

Protilátkové arrays odhalující nové prognostické znaky dětských akutních leukemií

Veronika Kanderová, Jan Stuchlý, Daniela Černá, Ondřej Hrušák, Tomáš Kalina
Klinika dětské hematologie a onkologie, CLIP-Cytometrie

Heidi Slåstad, Weiwei Wu, Luiz F. De Souza Goulart, Daniel de la Rosa Carrillo,
Anders Holm, Fridtjof Lund-Johansen
Rikshospitalet Medical Center and the University of Oslo, Norway

norwegian financial mechanism

norway
grants

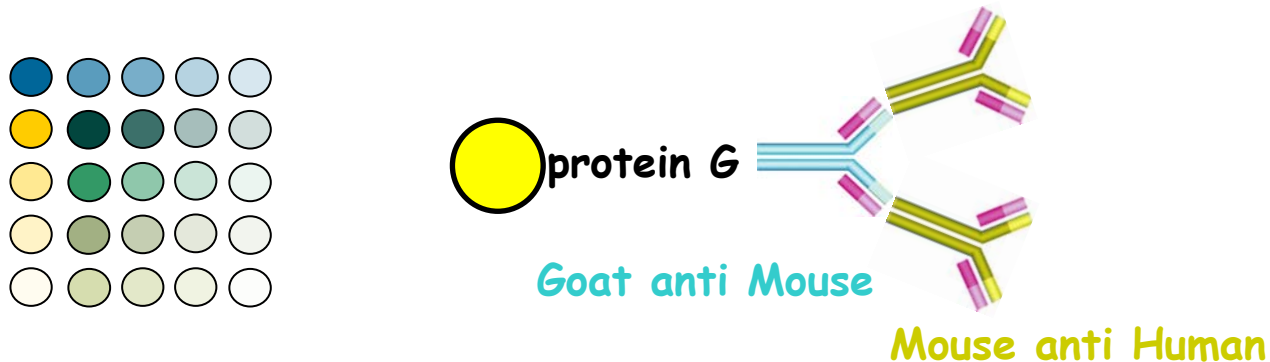
eea
grants
iceland liechtenstein norway



Proč proteomika, když máme genomiku?

PROTOŽE PROTEINY A NIKOLIV GENY PŘEDSTAVUJÍ FENOTYP

- špatná korelace hladin mRNA a skutečných hladin bílkovin
- na základě sekvence DNA nebo mRNA nelze určit funkci proteinu
- pomocí studia genomu nelze popsat molekulární mechanismy



1) Izolace buněčného proteomu

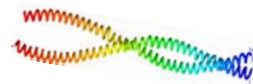


Periferní krev
Leukemické linie
Primárních leukemické buňky

extrakce všech proteinů

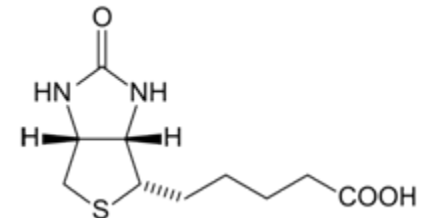
extrakce membránových a cytoplazmatických proteinů

