

Grundlagen der Immunologie
5. Semester - Dienstags 11.15 Uhr
Ruhr-Universität Bochum, HMA 20



Diagnostik und Immundefizienzen

Albrecht Bufe

www.ruhr-uni-bochum.de/homeexpneu

Immundiagnostik

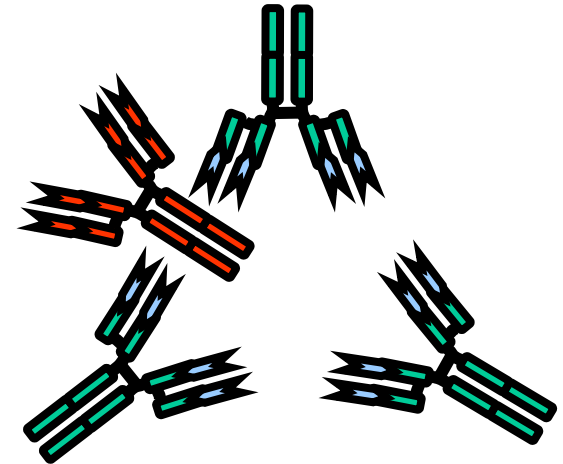
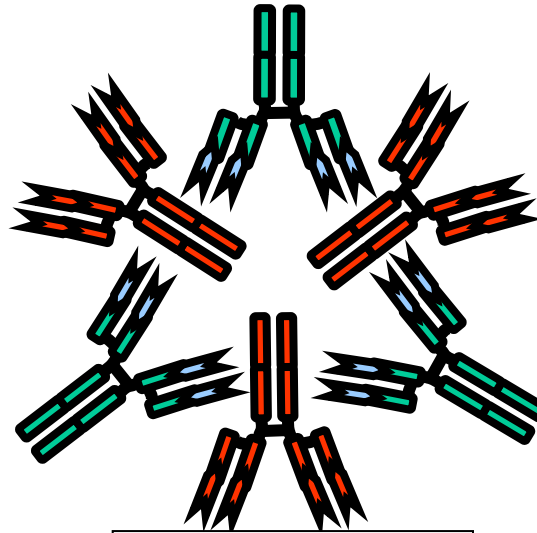
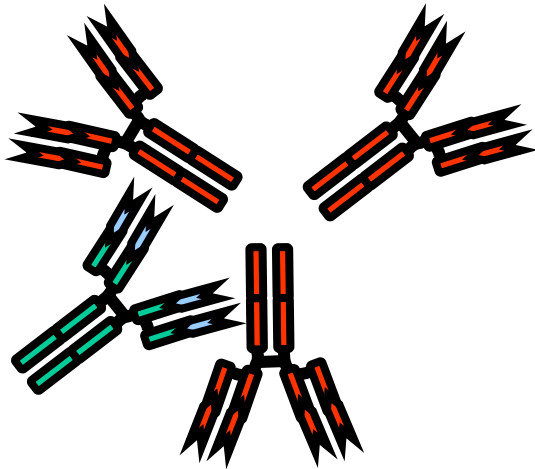
(Antikörper-/ Antigennachweis)

Antikörpernachweis: Nephelometrie

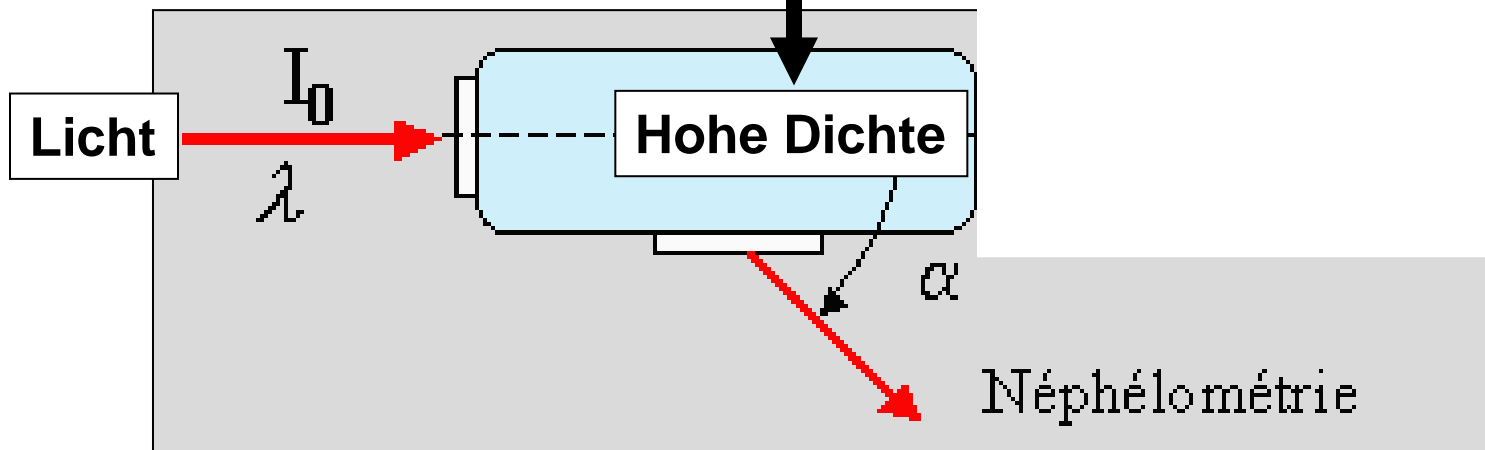
Antigenüberschuß

/ Äquivalenz /

Antikörperüberschuß

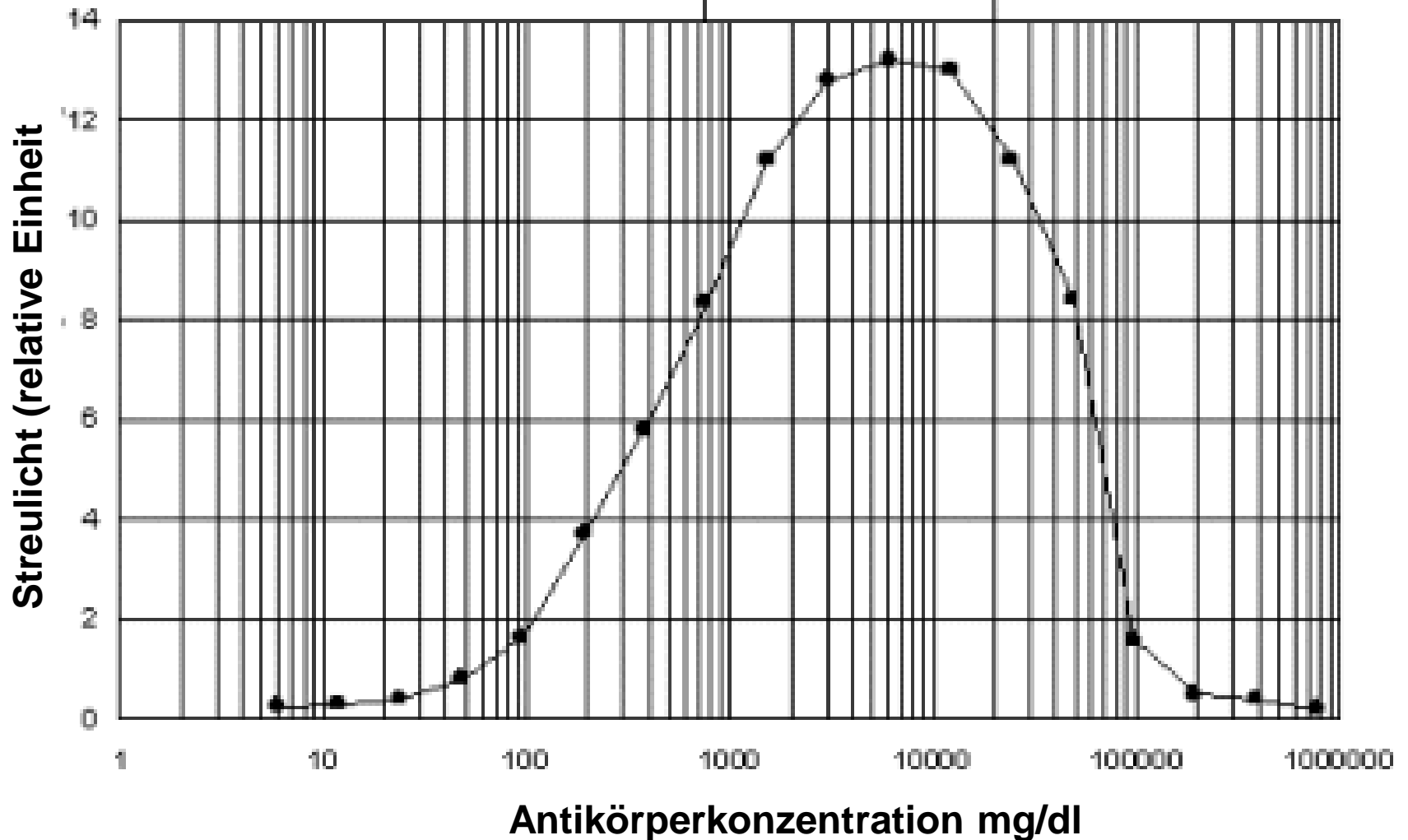


Präzipitation



Antikörpernachweis: Nephelometrie

Antigenüberschuß / Äquivalenz / Antikörperüberschuß



Quantifizierung von Gesamt-Ig-Antikörpern mittels ELISA (Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay)

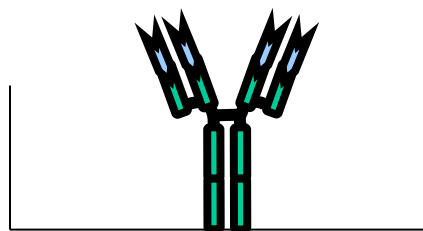
Substrat:

BCIP (5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat)

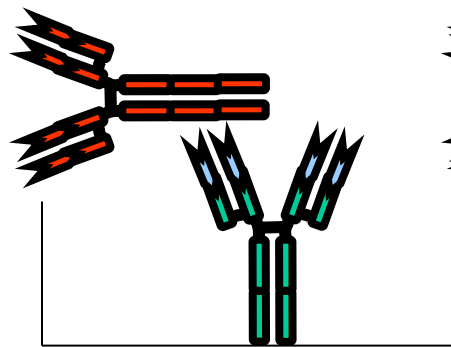
+

NBT (Nitroblau-Tetrazoliumchlorid)

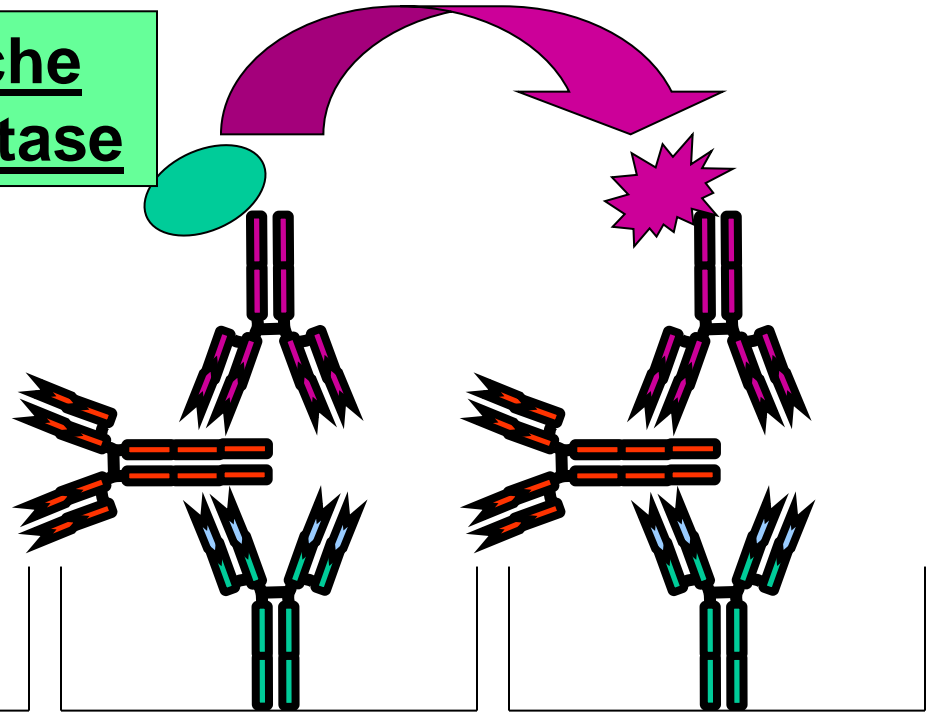
Alkalische
Phosphatase



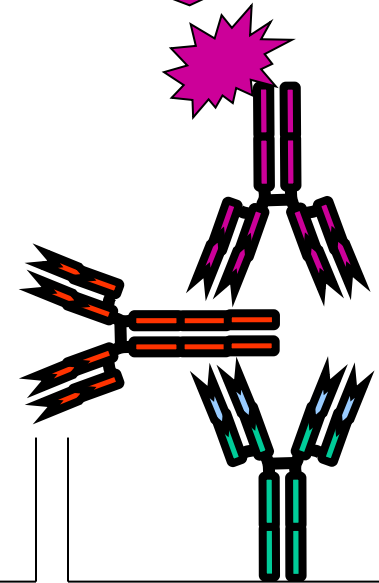
Capture-AK
(IgG-Anti-IgE)



+ Serum-IgE



+ Nachweis-AK
(IgG-Anti-IgE)



+ Substrat

Nachweis von spezifischen Ig-Antikörpern mittels ELISA

(Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay)

