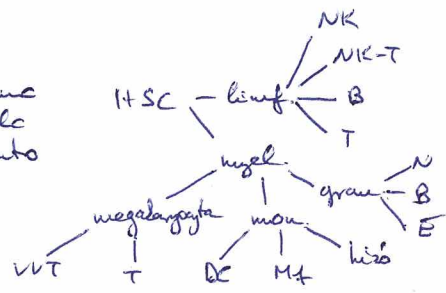


# Gyakorlatok anyagjai

## I. Bev.

- 4 fő jellemző:
  - spec.
  - szel.
  - szenz.
  - membrán
- válasz típusai:
  - eliminálás
  - tolerancia
  - ignorancia
- Ag - 3 faja:
  - xen
  - allo
  - auto
- felismerő receptorok:
  - term. - PRR ← PAMP, DAMP
  - spec. - TCR/BCR ← epitóp = Ag-determináns
- DAMP elhárít:
  - i.c. felh. (→ Hsp, HMGB1), ECM felh., ura, északadukt DNS
- BCR =  $I\alpha + I\beta + I\gamma + I\delta$ 
  - I $\alpha$  szel.  $\rightarrow$  HC I $\alpha$  felh. → Ag-aktív
  - I $\beta$  szel.  $\rightarrow$  HC I $\beta$  felh. → IM aktivitást meghat.
  - LC → K, L
  - HC →  $\alpha, \delta, \epsilon, \gamma, \mu$
- C3b-aktív rec. a van: DC, Mf, hsd, G- $\epsilon$ , s $\rightarrow$  i.c. in sejt
- Nyos. → fagoc. + APC funde. → cortex → B + Mf
  - ↳ folliculus → CG → akt. B
  - ↳ paracortex → T, DC
  - ↳ medulla → plazmaszövet → sejt nyúlásai
- Képz. → fcl. → B  
PAIS → T  
marg. → DC, Ly
- Bcl → hám → IEL, M  
Peyer → B



- B → cinkellen CD19<sup>+</sup> → plazmaszövet membrán
- T → mind CD3<sup>+</sup> → segít rögzíteni TCR-t.
- Ly-homing: 1. ny. → vér (HEV) → 2. ny. → nyirok
- HA! 2. ny. ben Ag-vel akt. → adhi. felh. → B  
↳ tud lépni az extra-limf. szór.
- AT → poliklonális → többféle B sejt km. többféle epitópot is  
monoklon → 1 B sejt km., 1féle epitóp.
- AG → monoklonális → 1 epitópra van  
multiklonális → több
- affinitás - aviditás

- citokémiaili reakc. (feszítés)
- PAS → mindkét sejtformát fest, DE! limfocitáknál citopl. rögzítés!
- nem-spec. enterikus reakc. → nyirok sejtet fest → mon.:  $\emptyset$  hsd, hsf-al  
gran.:  $\emptyset$
- Szennyeződés:
  - sejt-sejt → kontakt / juxtalin
  - szolubilis
  - mikrovezeték → cella sejt mbr. be olvadva A-hatás = funkcióvesztés!
  - ↳ lehetőségek károsítói:
    - stím./kötés
    - hatás időtartama ↑
    - olyan anyagot is lehet eny. ami elvételét E-terbe

