

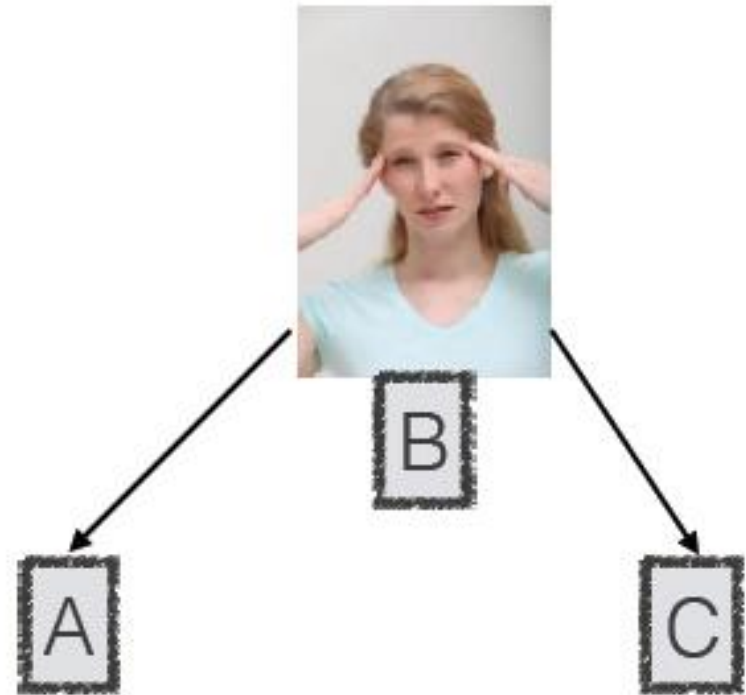
The logo for the TV show 'Dr. House M.D.' is centered on a dark, textured background. It features the word 'HOUSE' in a large, white, sans-serif font. The letter 'H' is enclosed in a white square frame. Below the letters 'O', 'U', and 'S' is a thin white horizontal line. To the right of this line, the letters 'M.D.' are written in a smaller, white, sans-serif font.

HOUSE M.D.

11. Dr. House. Biokémiai és
sejtbiológiai módszerek
alkalmazása az orvoslásban

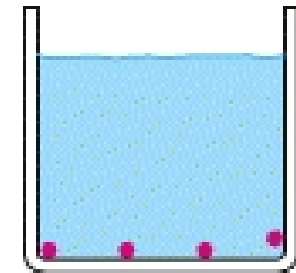
HIV fertőzés kimutatása - (fiktív) esettanulmány

- 35 éves nő, HIV fertőzöttség gyanúja. Két partner az elmúlt időszakban.
- Fertőzött-e a nő, ha igen, átadta-e a partnereinek?

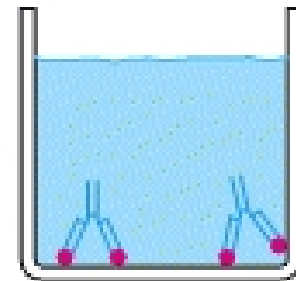


HIV fertőzés kimutatása - (esettanulmány)

- HIV ELISA - első és legalapvetőbb teszt a HIV fertőzés kimutatására
- Az edény alját HIV-antigénekkal borítják
- A szérumban különféle ellenanyagok találhatóak. Ha a páciens **HIV+**, akkor a **vérében a vírusra specifikus ellenanyag található**. Ez az ellenanyag hozzákötődik az edény alját borító Antigénhez.



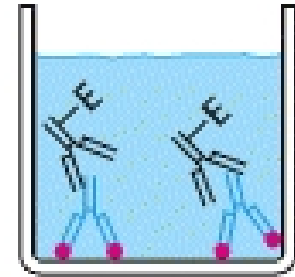
Antigen-coated well



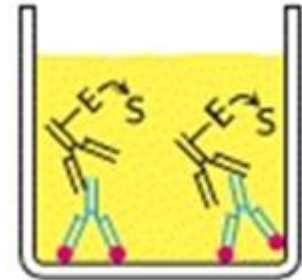
Specific antibody binds to antigen

HIV ELISA teszt

- A második ellenanyag enzimhez kötött.
- A hozzáadott szubsztrátból színes anyag keletkezését katalizálta. Így a vérben lévő ellenanyag-mennyiség arányában kapunk színes terméket.
- Érzékeny, reprodukálható, gyors, de nem 100% specifikus teszt, általában 2-3 héttel a fertőzést követően alkalmazható



