



IMMUNOLÓGIAI ÉS
BIOTECHNOLÓGIAI
INTÉZET



4. gyakorlat: Immunhisztokémia, fluoreszcens mikroszkópia Áramlási citometria, sejtszeparációs technikák

Az immunológia alapjai

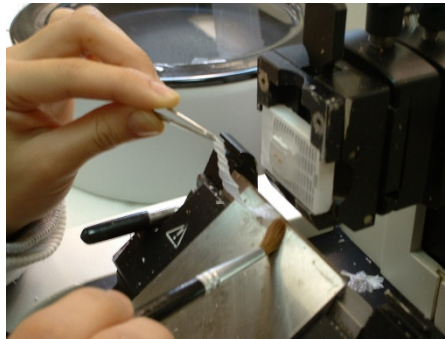
PTE-KK, Immunológiai és Biotechnológiai Intézet
Pécs, 2021.

Immunhisztokémia 1.

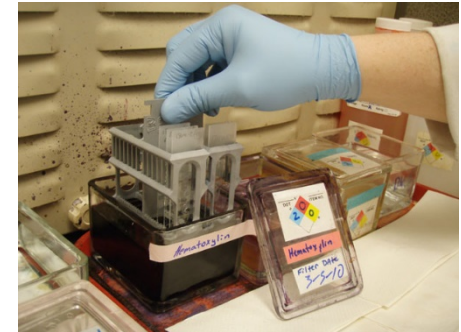
1. Mitől „hiszto”? → hisztológia = **szövettan** (ilyet már sokat láttatok)



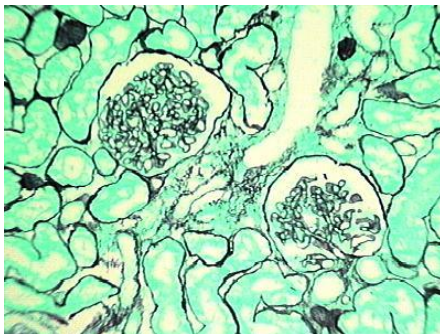
1. Szöveti mintavétel



2. Szövet metszése



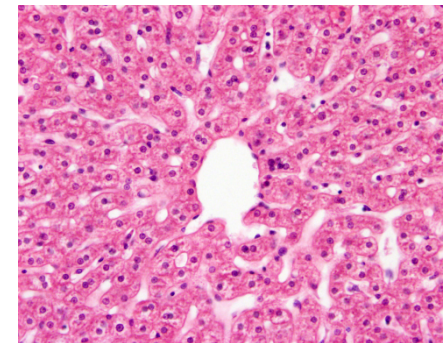
3. Szövet festése



Glomerulusok (Gömöri-féle ezüstözés)



4. Vizsgálat fénymikroszkóppal



Máj (H&E festés)

Immunhisztokémia 2.

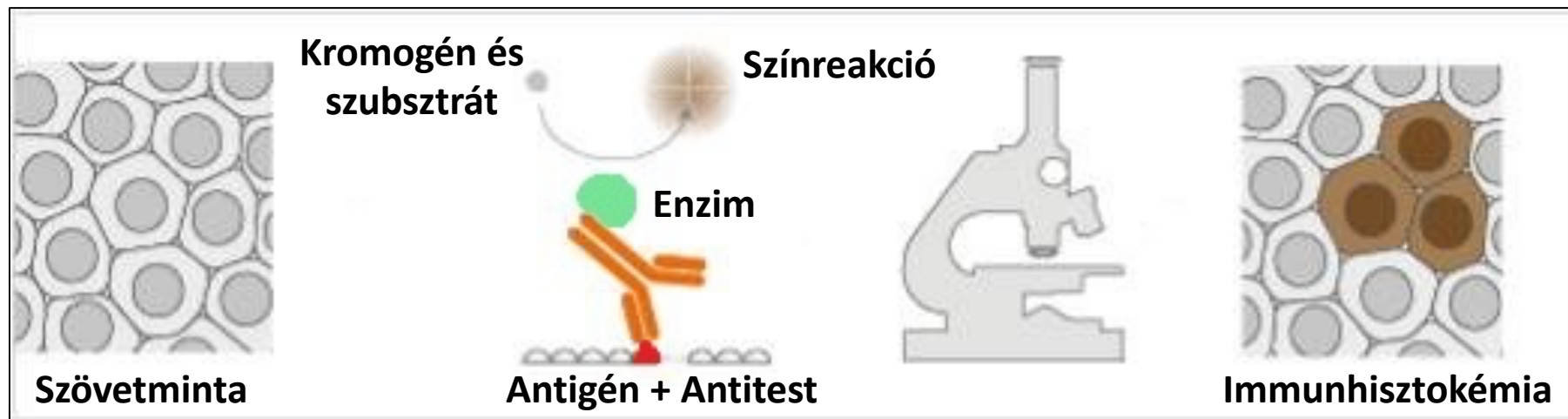
2. Mitől „hisztokémia”?

- A szövet kémiai összetételét próbáljuk jellemezni.^[1.]
- Pl. H&E festésnél:
 - hematoxylin → savas kémhatású anyagok („basophil” pl. DNS a sejtmagban)
 - eosin → lúgos kémhatású anyagok („eosinophil” pl. fehérjék a cytoplasmában, kollagén az extracelluláris mátrixban, stb.)

3. Mitől „immunhisztokémia” (IHC)?

- **Antitest-antigén reakción** alapul.
- Cél: Valamilyen **antigén** kimutatása **specifikus antitest** segítségével a szövetben. (a sejtfelszínen, a sejt belsejében, vagy az extracelluláris térben)
- Az antigén-antitest reakció **színtelen**, láthatóvá a használt antitesthez kötött **jelölő molekulákkal** tehető. (lásd előző gyakorlaton)
- Enzim immunhisztokémia esetében a jelölő molekula egy **enzim**, ami a hozzáadott szubsztrát és **kromogén** hatására utóbbiból valamilyen oldhatatlan **színes végterméket** hoz létre, ami fénymikroszkópban látható.
- Fluoreszcens IHC esetén a jelölőmolekula egy fluorokróm. (lásd később)

Enzim immunhisztokémia



Leggyakrabban használt enzimek:

1. **HRP** (Horseradish peroxidase):
Torma peroxidáz

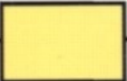

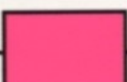

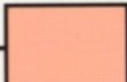
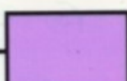
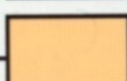
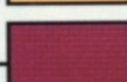

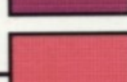
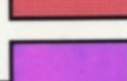
2. **ALP** (alkaline phosphatase):
Alkalikus foszfatáz

Fontosabb kromogénjeik:

- **DAB** (diaminobenzidin)
- **AEC** (amino-etilkarbazol)

- **NBT** (nitro blue tetrazolium)



Alkalikus foszfátáz				
p-nitrofenil-foszfát (pNPP)		oldható	ELISA	
Nitro blue tetrazolium (NBT)		oldhatatlan	hisztokémia, immunoblot	
Fast Red		oldhatatlan	hisztokémia, immunoblot	
Peroxidáz				
ABTS		oldható	ELISA	
o-feniléndiamin (OPD)		oldható	ELISA	
tetrametilbenzidin (TMB)		oldható	ELISA	
o-dianizidin		oldható	ELISA	
5-aminoszalicilsav (5-ASA)		oldható	ELISA	
diaminobenzidin (DAB)		oldhatatlan	hisztokémia, immunoblot	
3-amino-9-etilkarbazol (AEC)		oldhatatlan	hisztokémia, immunoblot	
4-kloro-1-naftol (4C1N)		oldhatatlan	hisztokémia, immunoblot	

A kromogéneknel fontos szempont, hogy oldható-e a **végtermékük**:

- Enzim **IHC** esetében követelmény, hogy a végtermék **oldhatatlan** legyen, hiszen így nem diffundál el a reakció helyétől, és ott látjuk a mikroszkópban a jelet, ahová az enzim-jelölt antitest kötődött.
- ELISA** esetén (lásd később) épp fordítva, **oldható** végterméket adó kromogének használatosak.

Direkt vagy indirekt?

Színes végtermék

Kromogén és szubsztrát

Jelölt elsődleges antitest

Enzim

Vizsgált antigén

SEJT

Direkt IHC



Jelöletlen elsődleges egér antitest

Jelölt másodlagos anti-egér antitest

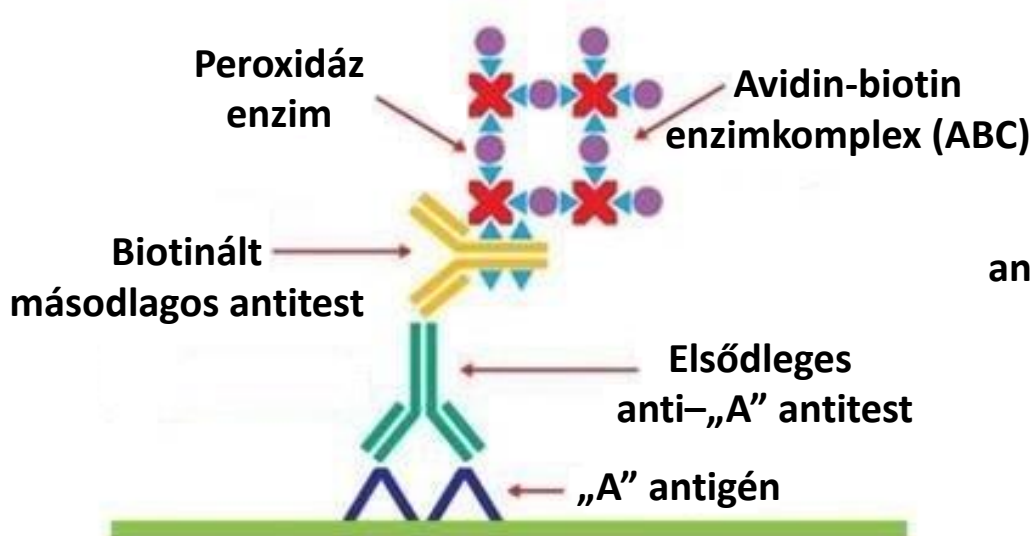
Indirekt IHC

Enzim IHC esetében az **indirekt módszer** terjedt el, mert bár időigényesebb, mint a direkt, de vannak előnyei:^[2.]

- **Erősebb a jel.** (Ez különösen akkor fontos, ha a vizsgált antigén csak kis mennyiségben van jelen a szövetben.)
- Hosszú távon **olcsóbb.** (Ugyanaz a másodlagos antitest több elsődleges antitesthez is használható, így egyetlen jelölt ellenanyag elég a különböző antigének kimutatásához. A jelölt antitestek rendszerint drágábbak.)

Komplex előhívó rendszerek

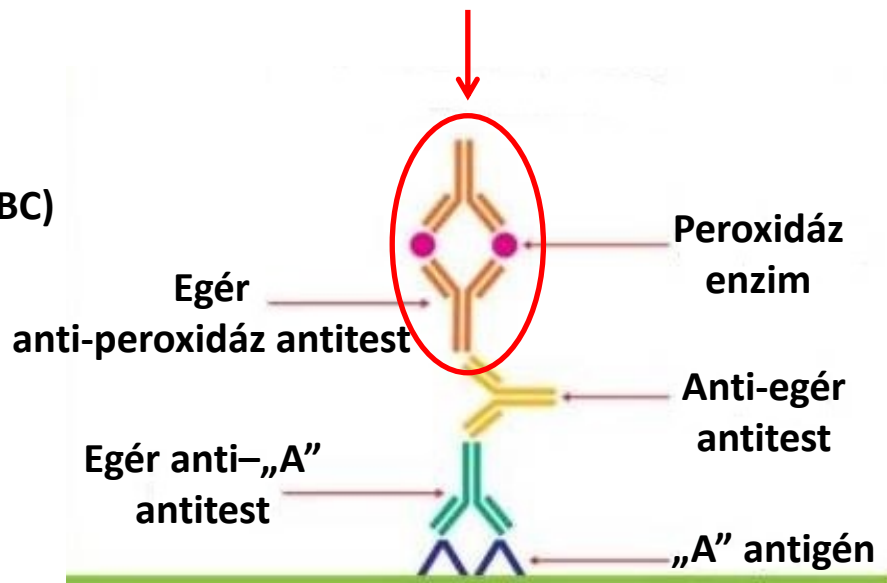
Avidin-biotin komplexek (ABC)



A biotin-avidin kötődés a legerősebb ismert nem-kovalens kölcsönhatás fehérje és ligandja között. A biotinált másodlagos antitesthez biotinhoz kötött enzimet és avidint vagy streptavidint adnak. Az avidin hídként szolgálva nagy enzimkomplexeket hoz létre.^[3.]

Értelme: **További jelerősítés**

PAP (peroxidáz anti-peroxidáz komplex)

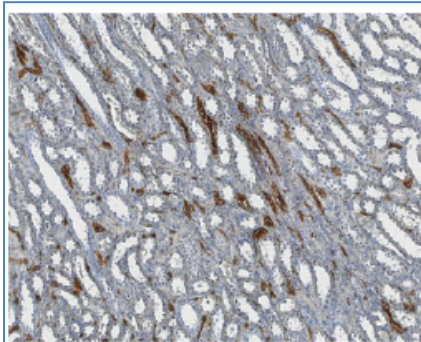


Peroxidázzal immunizált állat szérumából nyert anti-peroxidáz antitesthez peroxidázt adnak. Az antitestek ezzel komplexet képeznek (PAP), az enzim azonban megtartja enzimatisz aktivitását.^[4.]

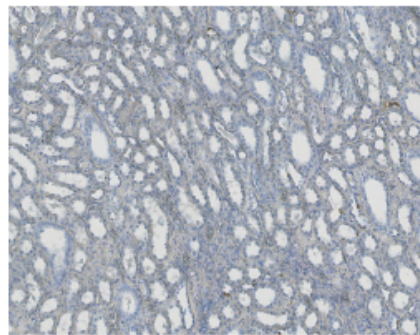
Értelme: **További jelerősítés**

Endogén peroxidáz gátlása

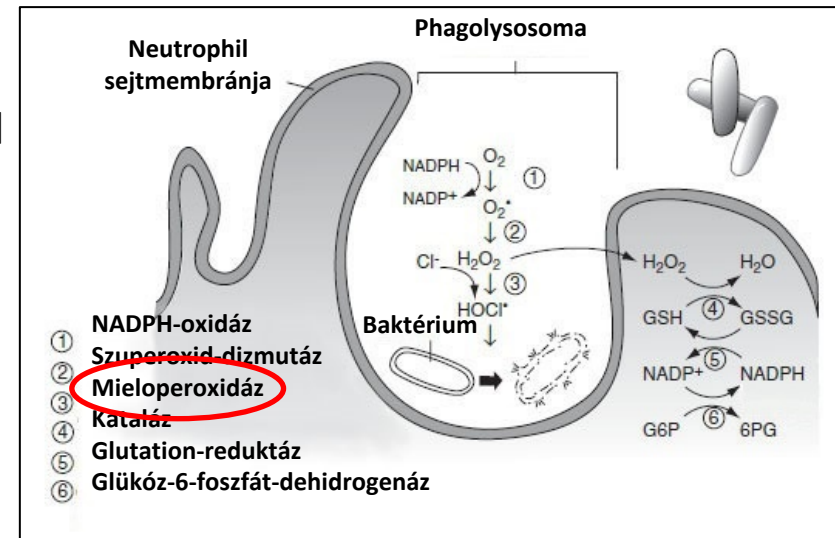
- Miért kell?
 - Peroxidáz sokféle sejtben található. Emlékeztek? → pl. **oxidatív burst** a mieloid fehérvérsejtekben (pl. neutrophil, monocyta/macrophag → 2. gyakorlat)
 - Az enzimeik ugyanúgy átalakítják a szubsztrátot. → nem csak a vizsgált marker látszana → **nem-specifikus háttérjel**
- Gátolni kell az endogén peroxidázt, **mielőtt** a szövethöz hozzáadnánk a jelölt antitestet.^[5.]



Endogén peroxidáz aktivitás vesében



Gátlás után nincs aspecifikus jel



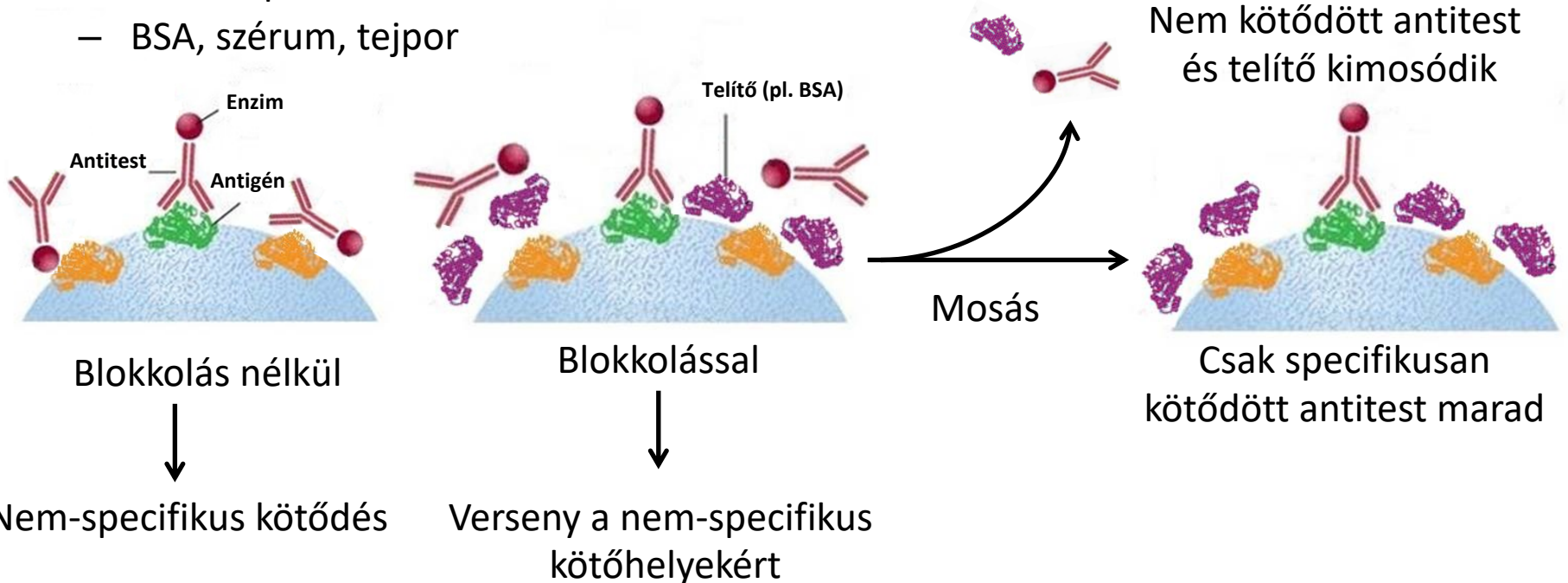
Főbb gátlószerek:^[6.]

- Fenilhidrazin
- Hidrogén-peroxid
- Azid

Telítés (blokkolás)

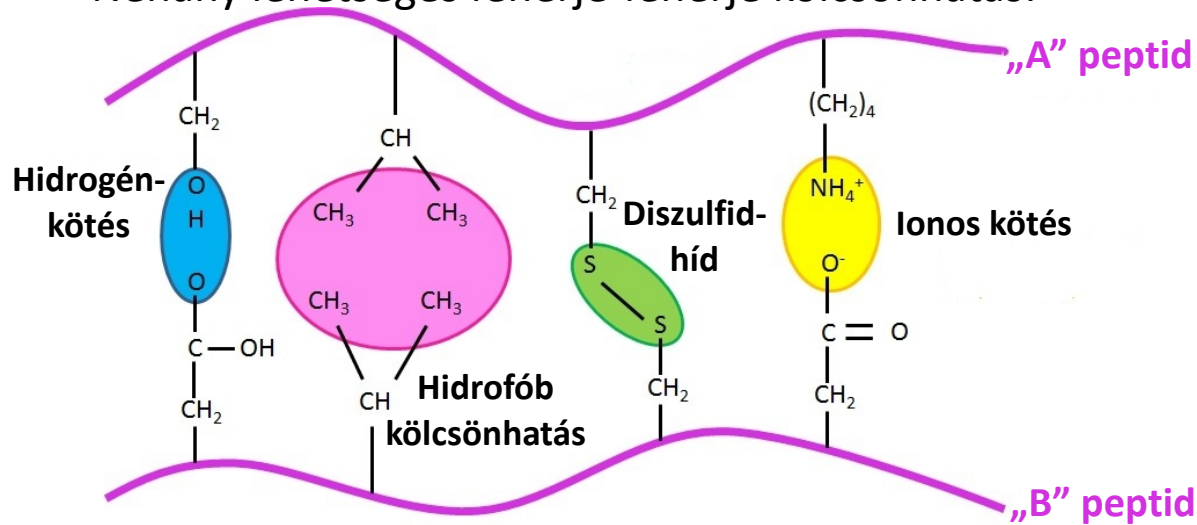
- Miért kell?
 - Ugyan az antigén és az antitest között specifikus reakció jön létre, azonban létrejöhetnek **nem-specifikus fehérje-fehérje kölcsönhatások** a szövetben található fehérjék és az antitestek között (lásd következő dia) → **nem-specifikus háttérjel**
- A nem-specifikus kötőhelyeket blokkolni kell, **mielőtt** hozzáadjuk az antitestet. Erre a vizsgált szövetből és a használt antitesttől függően különböző fehérje oldatokat használnak, pl.:^[7.]