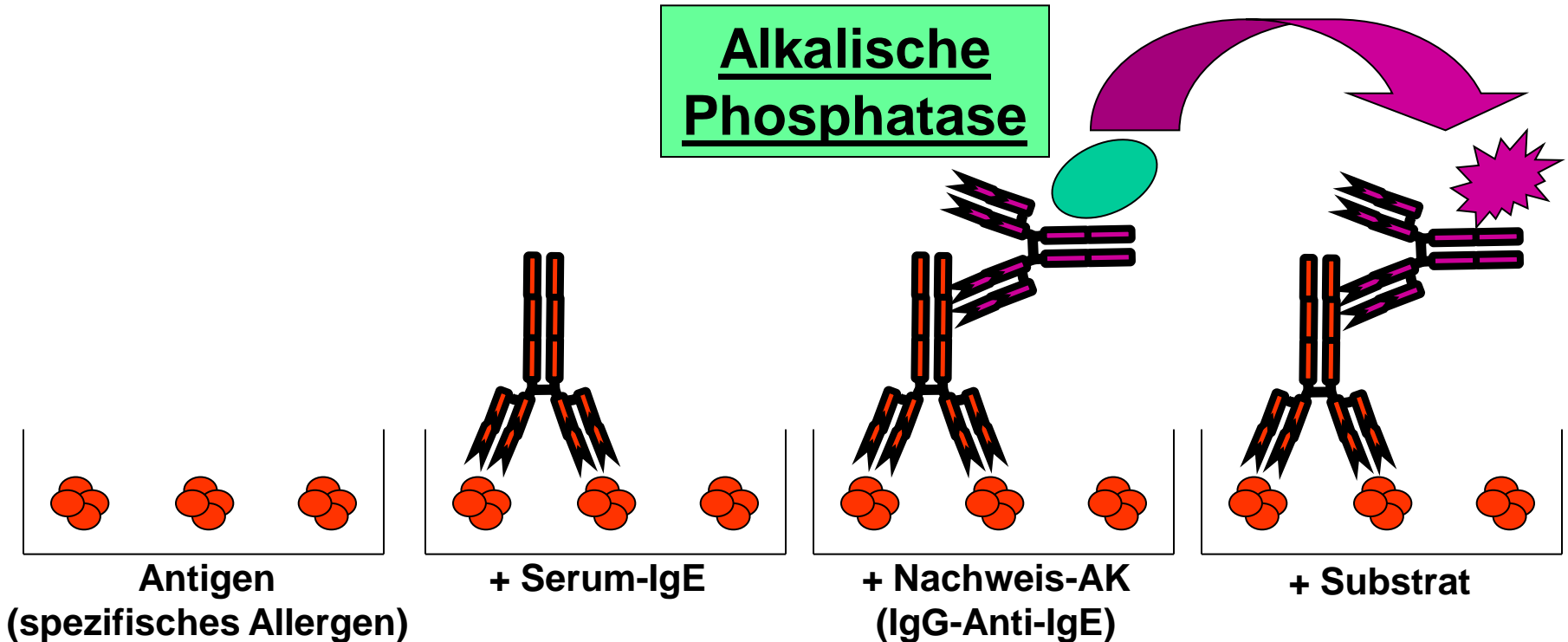
Substrat:

BCIP (5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat)

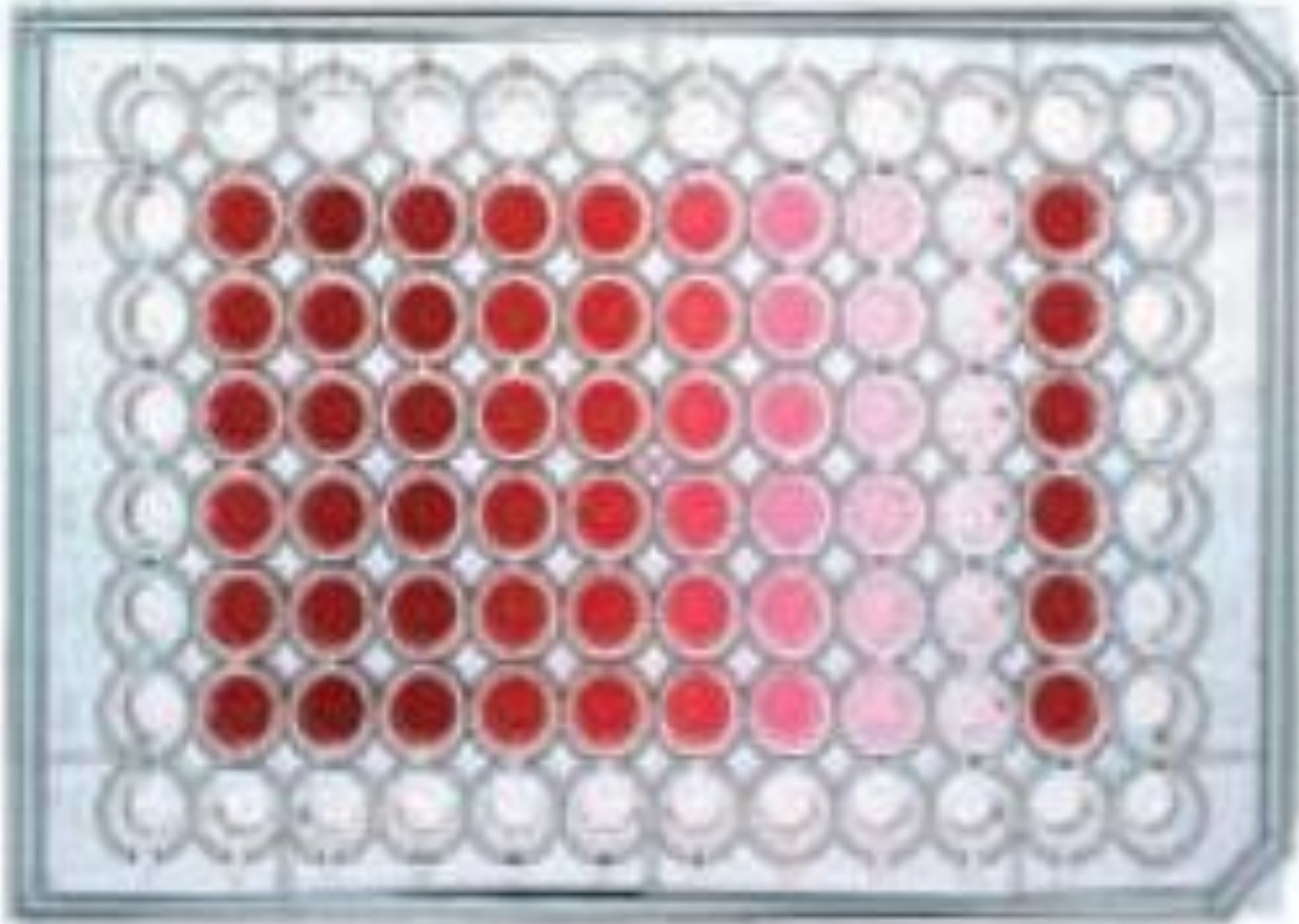
+

NBT (Nitroblau-Tetrazoliumchlorid)

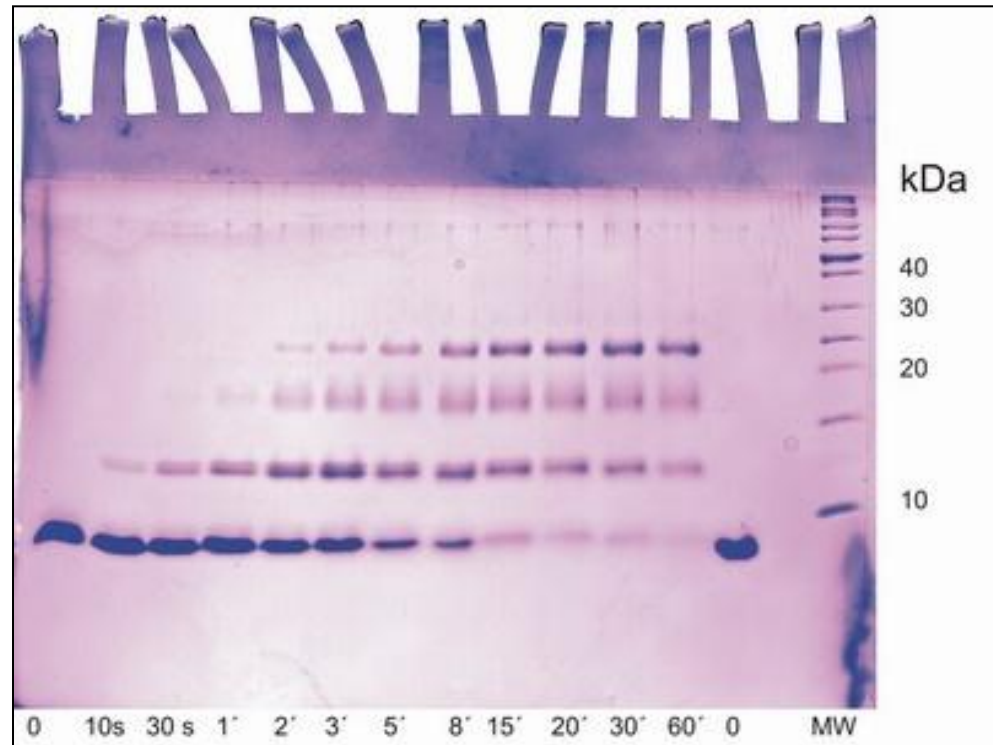
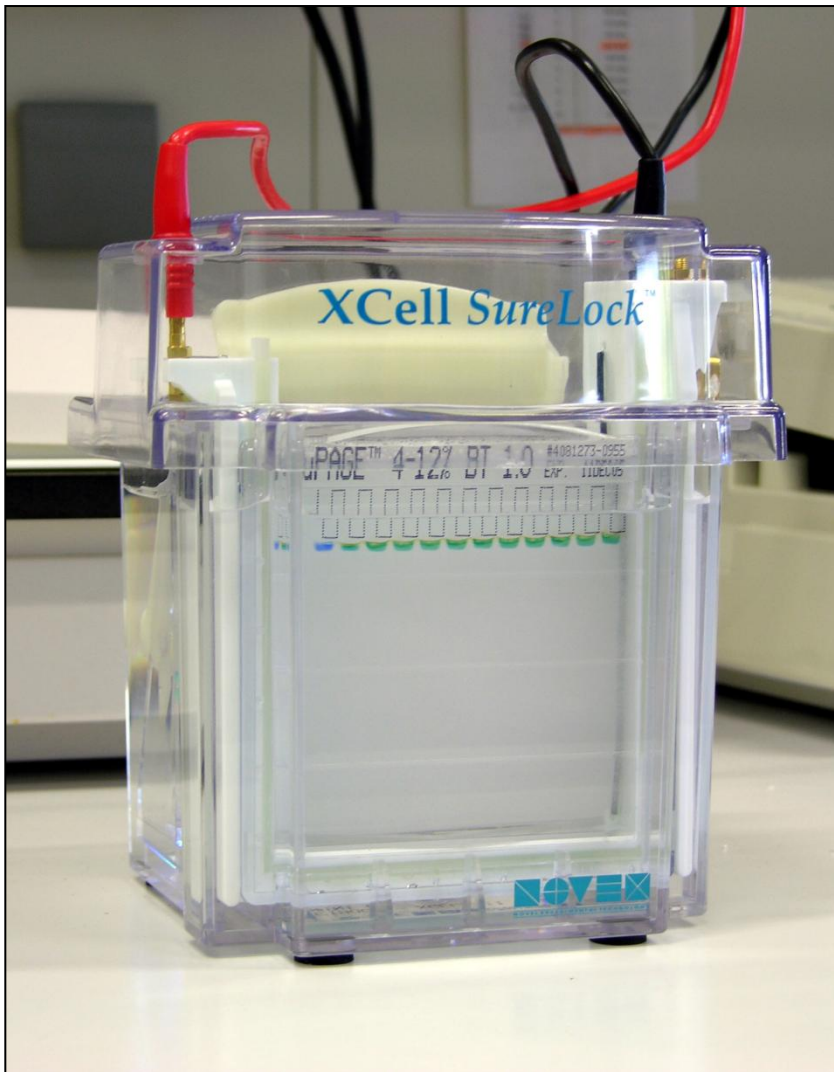
Alkalische Phosphatase



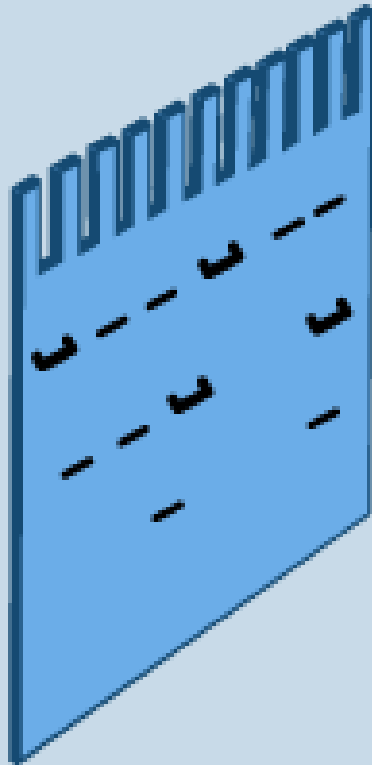
Quantifizierung des Substrats mittels Photometer



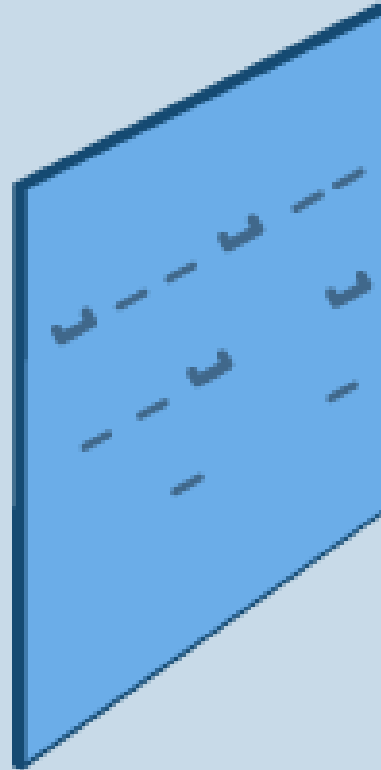
SDS-PAGE (Sodium-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamid Gel-Elektrophorese)