biotinilace proteinů



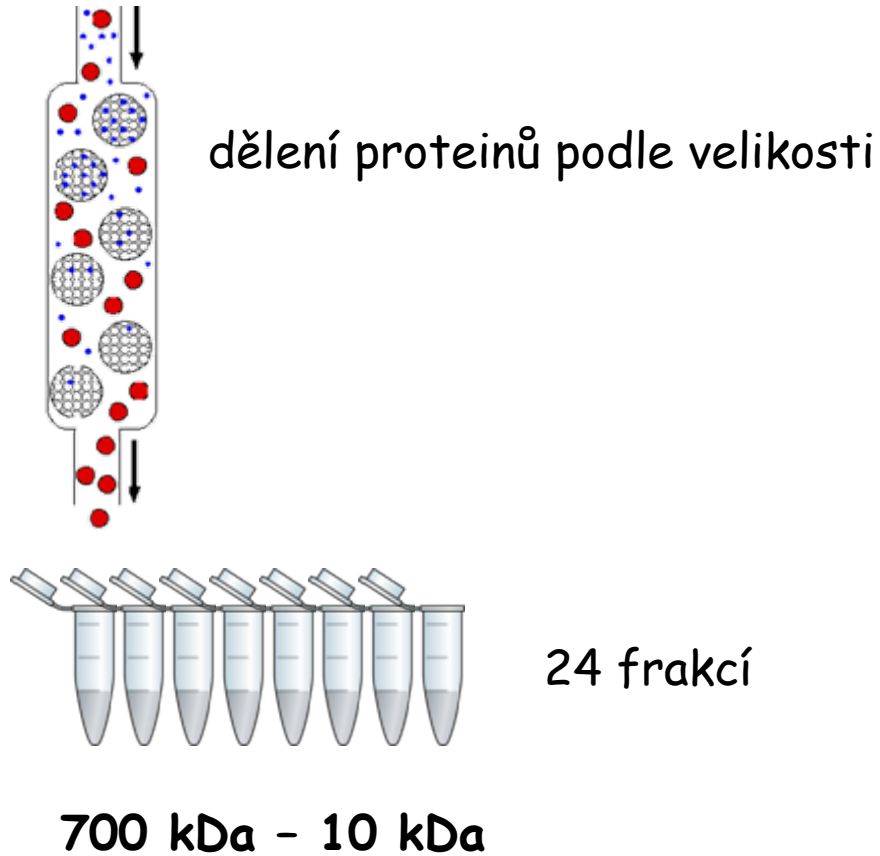
protein-biotin

biotin-PEO4-NHS



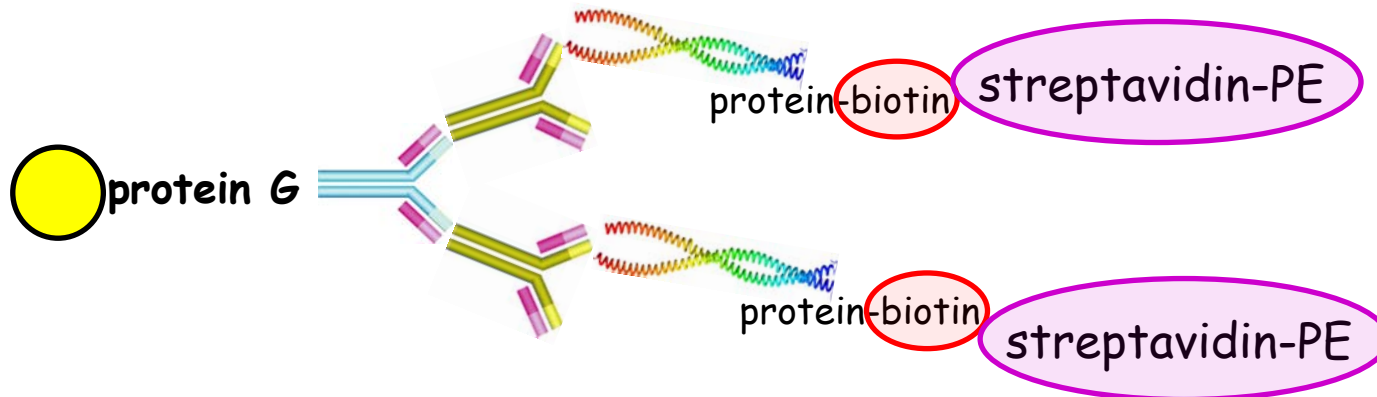
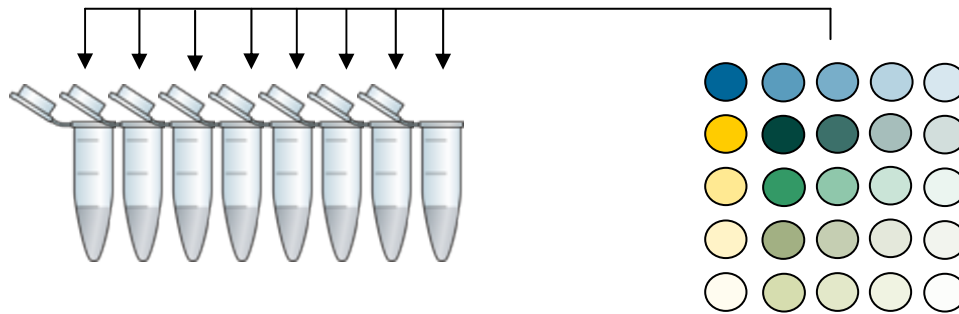
2) Chromatografie

Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC)

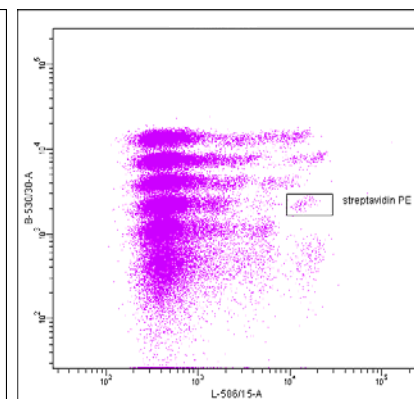
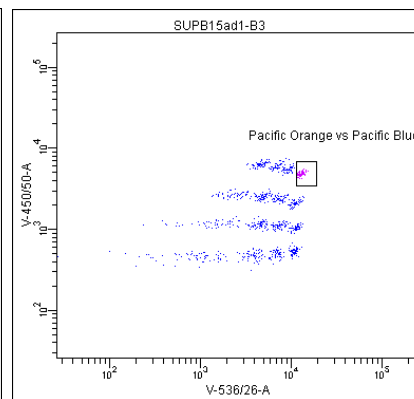
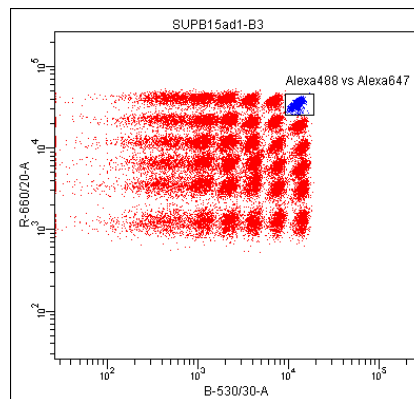


3) Imunoprecipitace a fluorescenční značení

inkubace frakcí z FPLC s fluorescenčně značenými kuličkami s navázanými protilátkami