- BSA, szérum, tejpor

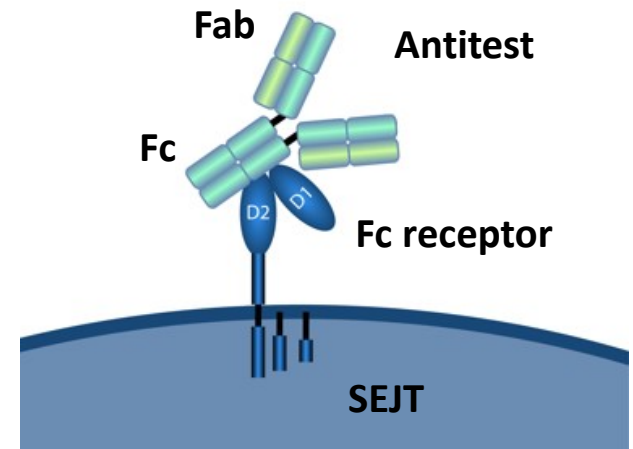


Nem antigén-specifikus antitest-fehérje kölcsönhatások

Néhány lehetséges fehérje-fehérje kölcsönhatás:

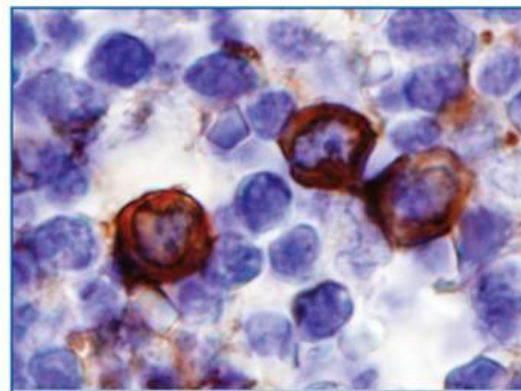
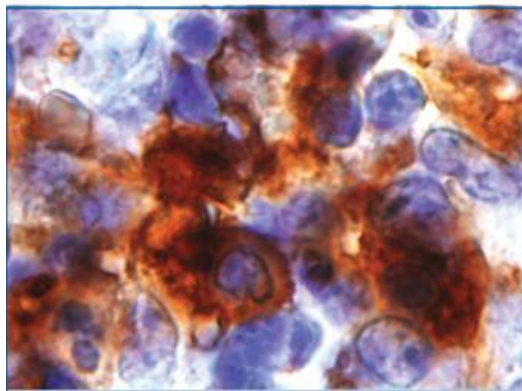


Speciálisan az antitesteket érintő probléma:



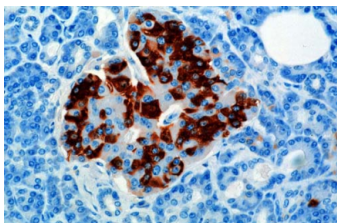
Az Fc receptorokat jelöletlen immunglobulinnal lehet blokkolni.

CD14 (LPS receptor) kimutatása humán mandulában telítés nélkül (bal) és telítéssel. (jobb)

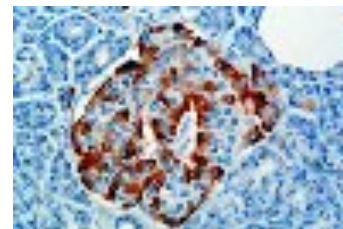


Kettős jelölés

- Hagyományos enzim IHC esetében egyetlen metszetben csak egy antigén mutatható ki, több antigén vizsgálatához ugyanabból a szövetből több metszetet kell készíteni és külön-külön jelölni az egyes markerekre. Pl.:

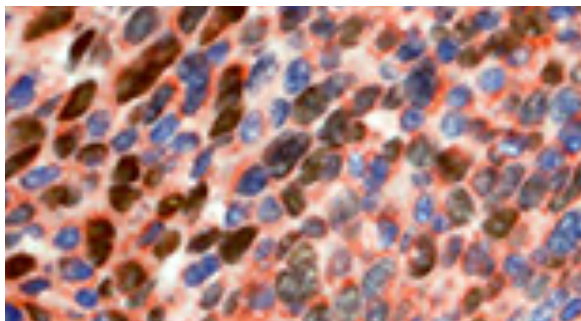


1. metszet: anti-inzulin



2. metszet: anti-glukagon

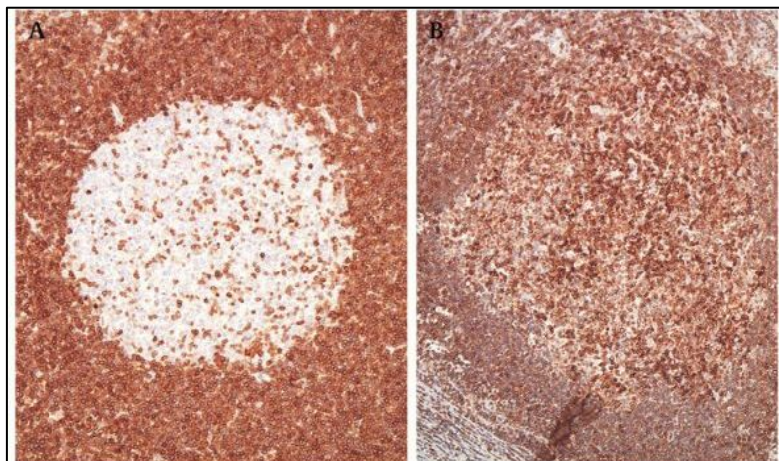
- Egyik lehetőség a kettős jelölés. → Két **különböző enzim**mel jelölt antitestet használunk, melyek **eltérő színreakciót** adnak, így megkülönböztethető a szövetben a két antigén.



Kettős jelölés humán prosztatarákban, a p53 tumor szuppresszor **barnával** (DAB), az AIF (apoptosis-inducing factor) pedig **vörössel** (Fast Red) látható ugyanabban a metszetben.^[9.]

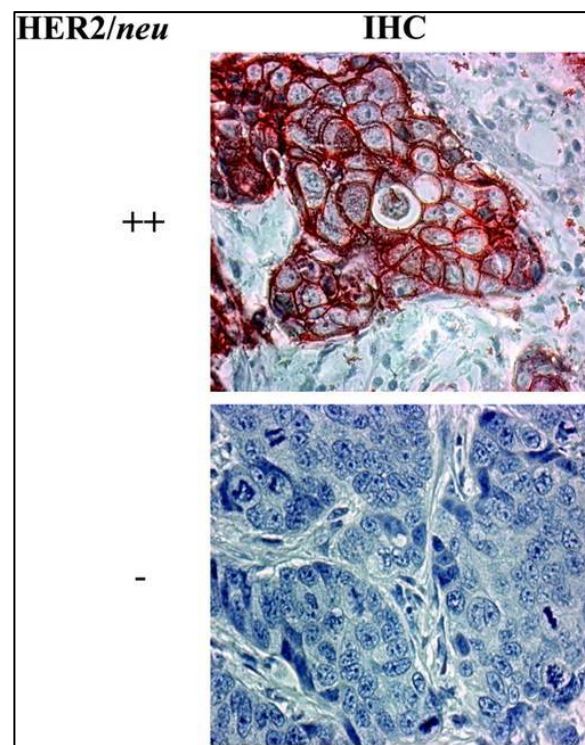
Az immunhisztokémia orvosi jelentősége

1. Morfológiailag nem egyértelmű szövettani megjelenésű eltérések **diagnosztizálásánál** nagy segítséget jelent egy-egy betegségre jellemző marker vagy molekuláris mintázat kimutatása. (lásd jövőre patológiából)
2. Bizonyos markerek jelenléte vagy hiánya nagy **prognosztikai jelentőséggel** bír és megszabhatja a beteg további kezelésének menetét is.



Az anti-apoptotikus Bcl-2 kimutatása normális folliculusban (bal) és follicularis lymphomában. (jobb)

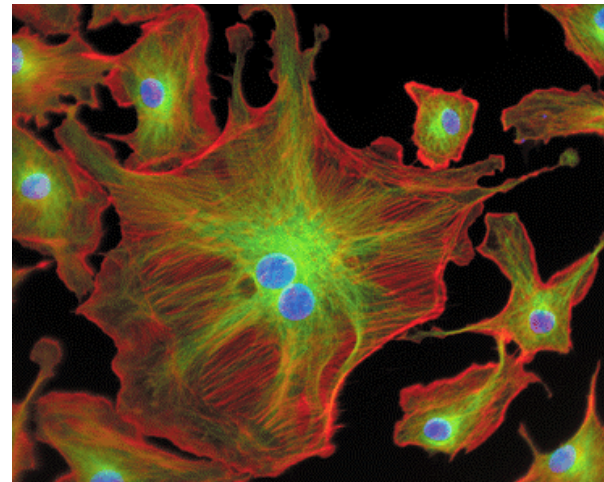
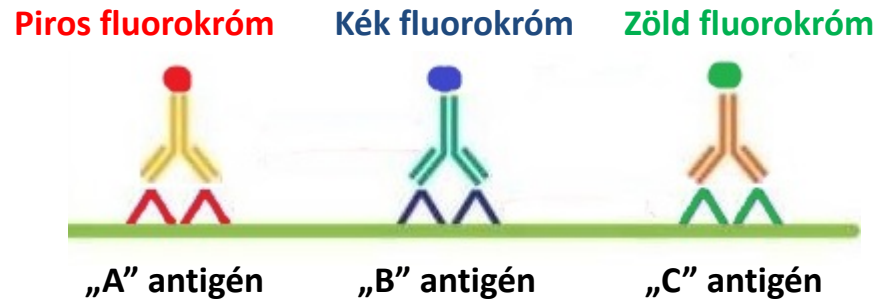
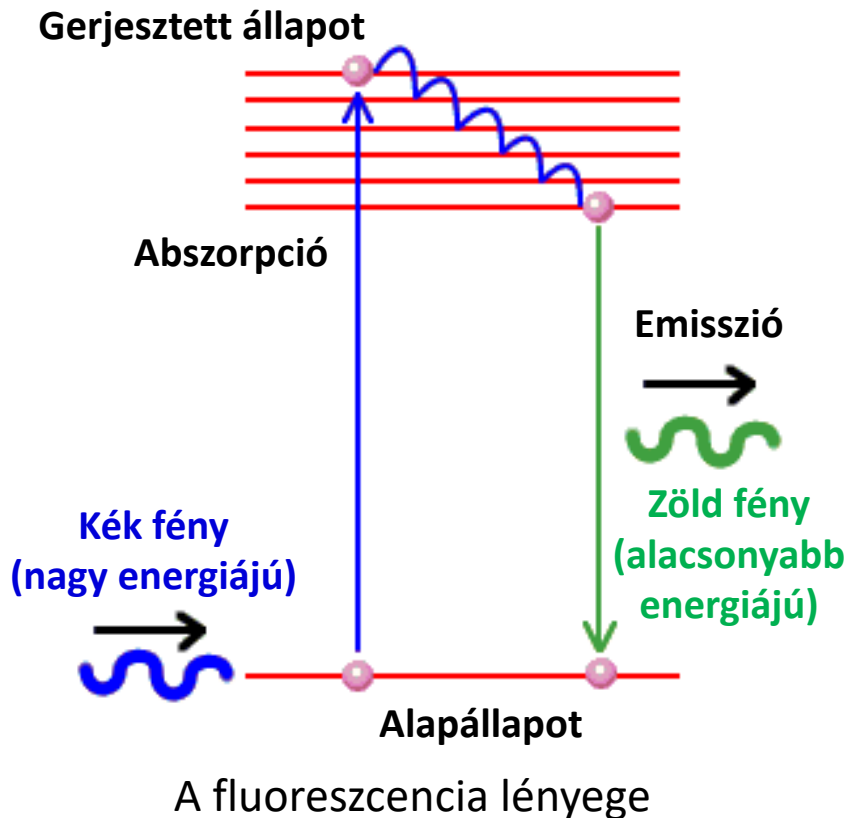
HER2 kimutatása emlőrákban:



A felső betegnél a tumorsejtek expresszálják a HER2 fehérjét, így nála a Herceptin® kezelés hatékony lehet.^[8.] Az alsó beteg tumorsejtei ezzel szemben HER2 negatívak.

Immunfluoreszcens jelölés

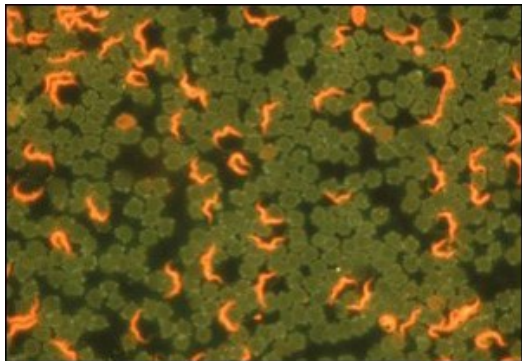
- Különböző **fluorokrómokkal** jelölt antitestekkel egyidejűleg **több antigén** is vizsgálható **ugyanabban a mintában**.^[10.] (pl. fluoreszcens mikroszkópia, áramlási citometria, lásd később)



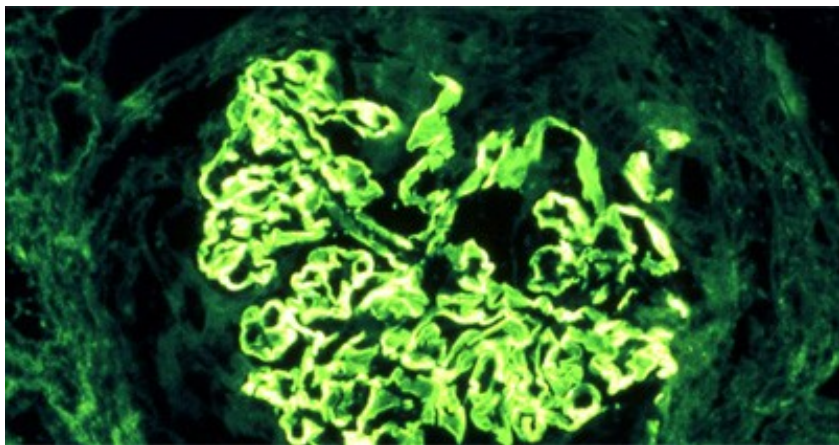
Zöld: tubulin
Piros: aktin
Kék: sejtmag

Endothel sejtek immunfluoreszcens mikroszkópos felvételen

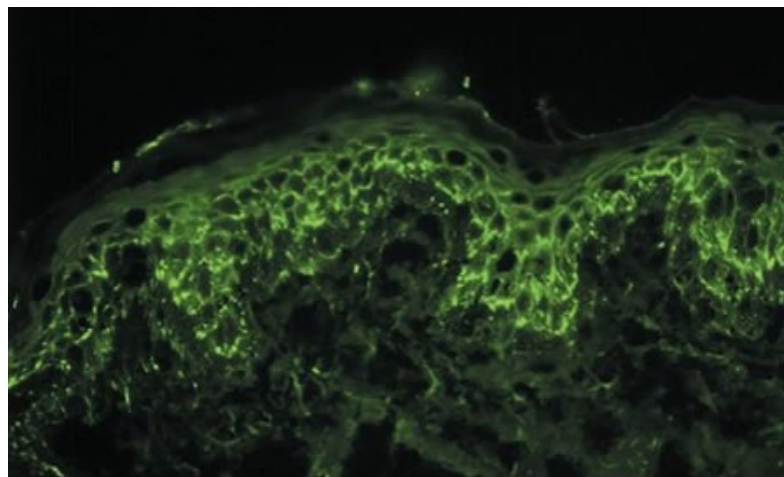
A fluoreszcens mikroszkópia orvosi jelentősége



Acridine Orange (narancssárga) fluorokrómmal jelölt paraziták (*Trypanosoma*) vérkenetben.



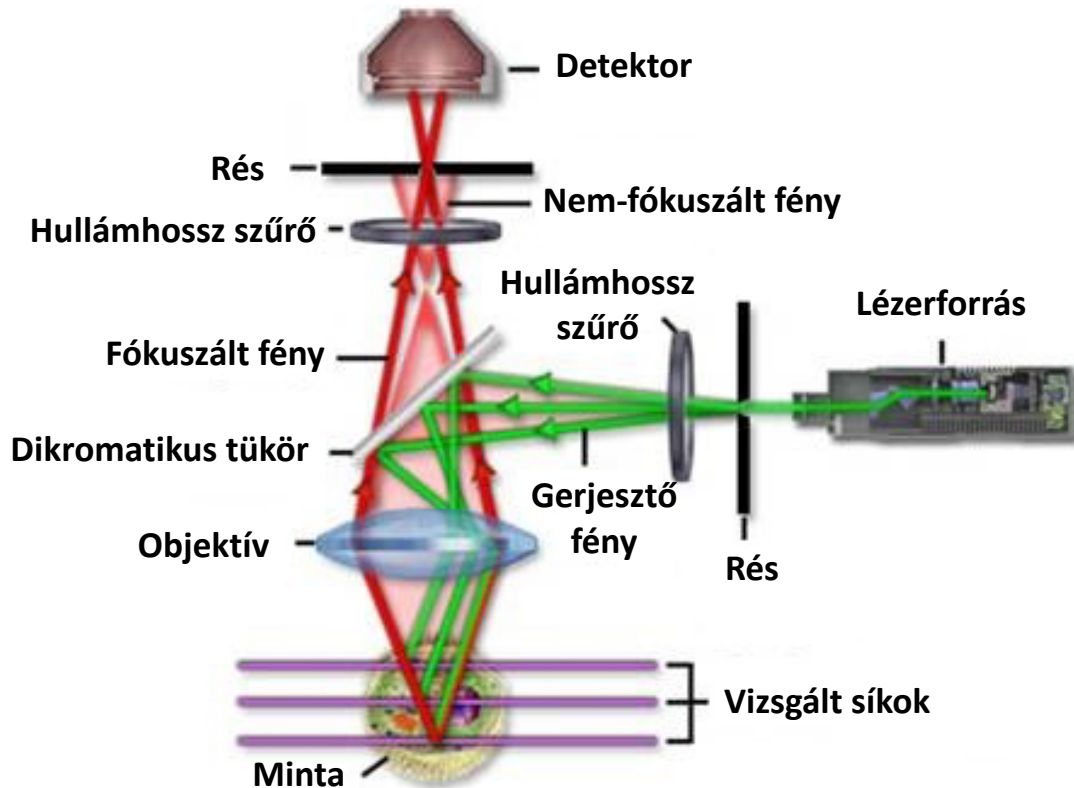
Lineáris IgG lerakódás végig a glomeruláris bazálmembrán (GBM) mentén Goodpasture syndromában. (lásd később)



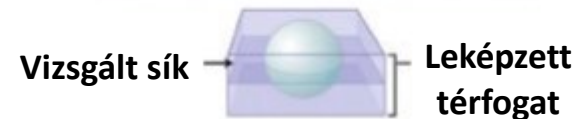
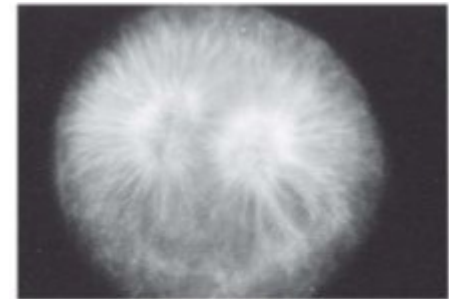
Intercelluláris (=sejtek közötti) IgG lerakódás a bőr hámrétegében pemphigus vulgarisban. (lásd később)

Konfokális mikroszkópia

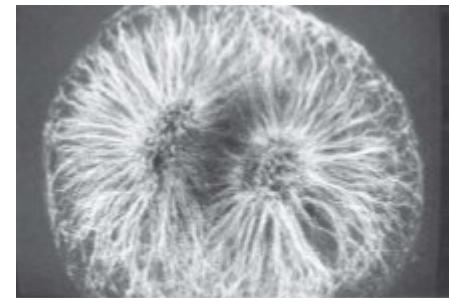
- Hagyományos mikroszkópia: egy nagyobb vastagság **összesített** képét adja (olyan, mint a közönséges röntgenvizsgálat)
- Konfokális mikroszkópia: egy-egy nagyon **vékony szelet** képét adja^[11.] (olyan, mint a CT)



Hagyományos:

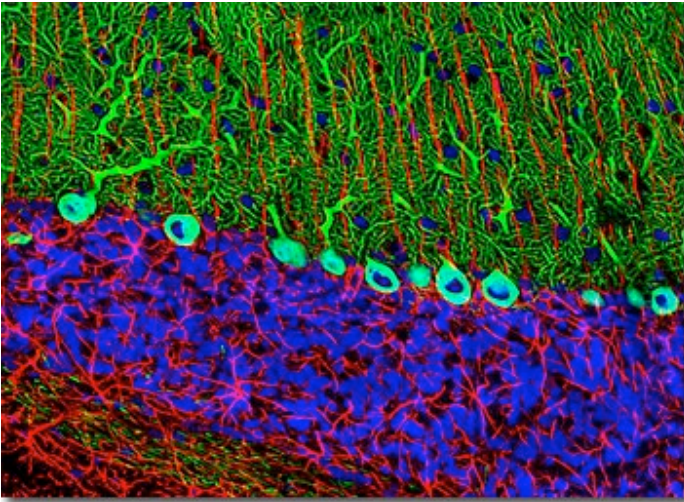


Konfokális:

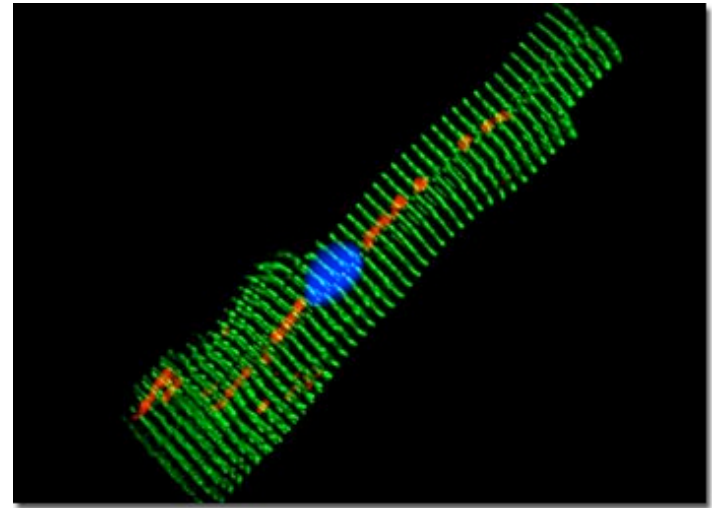


Anti-tubulin antitesttel végzett jelölés egy mitotikus sejtben.