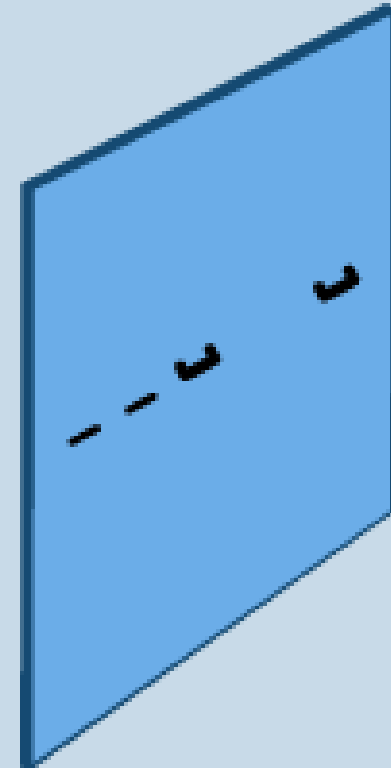
Western Blot (to blot = mit Löschpapier abtupfen)



**Gefärbtes
SDS-PAGE-Gel**

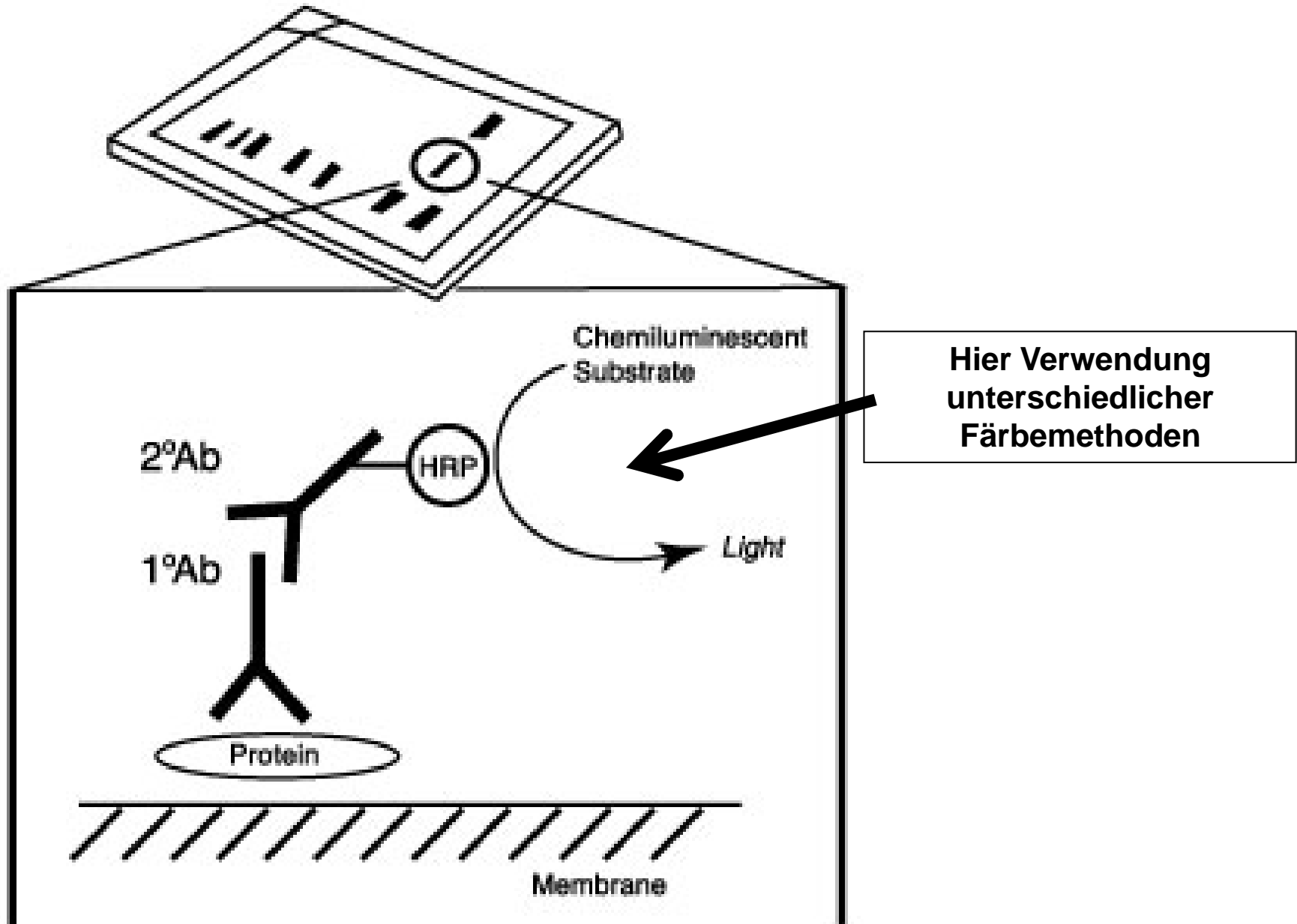


**Blot nach dem
Transfer der Proteine**



**Western Blot Banden,
mit einem spezifischen
Antikörper identifiziert**

Western Blot (spezifischer Nachweis eines Proteins mittels Antikörper)



Immundiagnostik

(Nachweis von spezifischen Zellen)

Antigendarstellung: Fluoreszenz

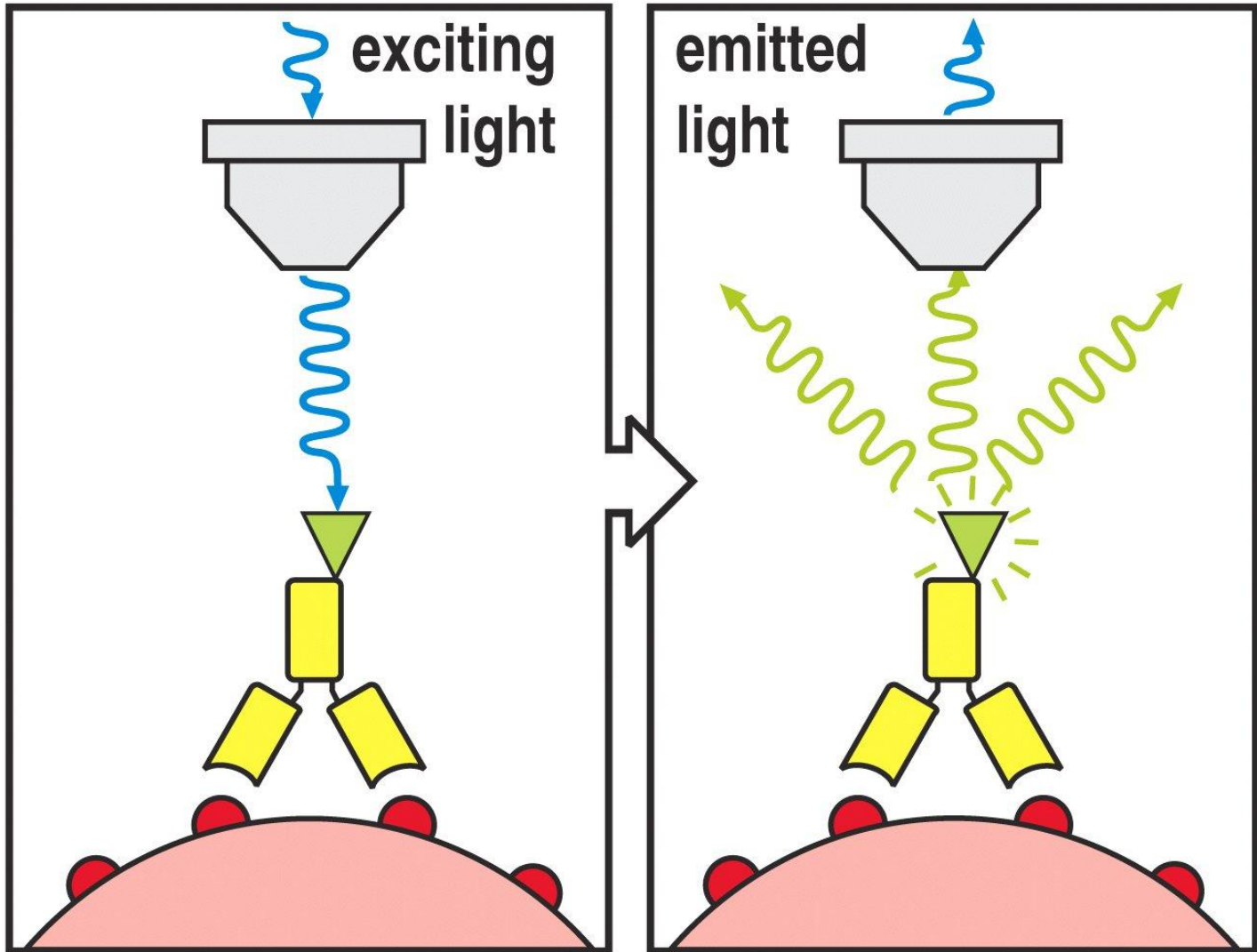
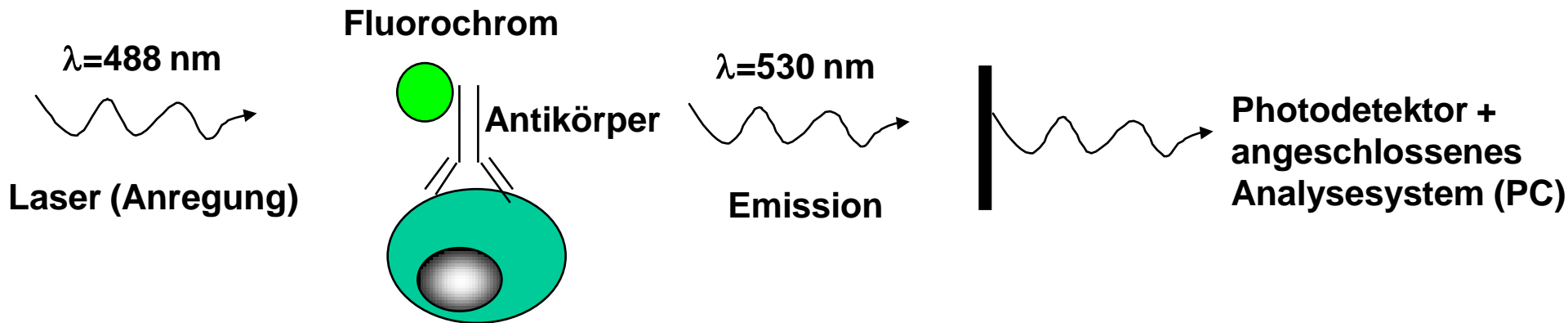


Figure A-17 part 1 of 2 Immunobiology, 6/e. (© Garland Science 2005)

Antigendarstellung: Fluoreszenz



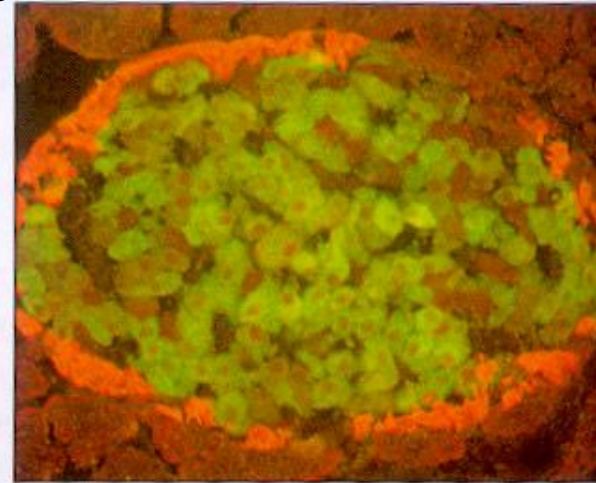
Häufig verwendete Fluorochrome	Anregung (nm)	Abstrahlung (nm)
R-Phycoerythrin (PE)	480; 565	578
Fluorescein	495	519
PerCP	490	675
Texas-Rot	589	615
Rhodamin	550	573

Antigendarstellung: Fluoreszenz

Medizinische Bedeutung:

Nachweis verschiedener Zelltypen in Suspension (**Differentialblutbild**) und **Gewebeschnitten** →

Langerhansschen Inseln im Pankreas)



α Zellen (**orange = Glutamin-Decarboxylase**)

β Zellen (**grün = Glucagon**)

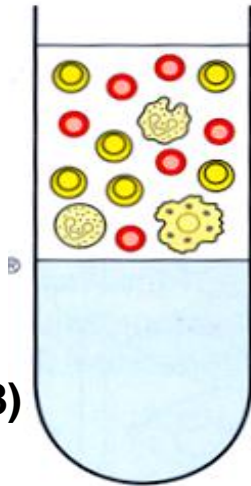
Immundiagnostik

**(Charakterisierung, Sortierung und
Präparation spezifischer Zellen)**

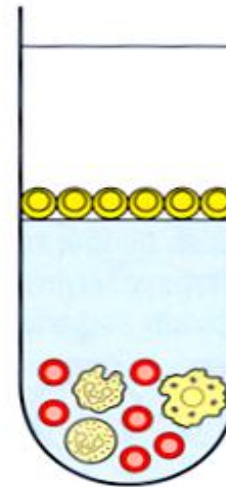
Zellsortierung: Mononukleäre Zellen mit Ficoll-Hypaque-Gradientenzentrifugation

verdünntes Blut

Ficoll
(Dichte = 1,078)