## II. Sejt-tenyésztés

- in vitro szaporítás előnye:
  - jól def. működési határ közg.
  - adott sejt típus
  - sok sejt
  - sejt funk. vizsgál.
- Sejt sejtformul.: hemocitometér
- festés: tripanbél → csak halott sejtet!
- Sejttenyésztés típusai:
  - ① primer tenyésztés
    - sejtet köz. egy nőv. darabtól szárm. pl. biopónia menta
    - DE! szaporításnál egyféle sejt típus
  - ② sejttransz
    - primer teny. köl. szűkítés
    - fiziol. és gen. jellem. bet. megfontol.
    - DE! 50-100x nőv. + kontakt gátl. hat. rá!
    - ~ monocultúr
  - ③ sejtvoal
    - transformált, immortalizált
    - kórtan. ont. nőv.,  $\emptyset$  kontakt  $\ominus$
    - ~ szuszpenziós teny. is lehet
    - pl. HeLa • aneuploid szór!
- opt. közg. felt.:
  - oldott anyagok; mátrix elvétel; fiz. paraméterek; sejt-sejt zh.
  - tápl. szenn. homon. nőv. F. letap. F.
  - teny. feltét. besorol. feeder layer. Kétszázal. Biomatrix
  - T pH O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> pihent. ozmolalitás stat/din teny. szét
  - X sejt sejtrelteg
- sejtteny. módjai:
  - a) monocultúr → 1 sejt sor  
szoros s-s; s-m zh-t sejtjelével  
letapadás függő → cell. aligant
  - b) szuszpenziós  
 $\emptyset$  s-s; s-m szel.  $\emptyset$  kontakt  $\ominus$   
pl. hemopet. sejt, transform. sejt
- \* hüvelyi sejtteny. 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 80-90% pára
- primális / subcultiválás: tenyészt. megújítása
- Hibridoma létrehozása:
  - ① állat immunizálás → adott AT km
  - ② B sejt izolálás
  - ③ fúzió myelomaszellel  
↳ belső HGPRT/TK hiányzik!
  - ④ hibridomasz. elválasztás HAT médiumban  
↳ B sejt nőv. repl. 4. nap  
↳ B sejt nőv. repl. 4. nap
- teny. foly. tart.:
  - 1. médium - foly. / fél foly.
  - 2. DE for. - glü.
  - 3. puffor - NaHCO<sub>3</sub>, HEPES
  - 4. stabilizátor - fenox. sz.
  - 5. fel. el. - fontos szel. szenn.  $\rightarrow$   $\emptyset$  202 AT →  $\emptyset$  CR1
  - ↳ 20000000 médium v. keményít
  - ⑤ megfelelő vonal. ziv. ELISA-val
  - ⑥ febragont
  - ⑦ szigor
  - ↳ vált. AT-bet. km. pop.  $\rightarrow$  monoclon. AT- $\emptyset$ !



# IV. Ag-AT k. módszerek

- polyklonális AT:**
  - immunizált állat séméből
  - 1500 fajta, az Ag kúl epitópjával reagáló AT
  - széles plazmaszjt kímében
  - 1500 fajta AT antily, aff, spec
  - HA! egyszer volt immunizáció → főleg AgM
  - többször → 3g6
  - alkalmazás: szekunder AT készlet
  - előáll. 4-8 hét

- monoklonális AT:** - hibridoma technika
  - immortalizált sejtekben nap.
  - sejtes AT-t sem. minden sejt
  - ve. kópis, na. epitópra spec.
  - alkalmazás:
    - standard készlet
    - AT készlet
    - előáll. 3-6 hónap

- berentraktív AT:** egyszer több Ag-vel reagáló képes AT (ha pl. az Ag-vel való kapcsolat az epitópra mérv.)
- antitest-titer:** az a legnagyobb hígítás, amivel még mérhető AT-Ag k.
- szenzitivitás:** adott AT esetén azt fejezi ki, hány %-os hely % at sem. jel. @ként
- specifitás:**  $\frac{\text{egyszeresed hely \% at @kés}}$

## 1. ELISA

1. Coating 2. mosás 3. blokkol 4. 1. AT 5. mos 6. 2. AT 7. mos 8. S + blokkol 9. leolv.

**indirekt:**

- újra szubs. rd spec. jelölt AT-vel
- szubs. a mintával → benne a keresett AT
- blokkolás indiff. jellel

**szenzitiv:**

- újra szubs. 2. AT-vel, ami Ag-vel epitópra spec.!
- szubs. mintával → benne keresett Ag
- coating, capture AT-vel