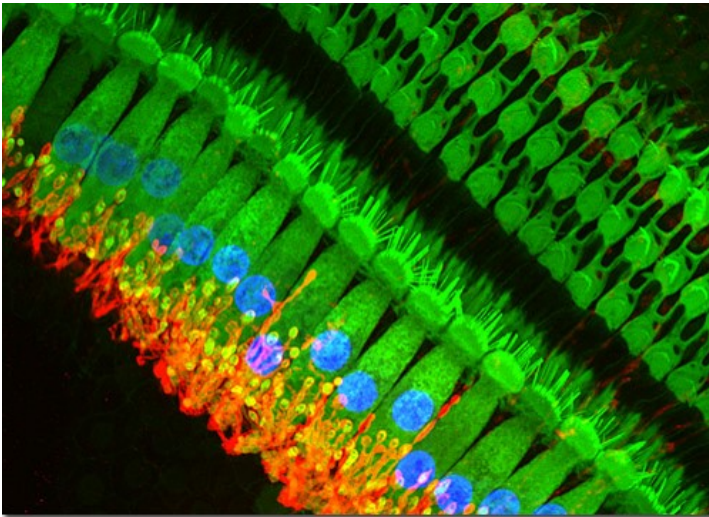
Konfokális mikroszkópia



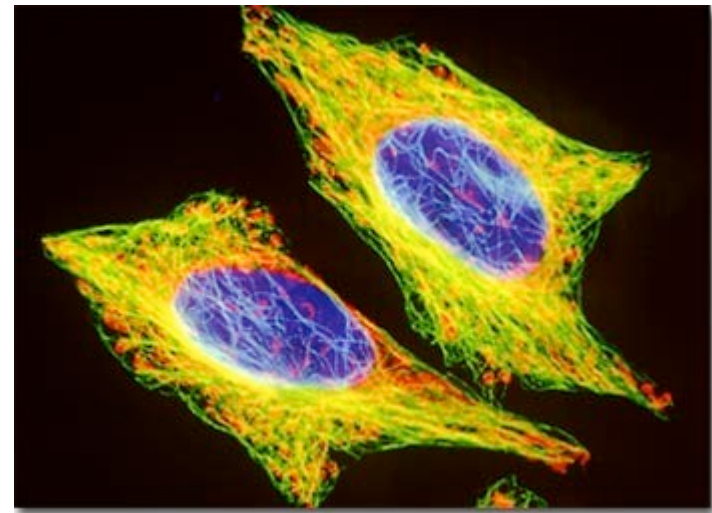
Patkány cerebellum



Szívizom



Corti-szerv

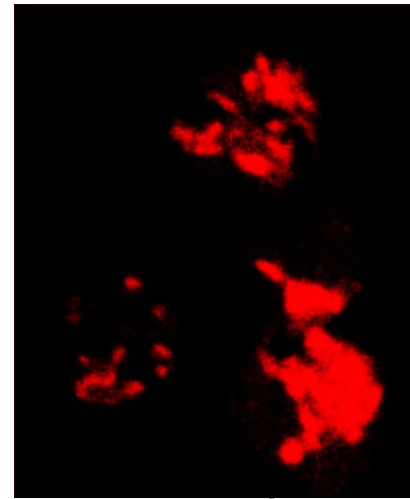
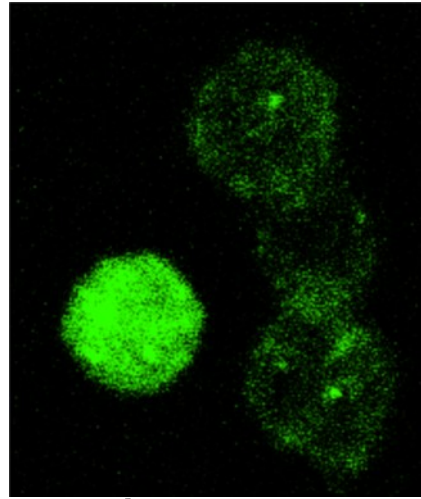
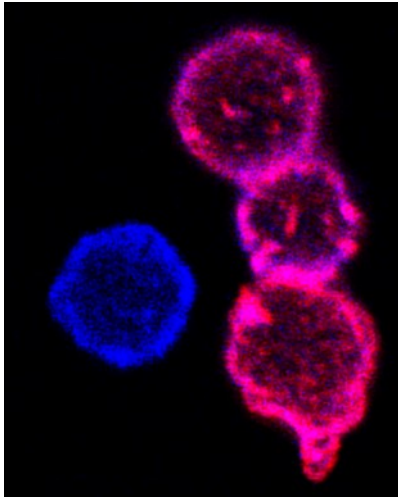


HeLa-sejtek

Kolokalizáció vizsgálata

Zöld: glükokortikoid receptor

Piros: mitokondrium



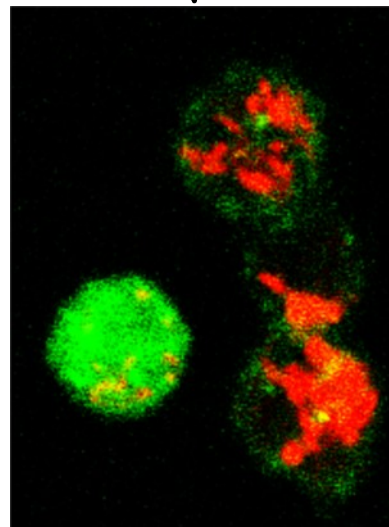
Kék: CD4

Pirosas: CD8

Lila: CD4/CD8 kettős pozitív



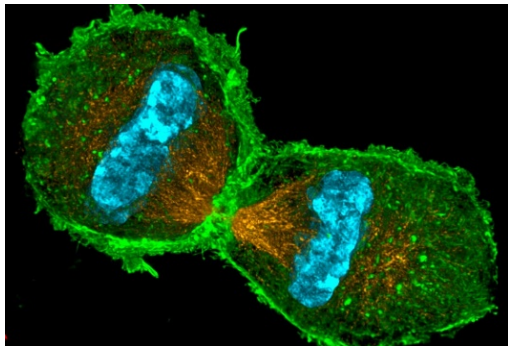
DP (double positive): Kettős pozitív T-sejt, éretlen T-sejt előalak, lásd később



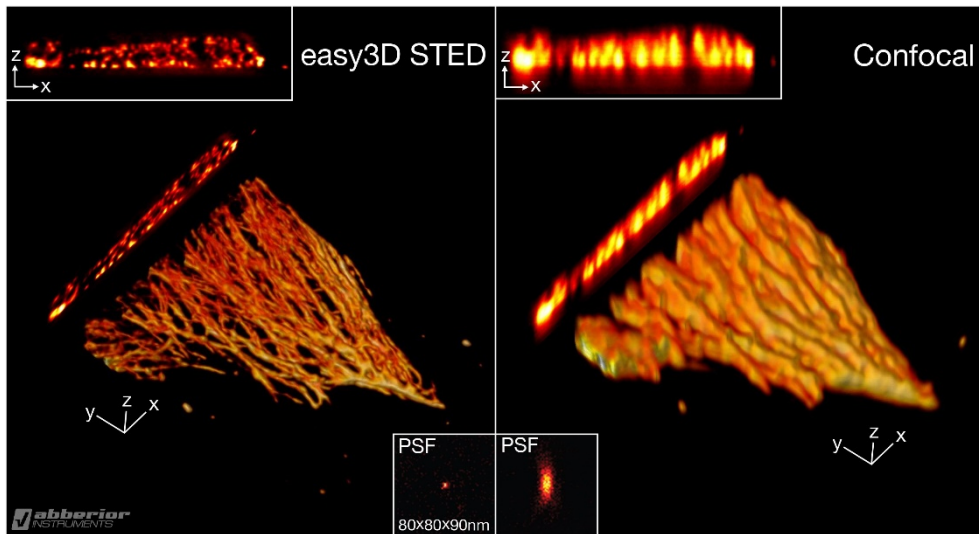
Sárga: GR+mitokondrium

Szuperfelbontású fluoreszcens mikroszkópia

20-50 nanométeres nagyságrend → fehérje komplexek^[12,13.]



Két egérséjt telofázisban
Narancs: tubulin
Zöld: aktin
Kék: kromatin



Eric Betzig



Stefan W. Hell



William E. Moerner



2014-es Kémiai Nobel-díj:
„A szuperfelbontású fluoreszcens mikroszkópia kifejlesztéséért.”^[14.]

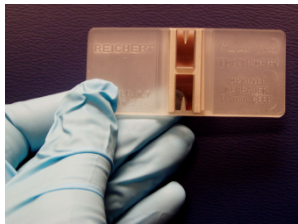
A konfokális (jobb) és a szuperfelbontású STED mikroszkópia (bal) felbontásának összehasonlítása mikrotubulusokon.

Lymphocyták szöveti megoszlása

	Perifériás vér	Nyirokcsomók	Lép
Th sejtek	50-60%	50-60%	35-40%
Tc sejtek	20-25%	15-20%	10-15%
B-sejtek	10-15%	20-25%	40-45%
NK-sejtek	≈10%	Igen kevés	≈10%

Az áramlási citometria (flow cytometry) definíciója

- Mitől citometria?
 - Sejtek paramétereinek vizsgálatára alkalmas módszer. (pl. sejtszám, méret, granularitás, fehérjék jelenléte a felszínen vagy a citoplazmában, DNS-tartalom, stb., lásd a következő diákon)
- Mitől áramlási?
 - Folyadékban szuszpendált sejteknek vagy egyéb partikulumoknak lézerefény és detektorok előtti áramoltatásán alapul. (lásd a következő diákon)
- Mire jó?
 - Egy nagyobb sejtmennyiség **gyors, multiparaméteres** vizsgálatát teszi lehetővé, vagyis amellet, hogy rövid időn belül sok sejtet vizsgál, egyetlen vizsgált sejtről egyidejűleg több paramétert is megad. (méret, granularitás, jelöléstől függően egyéb, lásd a következő diákon)

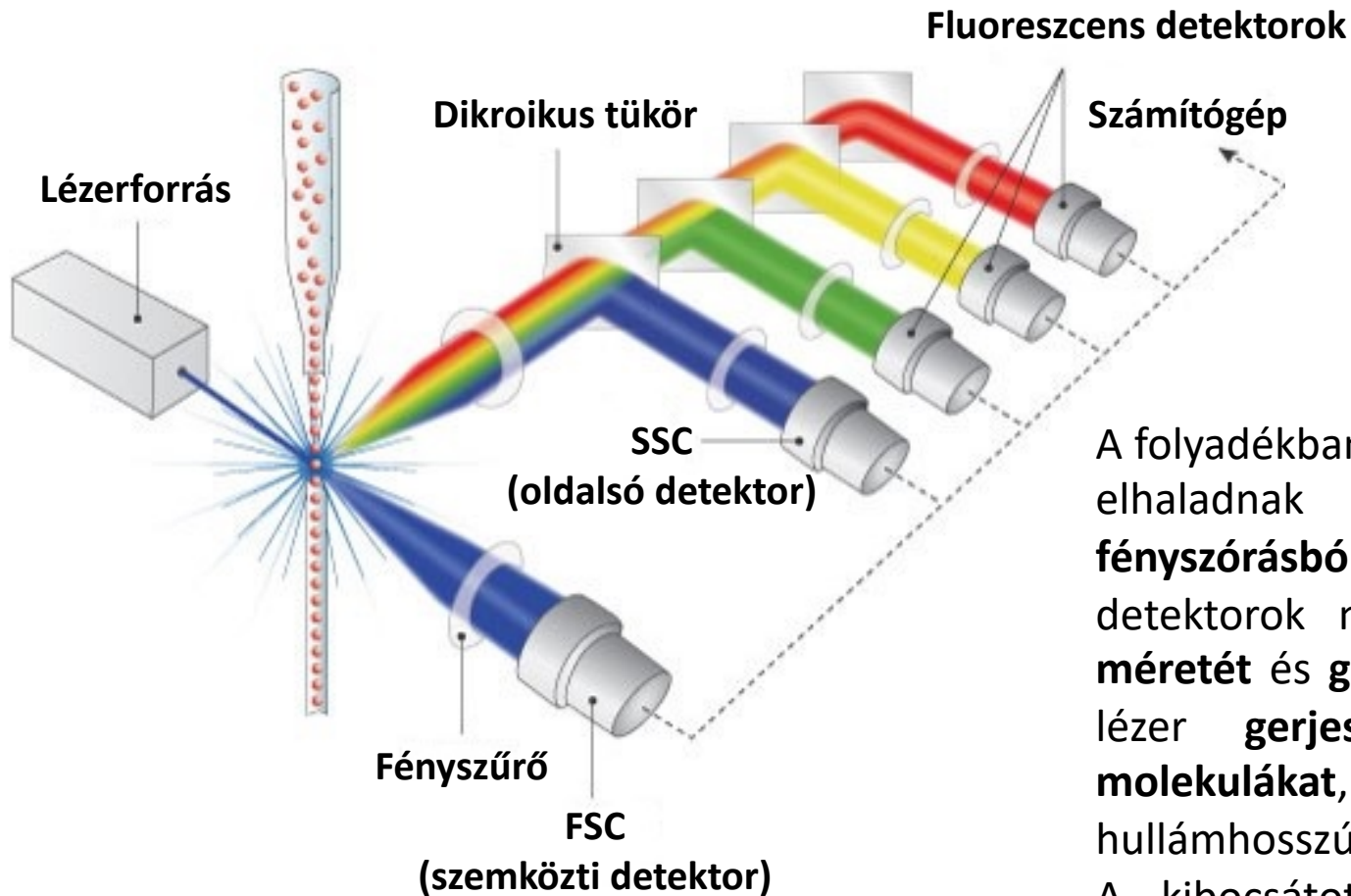


Egy hemocitóméter:
Mikroszkóp alatt a vizsgáló megszámol percenként kb. 100-200 sejtet.



BD FACSCanto™ II áramlási citóméter:
Egy másodperc alatt akár 10.000 sejtet is képes lemérni.^[1.]

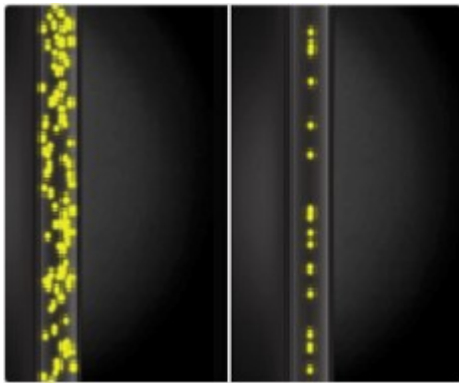
Az áramlási citometria lényege



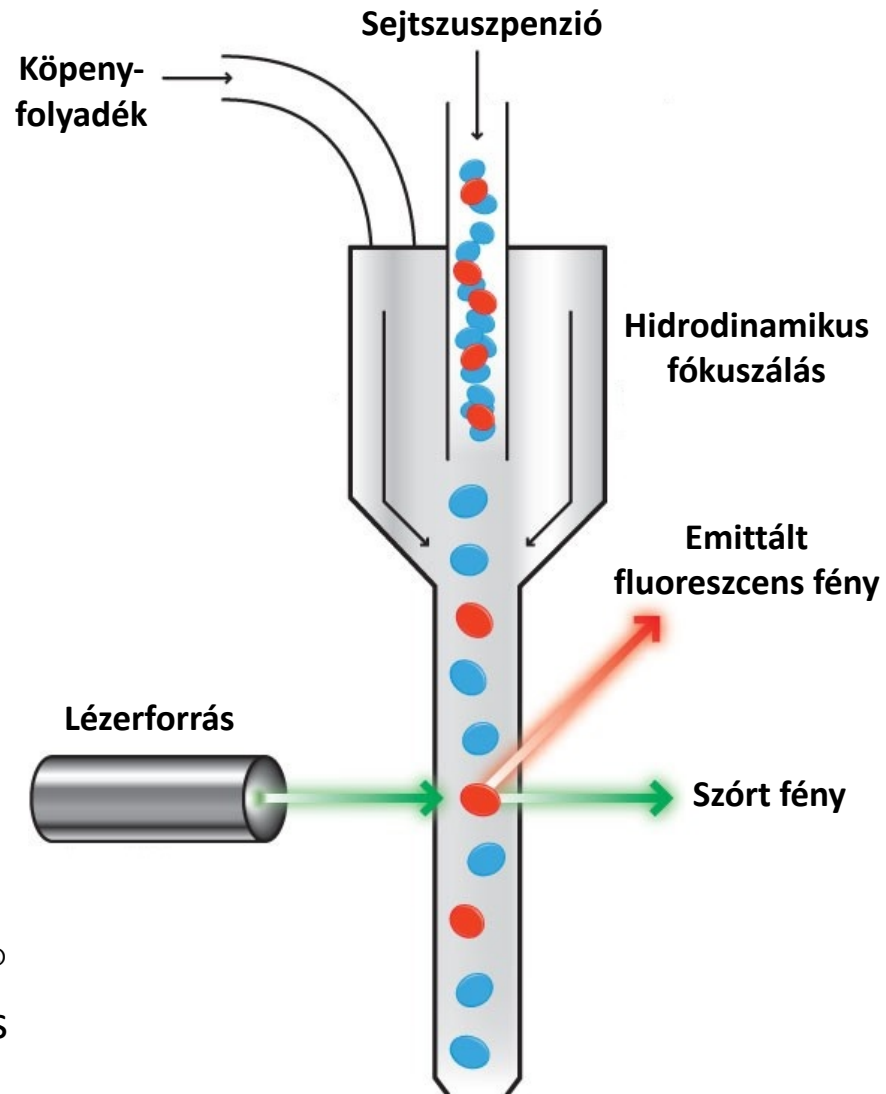
A folyadékban lévő sejtek **egyesével** elhaladnak a lézer előtt. A **fényszórásból** az FSC és SSC detektorok meghatározzák a sejt **méretét** és **granularitását**, illetve a lézer **gerjeszti** a **fluoreszcens molekulákat**, amik a rájuk jellemző hullámhosszágú fényt **emittálják**. A kibocsátott fluoreszcens fényt **dikroikus tükrökkel** vagy filterekkel terelik a megfelelő **detektorhoz**.^[2.]