Zentrifugation

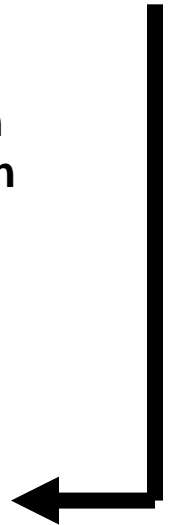
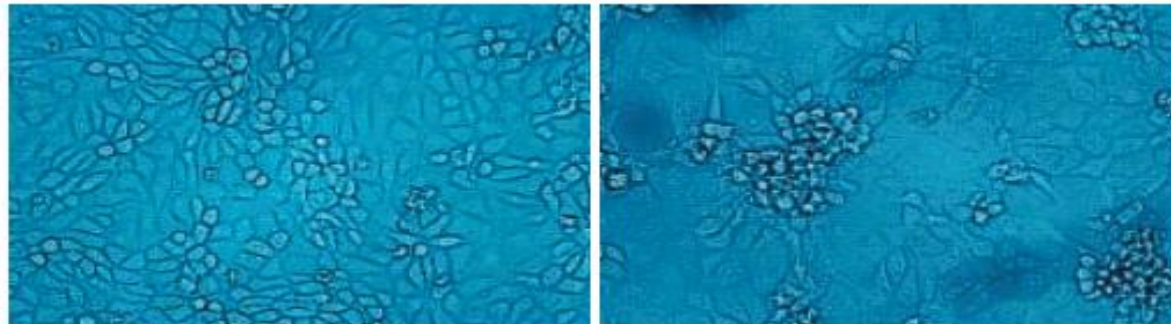


Thrombozyten

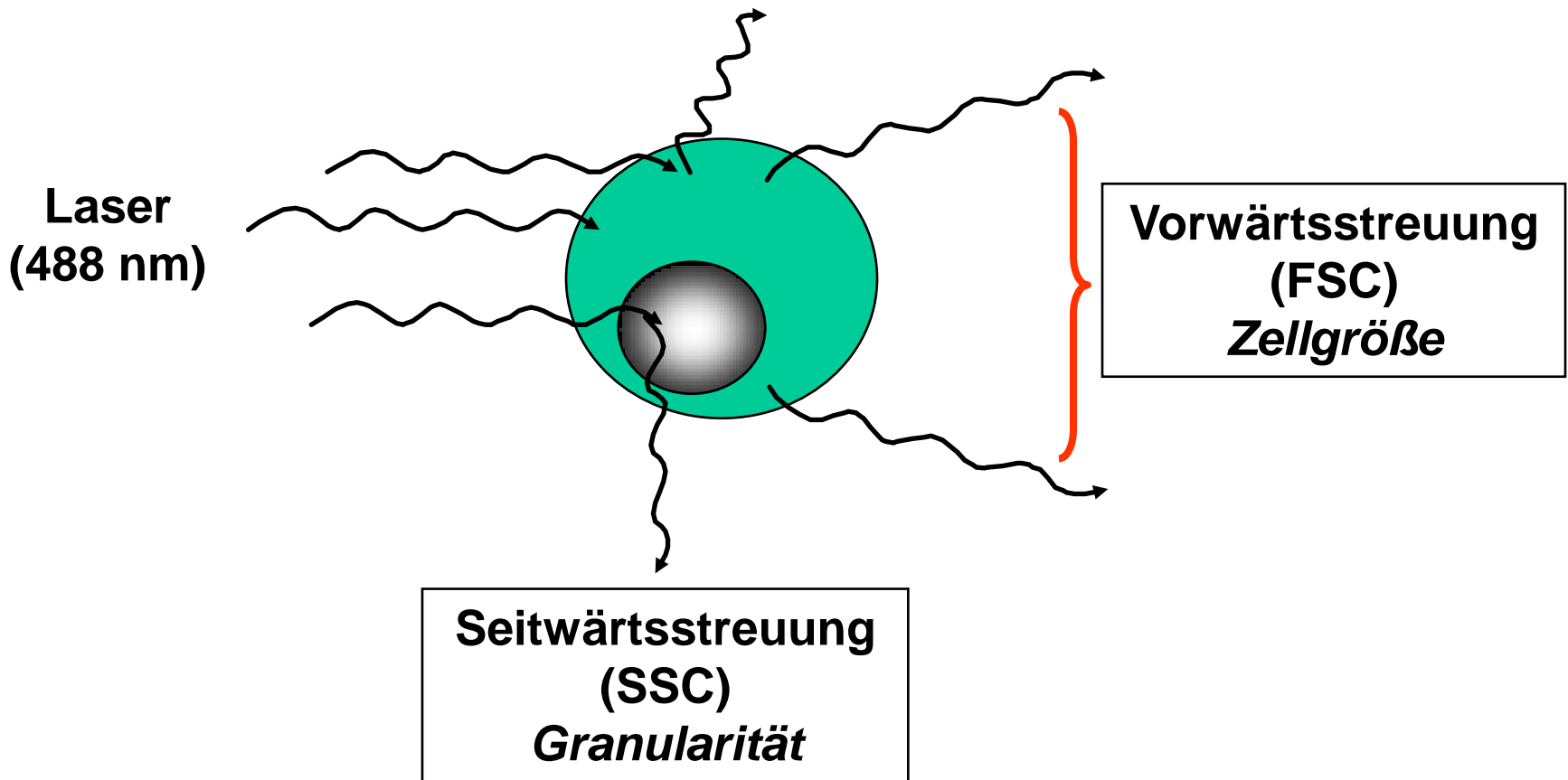
Mononukleäre Zellen
des peripheren Blutes
(PBMC)

Erythrozyten
Granulozyten

Zellkultur
in vitro



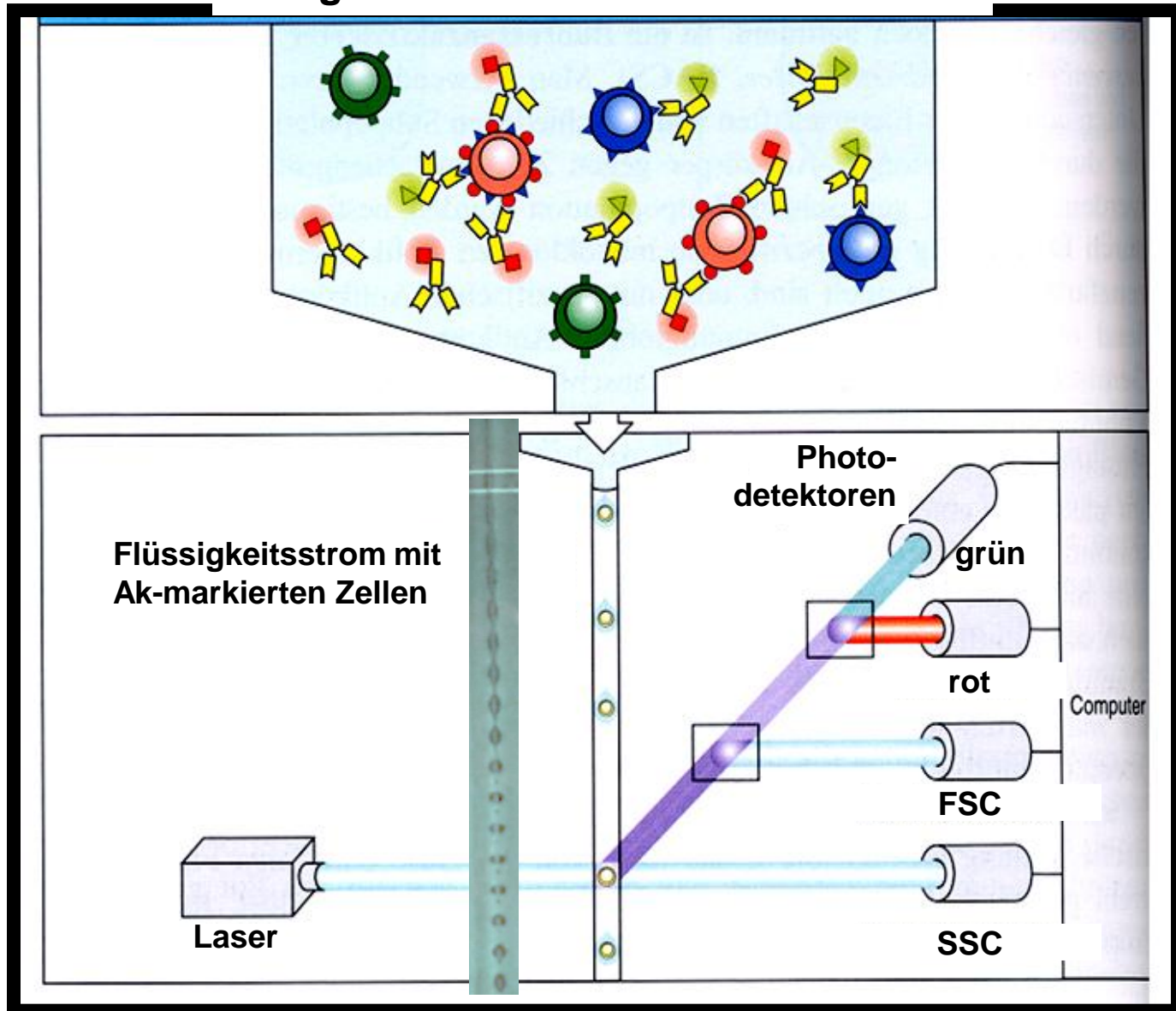
Zellanalysen: Durchflußzytometrie [Prinzip]



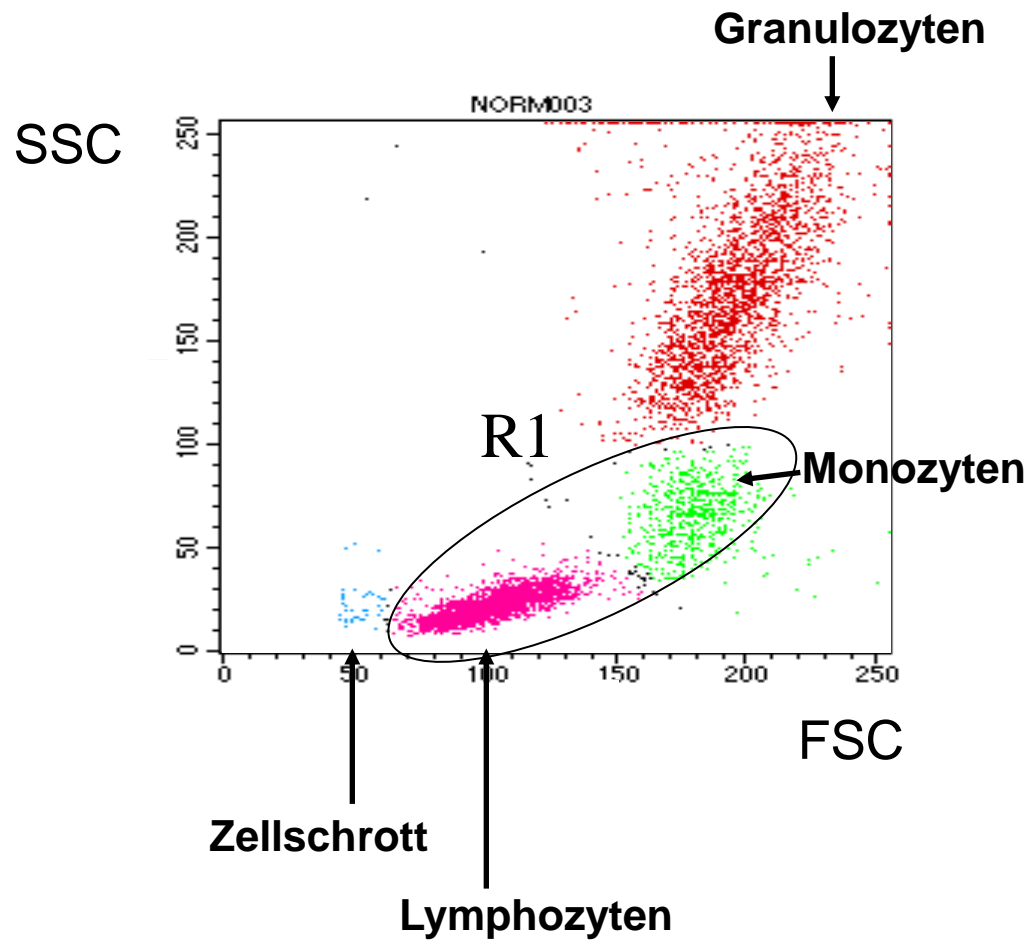
Zellanalysen: Durchflußzytometrie

(oder: Fluoreszenz assisted cell sorting = FACS)

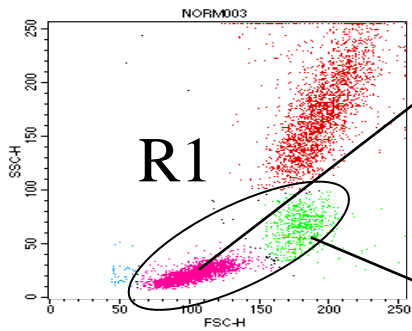
Zellgemisch mit fluoreszierenden Ak



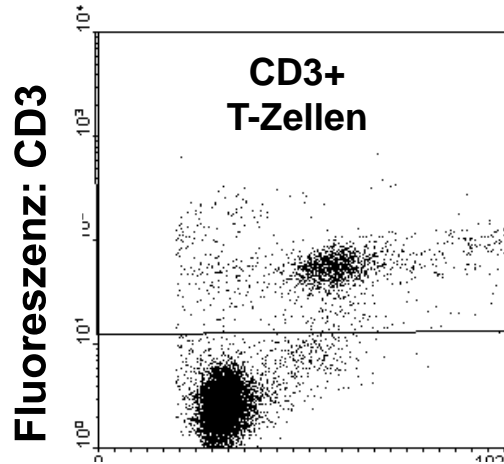
Zellanalysen: Durchflußzytometrie [Vollblutanalyse mittels Morphologie]



