



УДК 577.156:612.015

**ПОЛУЧЕНИЕ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ К  
ГЛИАЛЬНОМУ ФИБРИЛЛЯРНОМУ КИСЛОМУ БЕЛКУ  
И ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ДЛЯ ХАРАКТЕРИСТИКИ  
ПОЛИПЕПТИДНОГО СОСТАВА ГЛИОСПЕЦИФИЧЕСКОГО  
БЕЛКА В ОНТОГЕНЕЗЕ МОЗГА ЧЕЛОВЕКА**

ГАЙДАР Л. И., \*ЛИТВИНОВА Л. В., \*\*ВТЮРИНА И. Ю.,  
\*СОЛОВЬЕВ Ю. Н., БЕРЕЗИН В. А., \*\*ВАСИЛОВ Р. Г.

Днепропетровский государственный университет

\*НИИ клинической онкологии ВОНЦ АМН СССР

\*\*ВНИИ биотехнологии Минмедбиопрома СССР, Москва

С использованием гибридной технологии получены и охарактеризованы моноклональные антитела к глияльному фибриллярному кислому белку. Моноклональные антитела клонов IC1 и 2A4 специфически взаимодействуют только с глияльным фибриллярным кислым белком и могут быть использованы в качестве диагностических реагентов в изучении опухолей нейроэпиталиального генеза. Моноклональные антитела клона 2B1 были использованы для изучения экспрессии полипептидов глияльного фибриллярного кислого белка в развивающемся мозгу человека методом иммуноблоттинга. Наблюдаемые изменения полипептидного состава глияльного фибриллярного кислого белка в онтогенезе мозга человека носят временный характер и свидетельствуют об изменении генной экспрессии при дифференцировке глии.

Глияльный фибриллярный кислый белок (ГФКБ) является специфическим компонентом цитоскелета астроглияльных клеток [1, 2]. ГФКБ представляет собой белок с М. 50 кД [3]. В последние годы разрабатывается направление по фенотипированию клеточных элементов опухолей периферической и центральной НС и мягких тканей нейроэктодермальной природы с использованием моноклональных антител к ГФКБ и нейрофиламентам [4, 5].

Настоящее исследование посвящено получению моноклональных антител к ГФКБ, характеристике их специфичности и использованию для изучения полипептидного состава ГФКБ в онтогенезе мозга человека.

#### **Материалы и методы**

*Выделение и очистку ГФКБ из белого вещества мозга человека (аутопсийный материал) осуществляли по методу Dahl, Vignani [6] с модификацией. После первой экстракции белка 0,005 М фосфатным буфером рН 8,0 проводили осаждение 0,2 М ацетатным буфером рН 4,0, повторная экстракция 0,005 М фосфатным буфером рН 8,0, хро-*

матогграфия белка на гидроксипанатите и высаливание сульфатом аммония при 30%-ном насыщении. На всех этапах выделения ГФКБ проводили контроль с помощью ракетного иммуноэлектрофореза с использованием кроличьей антисыворотки к ГФКБ, полученной ранее [7].

*Получение гибридом*, продуцирующих моноклональные антитела к ГФКБ проводили по методу Köhler, Milstein [8] в модификации De Fozesa, Scheidegger [9]. Иммунизацию мышей линии BALB/c осуществляли либо путем многократных инъекций антигена (50 мкг ГФКБ на инъекцию; 3—5 инъекций с двухнедельными интервалами) внутривенно с полным адъювантом Фрейнда, либо путем однократной инъекции антигена непосредственно в селезенку. Иммунный ответ оценивали измерением титра антител в сыворотке с помощью иммуоферментного анализа [10]. У мышей с высоким уровнем антител к ГФКБ на 4-й день после последней инъекции антигена удаляли селезенку и спленциты сливали с миеломными клетками линии X63Ag8653 с помощью полиэтиленгликоля с M<sub>n</sub> 4 кД. Скрининг гибридом осуществляли иммуоферментным методом с использованием ГФКБ. Положительные клоны исследовали методом непрямой иммунофлуоресценции на ткани мозга. Клетки из лунок, давших положительный ответ в обоих тестах, были трижды клонированы и затем использованы для паработки моноклональных антител в культуре или в виде асцита.