Hidrodinamikus fókusztálás

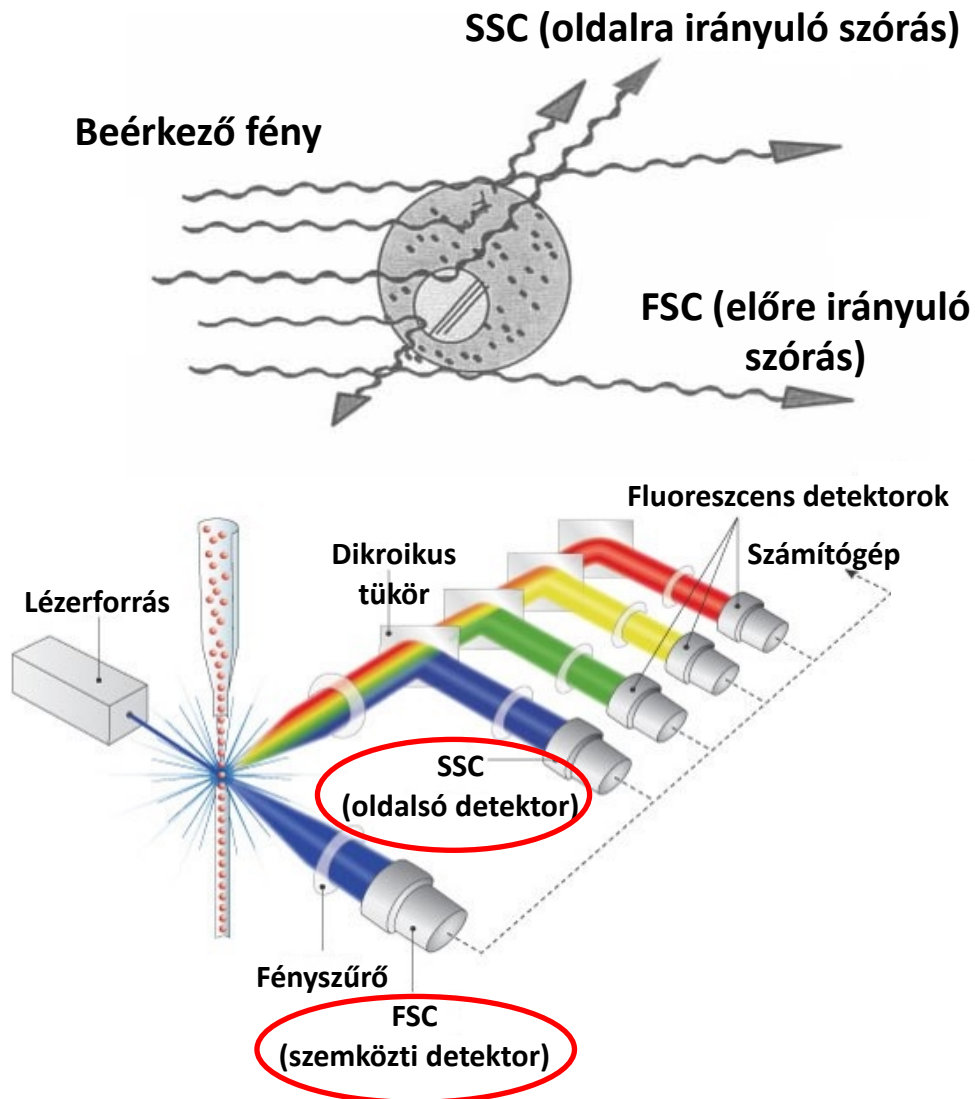
- A folyadékban lévõ sejteket a hozzájuk áramoltatott **köpenyfolyadék** (angolul sheath fluid, ez általában PBS) sorba rendezi. A sejtek így egymás után, **egyesével** haladnak egy **kapillárisban**. A **lézerfény** erre a kapillárisra fókusztált.
- Ultrahang is használható a sejtek fókusztálására (akusztikus fókusztálás):



Az akusztikus fókusztálást használó Attune[®] áramlási citométer fókusztálás nélkül (bal) és fókusztálással (jobb).



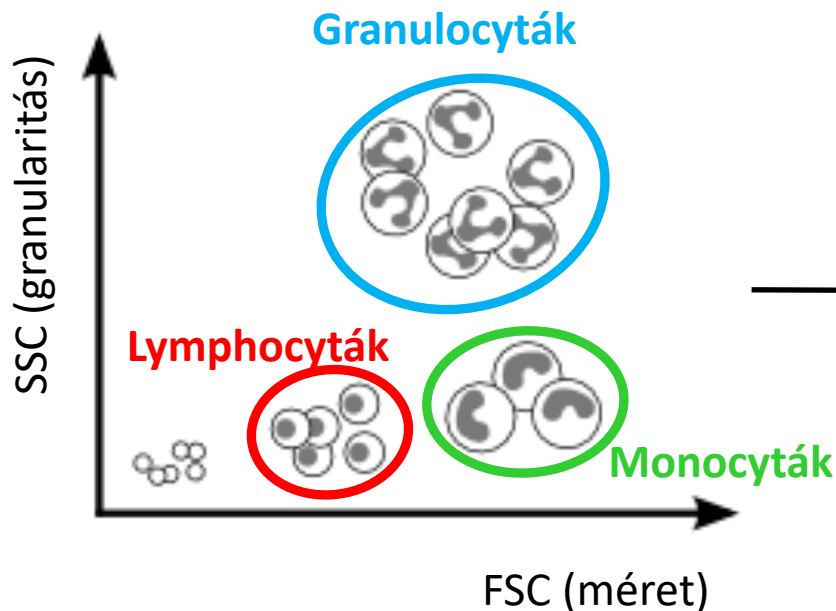
Az FSC és SSC detektorok



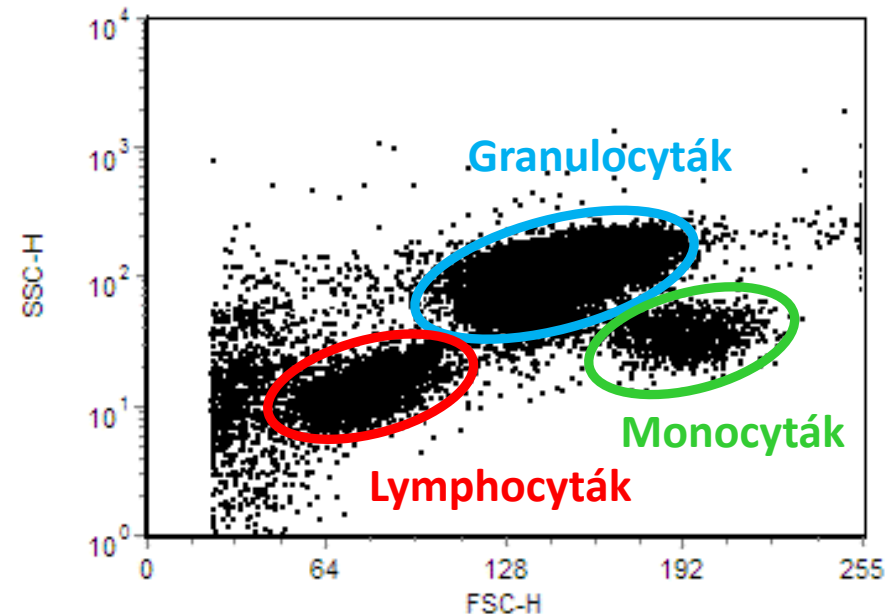
- A **FSC** (forward scatter) detektor a kibocsátó lézerforrással nagyjából szemben található, a sejt felszíne által okozott fényszórást méri, ami a sejt **méretével arányos**.
- Az **SSC** (side scatter) detektor a sejtre érkező lézerefényhez képest oldalt található, a sejt belsejében előforduló membránnal körülvett struktúrák (pl. granulumok, mitokondriumok, stb.) által okozott szórást méri, ami a sejt **granuláltságával arányos**.

Dot plot bemutatása FSC és SSC alapján

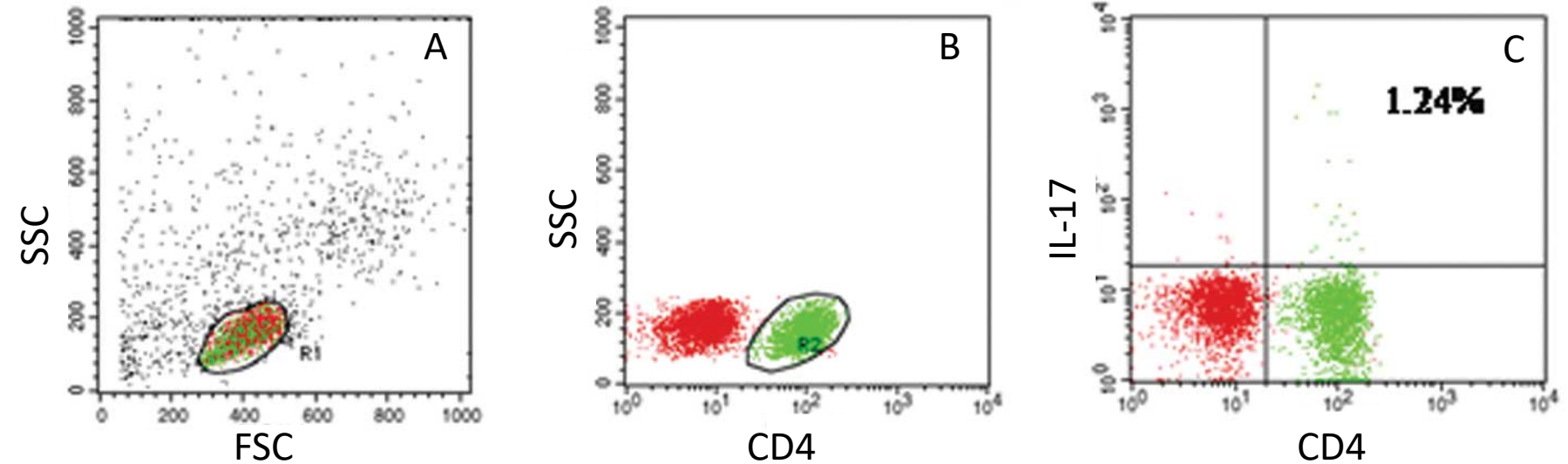
A **dot plot** (dot = pont, plot = kép) az áramlási citometriás vizsgálatok egy jellegzetes megjelenítési formája. Egy **kéttengelyű koordináta-rendszerben** helyezi el a sejteket a beállított két paraméter függvényében. Minden egyes látott pont egy sejtnek felel meg. Az azonos sejtcsoportba tartozó sejtek nagyobb halmazokat, **sejtpopulációkat** alkotnak. Az egyes populációk ezt követően kiválaszthatók („**kapuzás**”) és külön-külön vizsgálhatók más paraméterekre.



Humán perifériás vér dot ploton:



Példa a kapuzásra

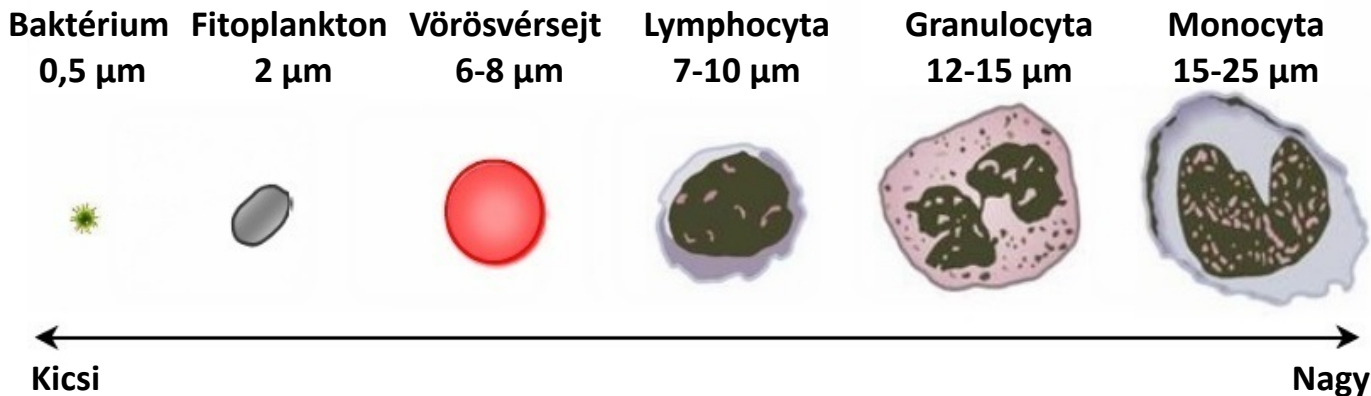


Szerették volna a mintában meghatározni a Th17 sejtek (lásd 2. gyakorlat) arányát. A vért fluoreszcensen jelölték (lásd következő diákon) CD4-re, és IL-17-re, majd a mintát áramlási citométerrel vizsgálták.

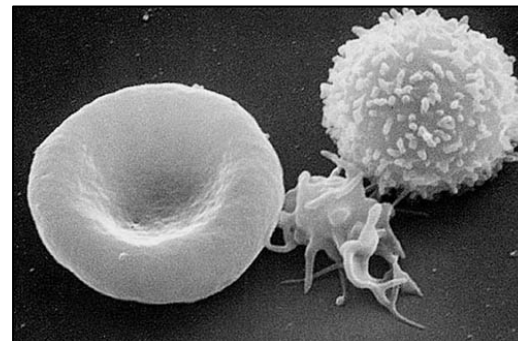
- **A:** Méret (FSC) és granularitás (SSC) alapján kiválasztották a lymphocytákat. (R1 kapu)
- **B:** A lymphocytákon belül kiválasztották a CD4 pozitív sejteket. (R2, zöld kapu)
- **C:** A lymphocytákon belül vizsgálták az CD4+ és IL-17+ sejtek arányát. (jobb felső kvadráns, 1,24%-a az összes lymphocytának.)

Áramlási citometria és a vörösvérsejtek

- A vörösvérsejtek zavarják a vérminták vizsgálatát, mert:
 - **Hasonló mérettartományba** esnek, mint a lymphocyták.
 - A lymphocytákhoz képest sokkal **több van belőlük**, ezért elfedik a lymphocytákból érkező jelet.

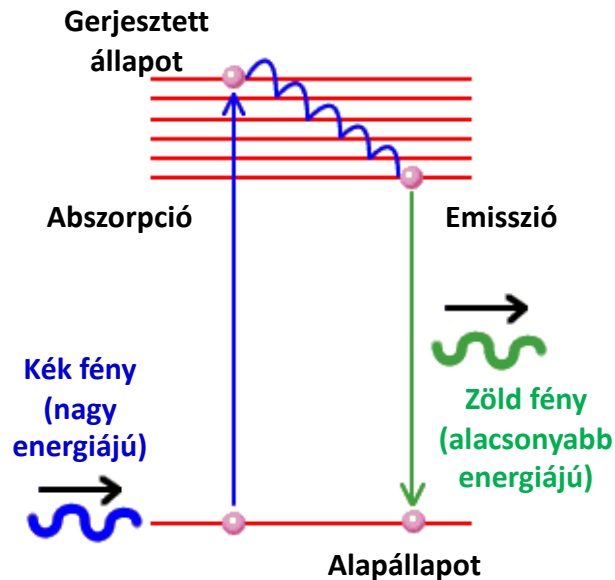


- Módszerek a vörösvérsejtek eliminálására:
 - **Hemolízis**
 - **Ficoll-grádiens centrifugálás** (lásd később)

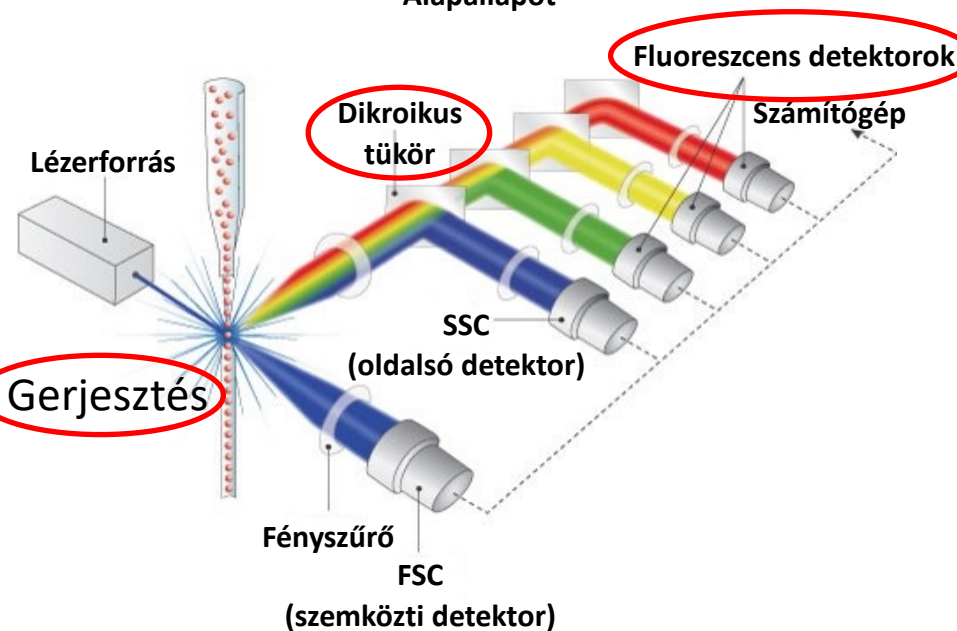


Vvt, tct és egy lymphocyta

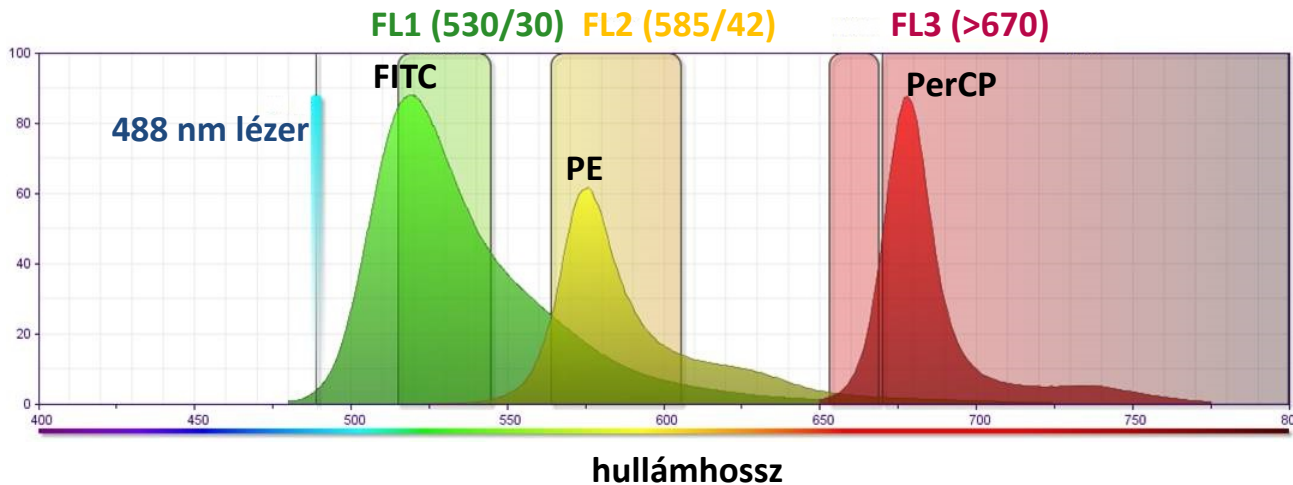
Immunfluoreszcens jelölés



A méret és a granularitás mellett a sejtekből érkező fluoreszcens jel is detektálható. A lézer **gerjesztő fényként** gerjeszti a jelöléshez használt antitesthez konjugált **fluorokrómot**, ami valamilyen rá jellemző hullámhossz tartományban (**emissziós spektrum**) fényt bocsát ki. A különböző hullámhosszú fluoreszcens fényt **dikroikus szűrőkkel** vagy **tükrökkel** el lehet különíteni és a nekik megfelelő **detektorokba** terelhetők.



A fluoreszcens spektrum



A BD FACSCalibur lézerei:^[3.]