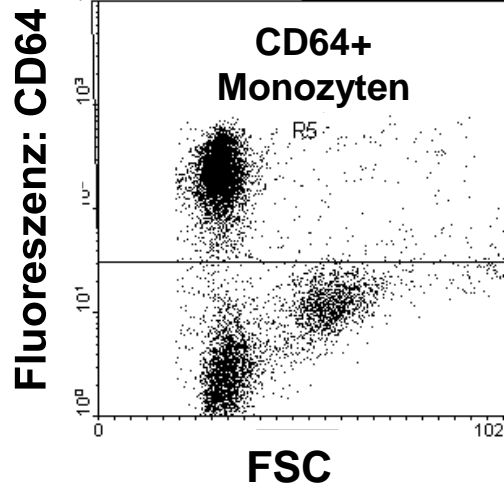
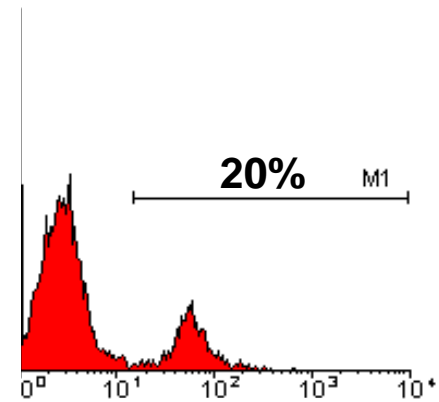
Zellanalysen: Durchflußzytometrie [Fluoreszenzanalyse aus R1]



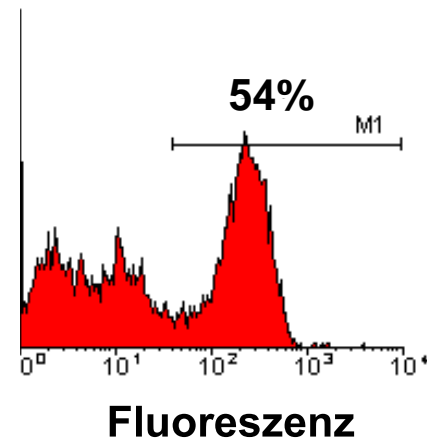
Dot Plot



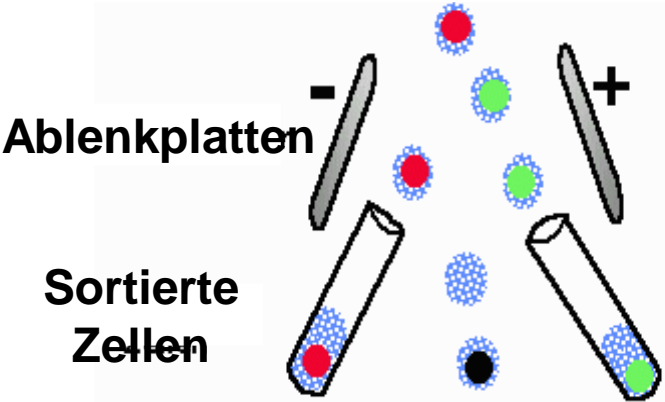
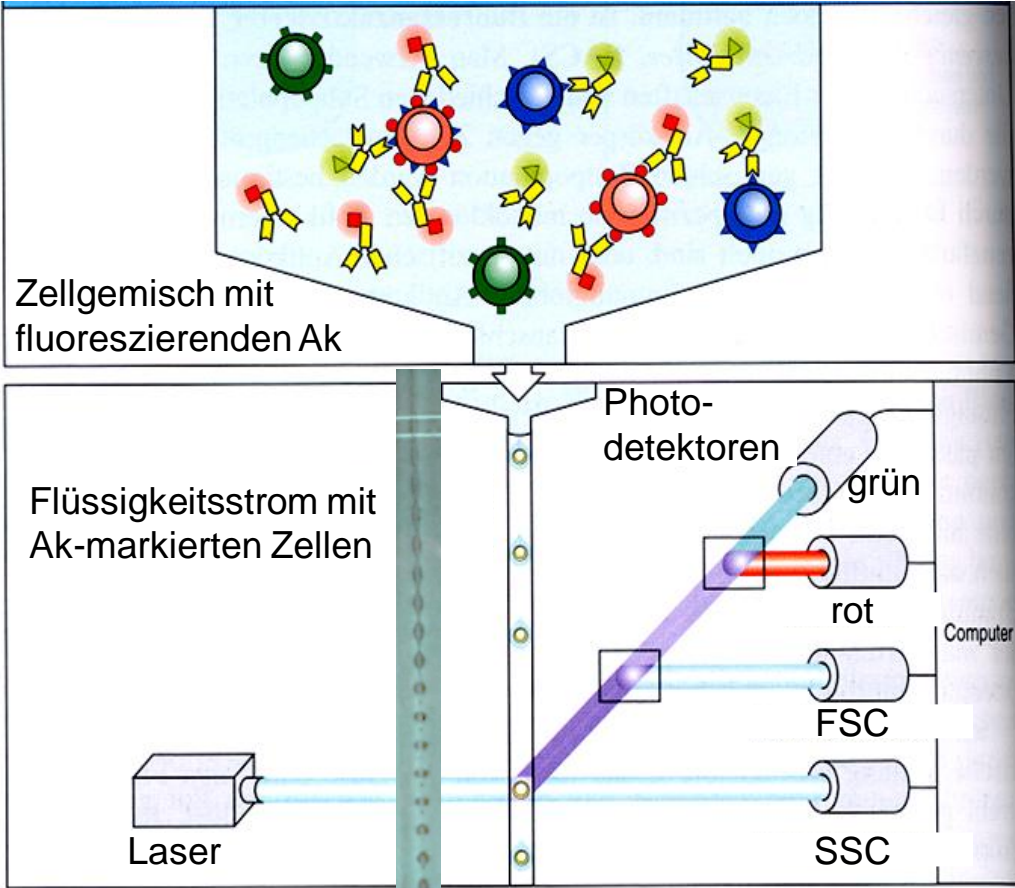
Histogramm



Quantitativ !



Zellsortierung:

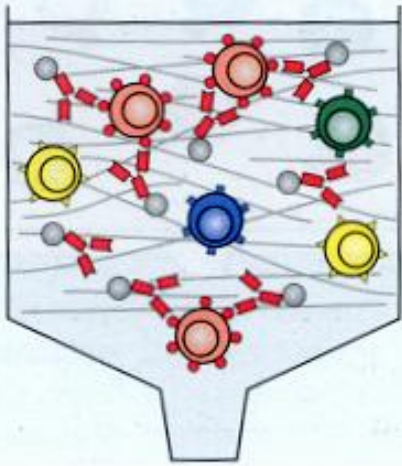


Zellsortierung: Magnetisch

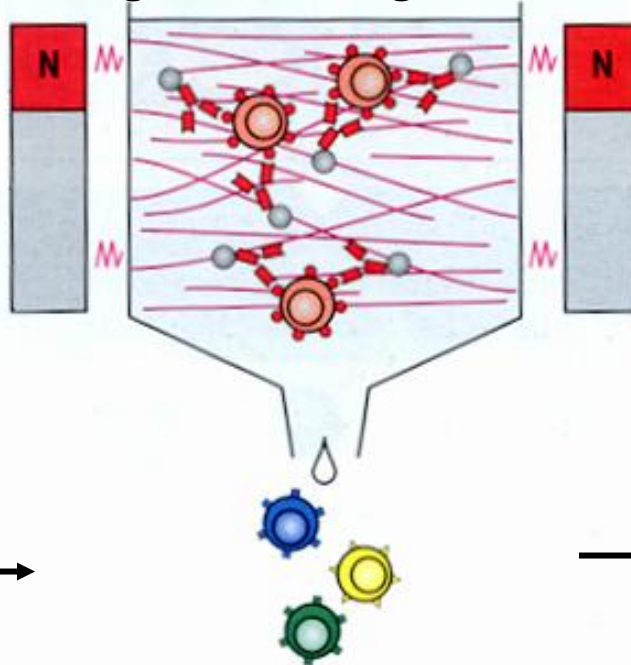
Zweck:

Isolierung magnetisch markierter Zellpopulationen aus einem Zellgemisch zur funktionellen oder phänotypischen Analyse

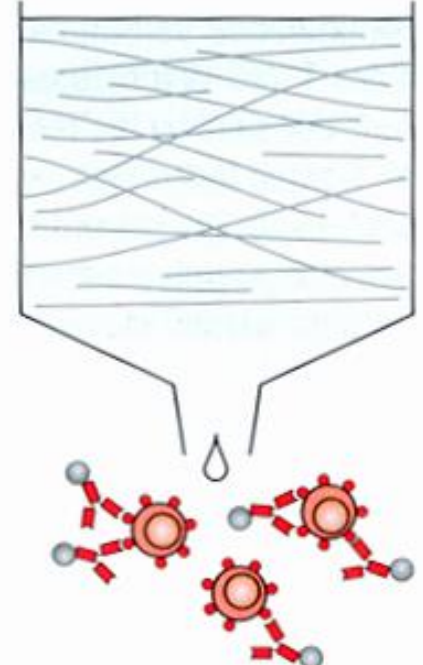
Prinzip:



Anlegen eines Magnetfeldes



Entfernen des Magneten



Zellgemisch mit Ak, an die paramagnetische Partikel gekoppelt sind

Magnetisch markierte Zellen werden zurückgehalten

gebundene Zellen werden freigesetzt

Diagnostik von Immundefizienzen

Besonderheiten der Anamnese bei Krankheiten des Immunsystems 1

- **Dauer und Häufigkeit von Symptomen bei:**
 - Infektionskrankheiten,
 - allergischen Erkrankungen,
 - Autoimmunerkrankungen,
 - Immundefizienzen
- **Art und Ort der Symptome:**
 - eitrig,
 - serös,
 - käsig
 - auf den Schleimhäuten,
 - in speziellen Organen (Gelenken, Gefäßen)

Besonderheiten der Anamnese bei Krankheiten des Immunsystems 2

- **Spezifisch für bestimmte Zellen:**
 - Mastzellen = Quaddel, Gefäßdilatation
 - Neutrophile Zellen = Eiter
 - B-Zellen = Antikörpermangel = eher bakterielle Infektionen
 - T-Zellen = Defizienz = eher virale Infektionen
- **Saisonales Auftreten der Symptome:**
 - Umweltbedingte Veränderungen

Immundefizienz

```
graph TD; A[Immundefizienz] --> B[Sekundäre Immundefizienz]; A --> C[Primäre Immundefizienz];
```

**Sekundäre
Immundefizienz**

**Infektionen
Tumoren
Unfälle / Operationen
Systemerkrankungen
Kachexie / Hunger
Medikamente
Intensivtherapie
Frühgeburtlichkeit**

**Primäre
Immundefizienz**

Genetische Defekte

Leitsymptome primärer Immundefekte

- Acht oder mehr eitrige Otitiden pro Jahr
- Zwei oder mehr schwere Sinusitiden pro Jahr
- Zwei oder mehr Pneumonien pro Jahr
- Antibiotische Therapie über zwei Monate ohne Effekt
- Impfkomplicationen bei Lebendimpfungen
- Gedeihstörungen im Säuglingsalter mit oder ohne chronische Durchfälle
- Rezidivierende tiefe Organ- oder Hautabzesse
- Persistierende Candidainfektion an Haut oder Schleimhaut jenseits des 1. LJ
- Zwei oder mehr viszerale Infektionen (Meningitis, Zellulitis, Osteomyelitis, septische Arthritis, Empyem, Sepsis)
- Rezidivierende Infektionen mit atypischen Mykobakterien
- Akute oder chronische Graft versus host Reaktion
- Positive Familienanamnese für Immundefekte

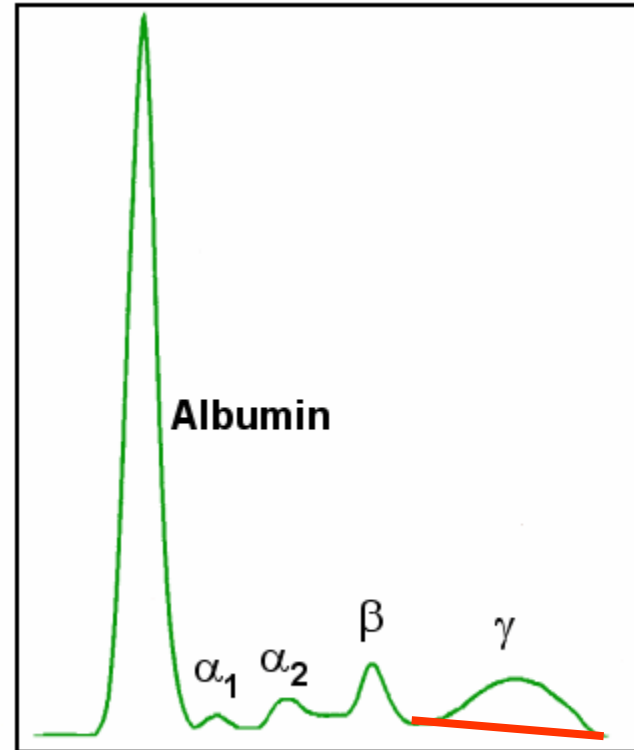
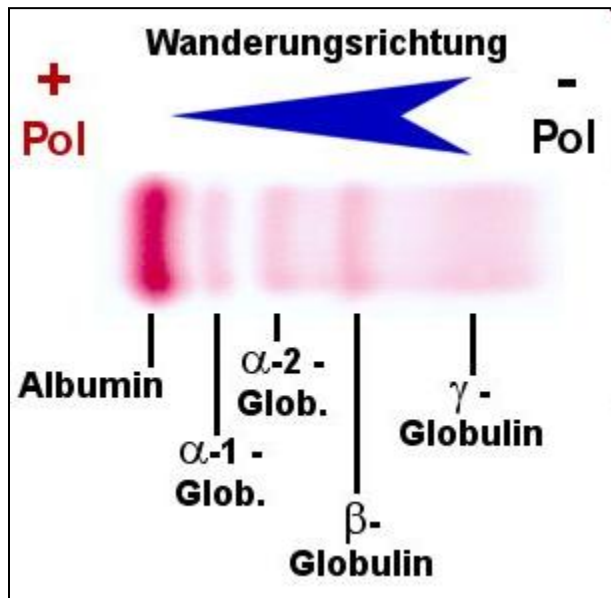
Antibody (B-cell) deficiencies