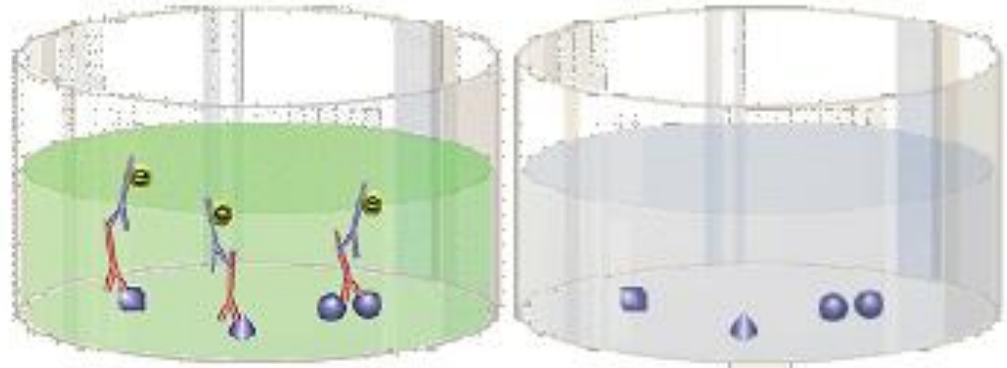
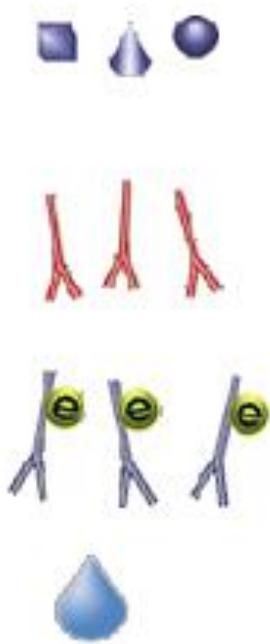
Enzyme-linked antibody binds to specific antibody



Substrate is added and converted by enzyme into colored product; the rate of color formation is proportional to the amount of specific antibody

HIV ELISA teszt

Pozitív Negatív
ELISA teszt

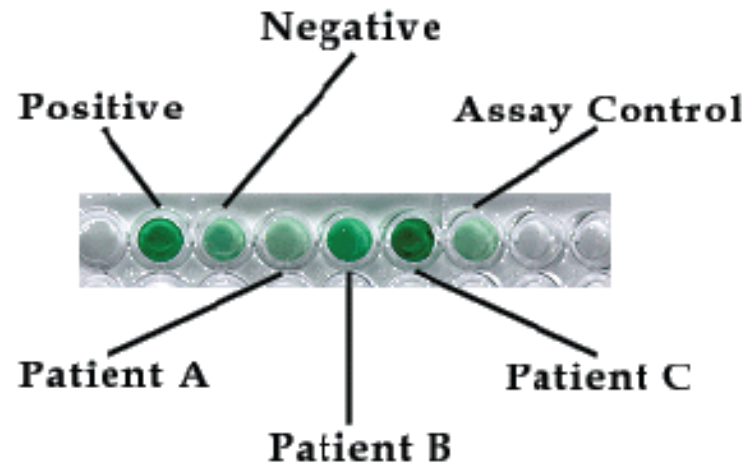


HIV ELISA teszt

- **Álpozitív teszt:** előfordulhat, hogy a teszt pozitív annak ellenére, hogy nincsen HIV fertőzés. Általában HLA (Human Leukocyte Antigen) antigének elleni ellenanyagot hordozó, többször szült nőknél fordulhat elő, a HIV ugyanis magába építheti ezen antigéneket, amikor lefűződik egy sejtről
- **Álnegatív teszt:** negatív a HIV fertőzés ellenére. Akkor fordul elő, amikor a fertőzés és az ellenanyag-válasz megjelenése közötti ablakperiódusban történik a vizsgálat.

HIV ELISA teszt

- $A = 0,300$ alatt negatív, $0,300 - 0,499$ közt meg kell ismételni a tesztet; $0,500$ felett pozitív
- Ha a teszt pozitív, megismétlik, majd megerősítésként Western blotot csinálnak
- Fertőzött-e A, B és C?