*Твердофазный иммуоферментный анализ* моноклональных антител к ГФКБ проводили следующим образом. Раствор ГФКБ (0,45 мкг/мл в 0,1 М карбонатном буфере pH 9,0) вносили в лунки планшета для иммуноанализа («Flow», Англия) по 50 мкл и инкубировали (12 ч, 4°). Затем раствор удаляли, лунки промывали забуференным физиологическим раствором (ЗФР), инкубировали с 1%-ным раствором БСА в ЗФР в течение 1 ч при 20° и вновь промывали, после чего вносили раствор исследуемых антител. После инкубации в течение 2-х ч при 37° антитела удаляли, лунки тщательно промывали и в них вносили раствор кроличьих антител к иммуноглобулинам мыши, конъюгированных с пероксидазой («Sigma», США). Затем следовала инкубация (1 ч, 37°), промывка лунок ЗФР и внесение хромогенного субстрата о-фенилендиамина («Sigma», США) в 0,05 М цитратном буфере pH 5,0. Реакцию останавливали добавлением 50%-ного раствора H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Оптическую плотность измеряли с помощью спектрофотометра Multiscan MCC 340 («Flow», Англия).

*Моноклональные антитела исследовали* с помощью иммуноблоттинга по методу Towbin и соавт. [11]. Перенос белков из ПААГ на нитроцеллюлозные фильтры («Schleicher and Schuell», ФРГ) осуществляли в течение 12 ч при силе тока 100 мА и напряжении 30 в. Затем фильтры инкубировали последовательно в 5%-ном растворе БСА в ЗФР (2 ч, 37°), растворе моноклональных антител (2 ч, 37°), растворе кроличьих антител против иммуноглобулинов мыши, конъюгированных с пероксидазой (1 ч, 37°) и в растворе субстрата диаминобензидина (5 мг в 20 мл 0,1 М Tris-HCl буфере, pH 7,4 с добавлением H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Экстракты тканей готовили в растворе 1%-ного DDS-Na.

*Иммуноморфологическое исследование* проводили методом непрямой иммунофлуоресценции и ПАП (пероксидаза-антипероксидаза)—реакции на криостатных срезах толщиной 5—6 микрон с лобных долей, мозжечка и ствола мозга (аутопсийный материал не позднее 5 ч после смерти от острого кровотечения). Первичное тестиро-

вание выполнено на нефиксированных, подсушенных на воздухе кри-остатных срезах; для более детального исследования использовали срезы, фиксированные в 4%-ном растворе формалина при pH 7,4. Инкубация с моноклональными антителами длилась 1,5 ч при 20° или 20 ч при 4°; инкубация с флуоресцирующими антителами против иммуноглобулинов белой мыши (ННН микробиологии и эпидемиологии им. Н. Ф. Гамалеи и «Sigma», США)—в течение 1 ч при 20°. ПАП-реакцию проводили с использованием реагентов НИИ микробиологии и эпидемиологии МЗ РСФСР (Горький); в качестве субстрата применяли диаминобензидин («Sigma», США). Для положительных контролей в работе использовали моноклональные антитела к ГФКБ, нейрофиламентам, виментину и кератинам (РКК-1) производства фирмы «Labsystems» (Финляндия), а также ламинину и энтактину, подсушенные Любимовым и соавт. [12].