- **X-linked agammaglobulinemia**
- **Transient hypogammaglobulinemia of infancy**
- **Common variable immunodeficiency**
- **Hyper-IgM immunodeficiency**
- **IgA or IgM deficiency**
- **IgG subclass deficiency**
- **Polysaccharide unresponsiveness**
- **Transcobalamin deficiency**
- **Immunodeficiency with thymoma**

Parslow, T.G. (2001) Medical Immunology. pp. 299-348

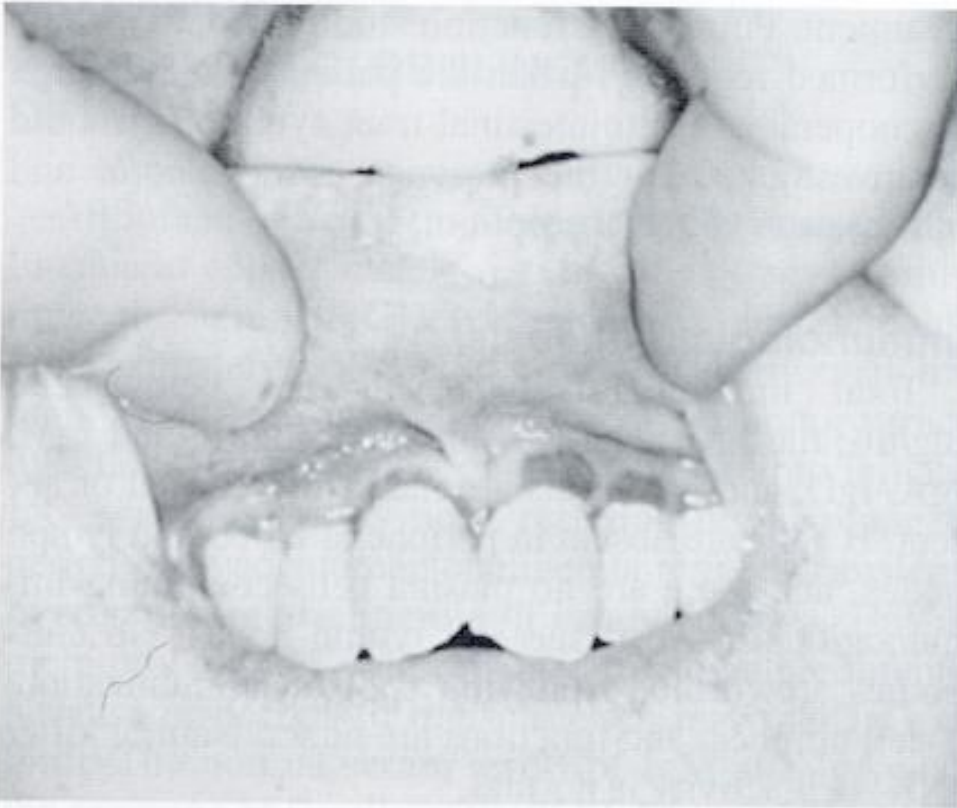
B-Zelldefekte

X-linked Agammaglobulinämie



Bei der Agammaglobulinämie werden in der Eiweißelektrophorese keine Gamma-Globuline sichtbar, weil die Antikörperproduktion fehlt.

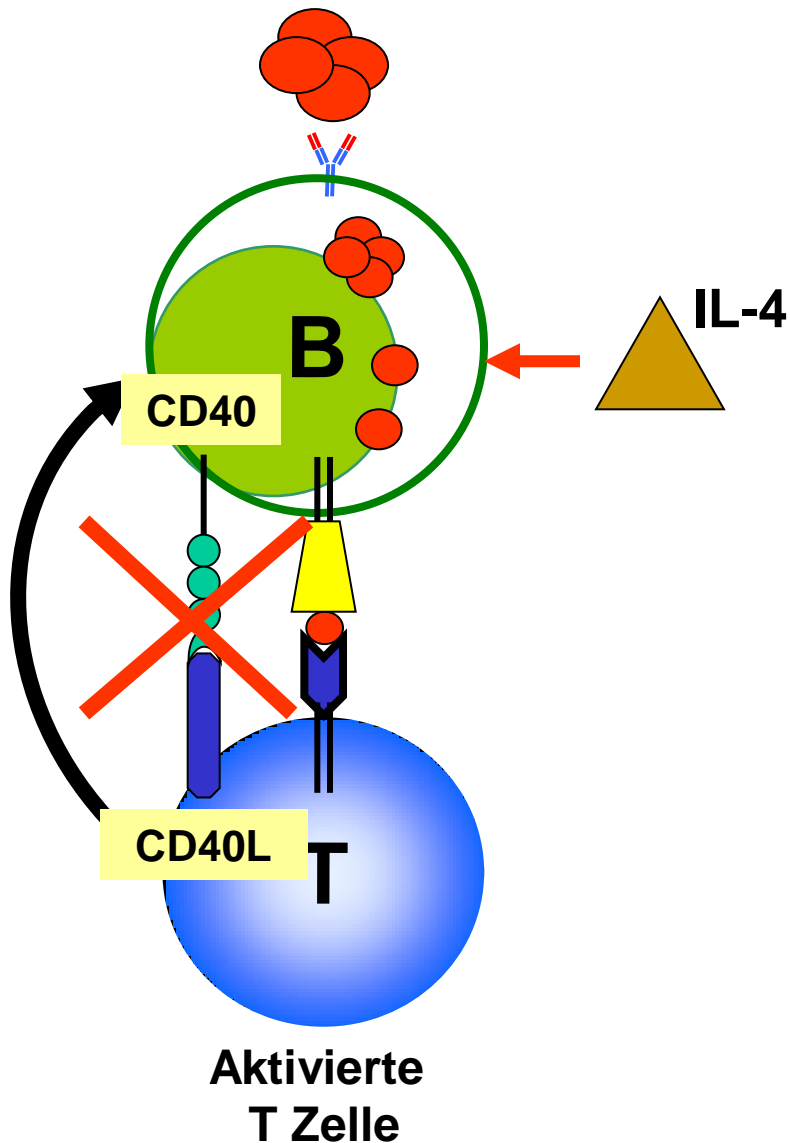
X-linked Agammaglobulinämie



Frühes periodontale Erkrankung bei einem Kind mit **Agammaglobulinämie**. Rezidivierende Otitiden und Zahnerkrankungen sind oft die erste Manifestation der Infektionsanfälligkeit.

1. Mutation im Gen der B-Zell spezifischen Tyrosinkinase (Bruton)
2. Keine B-Zellen
3. Fehlen der γ -Globuline in der Eiweiß-Elektrophorese
4. IgG < 200 mg/dl, Fehlen von IgM, IgA, IgD, IgE
5. Pyrogene Infektionen (5.-6. Monat)
6. Gutes Ansprechen auf Behandlung mit Immunglobulinen

Hyper-IgM Syndrom



1. HIGM Typ 1: Mutation im Liganden für CD40; X-chromosomal-rezessiv; Typ 2: Defekt der Activation-induced Cytidine-Deaminase; Typ 3: CD40 Defekt.
2. Fehlender Isotypswitch, Differenzierungsstop der B-Zellen, fehlende Produktion von IgG, IgA, IgE, verstärkte Produktion von IgM.
3. Vermehrt bakterielle Infektionen und Infektionen der Atemwege; Risiko für Lymphome erhöht. Auch Thromozyto- und Neutropenien
4. Therapie: Gabe von intravenösen Immunglobulinen (IVIG) und Antibiotikabehandlung bei Infektionen
5. Knochenmarkstransplantation

Hyper-IgM Syndrom

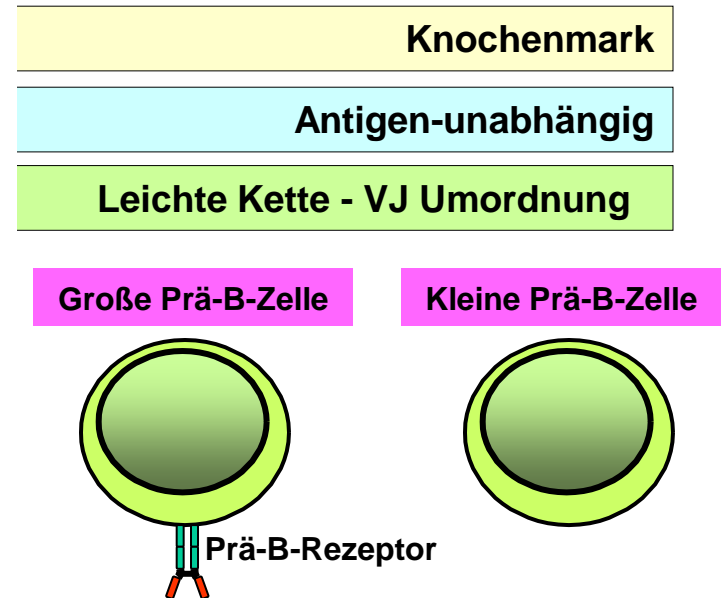


Von einer WEBSITE, auf der Spender für Knochenmarkstransplantation gesucht werden.

Rohan ist 18 Monate alt und leidet an x-linked Hyper-IgM Syndrom. Die einzige heilende Therapie ist eine Knochenmarkstransplantation. Bis er eine solche erhält, bekommt er alle drei Wochen intravenöse Immunglobuline (IVIG). Zwischendurch ist er wegen zahlreicher Infektionen hospitalisiert, die durch IVIG nicht verhindert werden können. Rohan's Lebensqualität und Aktivitäten sind stark eingeschränkt, um weitere Infektionen zu verhindern.

Common Variable Immunodeficiency (CVID)

1. Heterogene Gruppe von Krankheiten, inadäquate Produktion von Immunglobulinen. Assoziation mit HLA-A1, -B8 und -DR3.
2. Arretierung der B-Zell Entwicklung im Prä-B-Zellstadium, **fehlende Plasmazellbildung**; Störung der B-Zellregulation durch Th-Zellen; Autoantikörper gegen reifende B-Zellen; Blockierung der Ig-Sekretion durch fehlerhafte Glykosilierung
3. **KLINISCH VARIABEL**: Beginnt zwischen 28 und 33 Jahren. Rezidivierende bronchopulmonale bakterielle Infektionen, GI-Infektionen, Hepatitis, Autoimmunerkrankungen, Lymphome.
4. Therapie: Je nach Erkrankung Antibiose, IVIG-Gabe, Anti-Inflammation, Zytostatische Behandlung



T-Zell und kombinierte B- und T-Zelldefekte

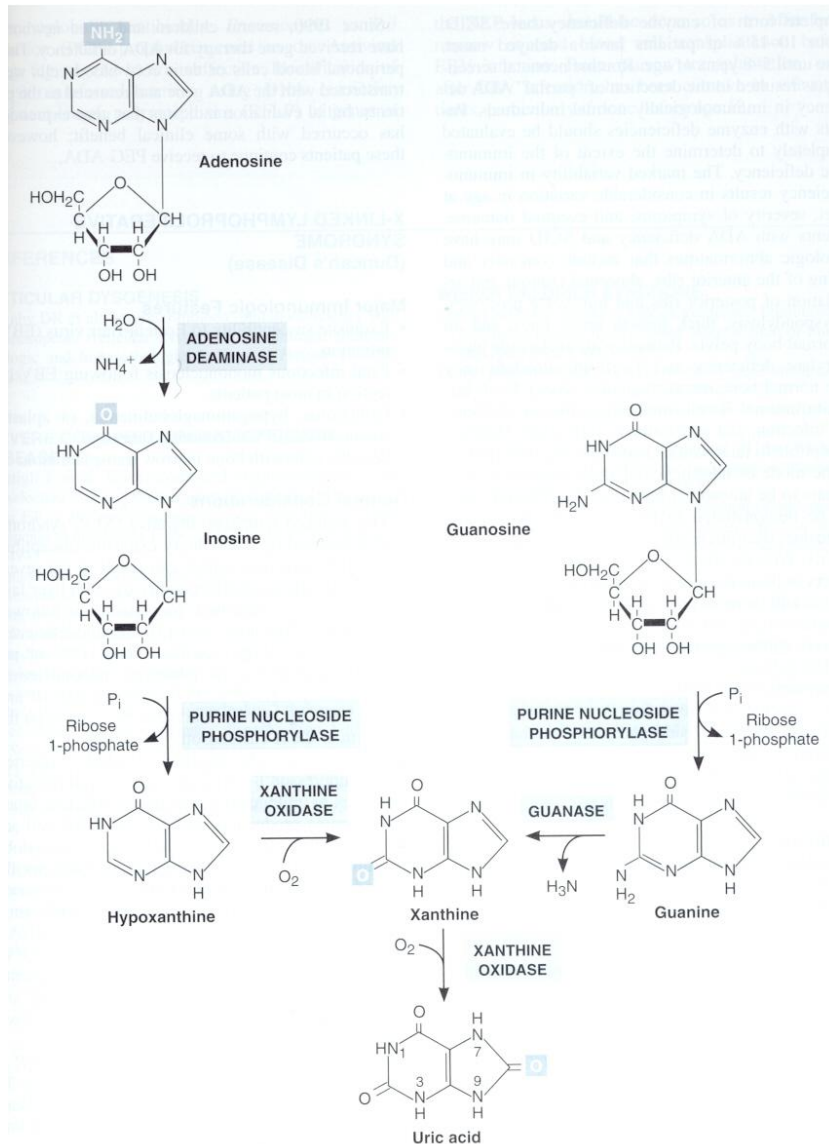
Severe combined Immunodeficiency (SCID)

1. Heterogene Gruppe von T-Zelldefekten. Wird ab dem dritten Lebensmonat auffällig.
2. Rezidivierende Infektionen der Atemwege mit Pneumocystis und Candida, des GI-Traktes mit Rotaviren, Hautkzemen.
3. Fehlender Thymus und fehlende Lymphknoten und Tonsillen.
4. Fehlen der CD3 positiven Zellen, also der T-Zellen.