Positive ct.	Negative ct	Patient A	Patient B	Patient C	Assay ct
1.689	0.153	0.055	0.412	1.999	0.123

Kérdések

- Mit mér az ELISA?
 - A. HIV ellenanyagot
 - B. HIV antigént
 - C. Szabad, vérben keringő vírust
 - D. HLA elleni ellenanyagot

Kérdések

- Mi történne, ha a szérum hozzáadása kimaradna, de az összes többi lépés rendben menne?
 - A. A második ellenanyag nem kötődne
 - B. A második ellenanyag specifikusan kötődne
 - C. A leolvasott értékek az assay control értékéhez lennének közel
 - D. A és C

Kérdések

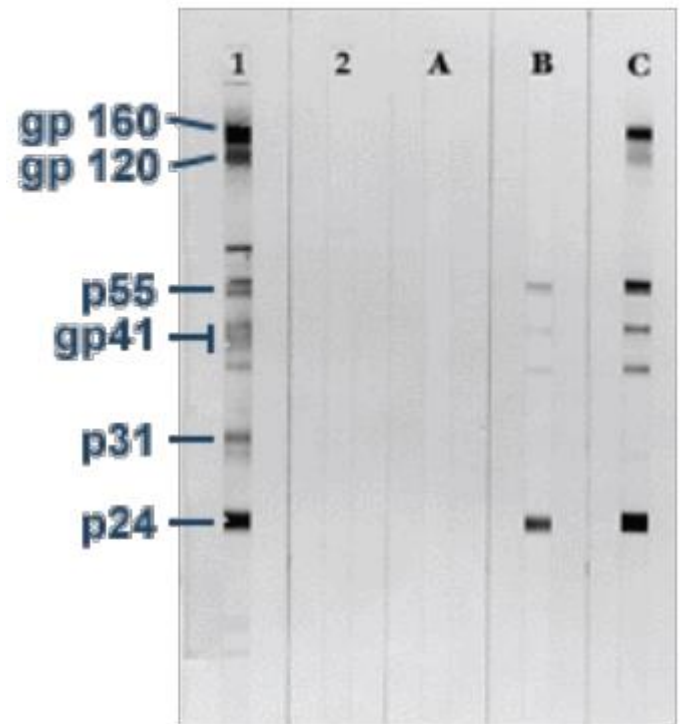
- Mi történne, ha a második ellenanyagot nem mosnánk ki?
 - A. A színreakció nem jönne létre
 - B. Semmi, a teszt megfelelően sikerülne
 - C. Minden minta egyformán magas értéket mutatna köszönhetően a feleslegben ott maradt második ellenanyagoknak.
 - D. A és B

HIV Western Blot

- Láthatóvá teszi az egyes vírusproteinek elleni ellenanyagot
- HIV fertőzött sejtekből készült fehérjekivonatot futtatják, blottolják, majd első ellenanyag gyanánt az egyes páciensek szérumát használják. A második ellenanyag enzim-jelölt anti-humán ellenanyag volt.
- Specifikus, ám hosszadalmas, nem kvantitatív
- ELISA megerősítésére használják

HIV Western Blot

- Poztív teszt kritériumai
- Nincs csík: **Negatív**
- p31 vagy p24 ÉS gp160 vagy gp120 csíkok: **Pozitív**
- Vannak csíkok, de a mintázat nem felel meg a fenti kritériumoknak: **Bizonytalan**
- Mi diagnózis, A, B és C esetében?



Band pattern Interpretation
Lane 1, HIV+ serum (positive control)
Lane 2, HIV- serum (negative control)
Lane A, Patient A
Lane B, Patient B
Lane C, Patient C

Kérdések

- Mit mér ez a Western blot?
 - Ⓐ HIV ellenanyagot
 - B. HIV antigént
 - C. Szabad, vérben keringő vírust
 - D. A fertőzött limfocitákban jelen lévő vírust

Kérdések

- Mihez kötődnek az elsődleges ellenanyagok variábilis (Fab) régiójának specifikus kötőhelyei?
 - A. HIV antigénekhez
 - B. Szubsztráthoz
 - C. Második ellenanyaghoz
 - D. A fentiek mindegyikéhez

Kérdések

- Általánosságban, a másodlagos ellenanyag mihez kötődik?
 - A. HIV proteinekhez
 - B. Anti-HIV elsődleges ellenanyaghoz
 - C. Bármely elsődleges ellenanyaghoz
 - D. Enzim konjugátumhoz

