

Rövid és hosszútávú in vitro immunológiai diagnosztikus eljárások

2011. / 8

Immunológiai és Biotechnológiai Intézet

PTE KK

Bevezetés

- **Definíció:** az élő szervezeten kívül (*in vitro*) tartunk élő sejteket
- **Cél:**
 - a kísérleti állatok kímélése, ha lehetséges
 - sejtek funkcionális vizsgálata
- **Előny:** precízen kontrollált kísérleti körülmények

Kezdetek:

- 1885. Roux embrionális madár sejtek
- 1889. amnion folyadékban tartott humán bőrsejteket

Osztályozás

- **Sejt – szövet, szervekultúra**
- **Rövid távú – hosszú távú kultúra**

Rövid távú kultúrák

A különböző szervezetekből, szövetekből izolált sejtek 1-2 napig *in vitro* is eltarthatók, de proliferációt csak stimulálás után lehet kiváltani. 30-50 osztódás után ezek a sejtek a legtöbb esetben elpusztulnak. Néhány sejt azonban túlélhet és folyamatosan osztódhat. Néhány sejtvonal ilyen egyedi, folyamatosan osztódó, túlélő sejtekből származik.

Hosszú távú kultúrák

A sejtvonalak általában tumoros eredetűek. A tumoros fenotípus könnyebben alkalmazkodik az in vitro tenyésztési körülményekhez, mint a normális fenotípusú sejtek. A folyamatosan osztódó sejteknek ezen tulajdonsága a nagyobb kromoszómaszám következménye lehet. (pl. 70-80 chromosoma a HeLa tumor sejtvonalba).

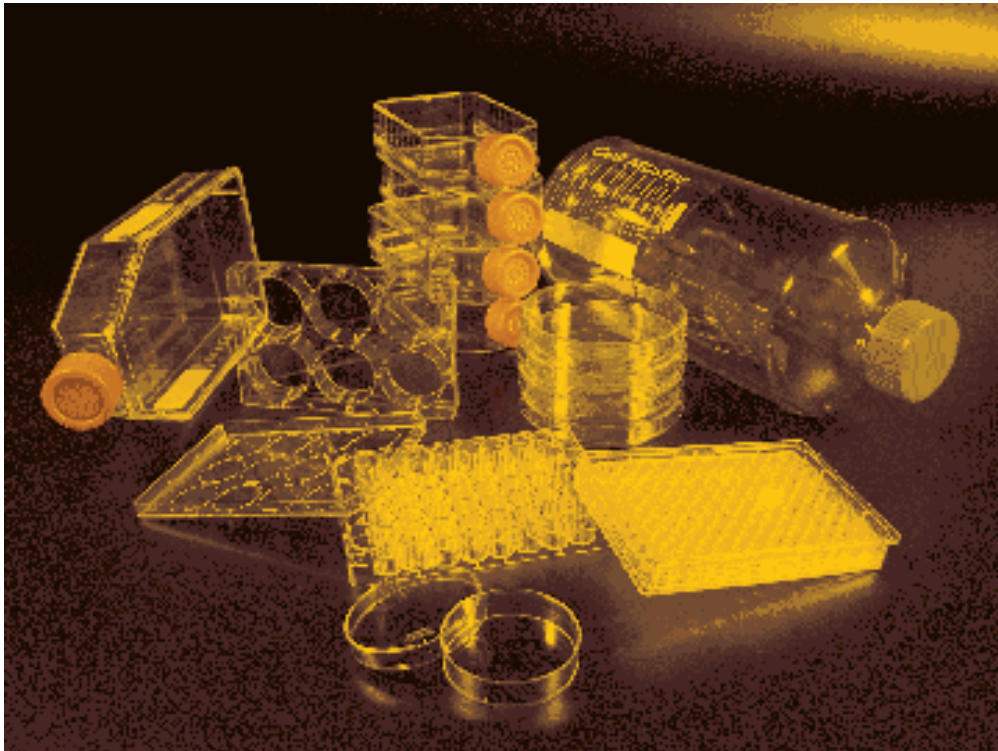
Tenyésztési körülmények

- **Teljes sterilitás!**
- Inkubátor (állandó ~ 37 °C hőmérséklet, ~ 90 % páratartalom, $p\text{CO}_2 \sim 5-6$ %)
- Tenyésztő oldat (médium) – optimális pH, tápanyagok (szénhidrátok, aminosavak, nukleotidok, vitaminok, peptidek, hormonok, növekedési faktorok), antibiotikumok.
- **A sejtek hosszú távú tárolása** folyékony nitrogénben lehetséges.

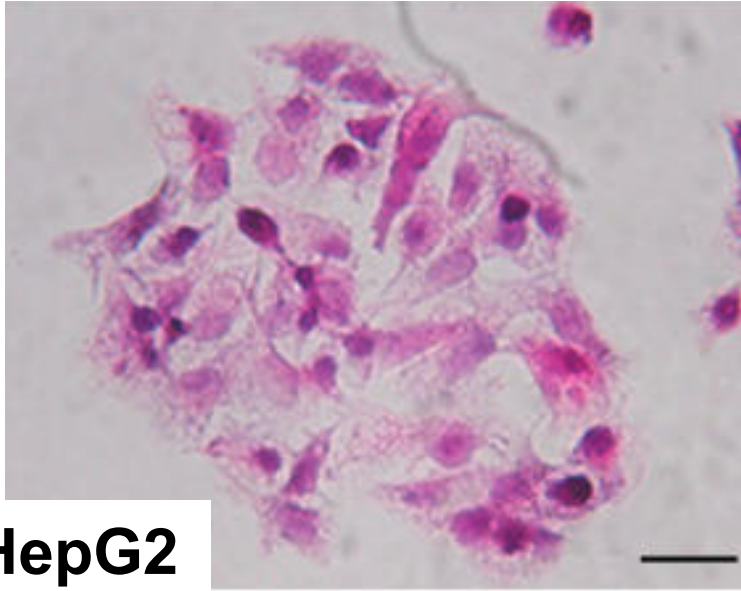
Szövettenyésztő steril fülke (laminar air flow)