## Результаты и обсуждение

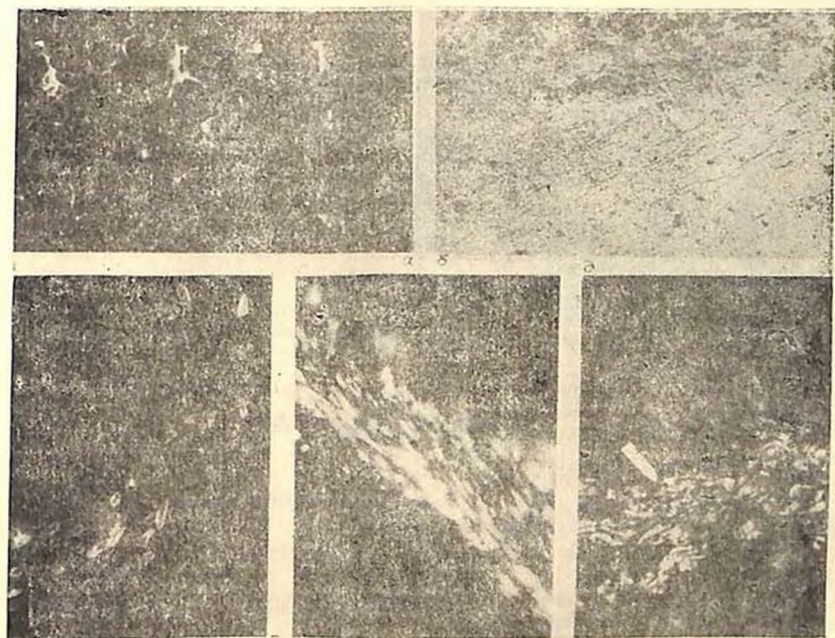
ГФКБ относится к семейству белков промежуточных филаментов и имеет ряд антигенных детерминант, общих с другими членами семейства (виментином, триплетом нейрофиламентов, десминином, цитоламентом характерен для тканей определенного генеза [13], характеристиками). Поскольку в основном каждый тип промежуточных фибрилл специфичности полученных моноклональных антител может быть проведена путем исследования различных тканей как иммуногистохимически, так и методом иммуноблоттинга.

В результате трех независимых гибридизаций спленоцитов мышей линии BALB/c, иммунизированных препаратом ГФКБ, с миеломными гибридными клетками (эффективность клонирования—80%). Отбор ми клетками линии X63g8b 3 было получено свыше 600 растущих клонов, продуцирующих моноклональные антитела, проведен иммуноперментным методом с использованием в качестве антигена препарата ГФКБ. Отобрано 57 клонов, исследованных затем на срезах головного мозга человека (кора и белое вещество больших полушарий, гипоталамуса, мозжечок и ствол) методом непрямой иммуофлуоресценции. Показано, что продукты 11 первичных клонов гибридных клеток реагировали с астроглией, 14—с нейронами, остальные—как с нейронами, так и с глиальными элементами, но обнаруживали сильное взаимодействие с эндотелием сосудов и с межклеточным веществом. Продукты первичных клонов, давших реакцию на ткани мозга только с астроглией и с нейронами (соответственно 11 и 14 образцов), исследованы на ткани кожи, молочной железы и желудка с целью исключения реакций с другими тканевыми антигенами. Из 25 исследованных образцов культуральной среды только 2 образца не дали реакций с другими тканевыми антигенами; 1 реагировал с мембранами клеток альвеол молочной железы, а антитела первичных клонов 3С3 и С3 окрашивали циточную каемку покровно-яочного эпителия желудка. Гибридомы, отобранные при помощи иммуоферментного и иммуноморфологического исследования были 3-кратно клонированы и использованы для наработки моноклональных антител. В результате получено 6 стабильных клонов, продуцирующих моноклональные антитела к ГФКБ и нейрофиламентам, пригодные для дальнейшего их в иммунохимическом анализе.