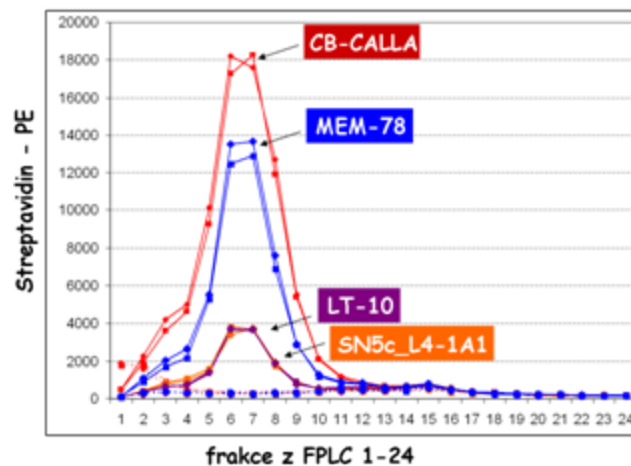
4) FACS detekce a analýza



Vlastní softwarová analýza, viz <http://clip.lf2.cuni.cz/>

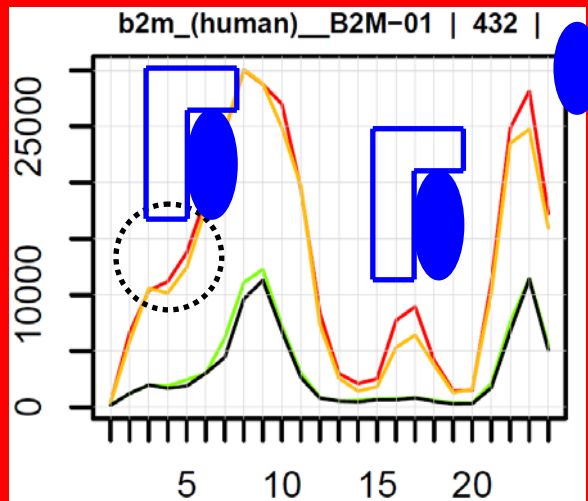
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 24 |
|--------------------|------|------|------|------|-------|-------|-------|-------|------|------|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| SUP-B15 (CD10 pos) | 1796 | 1788 | 898 | 416 | 399 | 300 | 280 | 261 | 333 | 372 | 437 | 397 | 447 | 390 | 464 | 399 | 350 | 213 | 197 | 177 | 164 | 139 | 193 | 143 |
| R5 4.11 (CD10 neg) | 459 | 2261 | 4202 | 5016 | 10144 | 18186 | 17599 | 12733 | 5542 | 2128 | 1185 | 879 | 655 | 691 | 810 | 533 | 340 | 296 | 306 | 227 | 223 | 200 | 198 | 191 |

CD10



5) Jak data zobrazovat?