488 nm argon lézer

635 nm vörös dióda lézer

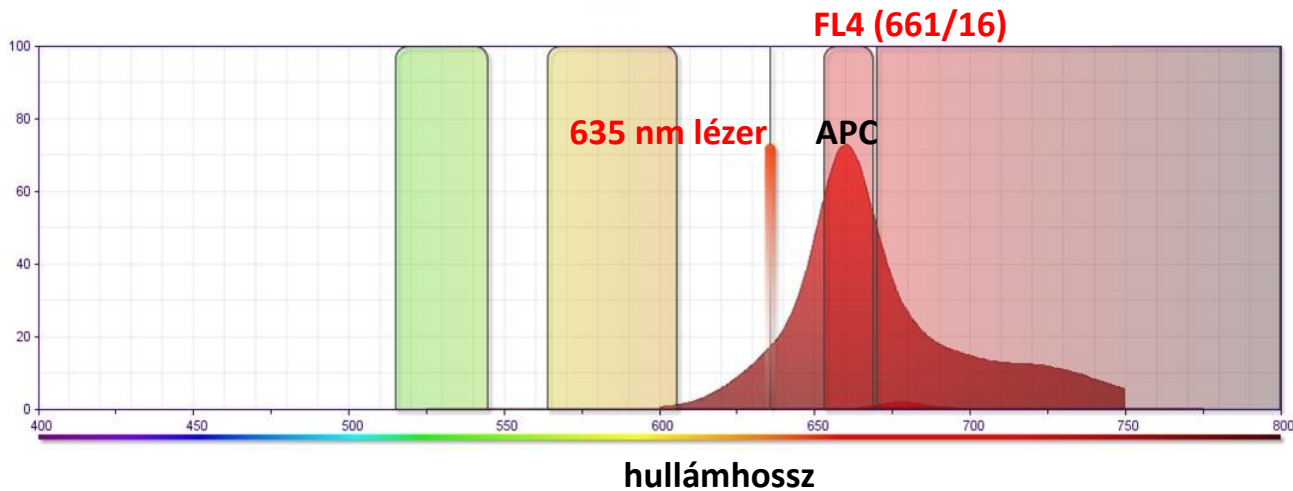
A BD FACSCalibur detektorai:

FL1: 515-545 nm (530/30)

FL2: 564-606 nm (585/42)

FL3: >670 nm

FL4: 653-669 nm (661/16)



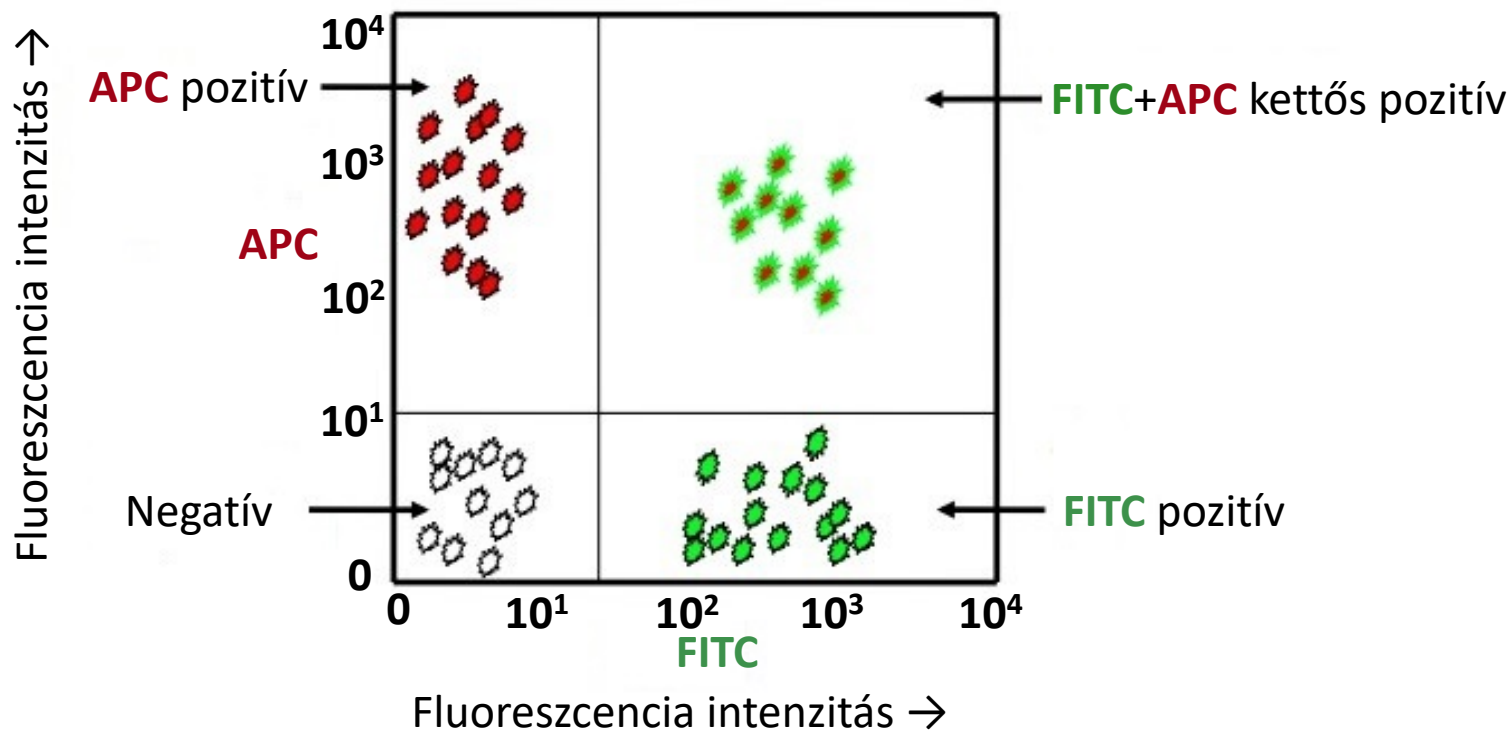
A lézerekkel ellentétben, amik egy fix hullámhosszúságú fénynyalábot bocsátanak ki, a fluorokrómok egy rájuk jellemző **emissziós spektrummal** rendelkeznek, amik sokszor jelentősen **átfednek** egymással.

Fluorokrómok

Fluorokróm	Színe	Gerjesztési hullámhossz		Emissziós hullámhossz
		max. (nm)	Gerjesztő lézer (nm)	max. (nm)
Hoechst 33342	Blue	350	355, 375	461
Brilliant Violet™ 421	Blue	407	405	421
BD Horizon™ V450	Blue	404	405	448
Pacific Blue™	Blue	401	405	452
BD Horizon™ V500	Green	415	405	500
AmCyan	Green	457	405	491
Alexa Fluor® 488	Green	495	488	519
FITC	Green	494	488	519
PE	Yellow	496, 564	488, 532, 561	578
Brilliant Violet™ 605	Orange	407	405	602
BD Horizon™ PE-CF594	Orange	496, 564	488, 532, 561	612
PI	Orange	351	488, 532, 561	617
7-AAD	Red	543	488, 532, 561	647
APC†	Red	650	633, 635, 640	660
Alexa Fluor® 647	Red	650	633, 635, 640	668
PE-Cy™5†	Red	496, 564	488, 532, 561	667
PerCP	Red	482	488, 532	678
PerCP-Cy™5.5	Far Red	482	488, 532	695
Alexa Fluor® 700	Far Red	696	633, 635, 640	719
PE-Cy™7	Infrared	496, 564	488, 532, 561	785
APC-Cy7	Infrared	650	633, 635, 640	785
BD APC-H7	Infrared	650	633, 635, 640	785

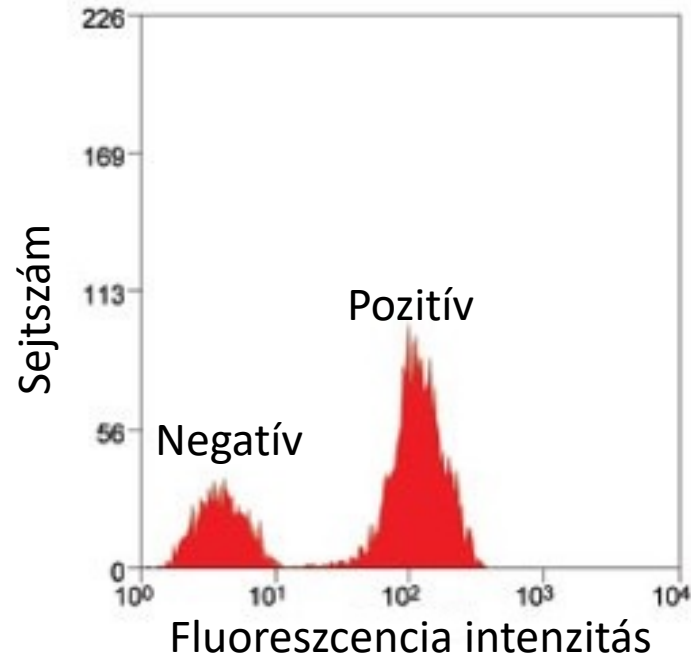
Ugyanabban a mintában ugyanazon lézer által gerjesztett és azonos színű fluorokrómok használata kerülendő, mert nem lesznek elkülöníthetőek a vizsgált antigének. (Gyakran használt kombináció: **FITC** + **PE** + **APC**)

Fluoreszcencia megjelenítése dot ploton



A vizsgálat **kvantitatív**, a mért fluoreszcencia intenzitások számban kifejezhetőek. (=A **pozitivitás mértéke** is meghatározható.)

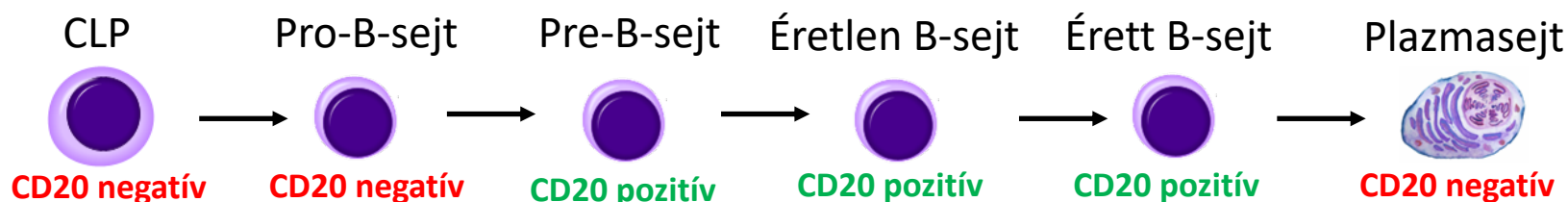
Példák egyéb megjelenítési formákra



Hagyományos hisztogram: A vízszintes tengelyen az adott detektorban mért fluoreszcencia intenzitás (=jelerősség), a függőleges tengelyen pedig a sejtek száma látható. A megadott példában elkülöníthető egy alacsony fluoreszcenciájú negatív és egy magasabb fluoreszcenciát adó pozitív sejtpopuláció.

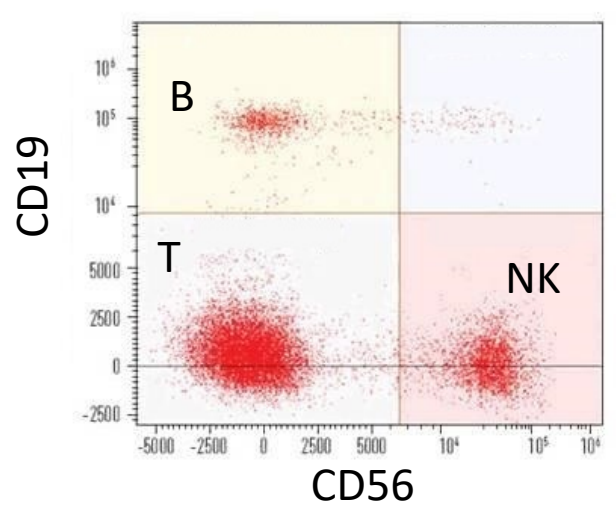
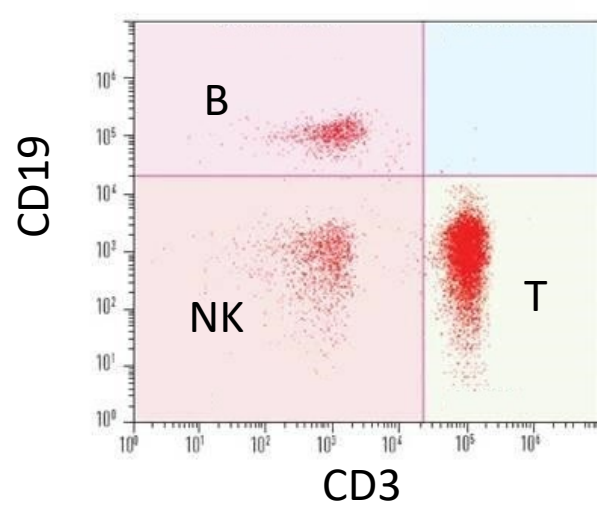
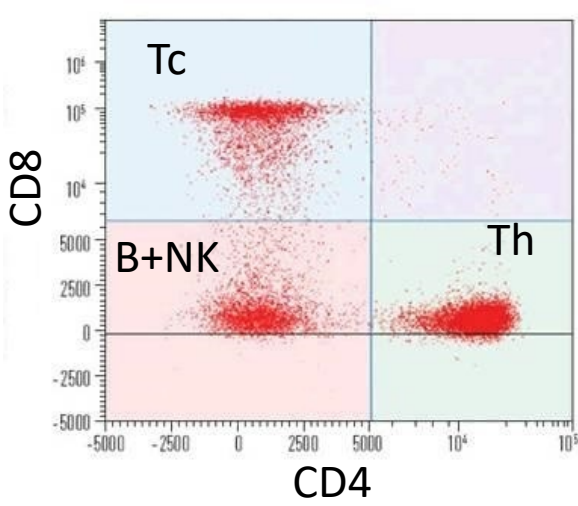
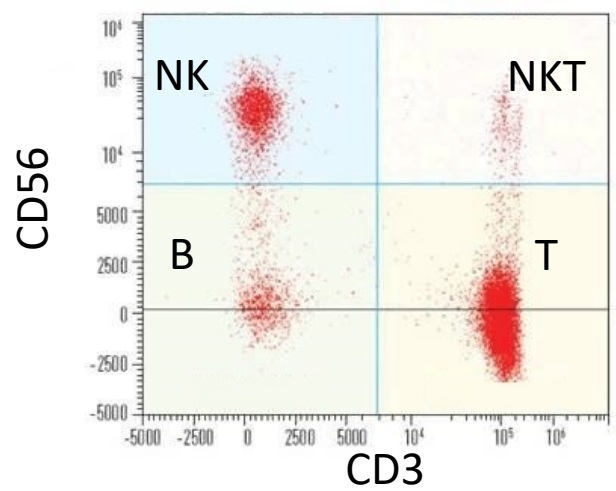
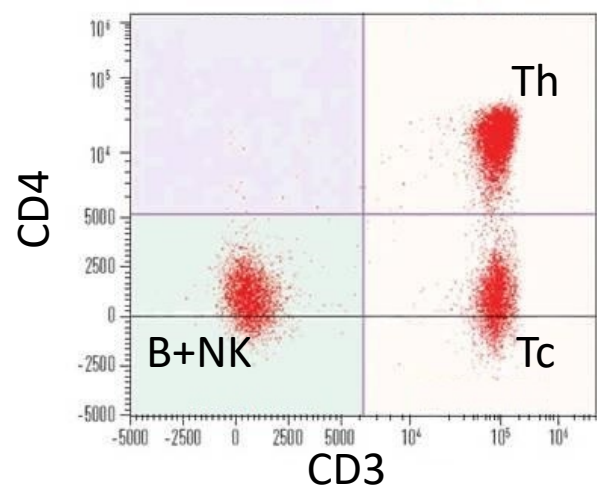
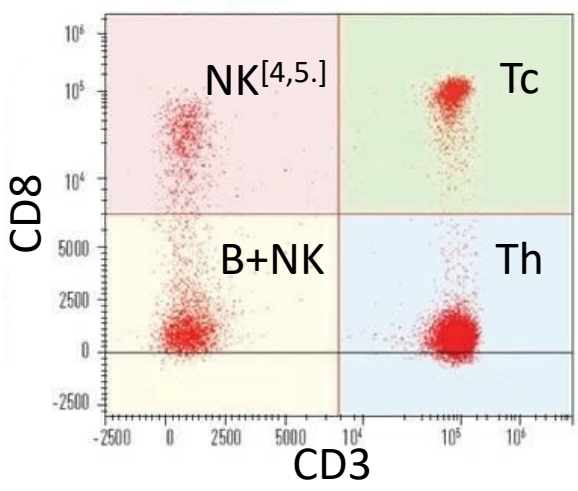
A CD markerek típusai

- **Sejtvonal markerek:** Kizárólag egy sejtvonalra jellemzőek, az adott vonal összes sejtjén jelen vannak, de más sejteken nem található meg.
 - Pl.: CD3 → minden T-sejten CD19 → minden B-sejten
- **Érészi markerek:** A sejterés eltérő fázisaiban különbözik az immunfenotípus, egyes molekulák csak a sejterés bizonyos fázisaiban vannak jelen, később eltűnnek, más molekulák csak az érett sejteken található meg, stb.
 - Pl.: CD20 (B-sejt marker is egyben, más sejteken nem fordul elő)^[1.]



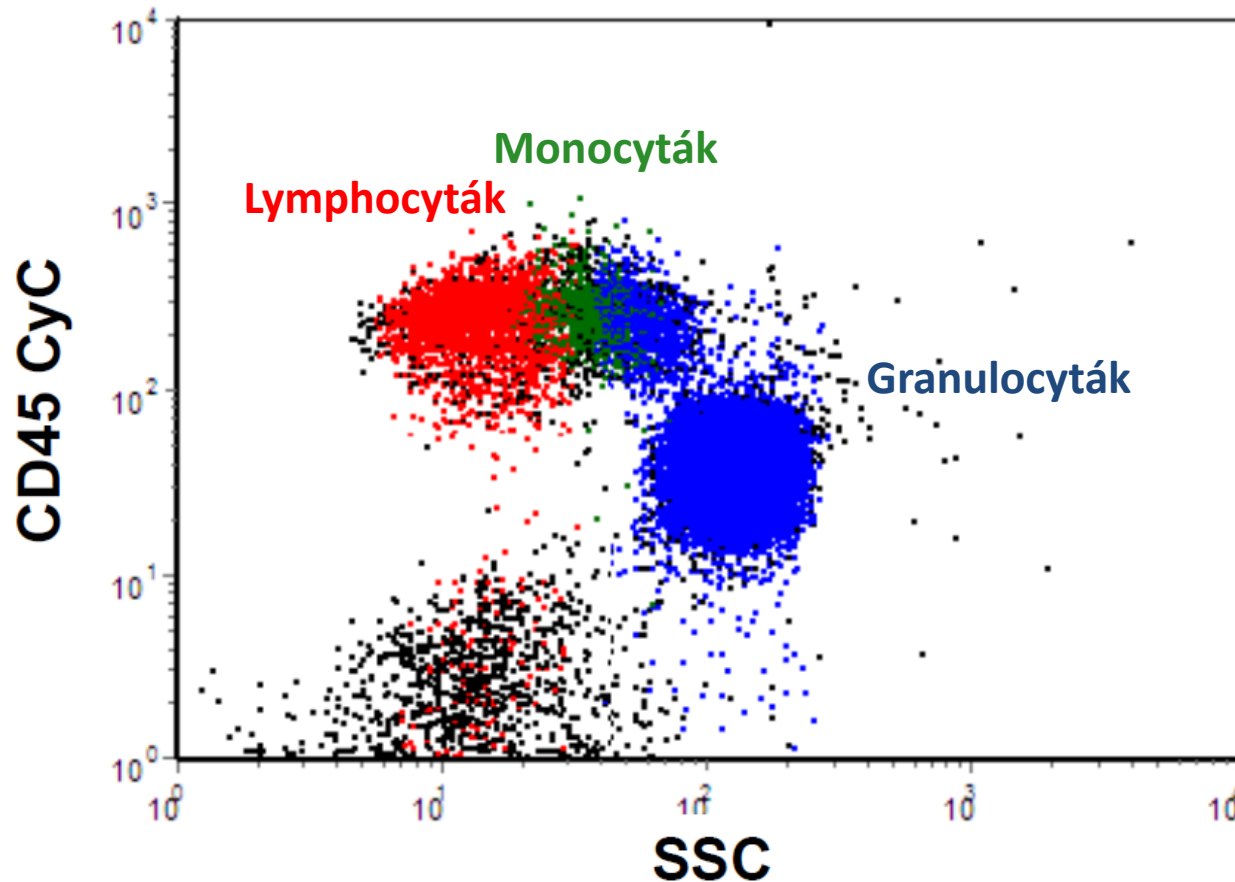
- **Aktivációs markerek:** Nyugvó sejteken nincsenek, vagy csak nagyon kis mennyiségben vannak jelen, de a sejttaktiváció hatására megjelennek, pl.:
 - CD25 (az interleukin-2 receptorának az alfa lánc, IL-2R α , lásd később)
 - CD80 és CD86 (B7-1 és B7-2, az antigén prezentáló sejteken található ún. kostimulációs molekulák, lásd később)