Der „bubble-boy“ hatte SCID und lebte 12 Jahre in einer Keim freien Plastikblase.

SCID: z.B. Adenosin Deaminase Defizienz (ADA)



1. Purinstoffwechsel gestört (ADA, PNP...)
2. Fehlen oder Mangel an T- und B-Zellen
3. Rezidivierende Infektionen durch Viren, Bakterien, Pilze, Protozoen
4. Knochenmarkstransplantation, Infusion bestrahlter Erythrozyten als Quelle der ADA

Andere Formen der „Severe Combined Immunodeficiency“ (SCID)

1. X-linked, autosomal oder sporadische Formen
2. X-linked: Mutation in der γ_c -Kette des IL-2 Rezeptors
3. Autosomal: Mutation der JAK-3 Kinase oder α -Kette des IL-7 Rezeptors
4. Autosomal: Mutation in der Rekombinase (RAG1 und RAG2)
5. T- und B-Zell Immunität schwer beeinträchtigt, weitere heterogene Immundefekte
6. Rezidivierende Infektionen durch Viren, Bakterien, Pilze, Protozoen
7. Knochenmarks- oder Stammzelltransplantation

DiGeorge-Syndrom

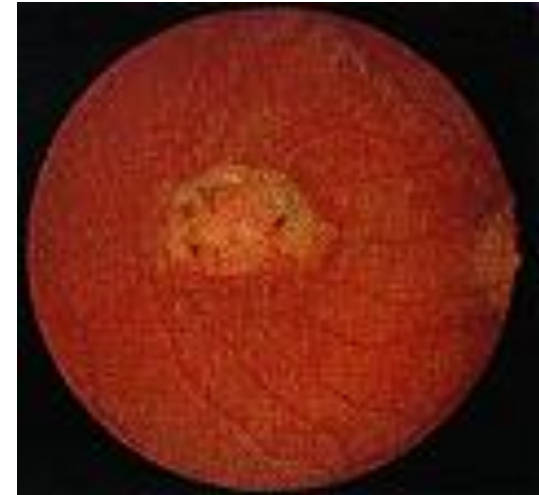


Kind mit DiGeorge Syndrom:
große, niedrig sitzende und fehlgeformte
Ohren, Hypertelorismus (vergrößerte Distanz
zwischen den Augen), Fischmund.

1. Embryonale, congenitale Entwicklungsstörung
2. Hypo- oder Aplasie des Thymus und der Nebenschilddrüse, Herzfehler (Dextrocardioversion)
3. Variierende T-Zell Defizienz, abhängig davon rezidivierende Infektionen durch Viren, Bakterien, Pilze, Protozoen
4. Hypokalziämie
5. Charakteristische Gesichtsveränderungen
6. Infektionsprophylaxe

Ataxia teleangiectatica (Louis-Bar Syndrom)

1. Trias: progrediente Immundefizienz, Kleinhirnataxie und okulokutane Teleangiektasie.
2. Heterogene Gruppe rezessiv vererbter Defekte mit Brüchigkeit der Chromosomen (z.B.- Translokation im Chromosom 14 mit Schäden der TCR und Immunglobulingene. DNA Reparatur defekt.
3. Hohe Empfindlichkeit für Ionisierende Strahlung
4. IgA und IgE erniedrigt, T-Zell-Mangel
5. Schwere Sinusitiden und Lungeninfektionen (Sinu-bronchiales Syndrom)
6. Symptomatische Therapie



Augenhintergrund und Skleren:
Deutlich erweiterte, teleangiektatische Gefäße



Zelluläre Defekte

Cellular (T-cell) deficiencies

- **DiGeorge anomaly**
- **Chronic mucocutaneous candidiasis**
- **Biotin-dependant multiple cocarboxylase deficiency**
- **Natural killer cell deficiency**
- **Idiopathic CD4 lymphopenia**

Defekte der Phagozyten

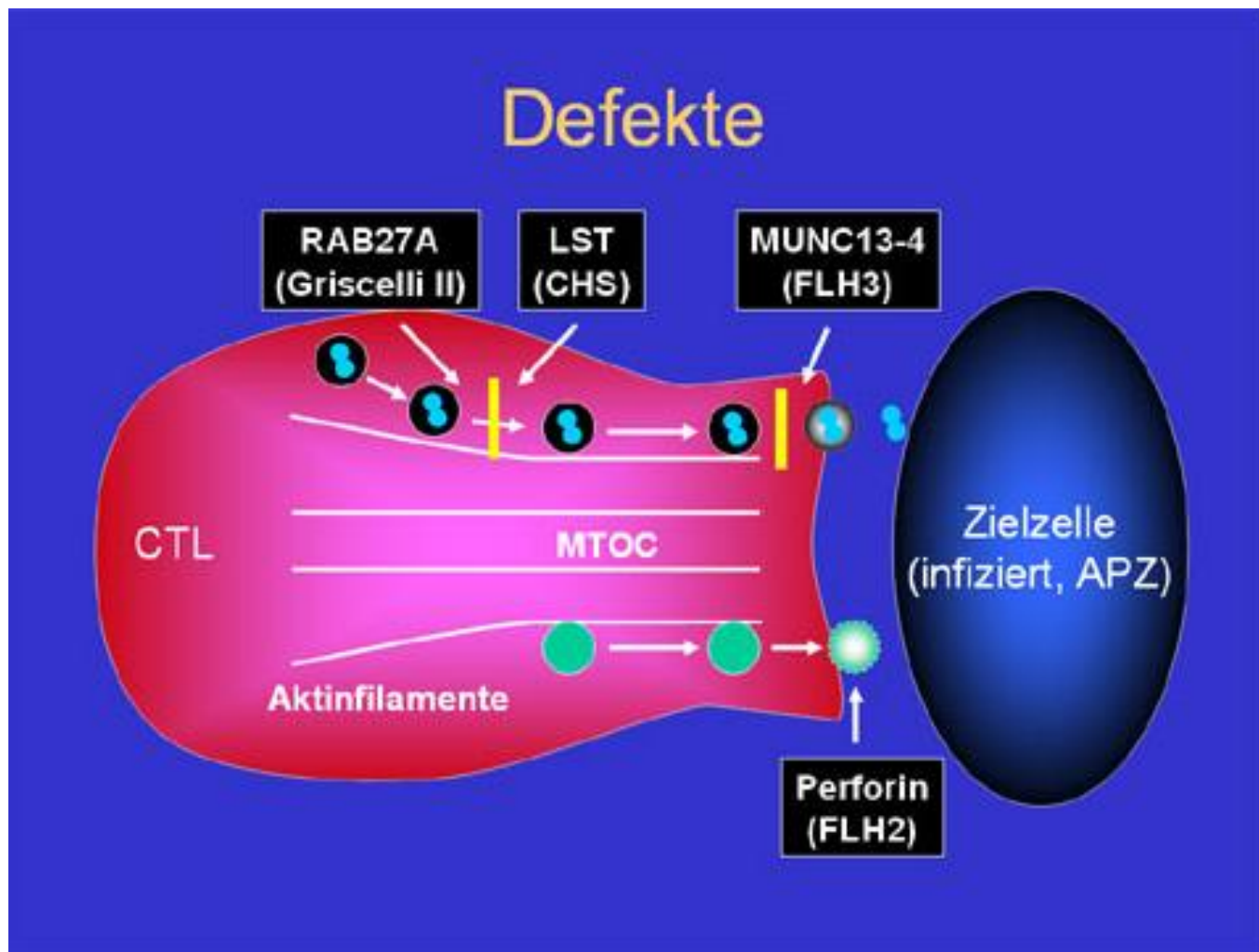
Infantile septische Granulomatose



Lucciano Vassalli hat eine Septische Granulomatose und bedarf täglich bis zu vier Antibiotikainfusionen.

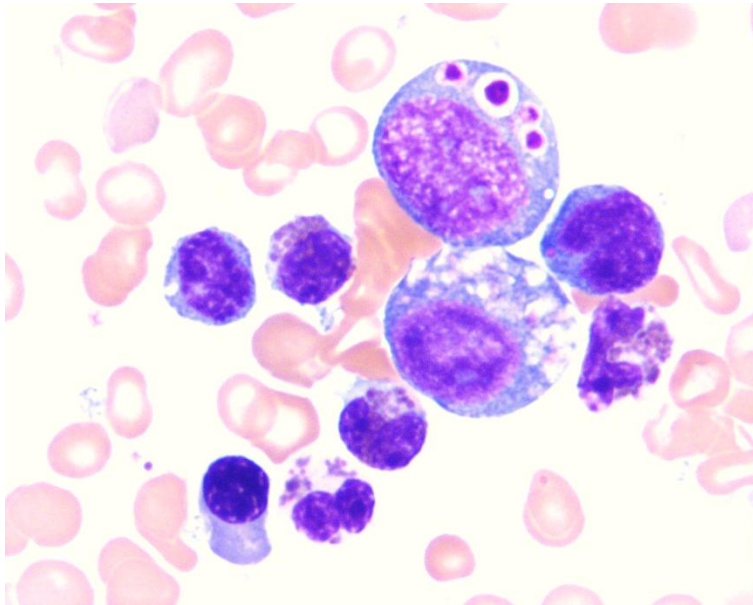
1. Unfähigkeit der Granulozyten, Bakterien durch mikrobizide Sauerstoffradikale abzutöten.
2. X-chromosomal rezessive Vererbung mit Mangel an Cytochrom b_{558} in der Phagosomen-membran der Granulozyten; Defekt der NADPH-Oxidase; Mangel an Glukose-6-Phosphat Dehydrogenase.
3. Lymphadenitis, Pyodermie, septische Absiedelungen in die Lunge, Darm, Knochen und Leber.
4. Häufige Erreger: Staphylokokken, Klebsiellen, Aspergillus, Hämophilus Influencae.
5. Therapie: Antibiose, operative Sanierung der Abzesse; allogene Knochenmarkstransplantation; Zukunft: Gentherapie.

Chediak-Higashi-Syndrom



Gestörte Mikrotubulifunktion mit fehlender Degranulation.

Chediak-Higashi-Syndrom



Riesenzellgranula in den Granulozyten.

1. Autosomal rezessiver Erbgang
2. Häufig bei Menschen jüdischer Herkunft.
3. Chemotaxis und intrazelluläre Bakterizidie gestört.
4. Riesenzellgranula und Mikrotubulifunktionsstörung.
5. Störung der NK-Zellfunktion und Defekt der Antikörper abhängigen zellulären Zytotoxizität.
6. Okulokutaner Albinismus mit Photophobie, neurologische Symptome
7. Besondere Empfindlichkeit auf Infektionen mit Katalase-negativen Bakterien.
8. Therapie: Antibiose und Cholinergika zur Erhöhung der intrazellulären cGMP-Spiegel, um Mikrotubuli-Aufbau zu fördern.