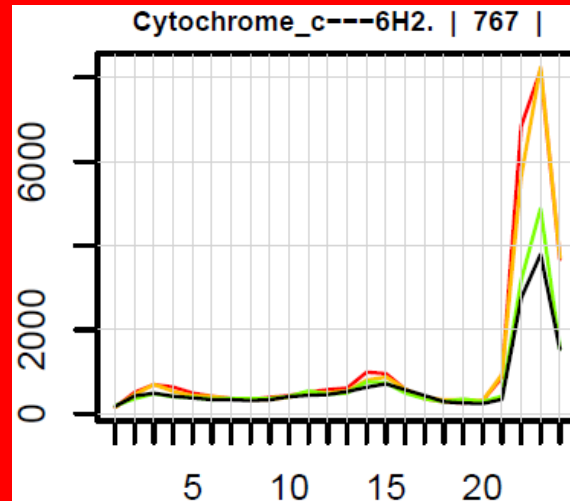
β 2 microglobulin



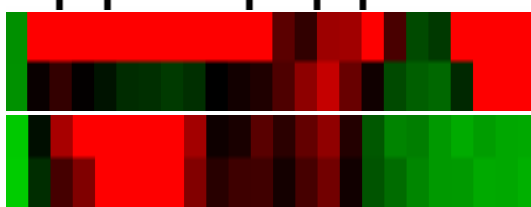
SUP-B15

RS 4,11

cytochrom c



670 440 158 75 50 kDa



β 2 microglobulin

cytochrom c

CD10_Sn5c_L4-1A1

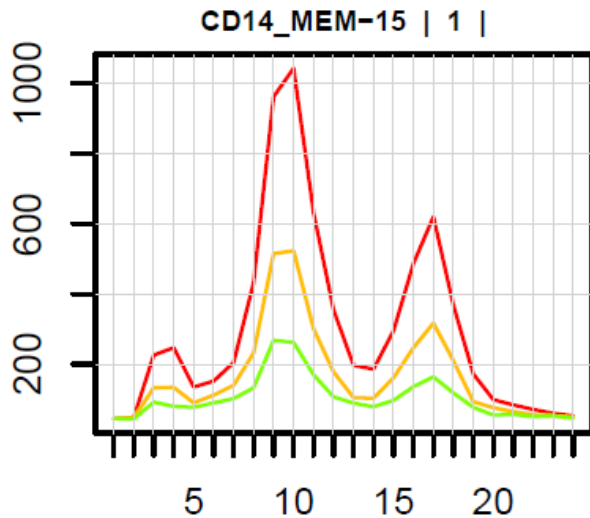
CD10_LT-10

B-ALL

6) Výsledky 1

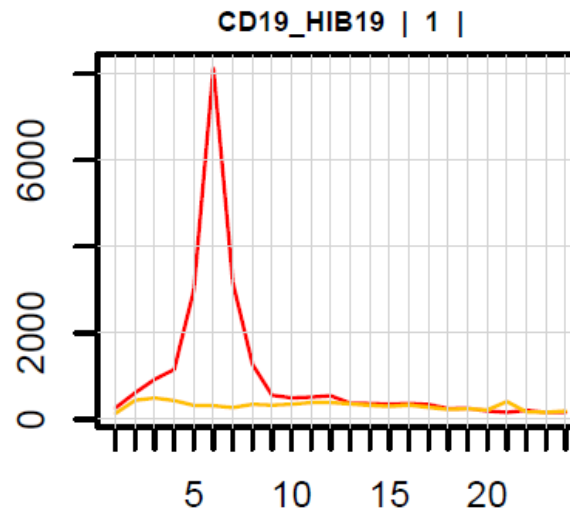
1100 vybraných cílů

diagnostické znaky - povrchové markery



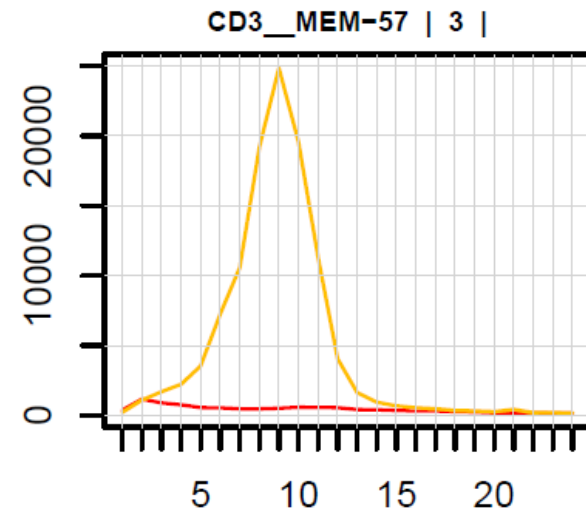
senzitivita

monocyty v PK



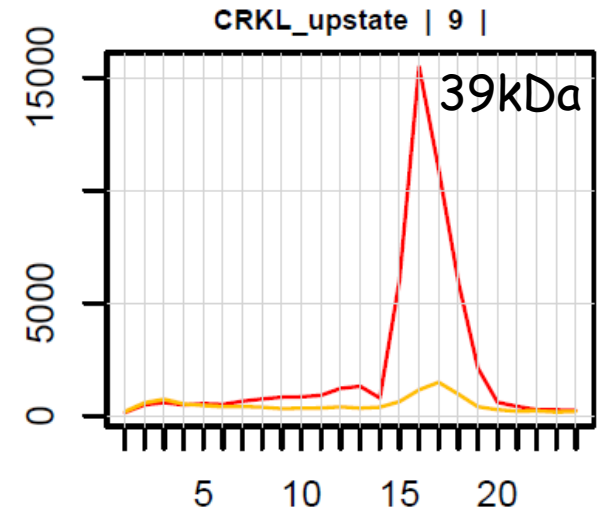
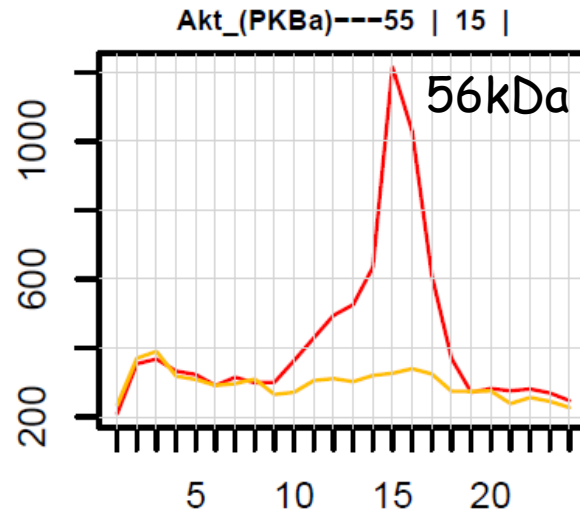
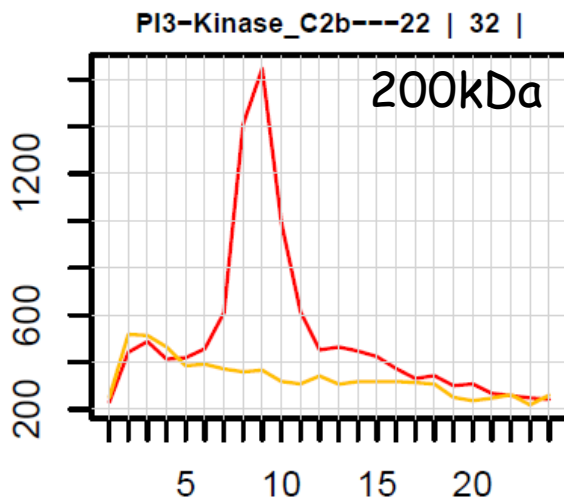
specifita