Гибридома 2В1 была получена путем однократной иммунизации в селезенку мыши препаратом ГФКБ, гибридомы 1С1, 2А4, 1С2, 3С3, С3—путем гипериммунизации препаратом ГФКБ. Моноклональные



антитела клонов 2B1, 1C1, 2A4, 1C2 на срезах мозга человека давали четкую реакцию с астроглией (рис. 1, а); антитела клона СЗ окрашивали нейроны (рис. 1, б), а клон 3С3 взаимодействовали и с астроглией, и с нейронами. При исследовании культуральной жидкости клеток клон 3С3 обнаруживалось неяркое свечение с отростками клеток в белом веществе мозга и вокруг капилляров. Как было выяснено в дальнейшем, при низких титрах антител в культуральной среде реакция прежде всего появляется в отростках астроглиальных клеток и аксонах нейронов, а не в телах клеток; причем морфологическая картина идентична как для реакции с антителами к ГФКБ,



**Рис. 1.** Иммуноморфологическая характеристика моноклональных антител, а, в, г, д—иммунофлуоресцентный метод,  $\times 160$ ; б—ПАП-метод  $\times 63$ . а—яркое свечение цитоплазмы отростков астроглии (реакция с антителами клона 2B1); б—антитела клона СЗ окрашивают аксоны нейронов мозга; в—антитела к мембранному антигену Майера; г—свечение ядерных мембран клеток волосяного фолликула с антителами клона 2B1; д—реакция антител клона 1C2 с гладкими мышцами кожи; д—реакция антител клона 1C2 с цитоплазмой клеток и отростками клеток — 3С3, в флуоресценции предрасполагающих эластических волокон

так и к нейрофиламентам. Идентичность морфологии при низких титрах антител к ГФКБ и нейрофиламентам послужила причиной отбора клон, реагирующего с детерминантой, общей для ГФКБ и нейрофиламентов.

С целью более полной характеристики специфичности моноклональных антител были проведены исследования взаимодействия со средами 10 различных органов и тканей человека, а также с некоторыми опухо-

лями человека не нейроэпителлиальной природы (рак яичника, рак молочной железы, меланома, круглоклеточная саркома). Результаты иммуноморфологической характеристики моноклональных антител, продуцируемых различными клонами, представлены в таблице. Моноклональные антитела гибридомы 1C1 не обнаружили перекрестных реакций с другими тканевыми антигенами как нормальных тканей, так и при исследовании образцов опухолей человека не нейроэпителлиальной природы. Антитела клона 2A4 нестабильно реагировали с клетками волосных фолликул кожи и клетками желчных капилляров печени, но при уменьшении концентрации антител (контролем являлась положительная реакция с астроглией) эти реакции исчезали.

Таблица

| Морфологическая характеристика моноклональных антител |     |                  |               |                                    |    |
|-------------------------------------------------------|-----|------------------|---------------|------------------------------------|----|
| Моноклональные антитела                               | 1C1 | 2A4              | 2B1           | 1C2                                | C3 |
| исследуемый образец                                   |     |                  |               |                                    |    |
| Большие полушария головного мозга                     |     |                  |               |                                    |    |
| астроглия                                             | +   | +                | +             | +                                  | —  |
| нейроны                                               | —   | —                | —             | —                                  | +  |
| Мозжечок                                              |     |                  |               |                                    |    |
| астроглия                                             | +   | +                | +             | +                                  | —  |
| нейроны                                               | —   | —                | —             | —                                  | +  |
| Щитовидная железа                                     | —   | —                | мембраны ядер | цитоплазматические мембраны        | —  |
| Молочная железа                                       | —   | —                | —             | —                                  | +  |
| Кожа                                                  |     |                  |               |                                    |    |
| гладкие мышцы                                         | —   | —                | —             | +                                  | +  |
| волосные фолликулы                                    | —   | единичные клетки | мембраны ядер | +                                  | +  |
| эпидермис                                             | —   | —                | —             | +                                  | —  |
| Желудок                                               |     |                  |               |                                    |    |
| слизистая оболочка                                    | —   | —                | мембраны ядер | +                                  | +  |
| гладкие мышцы                                         | —   | —                | —             | —                                  | —  |
| Печень                                                |     |                  |               |                                    |    |
| желчные капилляры                                     | +   | +                | мембраны ядер | +                                  | +  |
| гепатоциты                                            | —   | —                | —             | —                                  | —  |
| Легкое                                                | —   | —                | —             | —                                  | —  |
| Надпочечник                                           | —   | —                | мембраны ядер | —                                  | +  |
| Яичник                                                |     |                  |               |                                    |    |
| тека-клетки                                           | —   | —                | мембраны ядер | +                                  | +  |
| Протоковый инфильтративный рак молочной железы        | —   | —                | —             | —                                  | —  |
| Эндометриозидный рак яичника                          | —   | —                | мембраны ядер | эпителиальные и стромальные клетки | —  |
| Меланома                                              | —   | —                | мембраны ядер | эпителиальные и стромальные клетки | +  |
| Синовиальная саркома                                  | —   | —                | мембраны ядер | —                                  | +  |