Tenyésztő edények és médium



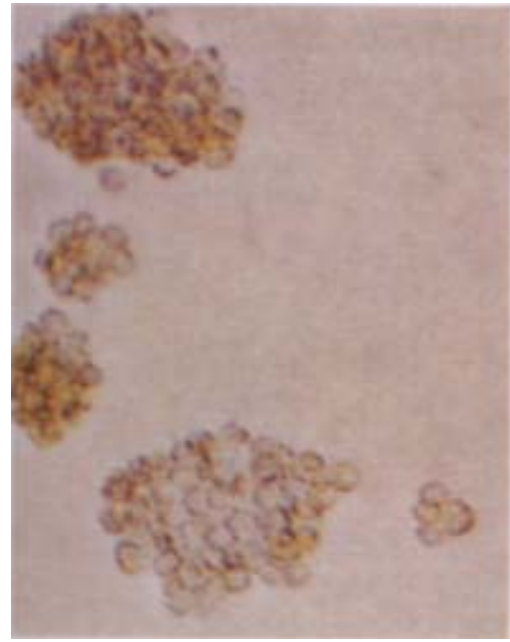
Sejtvonalak



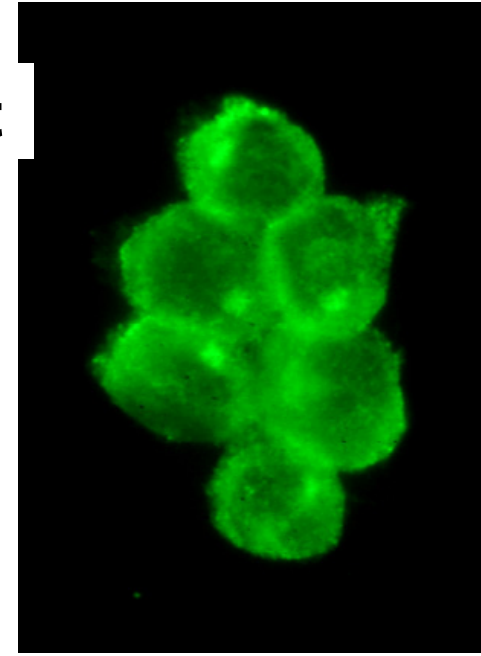
HepG2



HeLa



Jurkat



Életképesség meghatározása

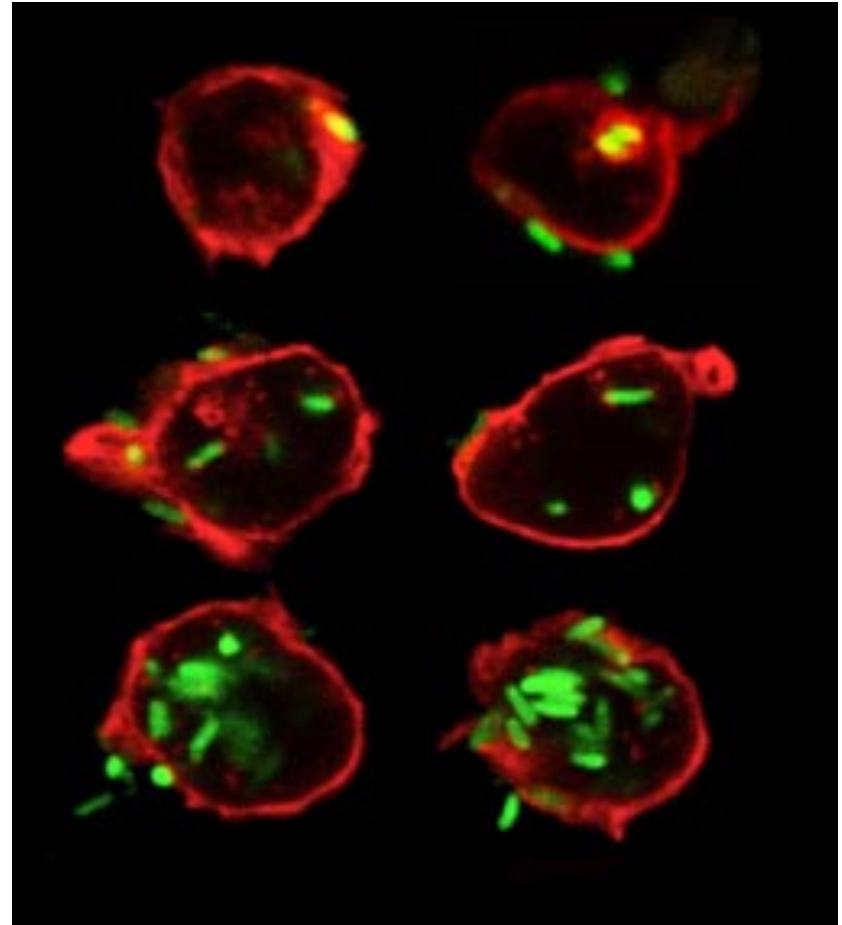
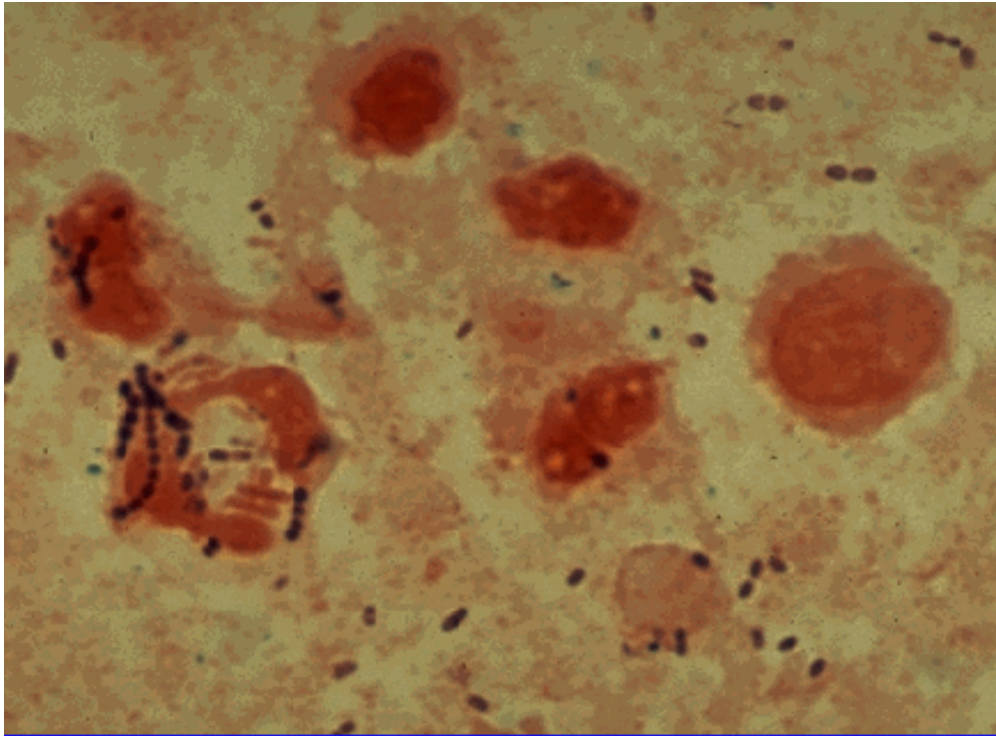
Festékkizárásos tesztek:

- **Tripan kék**
- **7-amino-actinomycin D**
- **Propidium-iodide**

Fagociták funkcionális tesztjei

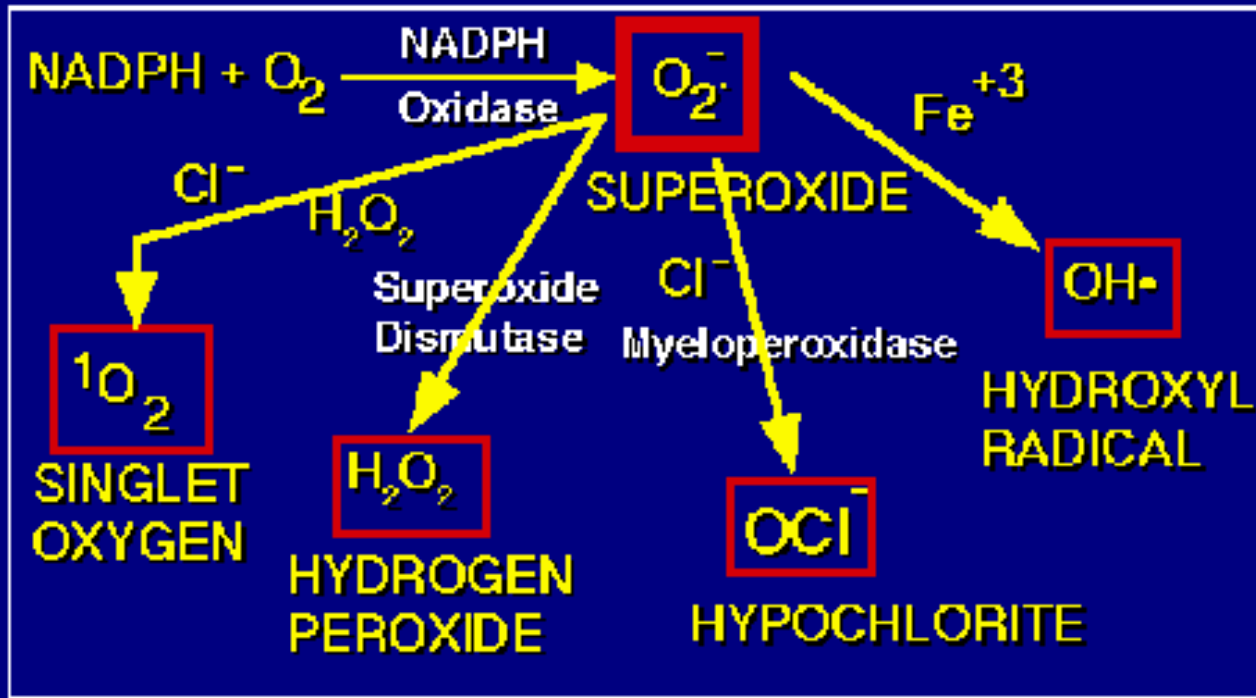
- **Izoláció** üveg vagy műanyag felületekhez kitapadnak
- **Migráció** spontán, irányított (chemotaxis), skin-window test
- **Fagocitózis** **nem-opszonizált** (nem specifikus receptorok által – lektinek), **opszonizált** (Fc receptor dependens, komplement receptor dependens fagocitózis)
- **Respiratory burst, fagocita enzimek** NBT-teszt, mieloperoxidáz, acid-foszfataz, lizozim
- **Mediátorok, citokinek** IFNg, TNFa, leukotriének, prosztaglandinok, tromboxánok, hisztamin stb. termelés kimutatása ELISA, RIA, FIA módszerrel.

Fagocitózis



O₂ szabadgyök produkció

Generation of Reactive Oxygen Species (ROS)



Limfocita funkcionális tesztek

- **Limfociták poliklonális aktivációja:** növényi lektinek (PHA, ConA), bakteriális sejtfal komponensek (LPS, dextrane-sulphate)
- **T-sejtek funkcionális tesztje:** citotoxikus aktivitás detektálása - Cr release assay
- **NK-sejtek funkcionális tesztje:** tumor sejt lízis (target sejt vonal: K562)
- **B-sejtek funkcionális tesztje:** Ig detektálás (Ig produkció immuncitokémiával, ELISA-val, plaque-forming sejt-szám (PFC), Ig génátrendeződés detekció PCR-rel, passzív kután anafilaxia (PCA) teszt)

Limfocita funkcionális tesztek

- Kevert limfocita kultúra (Mixed lymphocyte culture):

Transzplantáció előtti vizsgálat

- Citokinek termelése

ELISA, Elispot, multiplex tesztek

Autoantitestek vizsgáló módszerei, HLA tipizálás

Természetes autoantitestek

- **IgM**
 - **Alacsony affinitás**
- **Alacsony szérumszint (ng/ml)**
 - **Polireaktív**
 - **CD5 + B1 sejtek**

Természetes autoantitestek által felismert antigének („immunológiai homunculus”)

Heatshock proteins	hsp65, hsp70, hsp90, ubiquitin
Enzymes	aldolase, citockrom c, SOD, NAPDH
Cell membrane components	β2-microglobulin, spectrin, acetylcholin receptor
Cytoplasmic components	actin, myosin, tubulin, myoglobin, myelin basic protein
Nuclear components	DNS, histones
Plasma proteins	albumin, IgG, transferrin
Cytokines, hormones	IL-1, TNF, IFN, insulin, thyreoglobulin

Pathológiás autoantitestek

- **IgG, IgA v. IgM**
- **Nagy affinitás**
- **Magas szérumszint (mg/ml)**
 - **B2 sejtek**

