985. V. 41. № 3. P. 665–676.
3. *Ogawa R., Sugamura K., Watanabe Y.* // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1987. V. 144. № 1. P. 160–165.
4. *Migliaccio A., Rotondi A., Auricchio F.* // EMBO J. 1986. V. 5. № 11. P. 2867–2872.
5. *Фаворова О. О., Фролова Л. Ю., Прасолов В. С.* // Журн. Всесоюз. хим. о-ва им. Д. И. Менделеева. 1986. Т. XXXI. № 3. С. 278–286.
6. *Snyder M. A., Bishop J. M., McGrath J. P., Levinson D. A.* // Mol. Cell. Biol. 1985. V. 5. № 8. P. 1772–1779.
7. *Chou C. K., Dull T. J., Russel D. S., Gherzi R., Lebwohl D., Ullrich A., Rosen O. R.* // J. Biol. Chem. 1987. V. 262. № 4. P. 1842–1847.
8. *Chen W. S., Lasar C. S., Poenie M., Tsien R. Y., Gill G. N., Rosenfeld M. G.* // Nature. 1987. V. 328. № 6133. P. 820–823.
9. *Wang J. Y. J.* // Anal. Biochem. 1988. V. 172. № 1. P. 1–7.
10. *Wang J. Y. J.* // Mol. Cell. Biol. 1985. V. № 12. P. 3640–3643.
11. *Frackelton A. R., Ross H. A., Eisen H. M.* // Mol. Cell. Biol. 1983. V. 3. № 8. P. 1343–1352.
12. *Ohtsuka M., Ihara S., Ogawa R., Watanabe T., Watanabe Y.* // Int. J. Cancer. 1984. V. 34. № 6. P. 855–861.
13. *Glenney J. R., Zokas L., Kamps M. P.* // J. Immunol. Meth. 1988. V. 109. № 2. P. 277–285.
14. *Северин Е. С., Кочеркова М. Н.* Роль фосфорилирования в регуляции клеточной активности. М.: Наука, 1985. 287 С.
15. *Tamura T., Bauer H., Birr C., Pipkorn R.* // Cell. 1983. V. 34. № 2. P. 587–596.
16. *Beatty J. D., Beatty B. G., Vlahos W. G.* // J. Immunol. Meth. 1987. V. 100. № 1/2. P. 173–179.
17. *Ross A. H., Baltimore D., Eisen H. N.* // Nature. 1981. V. 294. № 5842. P. 654–656.
18. *Seki J., Owada M. K., Sakato N., Fujio H.* // Cancer Res. 1986. V. 40. № 2. P. 907–916.
19. *Getzoff E. D., Geysen H. M., Kodda S. J., Alexander H., Tainer J. A., Lerner R. A.* // Science. 1987. V. 235. № 4793. P. 1191–1196.
20. *Fukami Y., Lipmann F.* // Proc. Nat. Acad. Sci. 1985. V. 82. № 2. P. 321–324.
21. *Kaplan D. R., Whitman M., Schaffhausen B., Pallas D. C., White M., Cantley L., Roberts T. M.* // Cell. 1987. V. 50. № 7. P. 1021–1029.
22. *Mitchell H. K., Lunan K. D.* // Arch. Biochem. and Biophys. 1964. V. 106. № 1–3. P. 219–222.
23. *Bradford M.* // Anal. Biochem. 1976. V. 72. № 1/2. P. 248–254.
24. *Hasegawa H., Parniak M., Kaufman S.* // Anal. Biochem. 1982. V. 120. № 2. P. 360–364.
25. *Kearney J. F.* // J. Immunol. 1979. V. 123. № 4. P. 1548–1550.
26. *Lane R. D., Crissman R. S., Lachman M. F.* // J. Immunol. Meth. 1984. V. 72. № 1. P. 71–76.
27. *Bruck C., Portetelle D., Glineur C., Bollen A.* // J. Immunol. Meth. 1982. V. 53. № 3. P. 313–319.
28. *Greenwood F. C., Hunter W. M., Glover J. S.* // Biochem. J. 1963. V. 89. № 1. P. 114–123.
29. *Svoboda J.* // Nature. 1960. V. 186. № 4729. P. 980–983.
30. *Bartek J., Viklicky V., Hořejši V., Verlova H.* // Folia Biol. 1984. V. 30. № 2. P. 137–140.
31. *Laemmli U. K.* // Nature. 1970. V. 227. № 5259. P. 680–685.

Поступила в редакцию  
29.XII.1988

MONOCLONAL ANTIBODIES TO AN ARTIFICIAL  
IMMUNOGEN SPECIFICALLY IDENTIFYING  
PHOSPHOTYROSINE-CONTAINING PROTEINS

PANYUTICH A. V.\*, RUBIKAITE B. I., VOITENOK N. N.\*,  
SHIDLOVSKAYA E. A.\*, GROKHOVSKY S. L., ZHUZE A. L., FAVOROVA O. O.

*Engelhardt Institute of Molecular Biology,  
Academy of Sciences of the USSR, Moscow;*

*\*Institute of Hematology and Blood Transfusion,  
Ministry of Health of the Byelorussian SSR, Minsk*

The importance of protein phosphorylation at tyrosyl hydroxy groups in the control of cell proliferation has recently been established. For identification of tyrosine-phosphorylated proteins, monoclonal antibodies (Mabs) against artificial immunogens containing O-phosphotyrosine (pTyr) or tripeptide pTyr-Gly-Gly as haptens were generated; the haptens were coupled to carrier proteins (bovine serum albumin, human immunoglobulin, keyhole limpet hemocyanin). After immunization of mice with pTyr coupled to keyhole limpet hemocyanin, Mabs were generated which were highly specific for pTyr and did not cross-react with O-phosphoserine, O-phosphothreonine, tyrosine or nucleoside-5'-monophosphates. The Mabs specifically react with tyrosine-phosphorylated proteins in the Rous sarcoma virus-transformed rat XC-cell.