Антитела клона 2B1 реагировали с оболочками ядер клеток эпителия и соединительной ткани (рис. 1, в), а также с оболочками ядер опухолевых клеток. Заметим, что на ткани мозга реакции с ядерными оболочками астроглии и нейронов не обнаружено.

Антитела гибридомы 1C2 интенсивно связывались с клетками придатка кожи, с гладкими мышцами кожи (рис. 1, г), тека-клетками яичника, с эпителием проксимальных и дистальных канальцев почек, с мембранами клеток щитовидной железы, а также с эпителиальными



ми и стромальными клеточными элементами рака молочной железы (рис. 1, *д*) и эндометриального рака (рис. 1, *е*). Антитела клон СЗ, кроме того, реагировали с клетками синовиальной саркомы.

В иммуноблоттинге с препаратом ГФКБ (рис. 2, *а*) моноклональные антитела клонов 1С1, 1С2, 2В1, 2А4, 3С3, а также использованные в качестве контроля моноклональные антитела к ГФКБ («Lab-systems», Финляндия) интенсивно окрашивали белковую зону с величиной  $M_r$  40—50 кД, что соответствует ГФКБ и продуктам его деградации. Антитела 1С2 интенсивно реагировали также с белком с величиной  $M_r$  57 кД (имитин) и слабо—с белками с  $M_r$  68 кД

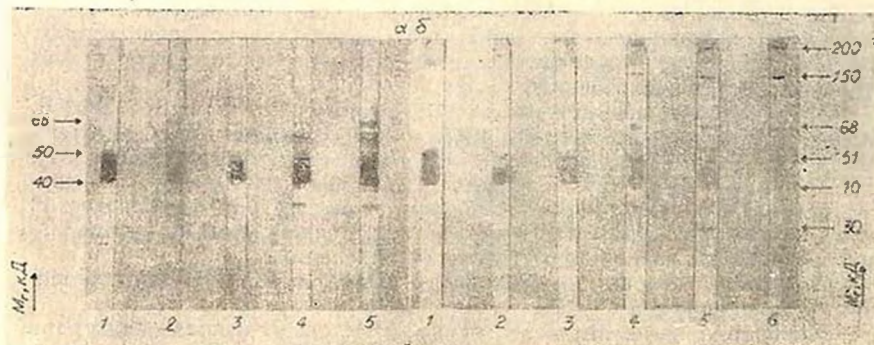


Рис. 2. Иммуноблоттинг препарата глиального фибриллярного кислого белка (*а*) и экстрактов мозга (*б*) человека с моноклональными антителами к глиальному фибриллярному кислому белку. Клоны: 1—2В1, 2—1С1, 3—2А4, 4—1С2, 5—3С3, 6—СЗ

(нейрофиламенты) и 30 кД. Антитела 3С3 показали интенсивную реакцию с белками с  $M_r$  57 и 68 кД и несколько слабее—с белком с  $M_r$  30 кД. Продукт клон СЗ реагировал с белком с  $M_r$  68 кД (нейрофиламенты).