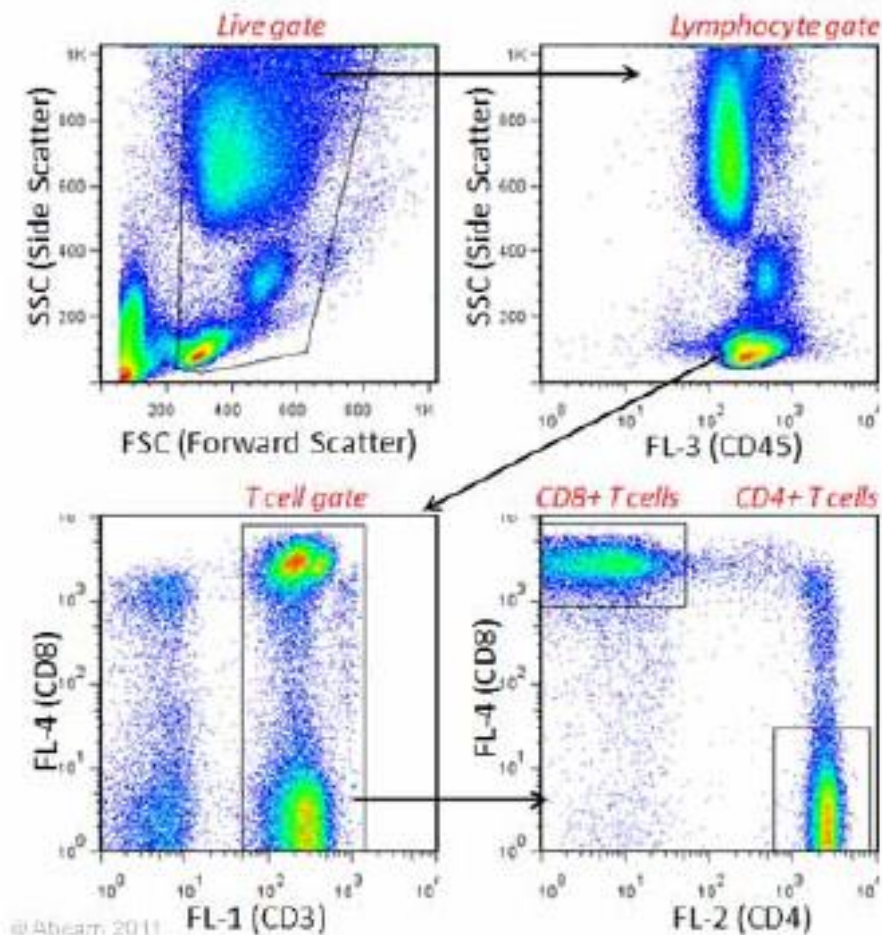
HIV vagy AIDS?

- AIDS: HIV fertőzés nyomán kialakuló szerzett immunhiányos betegség
- T-sejteket érinti
- Az összes T sejt száma, és a CD4+ T sejtek száma, valamint a CD4 (helper) / CD8 (killer) sejtek aránya lecsökken
- Mérés áramlási citometriával

	Normál	AIDS
T limfocita	> 1000	< 600
Teljes T sejt szám	> 60%	< 30%
Abszolút CD4+	> 600	< 200
CD4/CD8	0.9 - 1.9	< 1

HIV/AIDS - áramlási citometria

CD4/CD8 pozitív sejtek kiválogatása (kikapuzása)