Normál humán vér lymphocyta alcsoportjai



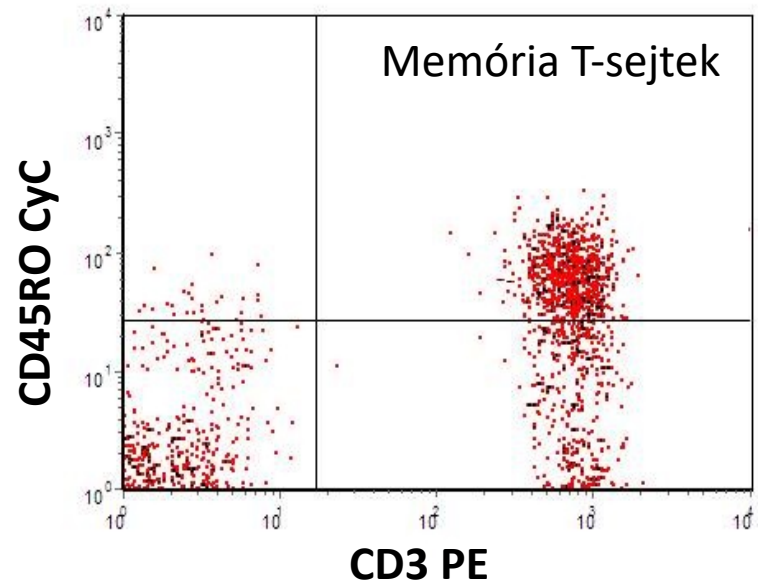
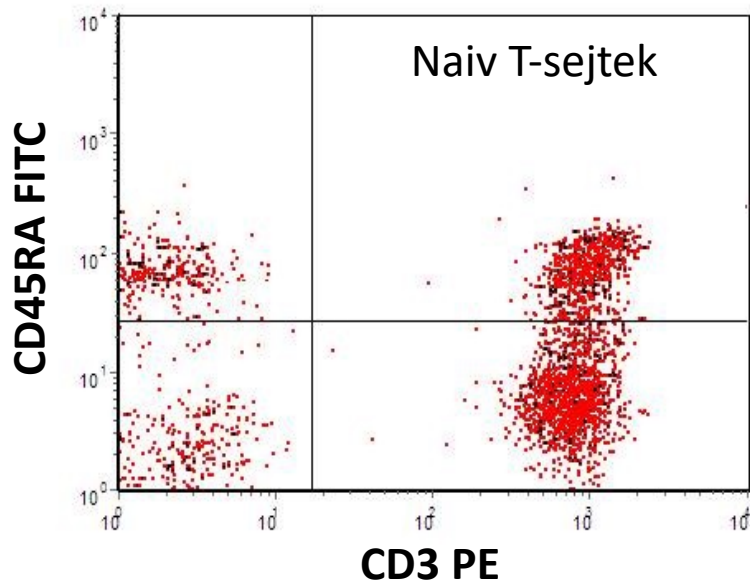
Emlékeztető: **CD3** → T-sejt, **CD4** → Th sejt, **CD8** → Tc sejt, **CD19** → B-sejt, **CD56** → NK-sejt

CD45 humán perifériás vérben



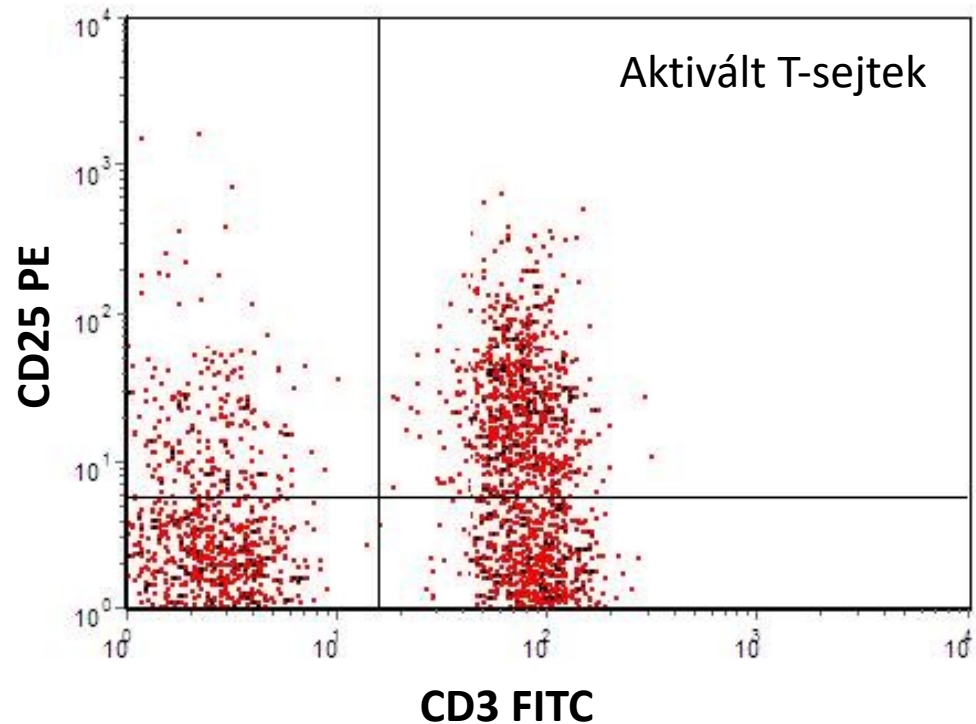
A **CD45** molekula **minden fehérvérsejten** megtalálható, ún. pan-leukocytá marker.

CD45RA és RO izoformák kimutatása humán vérben



CD45 funkciója: Sejtmembránba ágyazott **foszfatáz**, számos izoformája ismert, a **CD45RA** a naiv T-sejtekre, a **CD45RO** a memória T-sejtekre jellemző.^[6.] (részletesen lásd előadáson)

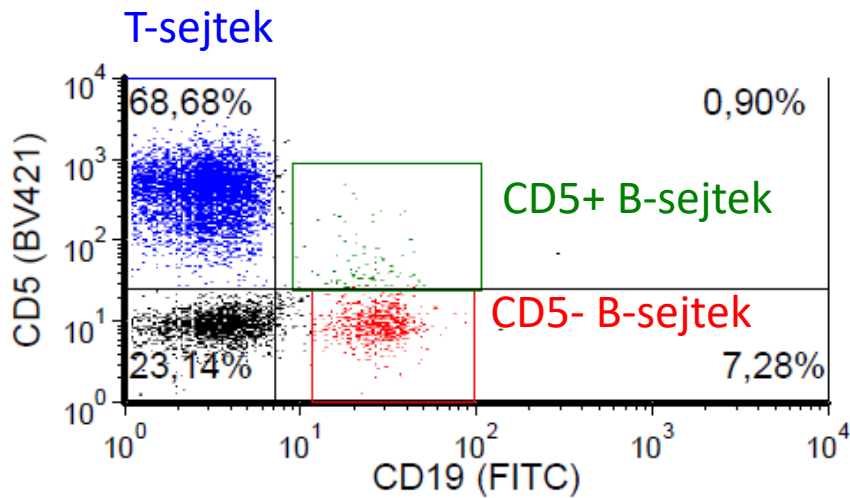
CD25 expresszió humán vér T-sejtjeiben



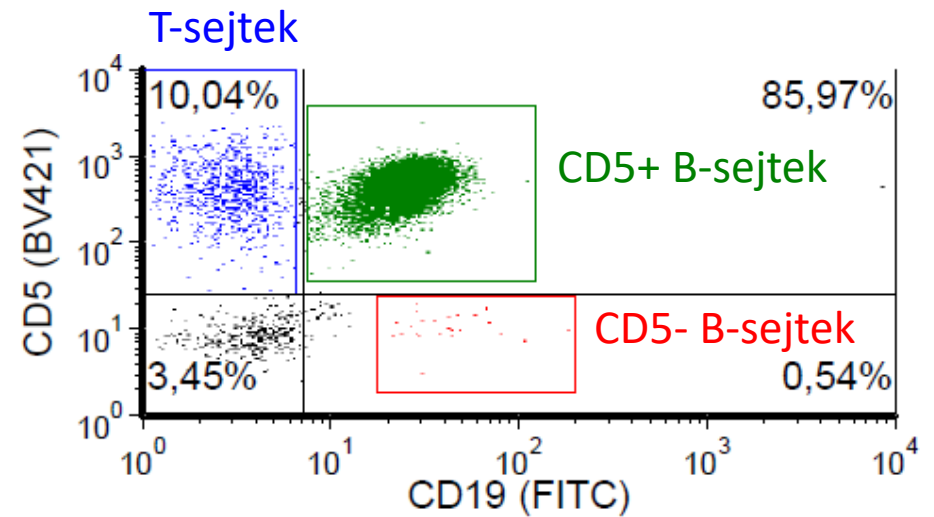
CD25: Az interleukin-2 receptorának alfa lánca (IL-2R α), mely aktivált lymphocytákon jelenik meg.^[7.] (részletesen lásd előadáson)

Humán CD5+ B-sejtek

Egészséges egyén perifériás vére:



B-sejtes chronicus lymphocytás leukaemia (B-CLL):



Az áramlási citometria jelentősége 1.

- Meghatározható a mintában található sejtek immunphenotípusa (**immunphenotipizálás**):
 - Malignus **hematológiai betegségek** diagnosztikája és differenciáldiagnosztikája^[8, 9.]
 - **Immunhiányos állapotok** diagnosztikája és differenciáldiagnosztikája^[10.]
 - **Autoimmun betegségek** követése
 - **Transzplantáció** előtti és utáni állapotok követése^[11.]
 - **HLA haplotípus** meghatározása^[12.] (lásd később)
 - **Fertőző betegségek** diagnosztikája és követése
- **Kvantitatív** mérési lehetőségek:
 - A vizsgált antigént hordozó **sejtek arányának** mérése
 - Az **antigén expressziójának** meghatározása a vizsgált sejtpopulációban
- **DNS és RNS tartalom mérése:**^[13.]
 - Apoptózis vizsgálata
 - Sejtciklus vizsgálata
 - Reticulocyták számának meghatározása
 - Aneuploidia kimutatása

Az áramlási citometria jelentősége 2.

- **Funkcionális tesztek:**
 - **Phagocytáló képesség vizsgálata**^[14.]
 - **Intracelluláris kalcium szint** mérése^[15.]
 - Intracelluláris pH meghatározása
 - Enzim mennyiség és aktivitás meghatározása
 - Chemotaxis vizsgálata
 - Reaktív oxigén szabadgyökök termelésének meghatározása
 - Proliferációs index mérése
- **Citokin szint mérés**^[16.] (CBA, lásd később a szerológiai teszteknel)
- **Sejtszeparálás**^[17.] (Sejt szortolás, lásd később)
- Hematológiai automaták → **vérkép** (fluoreszcens jelölés nélkül)

A következőkben láthattok pár **szemléltető diát** az áramlási citometria felhasználási területeiről. Az azokon szereplő anyagot természetesen **nem kérjük számon**, azonban a főbb **felhasználási területeit** ismerni kell és **tudnotok kell dot plotot elemezni!**

Példa immunphenotipizálásra 1.

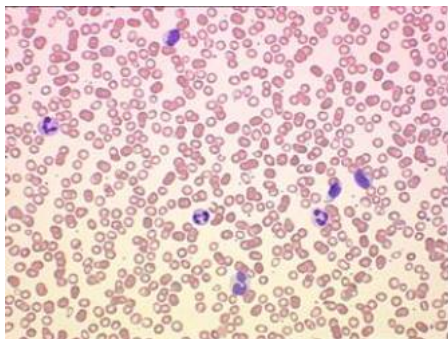
A betegnél vérvétel során kórosan emelkedett lymphocytaszámot (lymphocytosis) találtak.



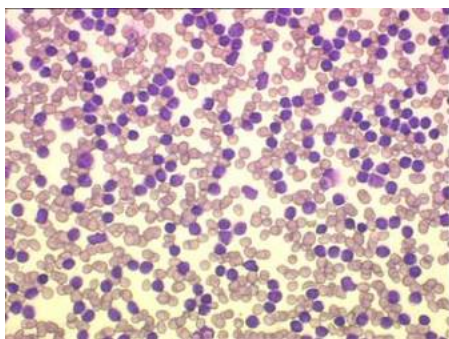
Áramlási citometria



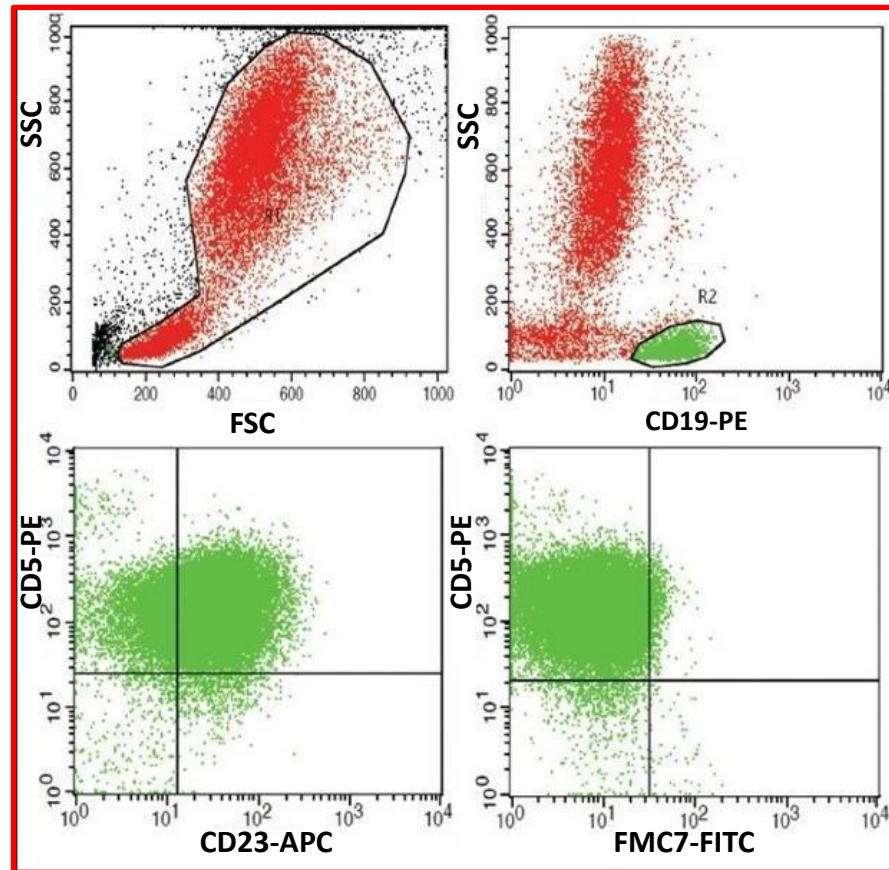
Kérdés: Milyen sejtek ezek?



Normál vérkenet



A beteg kenete



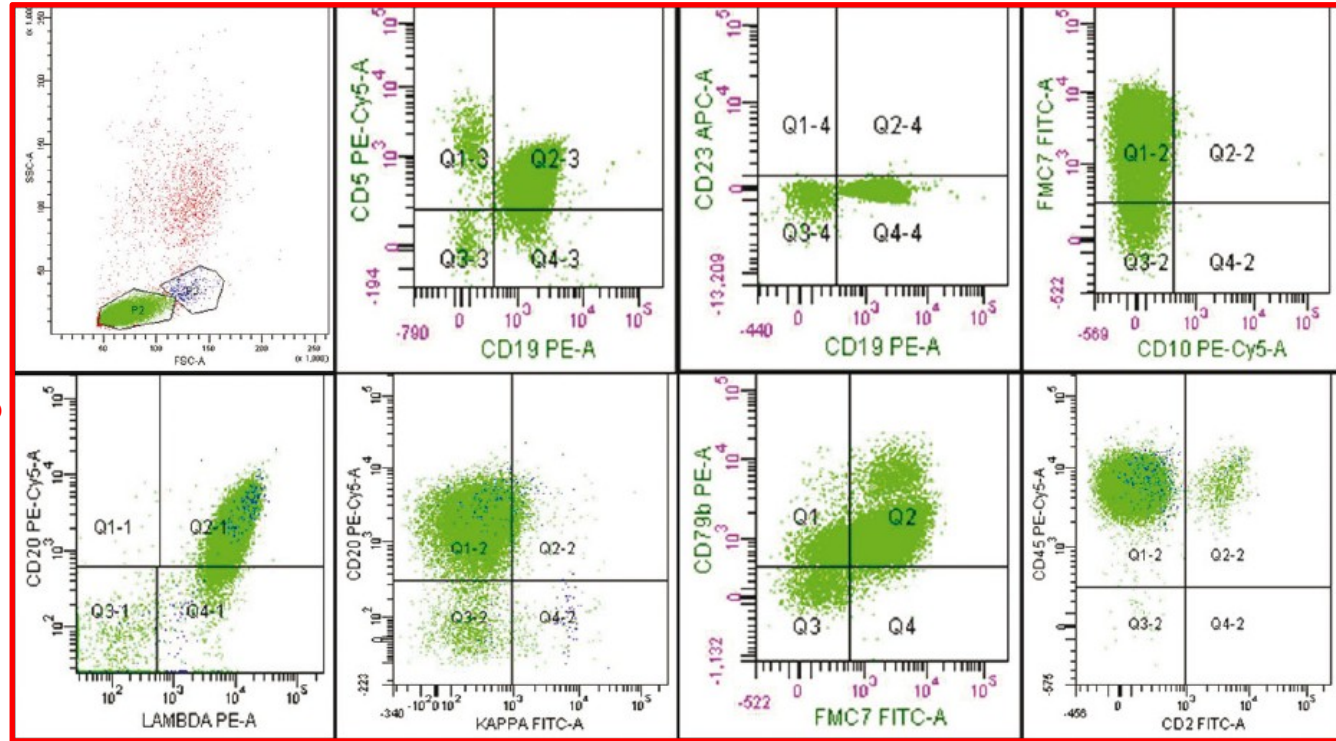
Kapott immunphenotípus:
CD5+/CD23+/CD19+/FMC7-



Diagnózis: B-sejtes chronicus lymphocytás leukaemia
(B-CLL, B-cell chronic lymphocytic leukemia)

Példa immunphenotipizálásra 2.

Lymphocytosis és nyirokcsomó-megnagyobbodás (lymphadenomegalia) miatt vizsgálták a beteget.



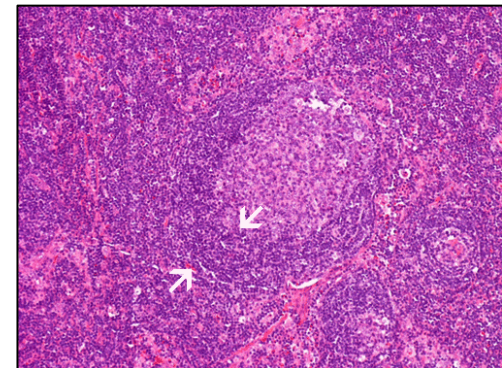
Kérdés: Milyen sejtek ezek?

