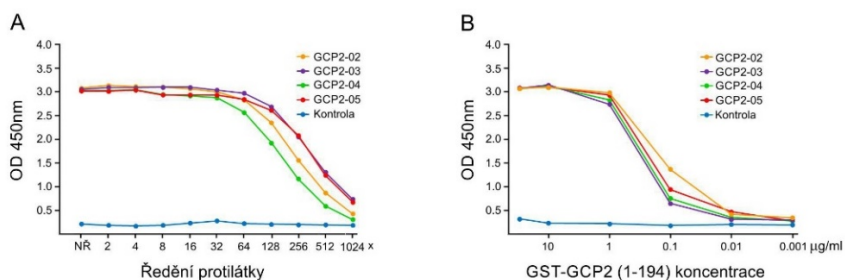
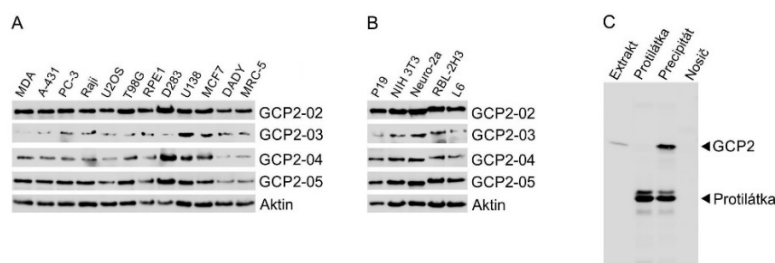


Panel monoklonálních protilátek anti-GCP2 pro diagnostiku nádorových onemocnění

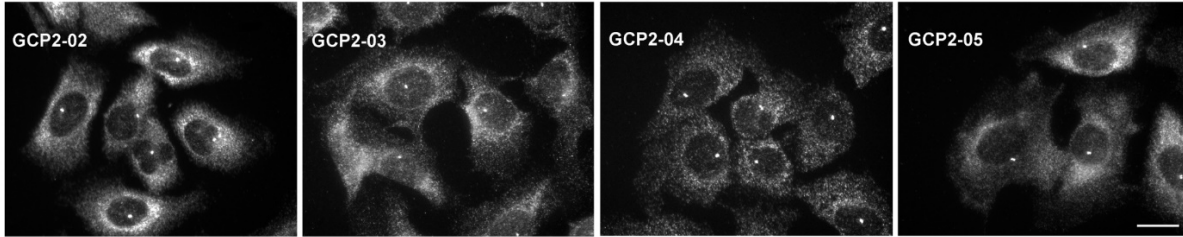
Protein GCP2 spolu s gama-tubulinem tvoří komplexy nutné pro tvorbu mikrotubulů. Bylo prokázáno, že se gama-tubulin ve zvýšené míře nachází v různých typech nádorových buněk a představuje novou značku prognózy gliomů. Rovněž bylo nalezeno, že v gliomech je aberantně exprimován GCP2. Lze očekávat, že zvýšená tvorba proteinů gama-tubulinových komplexů je příčinou deregulace mikrotubulů nádorových buněk. Na Ústavu molekulární genetiky AV ČR v.v.i. byl připraven panel protilátek, které v imunoblotingu reagují specificky s myším GCP2. Pro širší využitelnost těchto protilátek byla v rámci projektu TAČR-Gama stanovena jejich reaktivita a specifita v dalších testech. Byla rovněž určena sekvence rozpoznávaných epitopů. Výsledky ukázaly, že myší monoklonální protilátky GCP2-02 (IgG1, kapa), GCP2-03 (IgG1, kapa), GCP2-04 (IgG2b, kapa), GCP2-05 (IgG1, kapa), jsou použitelné pro ELISA testy (**Obr. 1A a 1B**), imunobloting na buněčných liniích různého druhového a tkáňového původu (**Obr. 2A a 2B**) a pro imunoprecipitaci, zejména GCP2-04 (**Obr. 2C**). Protilátky značí GCP2 jak v imunofluorescenční mikroskopii (**Obr. 3**), tak i tkáňových řezech (GCP2-04). Pomocí "pulldown" experimentů byly určeny oblasti vazby protilátek na molekulu proteinu (**Obr. 4A**). Pomocí imobilizovaných syntetických peptidů byla v těchto oblastech určena vazebná místa pro protilátky. (**Obr. 4B**). Protilátky rozpoznávají tři unikátní epitopy v N-terminální doméně GCP2 proteinu (**Obr. 4C**).