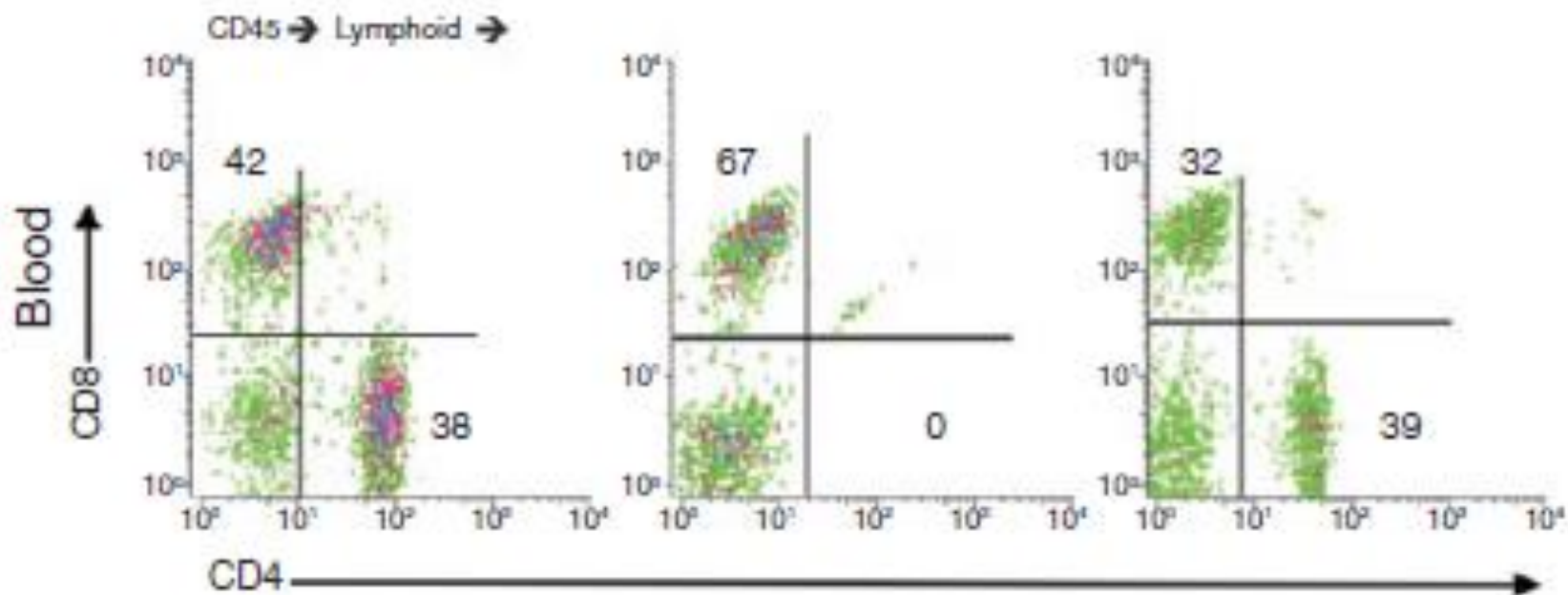


HIV/AIDS - áramlási citometria

negatív

C páciens

B páciens



Diagnózis

- A kérdéses személy, B páciens lehet, hogy HIV fertőzött, még nem egyértelmű
- Partnerét, A páciens nem fertőzte meg, ő HIV negatív
- C páciens fertőzött, sőt AIDS-es, valószínűleg ő fertőzte meg B-t

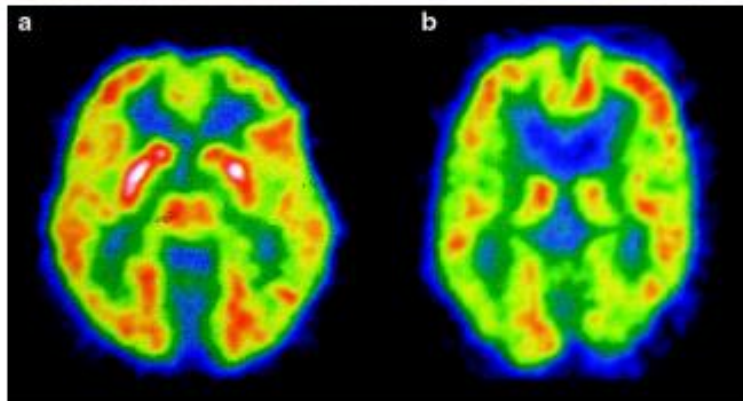
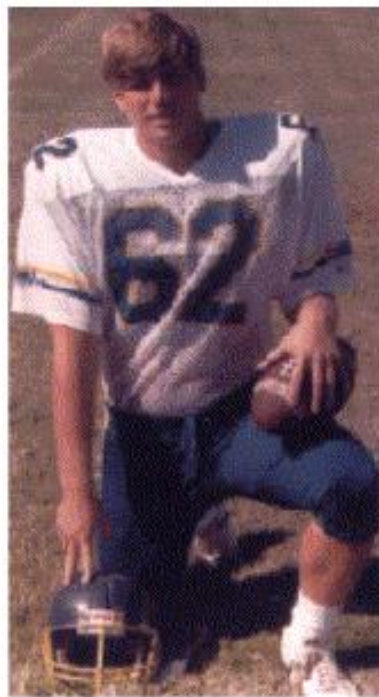
Huntington-kór

- Súlyos idegrendszeri betegség, 10-15 év teljes leépüléshez, végül halálhoz vezet
- Motoros (vitustánc), pszichológiai és értelmi tünetek
- Általában 40 éves kor körül jelentkezik
- Genetikai betegség. Dominánsan öröklődik, azaz egyetlen hibás kópia elég, hogy a betegség megjelenjen (a két allél közül elég, ha az egyik hibás)

Huntington-kór

- 100%-os a penetranciája, azaz ha valaki hordozza a hibás allélt, akkor a betegség mindenképpen megjelenik
- Mivel a tünetek ált. a reprodukciós életszakaszt követően jelentkeznek, a betegség már továbbadódik a következő generációra, mielőtt a páciens tudomást szerez érintettségéről (vö. R. Dawkins: Az önző gén c. művében a sikeres gén leírását)
- Nem gyógyítható.