При взаимодействии с экстрактом мозга человека антитела клонов 2В1, 1С1, 2А4 (рис. 2, *б*) окрашивали только зону, соответствующую ГФКБ и продуктам его деградации— $M_r$  40—50 кД; антитела 1С2 и 3С3 дополнительно взаимодействовали с белками с  $M_r$  150 и 200 кД и слабо—с полипептидами с величиной  $M_r$  20, 30 и 37 кД. Антитела клон СЗ при реакции с экстрактом мозга (продолговатый мозг) обнаруживали полипептиды с  $M_r$  68, 150 и 200 кД (нейрофиламенты), выявляли белки с  $M_r$  40—50 кД, соответствующие ГФКБ, и более слабо окрашивали зоны с  $M_r$  20, 30, 36, 57, 92, 110 и 160 кД. Аналогичная картина, только значительно слабее, наблюдалась и в случае экстракта надпочечника.

При изучении методом иммуноблоттинга экстрактов других тканей не обнаружено взаимодействия моноклональных антител с экстрактами почек; моноклональные антитела 2В1, 1С1, 2А4 не взаимодействовали с экстрактами желудка, печени, матки. Моноклональные антитела 1С2, СЗ и 3С3 выявляли две близкорасположенные полипептидные зоны с  $M_r$  150 кД в экстракте печени и 130 и 150 кД в экстракте матки. Кроме того, антитела 3С3 и СЗ реагировали с белком с  $M_r$  130 кД в экстракте желудка.

Таким образом, на основании проведенного иммуноморфологического анализа и анализа полипептидного состава полученные моно-

клональные антитела могут быть сгруппированы следующим образом:

1. Моноклональные антитела 1С1 и 2А4, скрашивающие на срезах мозга только астроглию и не проявляющие перекрестных реакций с антигенами других нормальных и опухолевых тканей человека. Эти антитела специфически взаимодействуют только с ГФКБ и являются кандидатами на роль диагностических реагентов в изучении опухолей нейроэктодермальной природы.

2. Моноклональные антитела 2В1, взаимодействующие в иммуноблоттинге только с ГФКБ и окрашивающие астроглию. Однако эти антитела взаимодействуют также с мембранами ядер клеток других гистологических типов тканей человека и, по-видимому, не могут быть использованы для диагностических целей, однако представляют интерес в качестве реагентов для иммунохимического анализа и нейробиологических исследований.

3. Моноклональные антитела 1С2, взаимодействующие с ГФКБ, 3С3—с эпитопом, общим для ГФКБ и нейрофиламентов, и антитела клона С3, взаимодействующие с нейрофиламентами. Антитела этих клонов, кроме того, взаимодействуют и с эпитопами некоторых других белков, что делает их непригодными для иммуноморфологической диагностики опухолей. Эти реагенты могут представлять определенный интерес для нейробиологических исследований.

Полученные клоны заморожены и хранятся в НИИ биотехнологии Минмедбиопрома СССР.

Моноклональные антитела клона 2В1 были использованы для изучения экспрессии полипептидов ГФКБ в развивающемся головном мозгу человека методом иммуноблоттинга (рис. 3). На 12-й неделе



Рис. 3. Иммуноблоттинг экстрактов мозга плода человека с моноклональными антителами клона 2В1: а—25—26-я неделя развития; б—30—32-я неделя развития. 1—кора больших полушарий, 2—мозжечок, 3—продолговатый мозг

после оплодотворения ГФКБ в мозгу представлен основной зоной 51 кД и рядом минорных низкомолекулярных полипептидов в диапазоне 35—40 кД (данные не представлены). На 25—26 неделе развития помимо полипептидной зоны 51 кД появлялась зона 100 кД