Kapott immunphenotípus:

- **CD5+**
- **CD19+**
- CD20+
- CD45+
- CD79b+
- **FMC7+**
- Lambda+
- **CD10-**
- **CD23-**

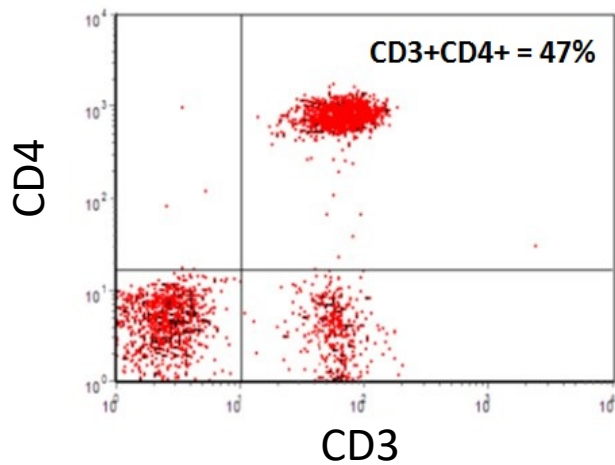
Diagnózis: Köpenysejtes lymphoma (MCL, Mantle cell lymphoma), leukaemiás vérképpel

Kiszélesedett köpenyzóna (mantle zone) egy nyiroktüsző körül MCL-ben. (fehér nyilakkal jelölve, H&E festés)



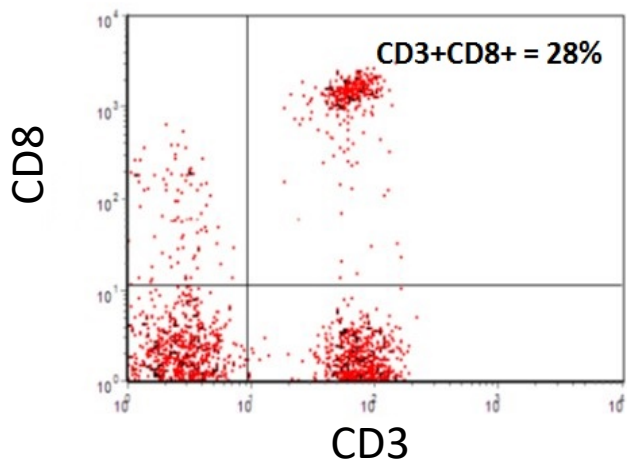
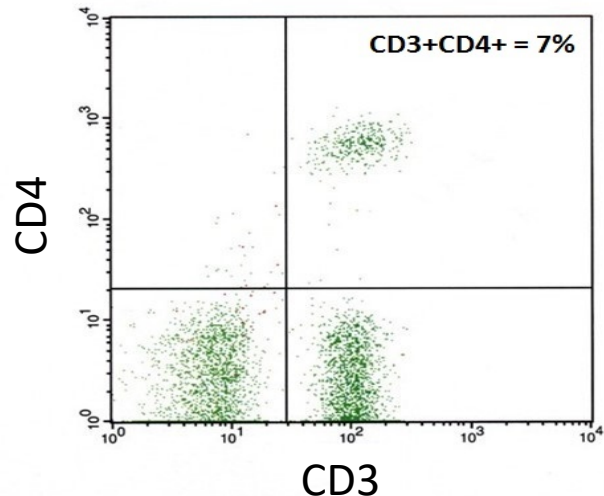
Példa immunhiány követésére

CD4/CD8 arány egy egészséges
egyén perifériás vérében:

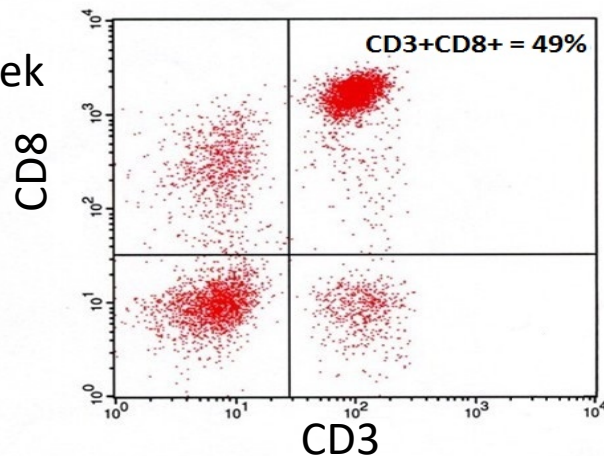


Helper T-sejtek

Kóros CD4/CD8 arány HIV
fertőzött betegben:

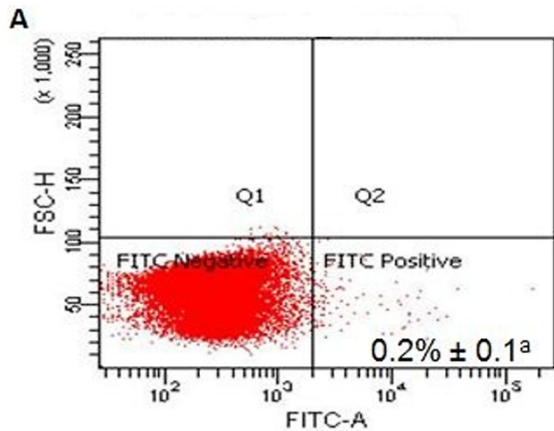


Cytotoxicus T-sejtek

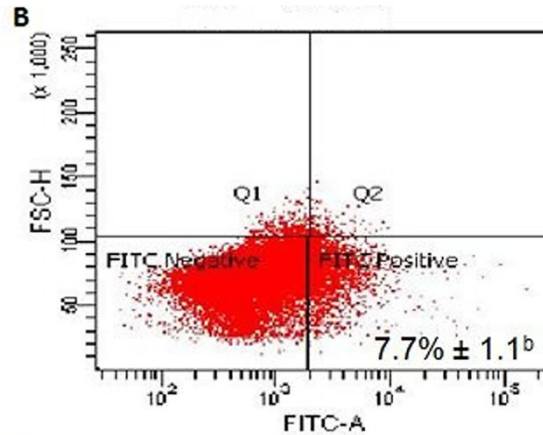


Példa phagocytosis vizsgálatára

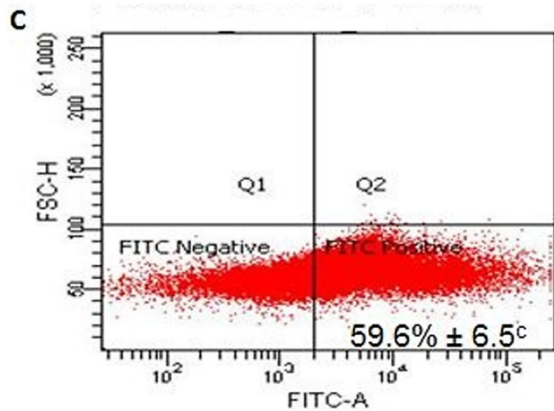
A: Kezeletlen macrophagok FITC-el jelölt latex gyöngyök nélkül



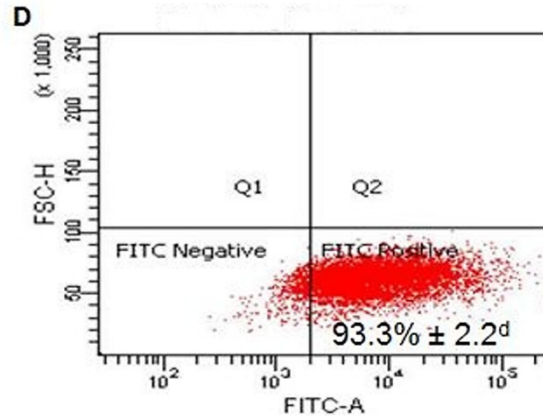
B: Kezeletlen macrophagok FITC-el jelölt latex gyöngyökkel inkubálva



A kezelések hatására fokozódik a macrophagok phagocytáló képessége.



C: Növényi poliszachariddal kezelt macrophagok FITC-el jelölt latex gyöngyökkel inkubálva

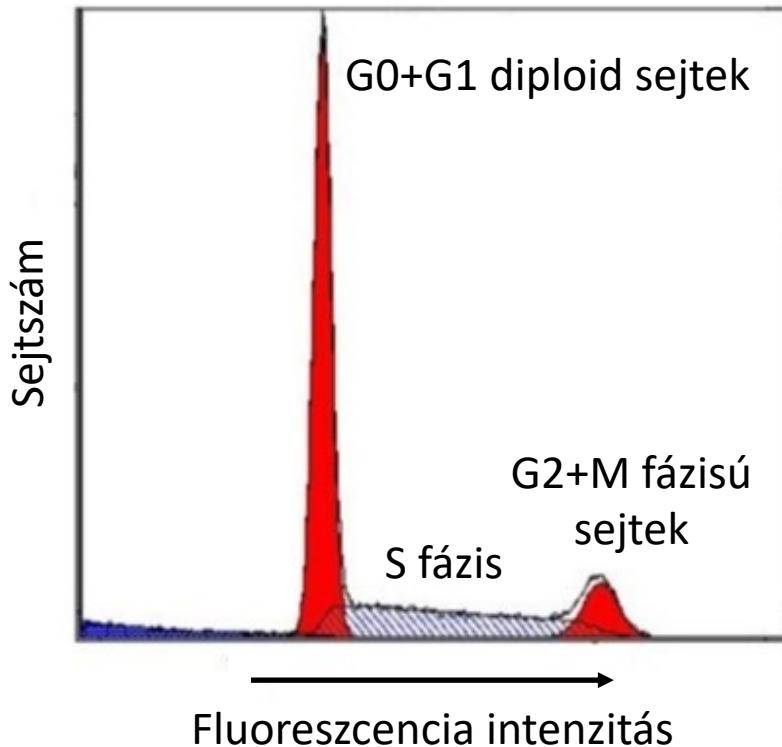


D: LPS-el kezelt macrophagok FITC-el jelölt latex gyöngyökkel inkubálva

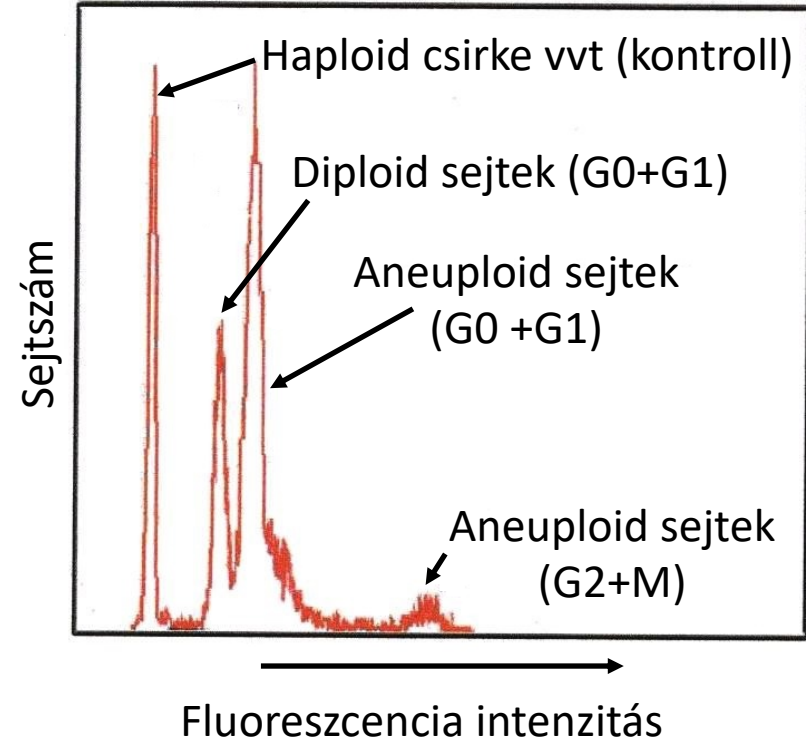
DNS tartalom vizsgálata tumorokban

DNS-t festő fluorokrómokkal kezelik a sejteket, majd megméri a fluoreszcencia intenzitást.

Normális állapot:



Májbiopszia hepatocellularis carcinomából:[18.]



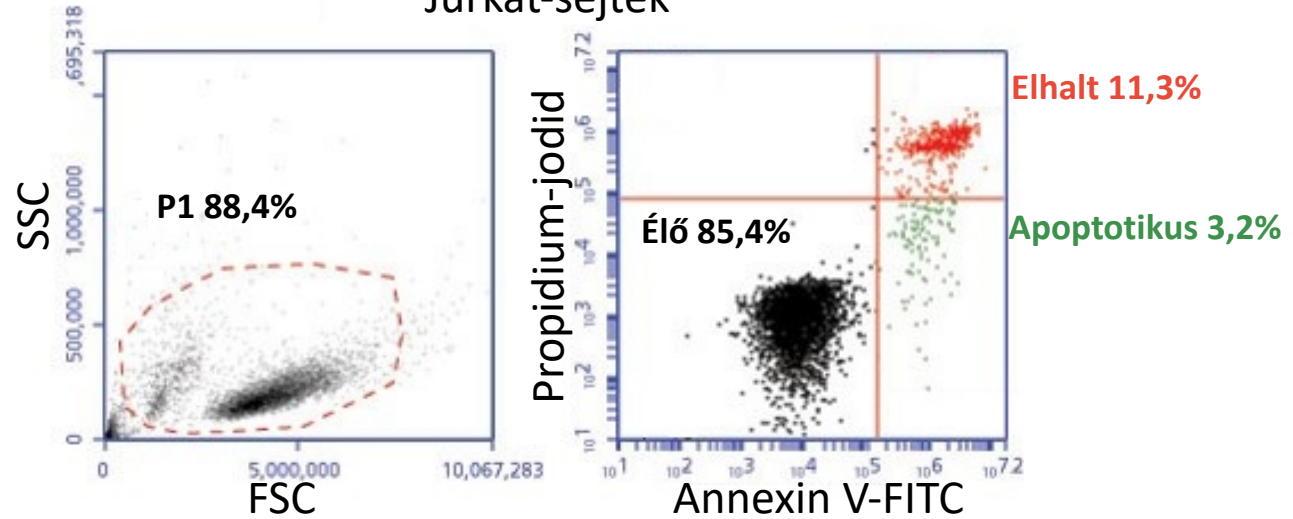
Aneuploidia: Abnormális kromoszómaszám (pl. 60 a 46 helyett G0 fázisú sejtekben)

Példa sejt életképesség vizsgálatára

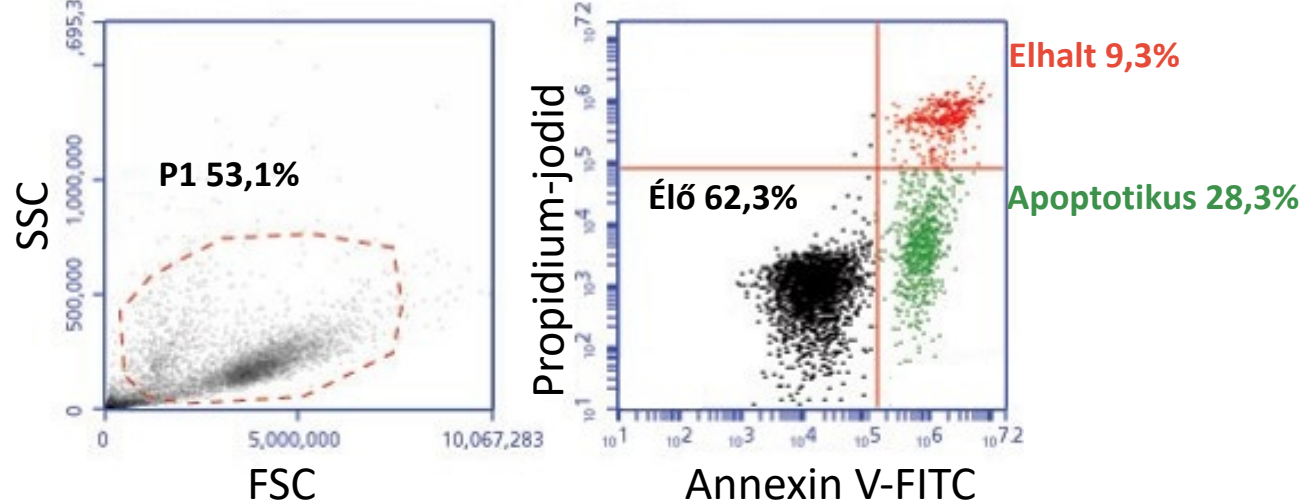
Propidium-jodid: DNS-t kötő fluoreszcens molekula, mely azonban az élő sejtek membránján nem jut át.

Annexin V: Az apoptotikus sejtek membránjában előforduló foszfatidil-szerinhez kötődik.

Jurkat-sejtek

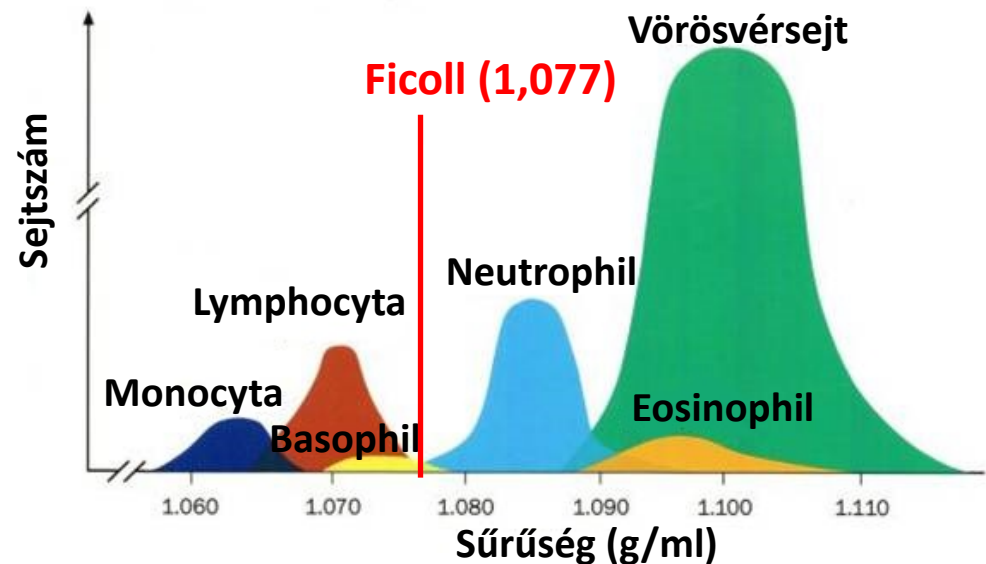


Jurkat-sejtek + camptothecin (kemoterápia)



Mononukleáris sejtek izolálása

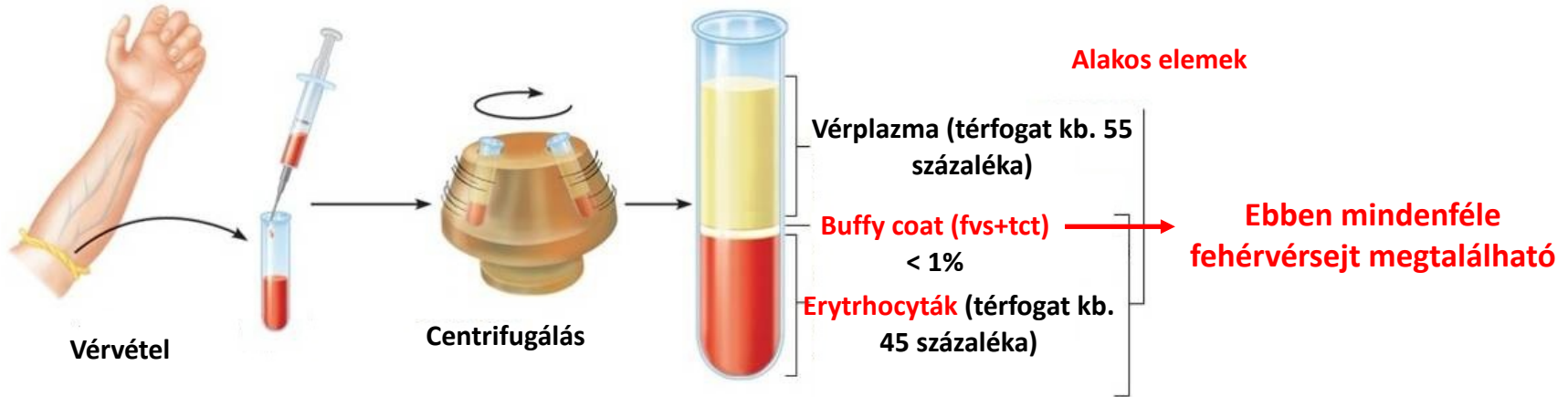
- **Fizikai paramétereken alapuló módszerek:**^[19.]
 - Filtráció (vérszámok mérete alapján)
 - Gradiens centrifugálás (pl. **Ficoll-gradiens centrifugálás**, a vér alakos elemeinek sűrűsége alapján)



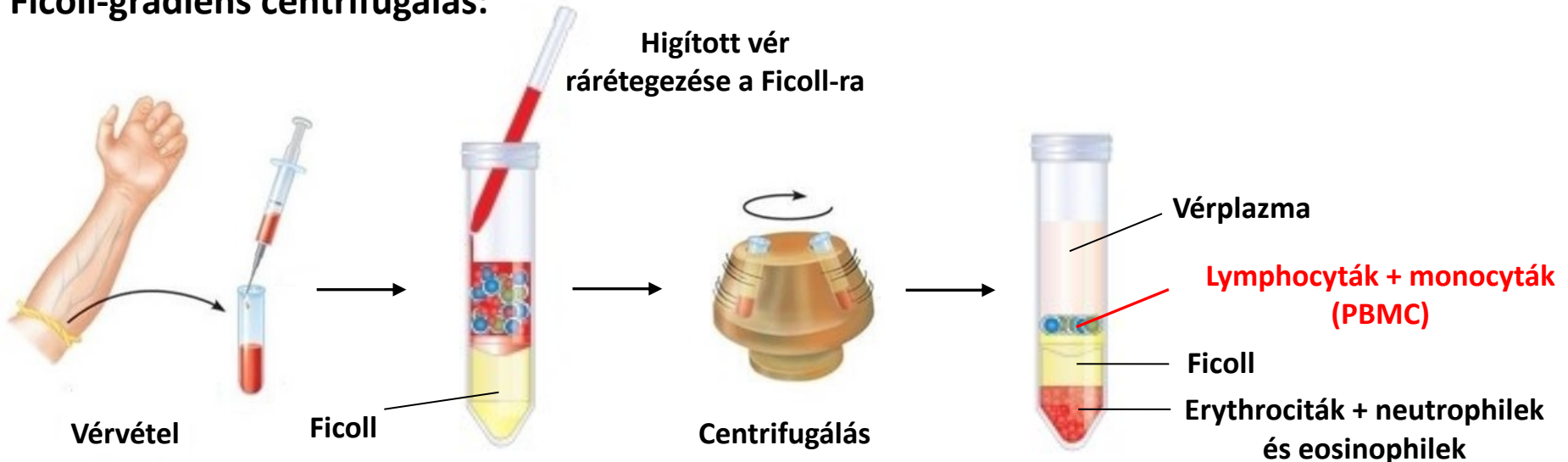
- **Adhéziós tulajdonságokon alapuló eljárások:**
 - Nylon vatta: monocyták és a B-sejtek kitapadnak
 - Műanyag/üvegfelület: monocyták kitapadnak, lymphocyták eltávolíthatók

Ficoll-grádiens centrifugálás 1.