Autoimmun betegségek

- Szisztémás: SLE, RA, Sjögren-sy.,
dermatomyositis,
polymyositis

Szerv specifikus: IDDM, Addison-kór

Hashimoto-thyroiditis

Graves-betegség,

Myasthenia gravis

Az autoantitestek kimutatására használt főbb módszerek

- Screening tesztek:

- **Direkt immunfluoreszcencia** a betegből vett szövetmintán
- **Indirekt immunfluoreszcencia:** humán Hep-2 sejtenyészetben vagy állati eredetű szövetmintán

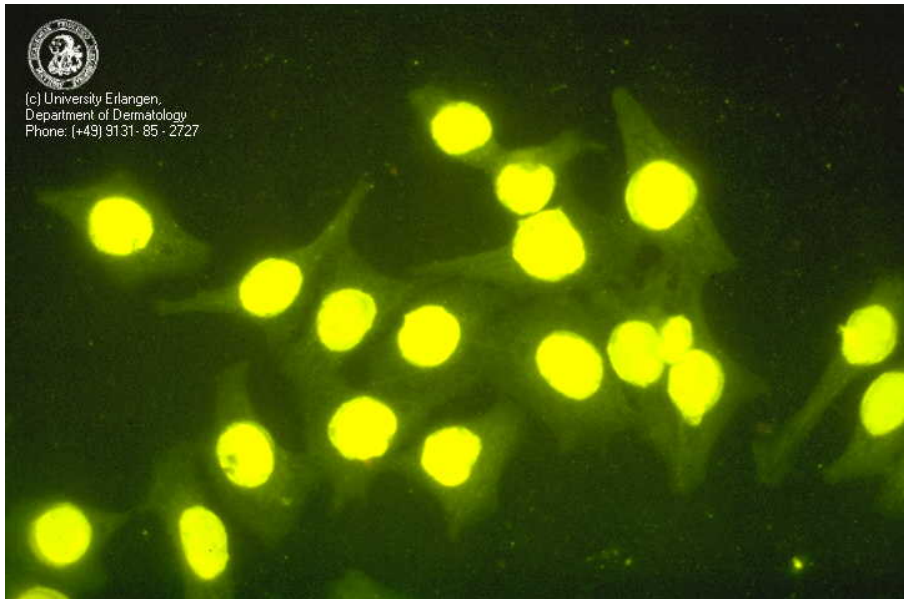
Az autoantitest specifikus mintázatot ad egy-egy szöveten, vagy sejten belül (nukleáris, nukleoláris, centromer, citoplazmatikus, mitokondriális stb mintázat)

(képek: <http://www.labodia.com/en/ana/Atlas/anaatlasocyto2.htm>)

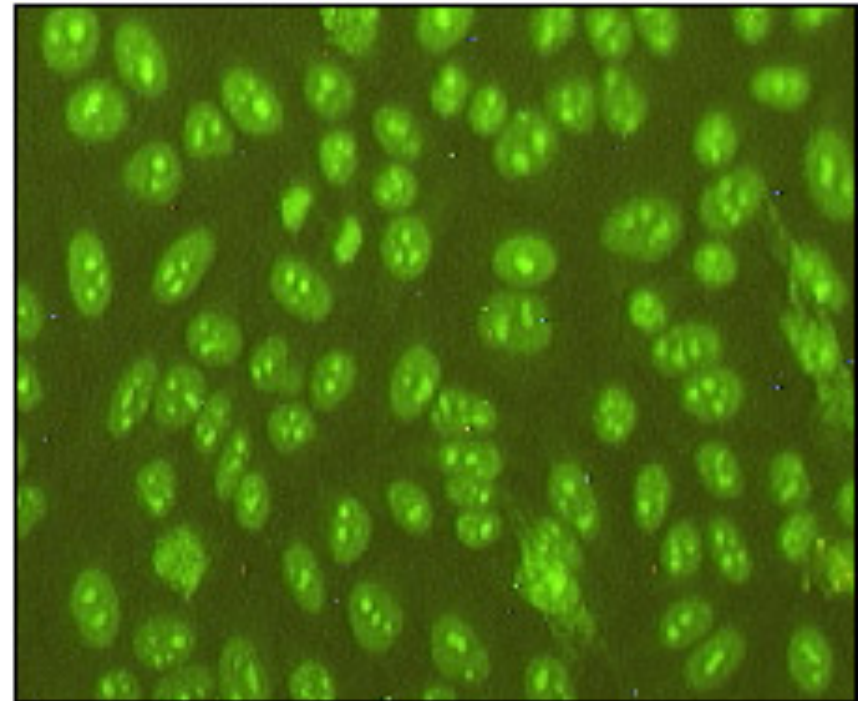
- Antigén specifikus vizsgálatok:

A screening teszt eredménye és a klinikai kép alapján antigén specifikus **ELISA**, **Western blot**, vagy **radiális immundiffúzió** módszerével.