ч слабая зона 68 кД. Значительное количество низкомолекулярных полипептидов с М в диапазоне 31—45 кД обнаруживали в продолговатом мозгу, тогда как в коре больших полушарий и мозжечке эти полипептиды проявлялись слабее. Такой характер экспрессии ГФКБ может свидетельствовать, с одной стороны, о большой изменчивости процессов деградации основного полипептида *in vivo* (низкомолекулярные полипептиды, особенно в продолговатом мозгу), а с другой—либо об измененной экспрессии самого ГФКБ, либо изменениях других белков семейства промежуточных филаментов (скорее всего белок в-интерфилламентов). При этом, по-видимому, выявляются антигенные детерминанты, родственные ГФКБ, но отсутствующие у этих белков в мозгу взрослого человека и на других этапах онтогенеза (рис. 2, б). Интересно, что наблюдаемые изменения полипептидного состава ГФКБ в онтогенезе мозга человека носят временный характер. На 30—32-й неделе развития плода человека в мозжечке и продолговатом мозгу экспрессируется только основной полипептид с М 51 кД, а в коре больших полушарий и эта зона выражена очень слабо. Обнаруженные изменения экспрессии полипептидов ГФКБ, по-видимому, отражают не только разницу в числе глальных клеток, синтезирующих ГФКБ, но и изменения генной экспрессии при развитии и дифференцировке глии в онтогенезе мозга человека.

# RAISING OF MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST GLIAL FIBRILLARY ACIDIC PROTEIN AND THEIR USE FOR CHARACTERIZATION OF POLYPEPTIDE COMPOSITION OF GLIA-SPECIFIC PROTEINS DURING HUMAN BRAIN ONTOGENESIS

GAIDAR I. I., \*LITVINOVA L. V., \*\*VTYURINA I. YU., \*SOLOVYEV YU. N.,  
BEREZIN V. A., \*\*VASILOV R. G.

Dnepropetrovsk State University

\*Institute of Clinical Oncology, National Oncological Research Centre, USSR Academy of Medical Sciences, Moscow

\*\*Institute of Biotechnology, Minmedbioprom USSR, Moscow

Monoclonal antibodies against glial fibrillary acidic protein (GFAP) have been obtained using hybridoma technology. Monoclonal antibodies produced by clones 1C1 and 2A4 specifically interact only with GFAP and can be used as diagnostic reagents in studies of neuroepithelial tumours. Monoclonal antibodies of the clone 2B1 were used to study the expression of GFAP polypeptides in the developing brain by immunoblotting. The observed changes in the polypeptide composition of GFAP during human brain ontogenesis are temporary and provide evidence for changed gene expression during glia differentiation.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Dahl D., Bignami A. Brain Res., v. 57, p. 343—360, 1973.
2. Dahl D., Bignami A. —In: Cell, and Muscle Motility, v. 6 p. 75—96, N. Y., London, 1985.
3. Eng L. —F. for Proteins of the nervous system, v. 2, p. 85—117, N. Y. 1980.
4. Березин В. А., Жигарева Е. Н., Ромоданов С. А., Шевченко Г. М. Бродская И. А. Вopr. онкологии, т. 31, № 12, с. 7—17, 1985.
5. Готтшалак Я., Енш В. Архив патологии, т. 49, № 3, с. 3—11, 1987.



6. *Dahl D., Bignami A.* Biochim. et biophys. acta, v. 386, № 1, p. 41—51, 1975
7. *Березин В. А., Шевченко Г. М., Жмарева Е. Н., Кузнецов А. В., Кузнецова И. В.* Нейрохимия, т. 3, № 3, с. 327, 1984.
8. *Köhler G., Milstein C.* Nature, v. 256, p. 495—497, 1975.
9. *Fazekas de S. G., Scheidegger D. J.* Immunol. Meth., v. 35, p. 1—21, 1980.
10. *Voller A., Bidwell D. B., Bartlett A.* The enzyme linked immunosorbent assay. Dynatech. Eur. Borough House, 1979.
11. *Towbin H., Staehelin T., Gordon J.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, v. 76, с. 4350—4354, 1979.
12. *Ljubimov A. V., Afanasjeva A. V., Litvinova L. V., Sentin V. M.,* Exp. Cell Res., v. 165, p. 530—540, 1986
13. *Osborn M. J.* Invest. Dermatol., v. 281, p. 104—109, 1983.

Поступила 4.II.1990