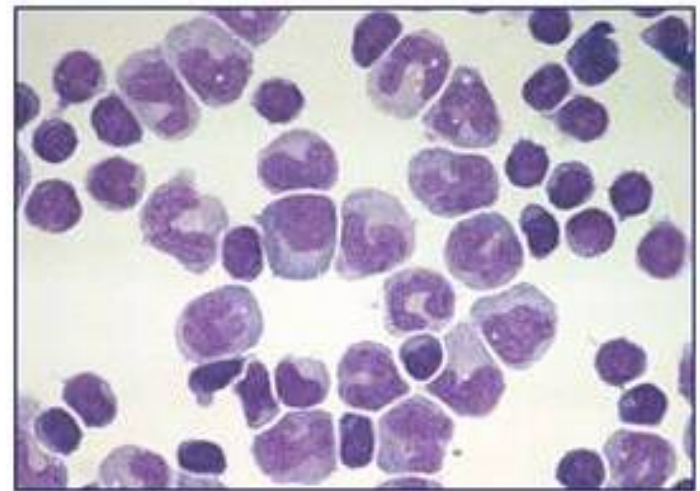
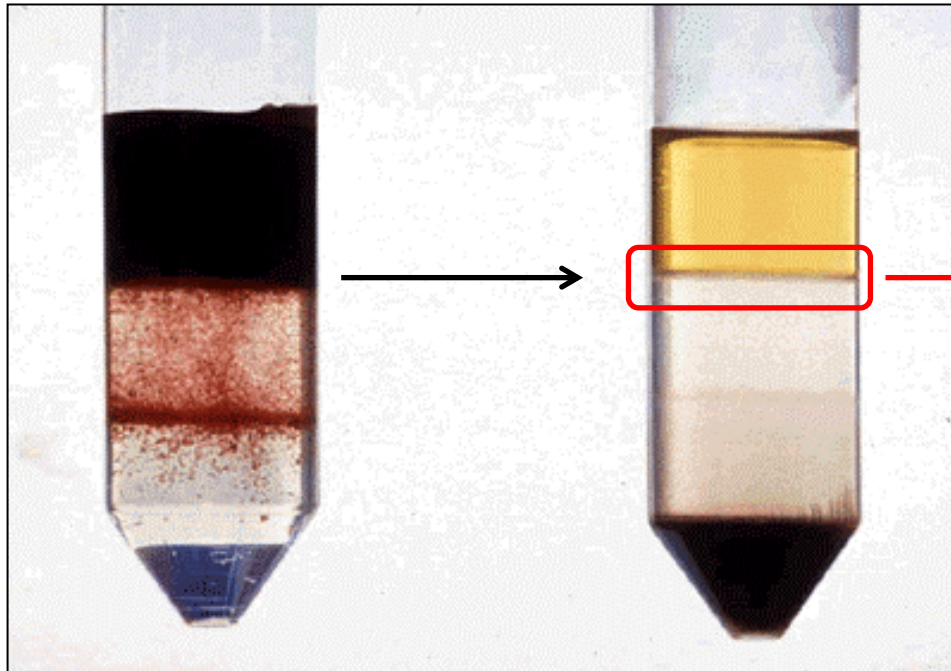
Közönséges centrifugálás:



Ficoll-grádiens centrifugálás:



Ficoll-grádiens centrifugálás 2.



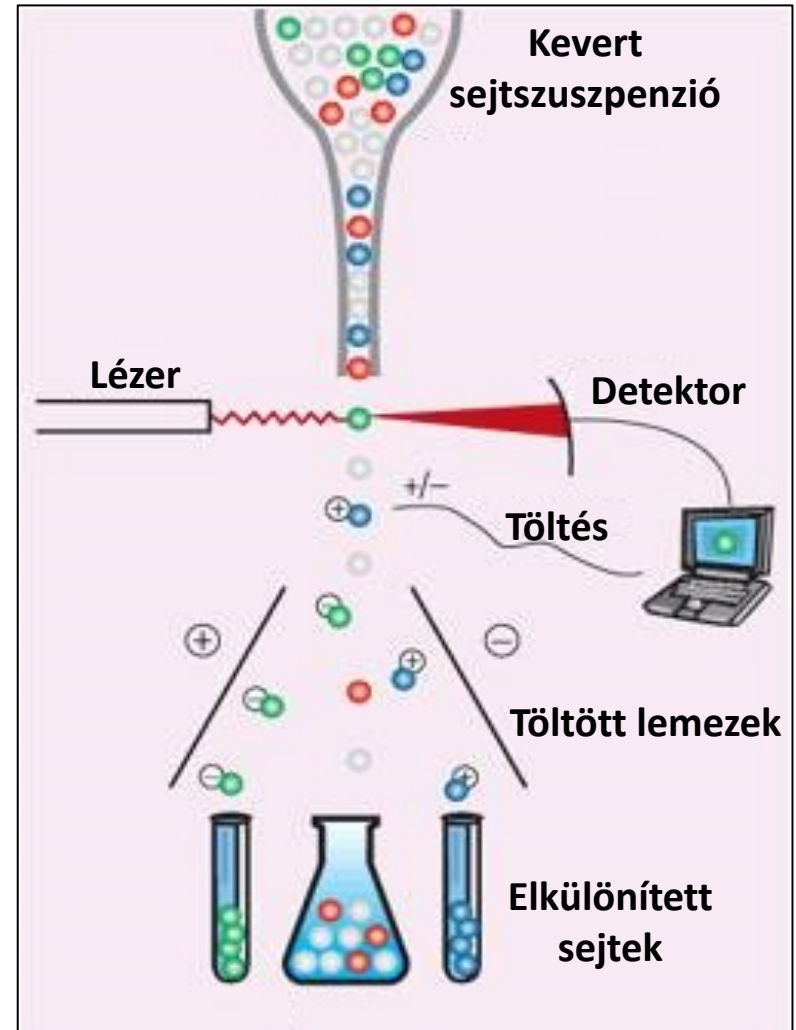
Perifériás vér mononukleáris sejtjei (**PBMC**, Peripheral blood mononuclear cells = nem-szegmentált magvú fehérvérsejtek): **Lymphocyták, monocyták** (és kis arányban basophil granulocyták)^[20.]

Szortolás

Szortolás: áramlási citometrián alapuló **sejtelválasztó technika**

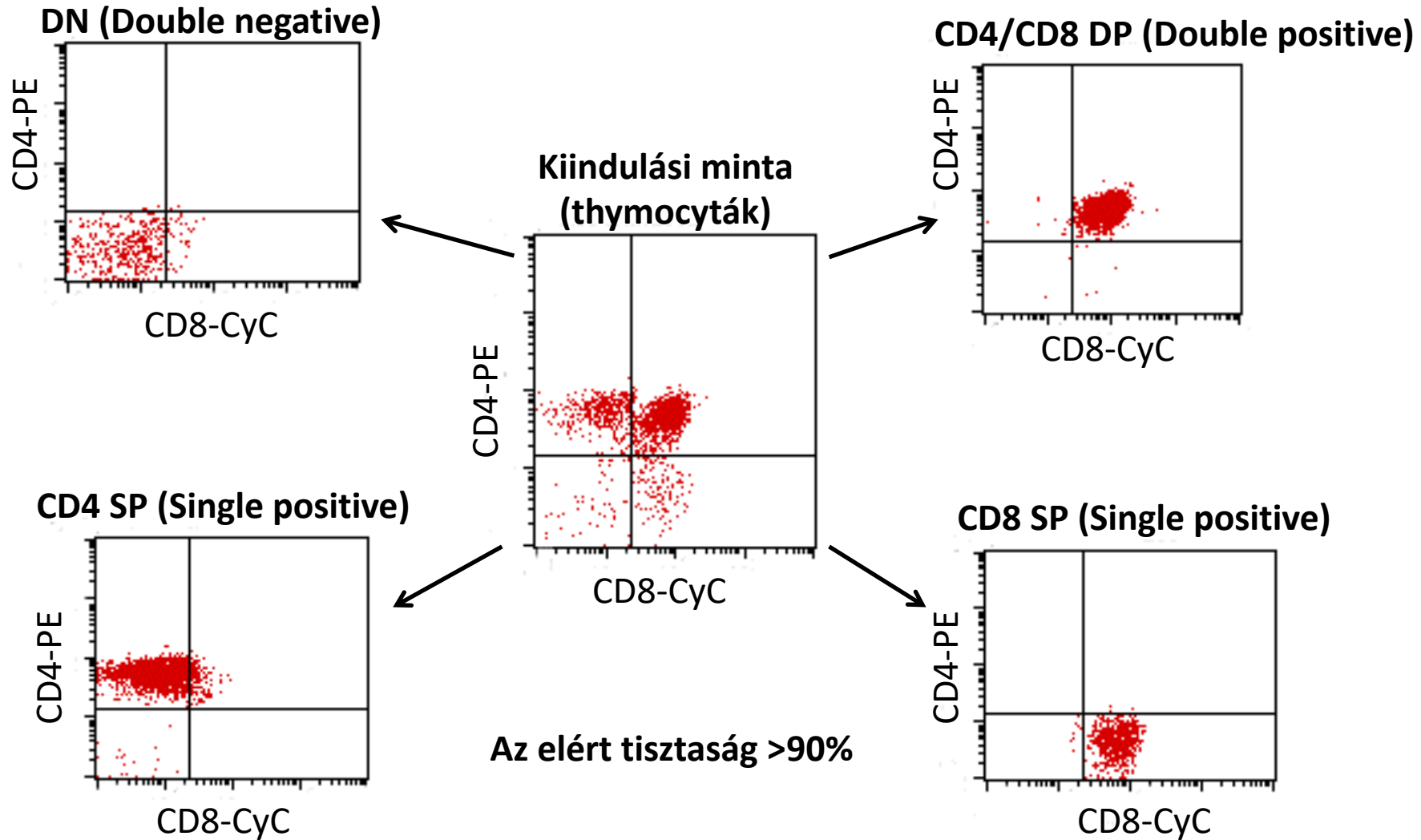
FACS: Fluoreszcencia-aktivált sejt szortálás
(Fluorescence activated cell sorting)

1. A sejtek egyesével egy-egy folyadékcseppbe kerülnek.
2. A fluoreszcensen jelölt sejt elhalad a lézer előtt, a szórt és az emittált fényt a detektorok mérik.
3. A cseppek a beállított paramétereiktől függően elektromos töltést kapnak.
4. A cseppeket eltérítik a pozitív és negatív töltéssel bíró lemezek.
5. A sejteket tartalmazó eltérített cseppek külön csövekbe kerülnek.



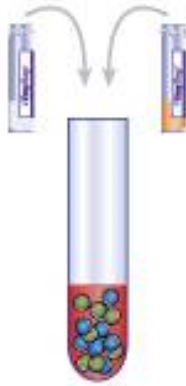
Az elkülönített sejtek életképesek és felhasználhatók

Szortolás egér thymusból



Immunomágneses sejtszeparálás (MACS)

1. Antitest keverék



2. Mágneses gyöngy

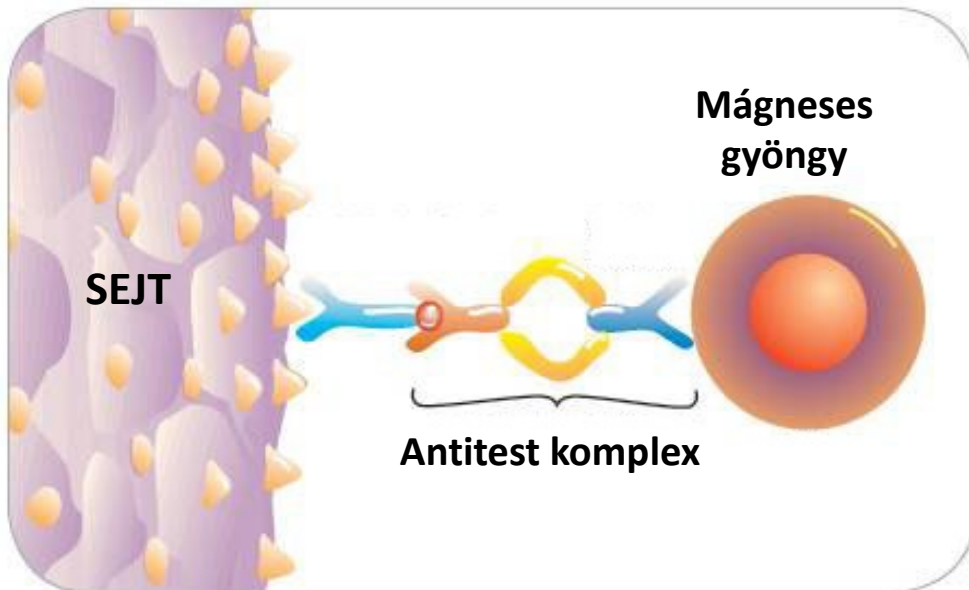
3. Inkubáció



5. Felülúszó leöntése

Pozitív szelekció: Csőhöz tapadt jelölt sejtek

Negatív szelekció: Felülúszóban lévő jelöletlen sejtek



A Stemcell Technologies™
EasySep™ mágnesese.

Hivatkozások 1.

1. Pellicciari C¹: **Histochemistry as an irreplaceable approach for investigating functional cytology and histology.** *Eur J Histochem.* 2013 Dec 19;57(4):e41. doi: 10.4081/ejh.2013.e41.
2. Chen X¹, Cho DB, Yang PC: **Double staining immunohistochemistry.** *N Am J Med Sci.* 2010 May;2(5):241-5. doi: 10.4297/najms.2010.2241.
3. Bratthauer GL¹: **The avidin-biotin complex (ABC) method and other avidin-biotin binding methods.** *Methods Mol Biol.* 2010;588:257-70. doi: 10.1007/978-1-59745-324-0_26.
4. Bratthauer GL¹: **The peroxidase-antiperoxidase (PAP) method and other all-immunologic detection methods.** *Methods Mol Biol.* 2010;588:243-55. doi: 10.1007/978-1-59745-324-0_25.
5. Liu G¹, Amin S, Okuhama NN, Liao G, Mingle LA: **A quantitative evaluation of peroxidase inhibitors for tyramide signal amplification mediated cytochemistry and histochemistry.** *Histochem Cell Biol.* 2006 Aug;126(2):283-91. Epub 2006 Mar 1.
6. Li CY¹, Ziesmer SC, Lazcano-Villareal O: **Use of azide and hydrogen peroxide as an inhibitor for endogenous peroxidase in the immunoperoxidase method.** *J Histochem Cytochem.* 1987 Dec;35(12):1457-60.
7. Buchwalow I¹, Samoilova V, Boecker W, Tiemann M: **Non-specific binding of antibodies in immunohistochemistry: fallacies and facts.** *Sci Rep.* 2011;1:28. doi: 10.1038/srep00028. Epub 2011 Jul 1.
8. Figueroa-Magalhães MC¹, Jelovac D¹, Connolly RM¹, Wolff AC²: **Treatment of HER2-positive breast cancer.** *Breast.* 2014 Apr;23(2):128-36. doi: 10.1016/j.breast.2013.11.011. Epub 2013 Dec 19.
9. Abcam.com: **Perfect for immunohistochemistry (IHC): the third RabMAb[®] advantage** (<http://www.abcam.com/primary-antibodies/perfect-for-immunohistochemistry-ihc-the-third-rabmab-advantage>)
10. Sanderson MJ¹, Smith I², Parker I², Bootman MD³: **Fluorescence microscopy.** *Cold Spring Harb Protoc.* 2014 Oct 1;2014(10):pdb.top071795. doi: 10.1101/pdb.top071795.

Hivatkozások 2.

11. Nwaneshiudu A¹, Kuschal C, Sakamoto FH, Anderson RR, Schwarzenberger K, Young RC: **Introduction to confocal microscopy.** *J Invest Dermatol.* 2012 Dec;132(12):e3. doi: 10.1038/jid.2012.429.
12. Betzig E¹, et al.: **Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution.** *Science.* 2006 Sep 15;313(5793):1642-5. Epub 2006 Aug 10.
13. MacDonald L¹, Baldini G, Storrie B: **Does super-resolution fluorescence microscopy obsolete previous microscopic approaches to protein co-localization?** *Methods Mol Biol.* 2015;1270:255-75. doi: 10.1007/978-1-4939-2309-0_19.
14. NoblePrize.org: **The Nobel Prize in Chemistry 2014**
(http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2014/)

Hivatkozások 3.

1. BD Biosciences: **BD FACSCanto II** (https://www.bdbiosciences.com/documents/facscanto_techsspecs.pdf)
2. McCoy JP Jr¹: **Basic principles of flow cytometry.** *Hematol Oncol Clin North Am.* 2002 Apr;16(2):229-43.
3. BD Biosciences: **BD FACSCalibur** (https://www.bdbiosciences.com/documents/facscalibur_brochure.pdf)
4. Addison EG¹, North J, Bakhsh I, Marden C, Haq S, Al-Sarraj S, Malayeri R, Wickremasinghe RG, Davies JK, Lowdell MW: **Ligation of CD8alpha on human natural killer cells prevents activation-induced apoptosis and enhances cytolytic activity.** *Immunology.* 2005 Nov;116(3):354-61.
5. Campbell JP¹, Guy K, Cosgrove C, Florida-James GD, Simpson RJ: **Total lymphocyte CD8 expression is not a reliable marker of cytotoxic T-cell populations in human peripheral blood following an acute bout of high-intensity exercise.** *Brain Behav Immun.* 2008 Mar;22(3):375-80. Epub 2007 Oct 18.
6. Altin JG¹, Sloan EK: **The role of CD45 and CD45-associated molecules in T cell activation.** *Immunol Cell Biol.* 1997 Oct;75(5):430-45.
7. Létourneau S¹, Krieg C, Pantaleo G, Boyman O: **IL-2- and CD25-dependent immunoregulatory mechanisms in the homeostasis of T-cell subsets.** *J Allergy Clin Immunol.* 2009 Apr;123(4):758-62. doi: 10.1016/j.jaci.2009.02.011.
8. Craig FE¹, Foon KA: **Flow cytometric immunophenotyping for hematologic neoplasms.** *Blood.* 2008 Apr 15;111(8):3941-67. doi: 10.1182/blood-2007-11-120535. Epub 2008 Jan 15.
9. Virgo PF¹, Gibbs GJ: **Flow cytometry in clinical pathology.** *Ann Clin Biochem.* 2012 Jan;49(Pt 1):17-28. doi: 10.1258/acb.2011.011128. Epub 2011 Oct 25.
10. O'Gorman MR¹, Zollett J, Bensen N: **Flow cytometry assays in primary immunodeficiency diseases.** *Methods Mol Biol.* 2011;699:317-35. doi: 10.1007/978-1-61737-950-5_15.

Hivatkozások 4.

11. Maguire O¹, Tario JD Jr, Shanahan TC, Wallace PK, Minderman H: **Flow cytometry and solid organ transplantation: a perfect match.** *Immunol Invest.* 2014;43(8):756-74. doi: 10.3109/08820139.2014.910022.
12. Bray RA¹, Tarsitani C, Gebel HM, Lee JH: **Clinical cytometry and progress in HLA antibody detection.** *Methods Cell Biol.* 2011;103:285-310. doi: 10.1016/B978-0-12-385493-3.00012-7.
13. Darzynkiewicz Z¹, Halicka HD, Zhao H: **Analysis of cellular DNA content by flow and laser scanning cytometry.** *Adv Exp Med Biol.* 2010;676:137-47.
14. Lehmann AK¹, Sornes S, Halstensen A: **Phagocytosis: measurement by flow cytometry.** *J Immunol Methods.* 2000 Sep 21;243(1-2):229-42.
15. June CH¹, Abe R, Rabinovitch PS: **Measurement of intracellular calcium ions by flow cytometry.** *Curr Protoc Cytom.* 2001 May;Chapter 9:Unit 9.8. doi: 10.1002/0471142956.cy0908s02.
16. Morgan E¹, et al.: **Cytometric bead array: a multiplexed assay platform with applications in various areas of biology.** *Clin Immunol.* 2004 Mar;110(3):252-66.
17. Tomlinson MJ¹, Tomlinson S, Yang XB, Kirkham J: **Cell separation: Terminology and practical considerations.** *J Tissue Eng.* 2013;4:2041731412472690. doi: 10.1177/2041731412472690. Epub 2012 Dec 28.
18. Ashraf Tabll¹ and Hisham Ismail^{2,3}: **The Use of Flow Cytometric DNA Ploidy Analysis of Liver Biopsies in Liver Cirrhosis and Hepatocellular Carcinoma** (<http://www.intechopen.com/books/liver-biopsy/the-use-of-flow-cytometric-dna-ploidy-analysis-of-liver-biopsies-in-liver-cirrhosis-and-hepatocellul>)
19. Fuss IJ¹, Kanof ME, Smith PD, Zola H: **Isolation of whole mononuclear cells from peripheral blood and cord blood.** *Curr Protoc Immunol.* 2009 Apr;Chapter 7:Unit7.1. doi: 10.1002/0471142735.im0701s85.
20. Mitre E¹, Taylor RT, Kubofcik J, Nutman TB: **Parasite antigen-driven basophils are a major source of IL-4 in human filarial infections.** *J Immunol.* 2004 Feb 15;172(4):2439-45.