**alkalmazás:** adott mintából Ag-t kimutat, DE! felt.: **polyklonális Ag** legyen!

**kompetitív:**

- AT-k + minta Ag-k → elszubsztálás
- coating mintán Ag-vel
- utána: 4 kérésből kiválasztás (amik helyesen Ag-vel telítődtek)
- majd rd a jelölt 2. AT
- alkalmazás: adott mintában és mennyiségű Ag kimut. (többi telíti az AT-ket)
- **monoklonális Ag-vel!**

## 2. ELFA

- fluoreszcencia alapú → szenzitívált ELISA-vel!
- zöldes fluoreszcencia szubsztát, majd old. -u spec. AT blokkolva, HA! mintából Ag-vel képes. → majd old. fluoreszcens reakc. ↑

## 3. ELISPOT

- ELISA-hoz hasonló elv, DE! 4 rétegű Ag/AT-k, hanem sejt!
- szubs. sejtbe
- blokkolás Ag-vel
- capture AT-k coating
- mosás után
- sejt által kimut. Ag kimut.

## 4. Western blot

- gélbej. (1)
- festés mbr. ra
- előhívás primer + jelölt sec. AT-vel

## 5. RIA

- ismert radioakt. Ag
- csökkent AT
- [szubsztát] Ag
- 2 fajta Ag verseng a helyekért

## 6. IRMA

- isra. szított monoklonális AT-k
- mintában Ag-k + radioaktív AT-k
- Ag-k szubsztát a szubszt. radioaktív, és a szított, d. jelölt
- isra. radioaktivitás mérese

## 7. Lateral flow test

- egy lépésű immunokromatográfia assay
- kontroll csík (2.): d. agt szított mikroemulzió szti
- rendeles csík: Ag-vel szított mikroemulzió szti

- Ag-vel szított → lateral flow
- sejtes/plazma méreseiben jó → ELISA
- ELISA-vel érzékenyebb (pl. hormonokhoz!) → RIA
- sejtes szubsztát → FACS
- sejtes szubsztát, Traktívitás, → ELISPOT
- valószínűleg. ml adott sejt reakc.

8) Immunohistochemia

⇒ pl. "PAP" - peroxid - anti peroxid

- direkt: mindenképp jelölt AT
- indirekt: 1. + 2. AT  
↳ jelölt

⇒ 3 riteges indirekt

1. jelöltlen primer AT
2. — " — sec. —
3. ehhez Enzim. a peroxid - anti peroxid komplex

"ABC" - avidin - biotin komplex

1. jelöltlen primer AT
2. biotincéljt sec. AT
3. avidin - biotin peroxid komplex

9) Fluoreszcencia és Gier kódot. mikroszk.

10) Immunoneurológiai módszerek:

2) 2D in diff.

1) radialis (Mancine)

2) Oudierlong



2)  $\frac{d^2}{2}$  Ag Banc

3) serum elfo.

1) kóros 2) 2D ⇒ eldöntés is főleg alapján is

c) immun. elfo.

AT elfo utalóhorrel

serum elfo. + im. diff. (elfjelölt AT) ⇒ precip. csődel is

d) nádektas elfo.

na, csak AT a serum elfo jelölve

- turbidimetria → fehérséget mérve
- nefelometria → magyit a névrist méri
- ⇒ kolloid oldatokra jók

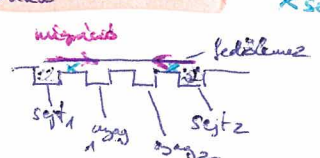
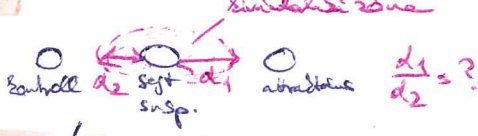
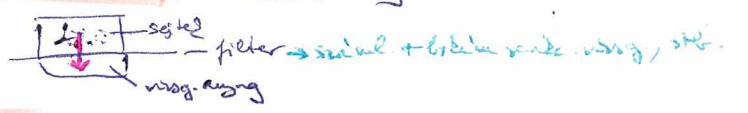
Agglut. módszerek:

- direkt - ABO vércso. meghat.
- - Widal - tífus
- indirekt - Casals test (Rh<sup>+</sup> Danyag meghat.)
- passzív - RT Ekvant.