Indirekt immunfluoreszcencia

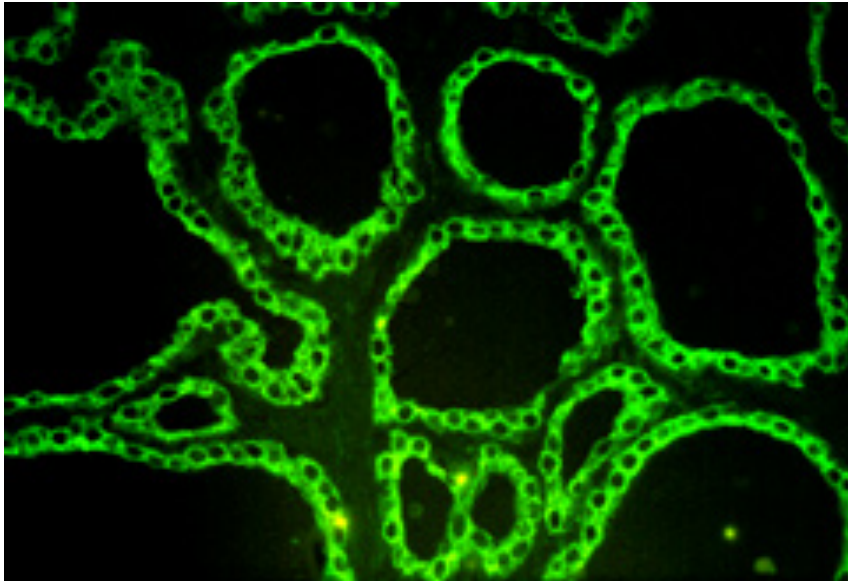


**Homogén magfestődés
(dsDNA, Hep2 sejtek)**

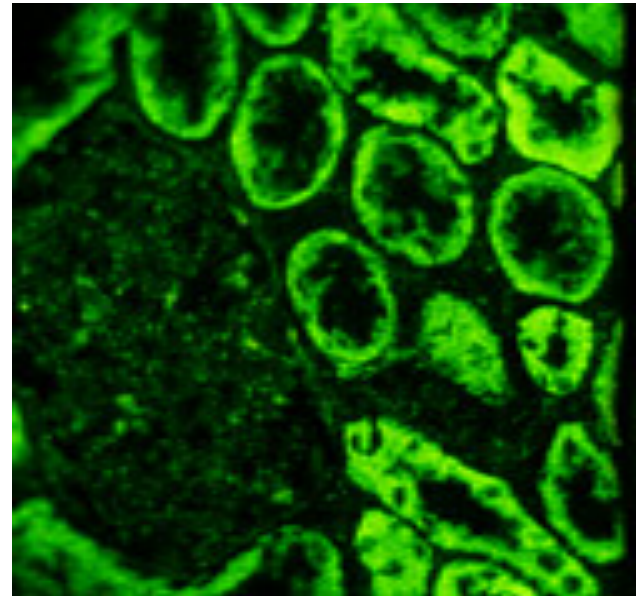


**Nukleoláris festődés
(SSA, Hep2 sejtek)**

Indirekt immunfluoreszcencia



**Pajzsmirigy – TPO
(Pajzsmirigy szöveten)**



**Mitokondriális festődés
(vese szöveten)**

Systemás betegséget jelző autoantitest (AAT) panelek

- **Anti-nukleáris AAT (ANA):**
 - kettősszalú DNS
 - ANA screen (Hep-2 extractum)
 - ENA-6 család
 - Centromer (Cenp-B)
- **Anti-neutrofil citoplazma AAT:**
 - MPO (myeloperoxidase) (ANCA)
 - PR3 (proteinase3)
- **Foszfolipid syndroma:**
 - cardiolipin,
 - b2-glycoprotein-1
 - foszfatidil szerin,
 - proteinS, proteinC,
 - prothrombin elleni

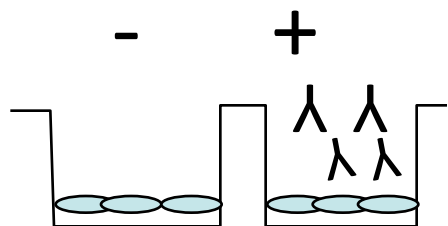
AAT

Szervspecifikus autoantitestek

- **Pajzsmirigy elleni AAT: - thyreoglobulin, TPO**
- **Coeliakiát jelző AAT: - szöveti transzglutamináz (tTG), gliadin, endomysium, desmin, simaizom**
- **Diabetes mellitus AAT: glutamic acid decarboxylase (GAD), thyrosine phosphatase (IA2)**
- **Primer biliaris cirrhosis: anti-mitochondriális AAT**
- **Goodpasture syndroma: GBM elleni AAT**

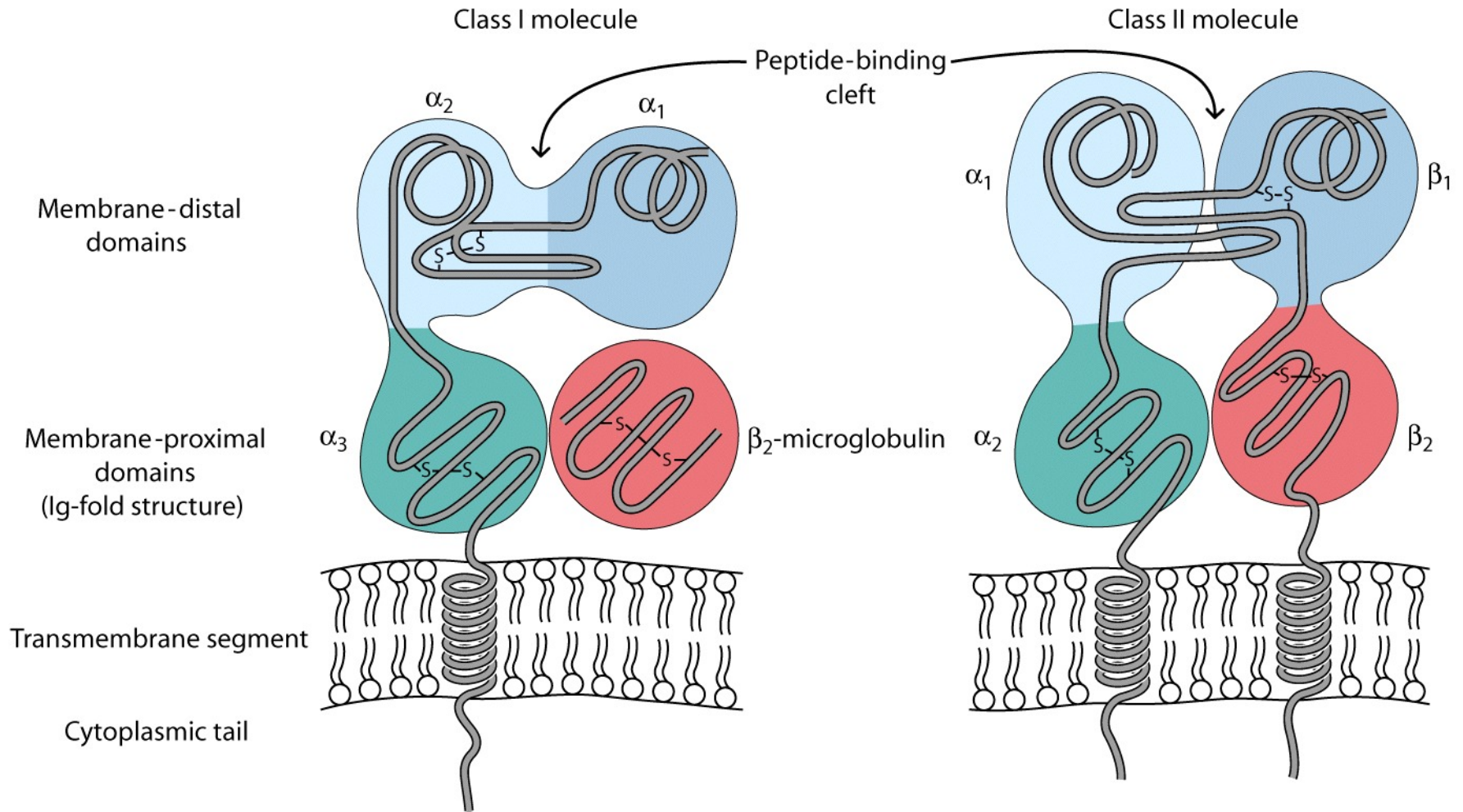
ELISA elve: minden antigén specifikus AAT mérése külön kit-ben

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Blank	3	11	19								
B	Cal.1	4	12	20								
C	Cal.2	5	13									
D	Cal.3	6	14									
E	Cal.4	7	15									
F	+ ctrl	8	16									
G	-- ctrl	9	17									
H	Se.1	10	18									89.