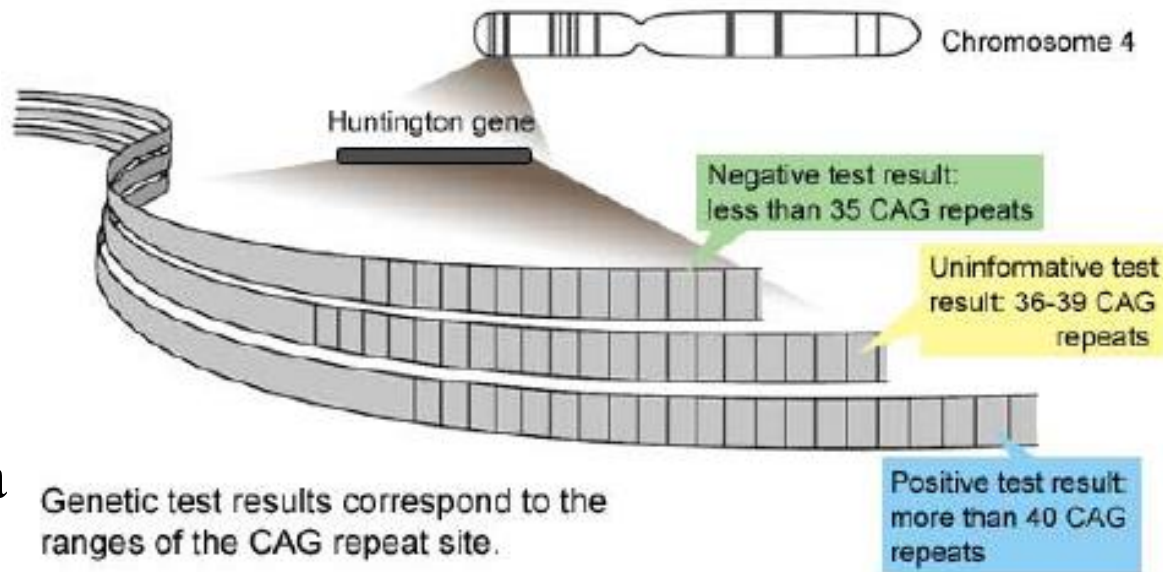
Huntington-kór



A Huntington-kór genetikai háttere

- Mikroszatellita trinukleotid (CAG) ismétlődés a huntington génben
- Az ismétlődés száma öröklődik, (sőt, generációról generációra növekedhet, ahogy a másoló mechanizmus hibát ejt a sok ismétlődés másolása közben)

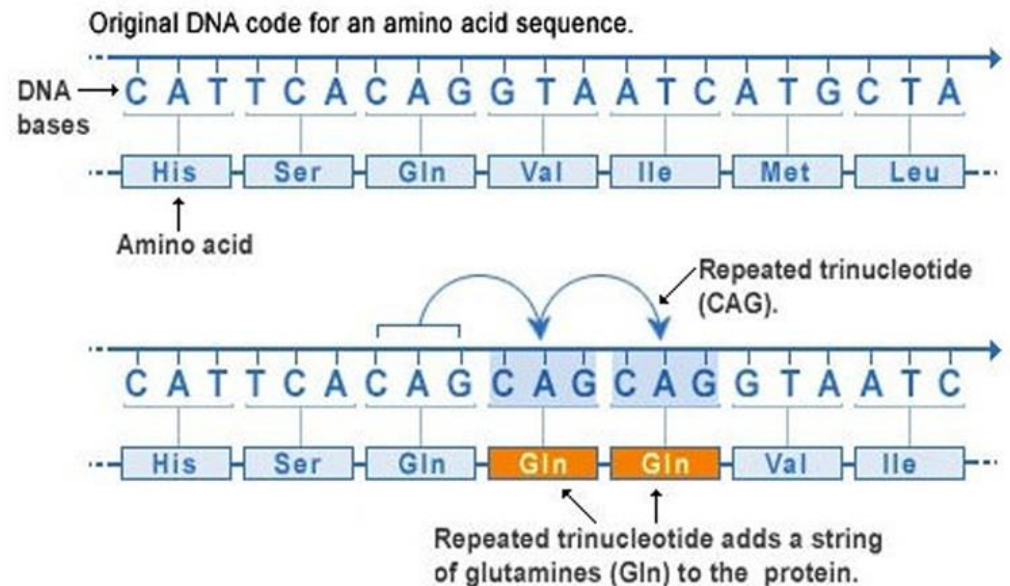
Figure S-3: CAG Repeat Counts on the Huntington gene



A Huntington-kór genetikai háttere

- A CAG vagy ugyanannyi, mint a szülőknél, vagy több
- Trinukleotid ismétlődési zavar