V. HLA - Hiperallergiás

- micro lymphocytotoxicity - test:
  - Ly-ét szűrt HLA-AT-ekkel ⇒ komplexek
  - serum komplement hozzá ⇒ eliss ⇒ mbr. g.
  - ↓
  - hiperallergiás reakció
- Érit. szétválasztás HLA-ét vizsgál. → melyik van Ly-n?
- Érvényes limfocita kult.:
  - 2 beteg Ly-ét ömlesztve ⇒ HA! van köztük két.
  - ↓
  - stimulálódhat egymás ellen
  - prof. leg.
- RFLP, PCR-ek
  - ↳ SSOP - két oldalt amplif. majd vizsgálhat
  - ↳ SSP - primer páros spec. allélok amplifikálhat
  - ↳ SBT - bármelyik meghat. szekvenálással

VI. Ktx. mérések

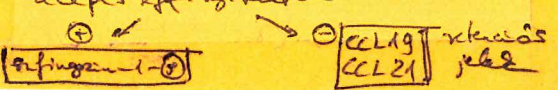
- Dana - Eaura** *x sejt rólal juttat*  

- Agar lemez**  
 → 3 lyuk  

- Boydin - Eaura / Transwell assay**  

- ELIS**  
 → hurok, de rá atam képes! → impedancia-mérés  
 sejt adn. észlelés met  
 → sejtet a pillére alá átráradalás eladromos jelet generál

Méregcs 3 felé!

- mesenchymalis → bontja ECM-et maga előt
- amöboid → eljuttat anyagot
- kollektív → ECM + sejtanyagot együtt vinné

DC-s migrációkat befolyásoló molekulák:

- aft. migráció → yes. cortex felé [CCR7-CCR2]
- jell. T<sub>H</sub> B-sejtbe [CXCR5-CXCL13]
- HEV-el köv. megfigyelt [CCL21]
- 2. lépés aft. migráció



VII. FACS

- gyors
- multiparaméteres
- qualitativ és quantitativ
- sejtet megkül. fluoreszcencia festéssel
- eltérő fluoreszcencia → separálhatóság!
- szep. pl. - jelle. állp. 1. alagút
- em. funkciók
- sejtet / solub. molekulák mérése is jó
- vialy k. fel. + tam sejtet érzékelésére
- **méret** → előrenézés → detekt. fotodetektor
- **organellum** → oldalsó → detekt. fotobeleáram-érzékelés
- **FRET**: 2 molekulán társalgás rel. meghatározása
- 2 fluoreszcens festék egyidejűleg a mérést, melyik jelel meg?
- **sejtcellus detektálásához**:  
 pl. propidium I → dsDNA hoz lat!

1. foly.
  2. optika → megvilágítás fényforr. (gerjesztés fény) → lézersugár → foto detektorok (emittált fény) → tüdőv. rendszer.
  3. elektr.
  4. anal. → histogram
  5. szort. → felhő szep → kontúr szep / denzitás szep
- lineáris mérések

Citometria	Műszerek
10 <sup>5</sup> -10 <sup>6</sup> sejt / 1-2 perc objektív	10 <sup>2</sup> -10 <sup>3</sup> sejt / Δt <sub>0</sub> subjektív
Éves sejtkez. jó! *	Éves sejtkez. ✓
jó reprodukálhatóság	rossabb
túl automatizált	kevesebb
festéklen munka is jó	festék is igényel

\* egyszerűbb kell!