1. Antigénnel fedett ELISA lemez
2. Szérum minta 100x hígításban
3. anti-humán IgG / IgM -HRPO
4. Szinreakció mérése

MHC-I. és II. szerkezete

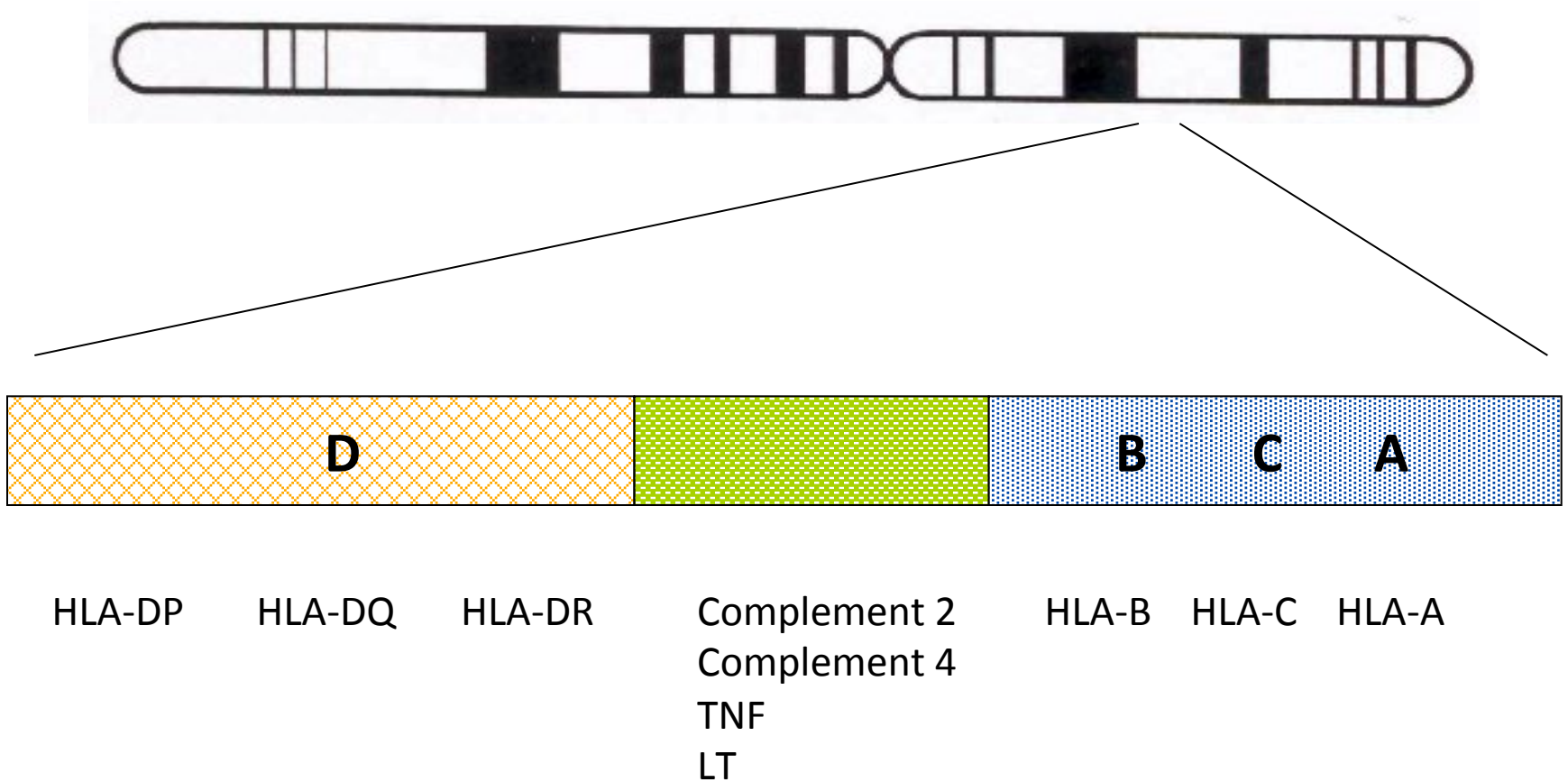


Öröklődés

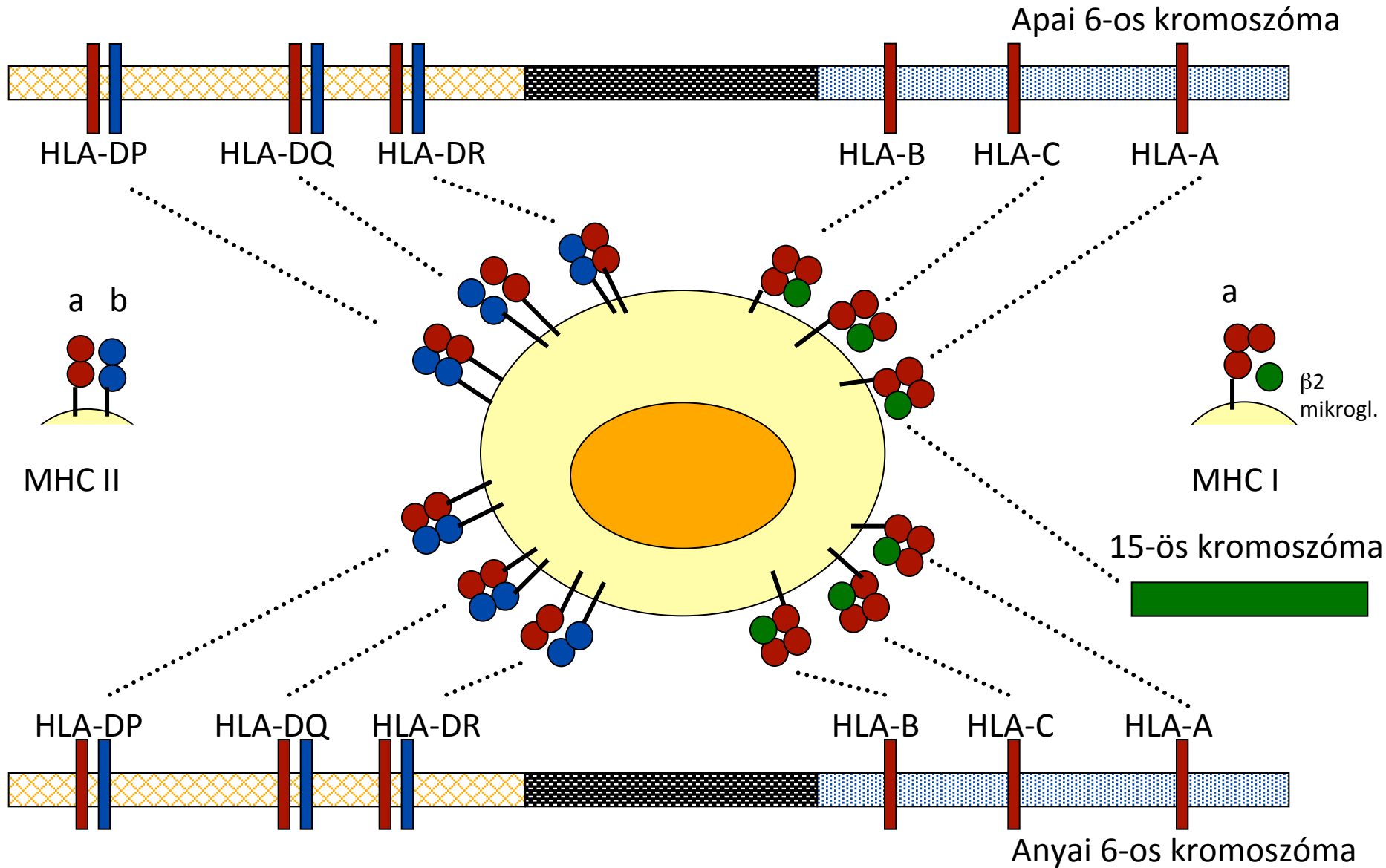
- **Poligénes**
- **Polimorf**
- **Kodomináns**

HLA gének szerkezete

Humán 6-os kromoszóma rövid karja



HLA gének terméke kodominánsan expresszálódnak



A HLA tipizálás felhasználása

- **HLA polimorfizmus variánsok (allotípusok) meghatározása.**
- **Transzplantáció esetén donor-recipient hisztokompatibilitási viszonyainak egyeztetése.**