CAG repeat expansion in *HTT*



A Huntington-kór biokémiai okai

- A CAG ismétlődések száma okozza a bajt
- CAG glutamint kódol, így poliglutamin jön létre a fehérjében
- A poli-Gln a fehérjék aggregációjához, sejtbeni felhalmozódásához, működésképtelenséghez vezet
- A Huntington gén a neuronokban aktív, illetve ezen sejtek kapacitása az aggregátumok eltávolítására korlátozott, a betegség idegrendszeri tünetekkel jár
- Az aggregáció hosszú távon történik, ezért okoz kései tüneteket
- Minél több az ismétlődés, annál előbb és annál súlyosabban jelentkeznek a tünetek

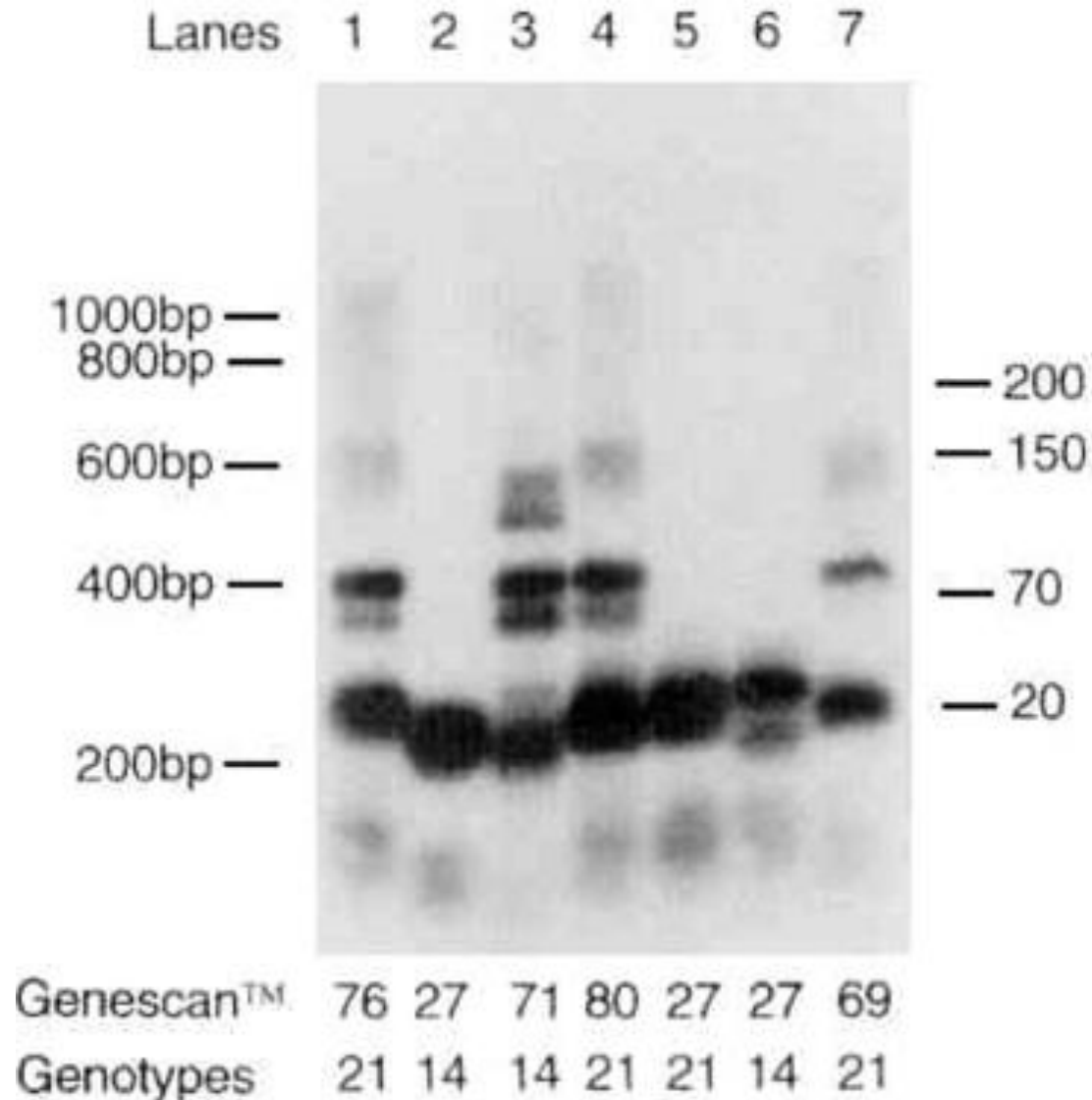
Huntington-kór genetikai analízise (esettanulmány)

- 28 éves apa felkeresi a genetikai szakrendelést, hogy megtudja, gyermekei örökölték-e a családjában előforduló Huntington betegséget. Ő maga azonban nem szeretné tudni, hogy érintett-e.
- Módszer: PCR (jelölt primer a HTT gén mellé)
+ restrikciós hasítás, gél elektroforézis

Huntington-kór genetikai analízise (esettanulmány)

- Jelölés: 1. Apa; 2. Anya; 3 -7. gyerekek
- A vizsgálat alapján melyik családtagok érintettek (> 40 ismétlődés)?
- Miért eltérő az ismétlődések száma az egyes családtagokban?