# VIII Immunizálás és vakcináció

- Az IHR felismerésénél 2-es fogalmak
  - haptén = Ag determináns = epitóp → konformációs → denat. val elvén a tal.
  - lineáris → denat. után is felismerhető
  - adjuváns = "részecskék" → kóstimulációs hatást biztosít a beoltott Ag elleni IMV-hoz!
  - ↳ v. elt. a kem. IR + akt. v. pl. PAMP jó erre
- protektív epitóp: az Ag szék epitóppja ez az, amely az IHR leginkább felismeri, is elleni IMV-hoz

## • Im. terápia's eljárások 3 félé:

- |                          |                          |                                   |
|--------------------------|--------------------------|-----------------------------------|
| ① <b>suppressio</b>      | ② <b>moduláció</b>       | ③ <b>stimuláció</b>               |
| - AIMD-é gátlása         | - TH1/TH2 arány állítása | - tumorsejtek elleni IMV segítése |
| - allergiák              | - Ig szintek Δ           | - bőrbetegségek elleni vakán      |
| - transplant. tolerancia | → mindkettő allergiában  |                                   |

- 1. Ag bejutás → IgM
- 2. → IgG } ha IgG-t nem kaptunk, oltás min. 2x! "emlékeztető oltás"

- **prevenció:**
  - aktív immunizálás → 1./2. oltás, 2. az "emlékeztető" → IgG
- **terápia:**
  - pl. postexpozíciós oltás → utólagos, de aktív immunizáció, ha esetleg elkapta a fert.
  - passzív immunizálás → v. AT-t és, fert. lezárását segíti \*

- \* passzív imm. 2 spec. eset
- 1) DC-vakcináció
- 2) adaptív sejt transfer

- **Szerepozitivitás:** az Ag stimulációra kialakuló spec. Ig-k megjelenése a szervezetben
- **Szerekonverzió:** oltás előtt és utáni ellenanyagok változása
- **Szereprotekción:** a nem oltott Ig mindig magas, h. hatékony védelmet jelentsen.

## • Adjuvánsok és szerepük, típusaik:

- HA: egy vakcina "alegység vénya": a MIO v. az az anyag, ami ellen neutralizáló AT-t képez → szerep
- ↳ ez AT → a, mit vakcinával kombinálják (pl. toxoid-dal) } kem. IMV ↑↑
- ↳ b, adjuvánsot adnak hozzá

- **Freund-adjuváns:** asv. folyékony susp. Mycobact. → szerep az az: bakt. sejttel v. v. MDP
- **aluminium-gél:** → TH2 akt. ↑ → imm. IMV ↑
- **Spec. elj-ú emulzió** ← "IFA"
- **Im. stimuláló komplexek (ISCOM)**
- **TLR-ekre ható spec. ligandok**
- **rec. ad,** amikre még hatnak az adj:

- NOD-like, RIG-like R (cikopl)
- C-like R, SR
- TREM-R

## • leposzómák!

### • vírus ellenes AT-é működése:

- 1) Fe mediált fagoc. ⊕
- 2) ⊖ a vírus replikációját (relatívított ⊖)
- 3) ⊖ a vírus fehéré kinevezését a gazd. sejtből

- DE! emberben ez til. v. s! (IFA = komplett Freund adj.)
- ↳ ez AT Mycobact. kinevezés belőle ("IFA")

### • rosszabb IMV és vakcináció problémái

- ny. ellen még kevés B-sejt, ekkor DC-é
- ⊕ elég kóstim. mel.
- agytól kapott AT-é neutralizálja a vakcina Ag-
- a szervezetben kialakult memória sejtél még ⊕ élethosszig élnek

### • 2 félé Tmemória sejt

- |                                  |                  |
|----------------------------------|------------------|
| <b>centralis</b>                 | <b>effektor</b>  |
| - CD4+ fell. TH                  | - TH1,2, 17      |
| - nagy T-vel szembeállított Ag-é | - nagy Ag szembe |
| - " " szembeállított Ag-é        | - IFNγ, IL-4, 17 |
| - IL-2 ↑↑                        | - ⊕ HEV en át    |
| - HEV-en át hozing               |                  |