- **Hisztokompatibilitási antigénekkal szembeni szenzitizáció fokának nyomon követése.**
- **Autoimmun betegségekre predisponáló haplotípusok kimutatása.**

HLA típusok, HLA identikus donor szelekció

1960-as évek: szerológiai módszerek – szerotípusok

1980-as évek: genetikai módszerek kezdete

1990-es évekre az összes I osztályú HLA gént megszekvenálták

6 / 6 antigén egyezése – A, B, DRB1

10 / 10 antigén egyezése – A, B, C, DRB1, DQB1

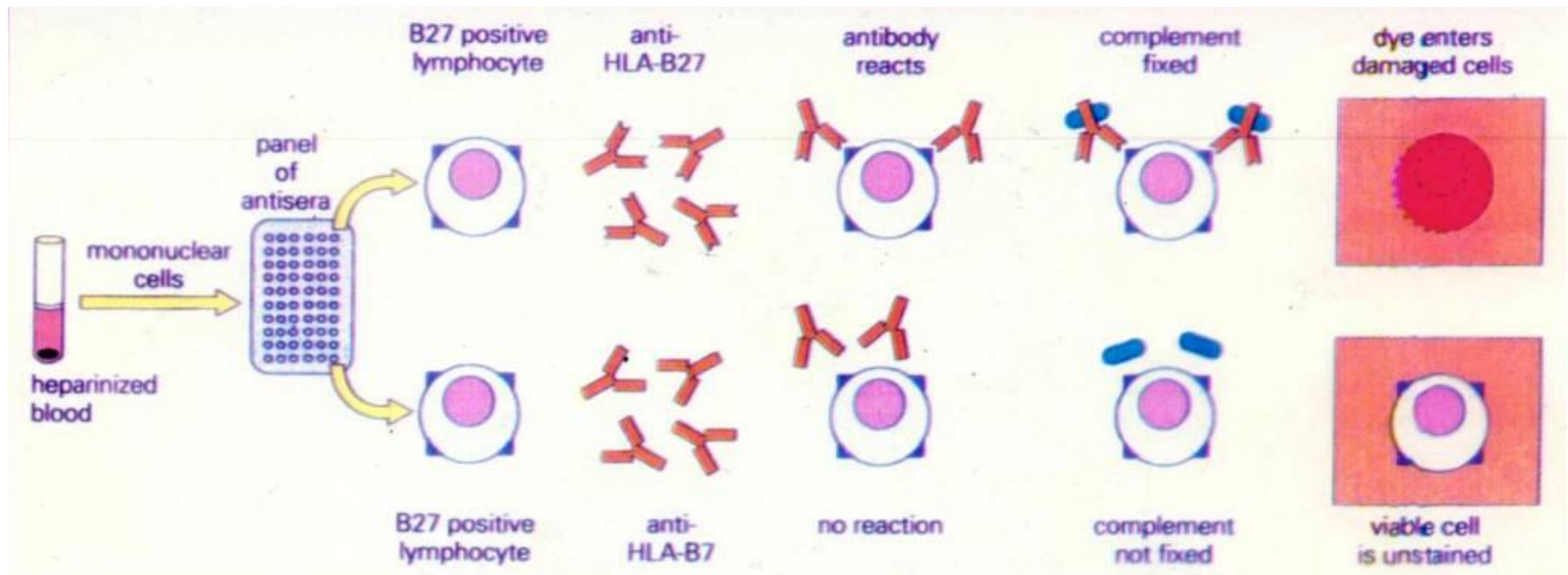
10 / 10 allél egyezése – A, B, C, DRB1, DQB1