Huntington-kór genetikai analízise (esettanulmány)



Huntington-kór genetikai analízise (esettanulmány)

- Amennyiben az apa logikus gondolkodású, titokban maradhat-e előtte a saját státusza?
- Hogyan lehetséges, hogy az egyik gyereknek 27/14 az ismétlődés száma, annyi, mint az anyáé?

	<i>apa</i>	<i>anya</i>	<i>gyerekek</i>				
Genescan™	76	27	71	80	27	27	69
Genotypes	21	14	14	21	21	14	21

- Vizsga

-

- Időpontok: december 21, január 6, 13, 20, 27
- Helyszín: 060-as előadó, 10-12-ig
- Nyáron vizsgakurzus
- 25-ponttól kettes
- Eredmények: még aznap a neptunban
- Reklamáció: MTA-TTK, K5.04-es szoba (előtte nem árt e-mailen egyeztetni kele.peter@ttk.mta.hu)

(max. 50 pont)

I. Definíciók (20 pont)

epitóp, szemikonzervatív replikáció, allél, VNTR, restriktív endonukleáz, antiparalell, hiszton, Okazaki fragmens, degenerált kód, stop kodon;

II. Tesztkérdések (1 pont / válasz, 15 kérdés)

•A *Southern blott technikát*-k elválasztására használják

- | | |
|-------------|--|
| a. RNS | |
| b. mRNS | |
| c. DNS | |
| d. Fehérjék | |

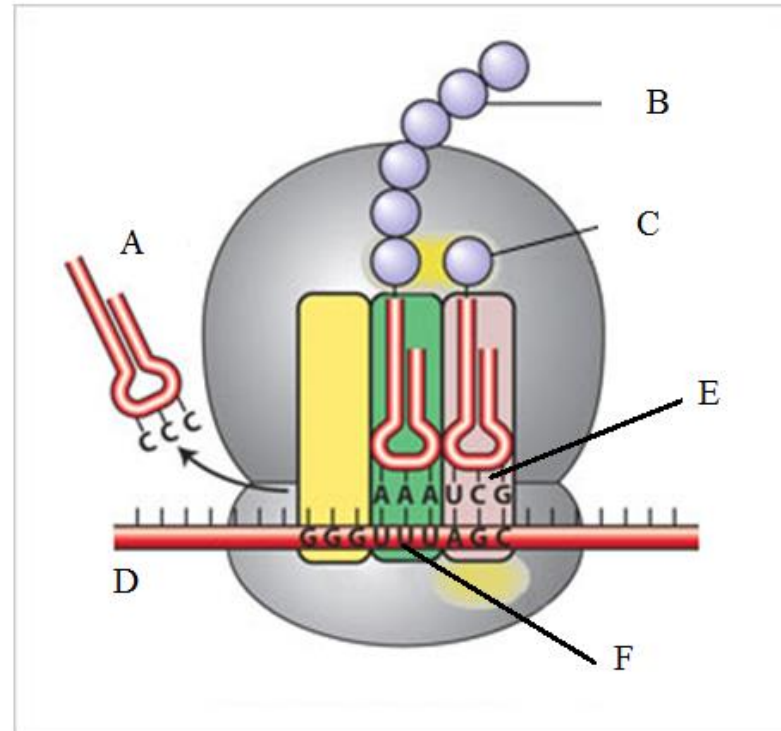
2. A *molecular beacon-ök segítségével pl.-t tudunk kimutatni*

- | | |
|------------------|--|
| a. Fehérjéket | |
| b. Cukrokat | |
| c. mRNS-eket | |
| d. Fluorofórokat | |
| e. Hisztonokat | |

3. Az *antitestek*

- | | |
|--|--|
| a. X-alakú nukleinsavak | |
| b. Y-alakú nukleinsavak | |
| c. Fc része kötődik az antigénekhez | |
| d. Fab része kötődik az antigénekhez | |
| e. Az immunrendszer H sejtjei termelik | |

III. Mit jelölnek az egyes betűk? (6 pont)



IV. Esszékérdés (9 pont)

Rekombináns DNS technika ismertetése (legfontosabb lépések, komponensek, szelekció, legalább egy példa)