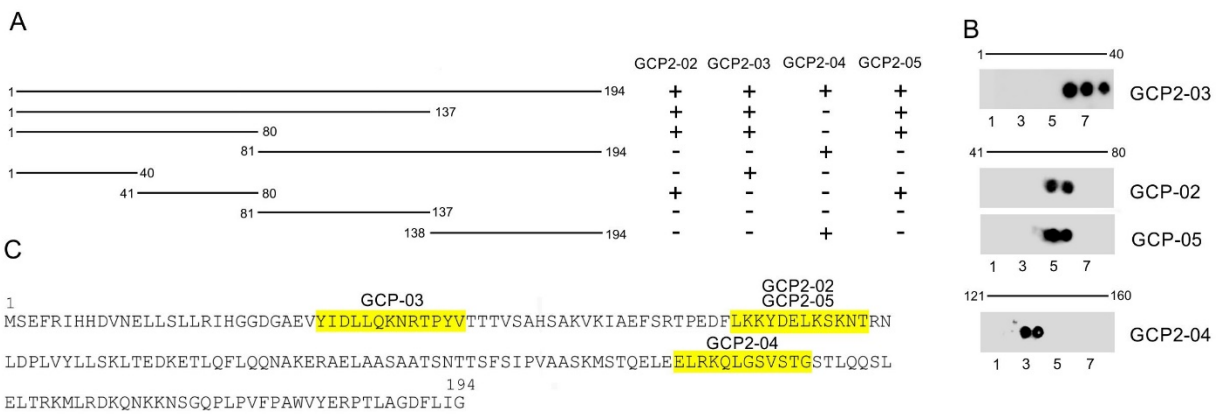
Obr. 1. ELISA testy s anti-GCP2 protilátkami. (A) Titrační analýza vazby protilátek ve formě supernatantů z hybridomových buněk na imobilizovaný GCP2 protein. Doména, GST-GCP2 (1-194), obsahující cílové epitopy a negativní kontrola (GST) byly imobilizovány v koncentraci 10 $\mu\text{g/ml}$. NŘ, neředěná protilátka. Vazba na GST je ukázána jen pro GCP2-02. (B) Detekce imobilizovaného GST-GCP2 proteinu pomocí panelu protilátek proti GCP2 a protilátky proti tubulinu (negativní kontrola). Protilátky byly použity ve formě supernatantu.



Obr. 2. Analýza exprese GCP2 proteinu v buněčných liniích (A-B) s využitím protilátek GCP2-02, GCP2-03, GCP2-04 a GCP2-05 a jeho imunoprecipitace (C) pomocí protilátky GCP2-04. (A) Imunoblot celkových buněčných lyzátů, solubilizovaných v SDS-vzorkovém pufru, lidských linií. (B) Imunoblot buněčných lyzátů myších (P19, NIH 3T3, Neuro-2a) a krysích (RBL-2H3, L6) linií. Aktin, kontrola nanašky buněčných lyzátů. (C) Imunoprecipitace z extraktu (1% NP-40) lidských buněk U2OS. Protilátka, imobilizovaná protilátka bez extraktu; Nosič, protein G bez protilátky inkubovaný s extraktem. K imunoprecipitaci i imunoblotingu byla použita protilátka GCP2-04.



Obr. 3. Imunofluorescenční lokalizace GCP2 v interfázních buňkách lidské linie U2OS s pomocí monoklonálních protilátek GCP2-02, GCP2-03, GCP2-04 a GCP2-05. Všechny protilátky značí GCP2, který je koncentrován v centrozómech. Metanolová fixace, Úsečka je 20 µm.



Obr. 4. Identifikace epitopů rozpoznávaných protilátkami GCP2-02, GCP2-03, GCP2-04 a GCP2-05. (A) Analýza reaktivit protilátek s GST-konstrukty GCP2 proteinu (+, pozitivní reakce). (B) Epitopové mapování s využitím imobilizovaných syntetických peptidů (15-mer, překryv 11 aa) pokrývajících aa oblasti 1-40, 41-80 a 121-160 (C) Pozice epitopů rozpoznávaných protilátkami GCP2-02, GCP2-03, GCP2-04 a GCP2-05 jsou vyznačeny žlutě..

Závěr: Výsledky ukazují, že myší monoklonální protilátky GCP2-02, GCP2-03, GCP2-04 a GCP2-05 mají vlastnosti, které je předurčují pro užití v ELISA testech, imunoblotingu, imunoprecipitaci (GCP2-02, GCP2-04, GCP2-05), imunocytochemických i histochemických (GCP2-04) experimentech. U všech protilátek byla identifikována sekvence rozpoznávaného epitopu.

V případě zájmu o další informace anebo zakoupení neexklusivní licence na hybridomy produkující protilátky GCP2-02, GCP2-03, GCP2-04 nebo GCP2-05 se obraťte na **Centrum pro Transfer Technologii**, ÚMG AVČR, Vídeňská 1083, 14220 Praha 4, Tel. (420-241 063 227 nebo 420-602 892 876).