12 / 12 allél egyezése – A, B, C, DRB1, DQB1, DPB1

HLA tipizálás 1. – Szerológiai módszerek

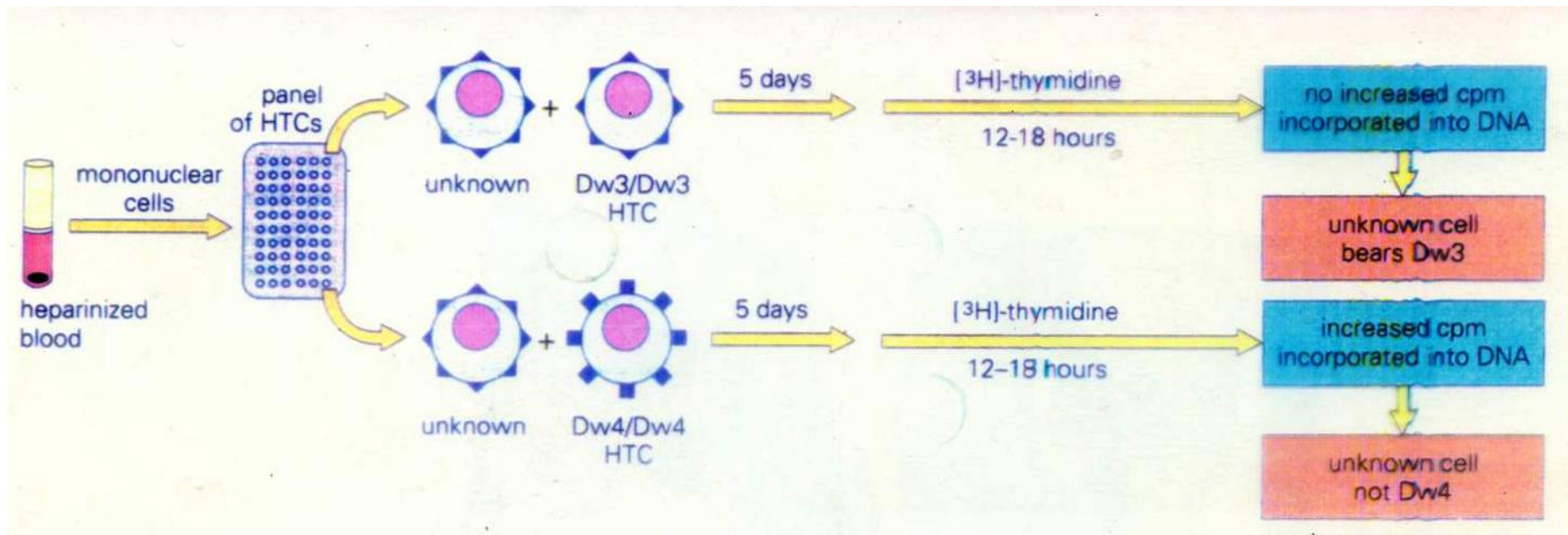
- **Mikrocitotoxicitási teszt (Terasaki) tipizáló savók + lymphocyták**
- **Panel reaktív antitest (HLA szenzitizáció fokának meghatározása)**
- **Keresztreakció (donor sejtjei + recipiens savó)**

Szerológiai módszerek 1.- Mikrocitotoxicitási teszt (Terasaki)



HLA tipizálás 2.

- **Kevert lymphocyta kultúra (MLC) (csak II. osztályú antigének)**

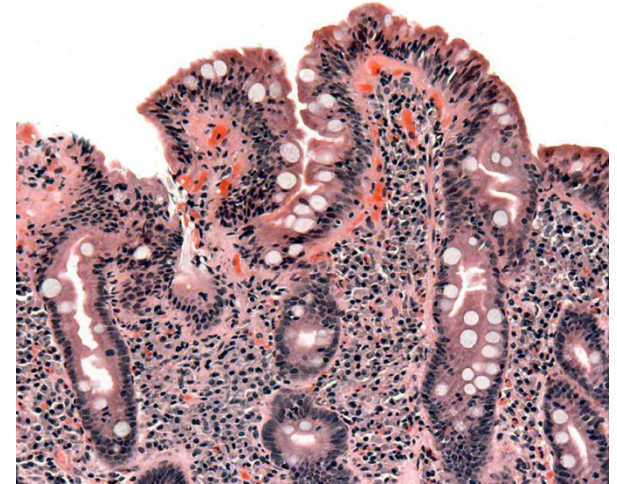


HLA tipizálás 3. – molekuláris biológiai módszerek

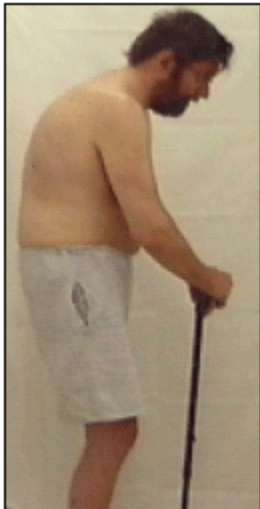
- 1. Restrikciós fragmens hossz polimorfizmus (RFLP)**
- 2. Szekvencia specifikus oligonukleotid szonda (PCR-SSOP)**
- 3. Szekvencia specifikus primerek alkalmazása PCR vizsgálathoz**
- 4. Szekvencia alapú tipizálás (SBT)**

HLA és betegség asszociációk

HLA-DQ2, HLA-DQ8 –
lisztérzékenység (coeliákia,
glutén szenzitív enteropáthia)



Limfocitákkal infiltrált vékonybél,
Ellapult bolyhok



HLA-B27 –
Bechterew kór
(spondylitis ankylopoetica)

HLA és betegség asszociációk



Vércukor-szint ellenőrzés

I. típusú diabetes mellitus

HLA-DR3-DQ2 – 3x-os kockázat

HLA-DR4-DQ8 – 10x-es kockázat

DR3 / DR4 heterozygota

– 25x-es kockázat

HLA-DQ6.2 – védelem (0,1x-es kockázat)

Az ősi **A1-B8-DR3-DQ2** haplotípus

a vártnál (0,9%) sokkal gyakoribb (7,1%), noha autoimmun betegségekkel asszociált (pl. coeliakia, myasthenia, 1. típusú diabetes, Addison, Sjogren...)