Phagocytic dysfunction diseases

- **Neutropenic syndromes**
- **Chronic granulomatous disease**
- **Leukocyte glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency**
- **Chediak-Higashi syndrome**
- **Myeloperoxidase deficiency**
- **Specific granule deficiency**
- **Glycogen storage disease type 1b**
- **Hyper-IgE/Job's syndrome**
- **Leukocyte adhesion defect (types I and II)**

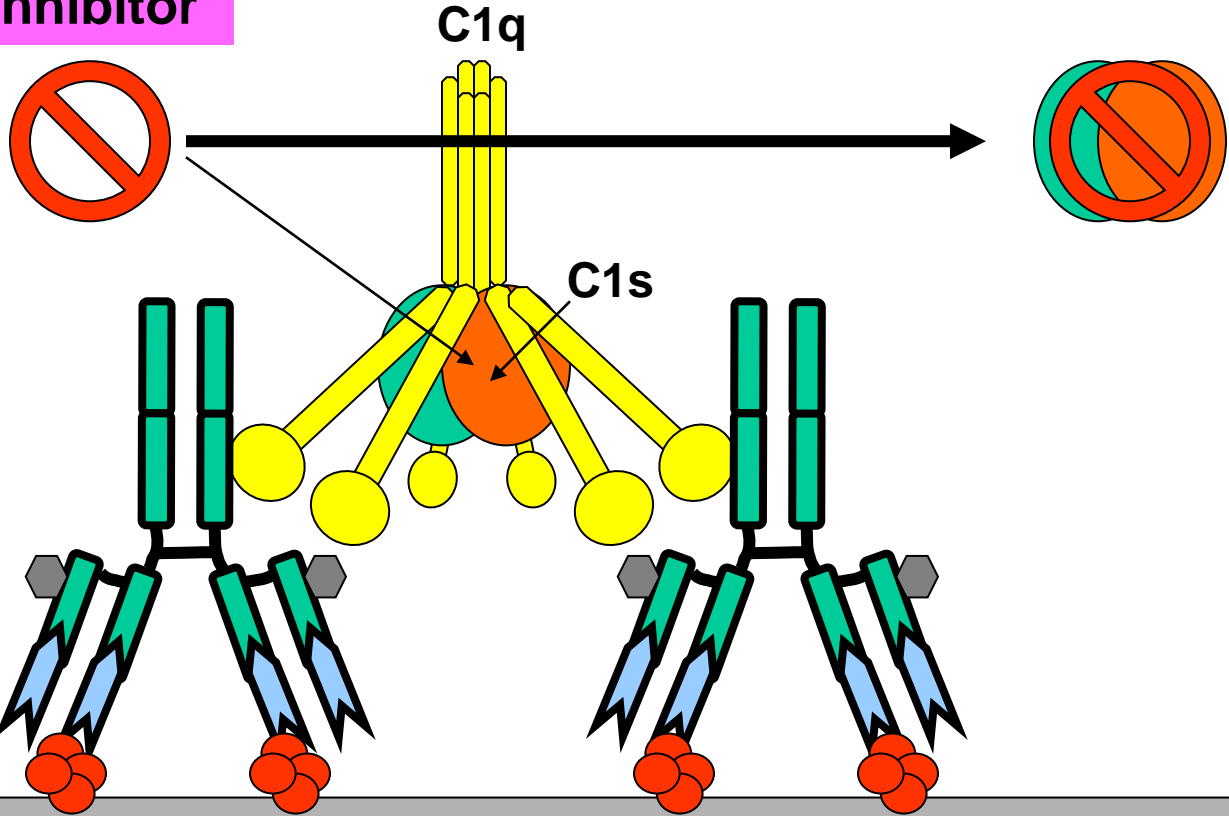
Parslow, T.G. (2001) Medical Immunology. pp. 299-348

Defekte des Komplementsystems

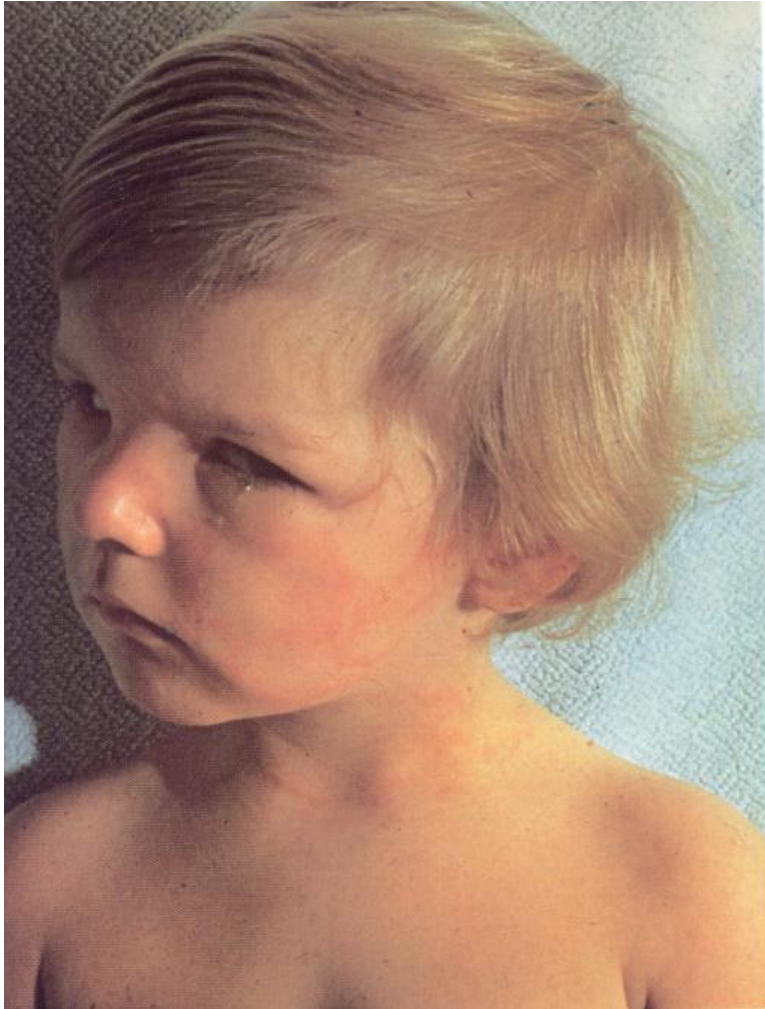
Hereditäres Angioödem

C1-Esterase-Inhibitor

Defektmutation

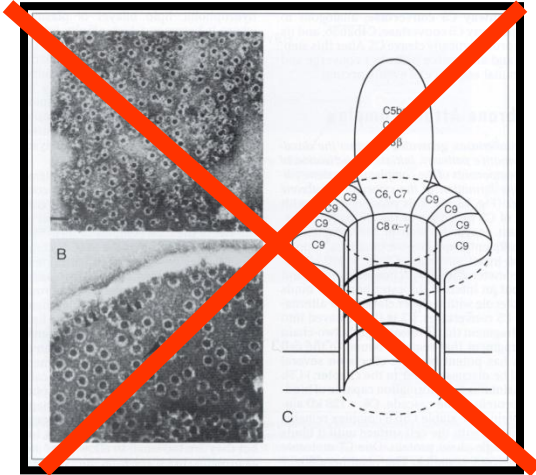


Hereditäres Angioödem



1. Autosomal-dominante Mutation des C1-Esterase-Inhibitor Gens (Chromosom 11) oder erworbene Form.
2. Unkontrollierte Aktivität der Protease, Freisetzung von Entzündungsmediatoren, Erhöhung der Gefäßpermeabilität, Ödem.
3. Anfälle von subkutanen Ödemen in der Haut (Gesicht), Gelenken, Gastrointestinaltrakt, Schleimhäuten, besonders der Bronchialschleimhaut mit Luftnotanfällen und Asthma ähnlichen Attacken.
4. Therapie: Androgenderivate, z.B. Danazol, bewirkt Steigerung der Produktion des C1-Inhibitors. Im Anfall Gabe von rekombinantem Inhibitor.

Paroxysmale nächtliche Hämoglobinurie

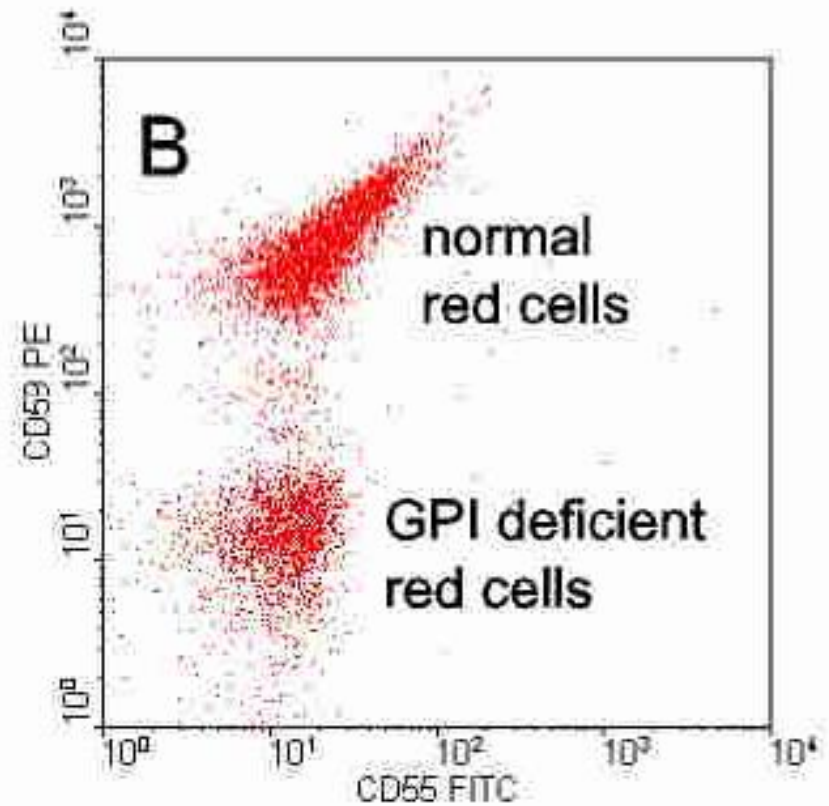
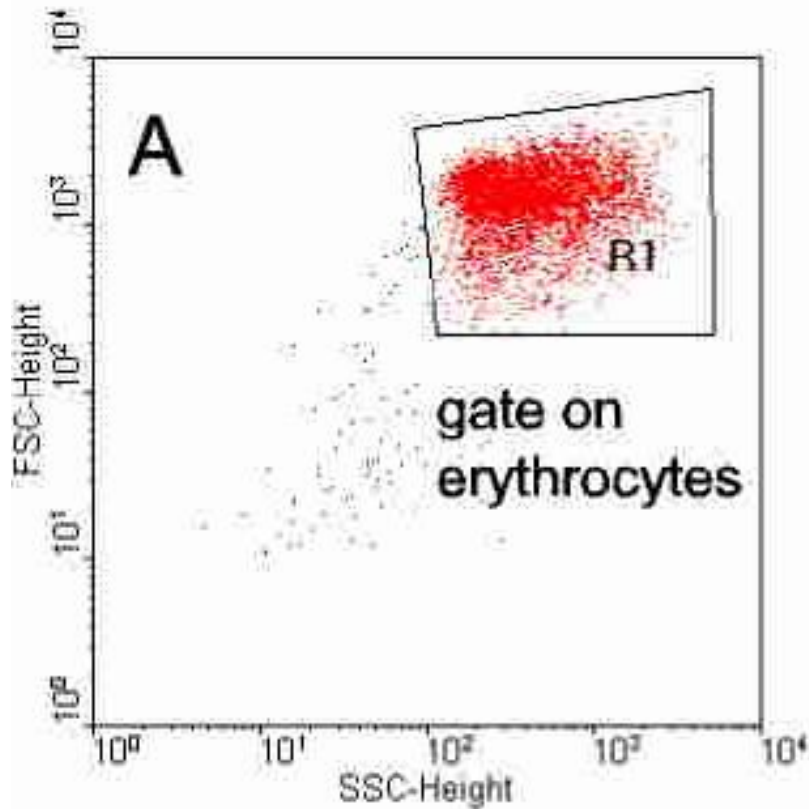


Körpereigene Zellen schützen sich vor dem Membran angreifenden Komplex (MAK) durch Oberflächenproteine, die die Einlagerung von C9 verhindern.

CD59 (Protektin) und CD55 (DAF = Zellerfall beschleunigender Faktor) binden über sogenannte Glykophospholipidanker (GPI) an die Zellmembran. Durch besondere laterale Mobilität verhindern sie den Einbau des C9 Faktors.

Defektmutationen bei diesen Faktoren führen zu einer verstärkten Lyse insbesondere von Erythrozyten.

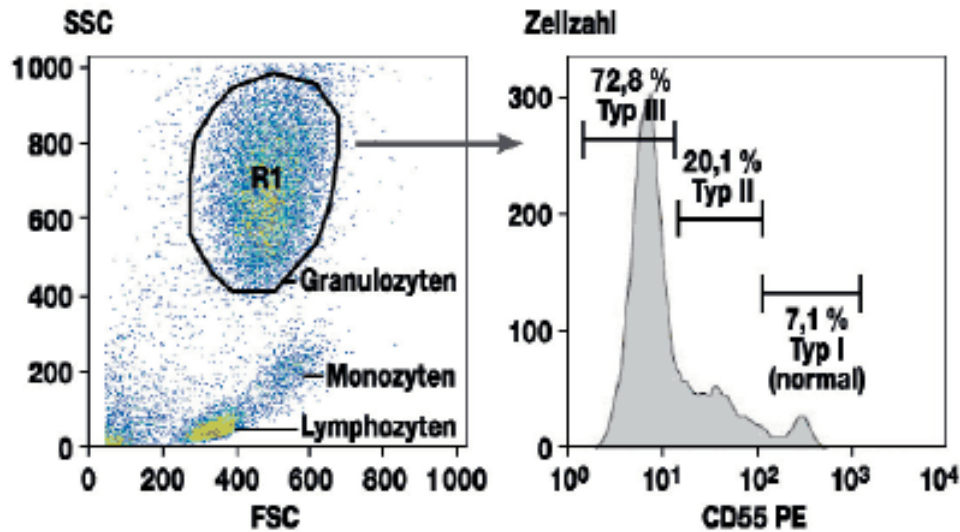
Paroxysmale nächtliche Hämoglobinurie



Durchflusszytometrie zum Nachweis von CD59 Expression auf der Oberfläche von Erythrozyten. Die Färbung mit Anti-CD59 Antikörper zeigt eine über 30%igen Anteil GPI defizienter Zellen.

Paroxysmale nächtliche Hämoglobinurie

GRAFIK 2



1. Defekt komplementregulatorischer Proteine auf Zelloberflächen: Proteine, die über glykosiliertes Phosphatidylinositol in der Membran verankert sind: DAF/CD55 (zerfallsbeschleunigender Faktor), erythrozytäre Acetylcholinesterase und LFA-3.
2. Proliferation von defekten Stammzellen, damit sind die Erythrozyten empfänglich für C3b, folglich Aktivierung der alternativen Komplementkaskade und reaktive Lyse der Zellen durch MAC.
3. Rezidivierende Anfälle intra- und extravasaler Hämolyse, klinisch Hämoglobinurie.
4. Therapie: Gegen C5 gerichteter monoklonaler Antikörper Eculizumab, der die terminale Sequenz der Komplementkaskade inhibiert.

Expression von CD55/DAF auf Granulozyten im Histogramm. Bei vielen Zellen fehlt CD55 teilweise (Typ II-Zellen) oder vollständig (Typ III-Zellen), nur wenige Zellen zeigen Typ I Expression von CD55.