B- a T- leukemické buněčné linie

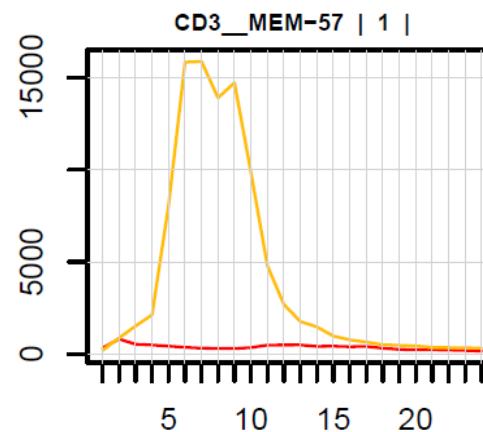
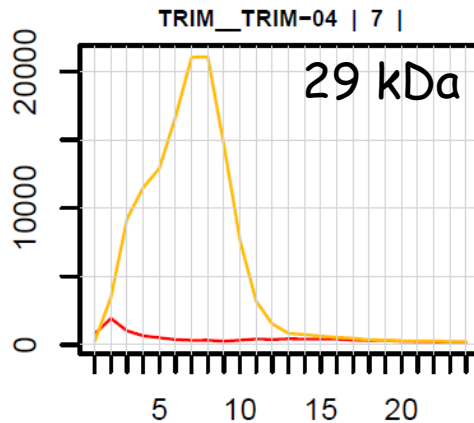


6) Výsledky 2

intracelulární signalizační proteiny a proteiny důležité u leukemií



cytoplazmatická x membránová lokalizace



7) Shrnutí

- ➊ Výběr znaků pro diagnostiku, predikci prognózy a výzkum signalizace a biologie
- ➋ Vytvoření arrays s 1100 protilátkami
- ➌ 8 různých buněčných leukemických linií ... následují primární maligní vzorky
- ➍ Analýza dat ... volba vhodného analyzačního přístupu

Proteinové „arrays“ s rozlišením velikosti jsou mocným „high-throughput“ nástrojem pro studium buněčných dějů.

Děkuji za pozornost



Tomáš Kalina, *Mr. FACS*

Daniela Černá, *Miss. Protein*

Jan Stuchlý, *Mr. Maths*

Ondřej Hrušák, *Mr. Leukemia*

Martina Vášková, *Mrs. Chip-Array*

Ester Mejstříková, *Miss. Diagnostics*

Ondrej Horváth, *Mr. Laser*

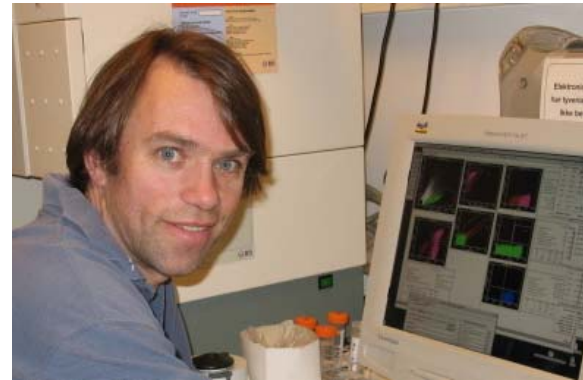
Karel Fišer, Jiří Soukup

Dana Čadková

Renáta Bourahi



Fridtjof Lund-Johansen, *Mr. Bead*



and *The Protein Team*

Heidi Slåstad

Weiwei Wu

Luiz Fernando De Souza Goulard

Daniel de la Rosa Carrillo

Anders Holm