



IMMUNOLÓGIAI ÉS
BIOTECHNOLÓGIAI
INTÉZET



13. Praktikum: Immunserologie Autoantikörper diagnostik

Grundlagen der Immunologie

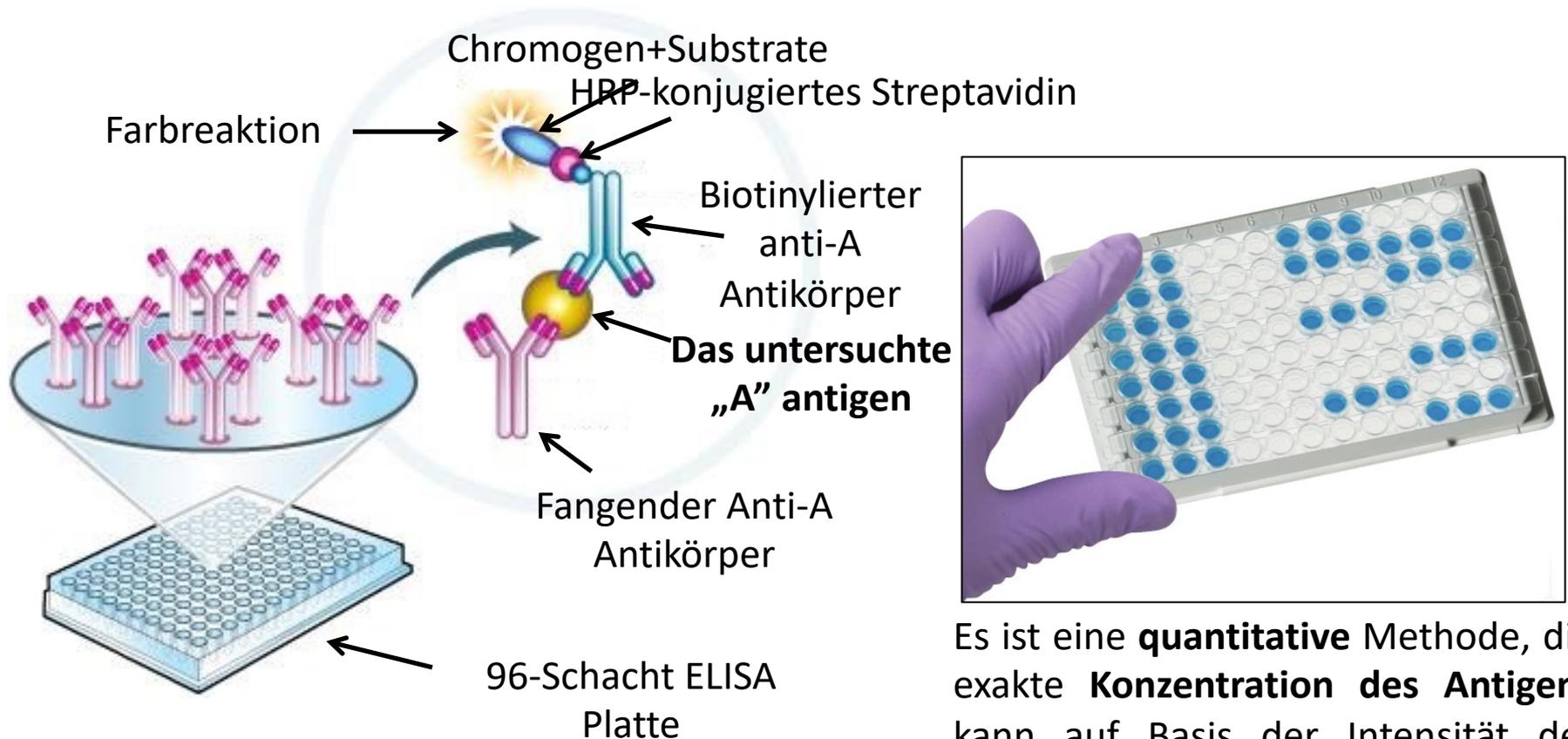
Universität Pécs, Klinisches Zentrum
Institut für Immunologie und Biotechnologie
Pécs, 2023.

Definition der Serologie

- Die wissenschaftliche Erforschung des **Blutserums** oder anderer Körperflüssigkeiten; In der Praxis handelt es sich um die Identifikation von **Antikörpern** im Serum.
- Erinnern Sie sich?
 - **Blutplasma**: Überstand des antikoagulierten Blutes
 - **Blutserum**: Überstand des koagulierten Blutes
- Basiert auch auf der **Antigen-Antikörper Reaktion**. (beide können detektiert werden)
- Welche Methoden umfasst die Serologie?
 - Methoden auf Basis der **Präzipitation**
 - Methoden auf Basis der **Agglutination**
 - **Immunassays** (ELISA, ELISPOT, Radioimmunassay, etc., siehe nächstes Praktikum)
 - **Immunblotting Technik** (Western blot, Dot blot, siehe nächstes Praktikum)
 - **(Indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie)**
- Wichtigste Klinische Anwendungen:
 - Diagnostik von **infektiösen Krankheiten** (z.B. Detektieren von Antikörpern die gegen Pathogene produziert werden)
 - Diagnostik **autoimmuner Störungen** (Detektieren von **Autoantikörpern**)
 - Diagnostik der **Immundefizienzen** (Bestimmen des Immunglobulin-Spiegels)
 - Bestimmen der Blutgruppe

ELISA Grundlagen I.

- **ELISA** = **E**nzyme-**L**inked **I**mmunosorbent **A**ssay^[1.]
- Ein Beispiel der Funktionsweise von ELISA: (so-genanntes Sandwich ELISA, siehe die folgenden Folien):

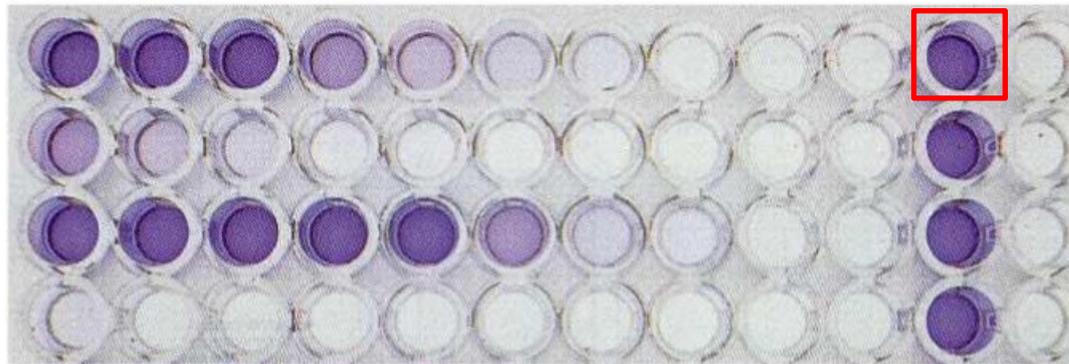
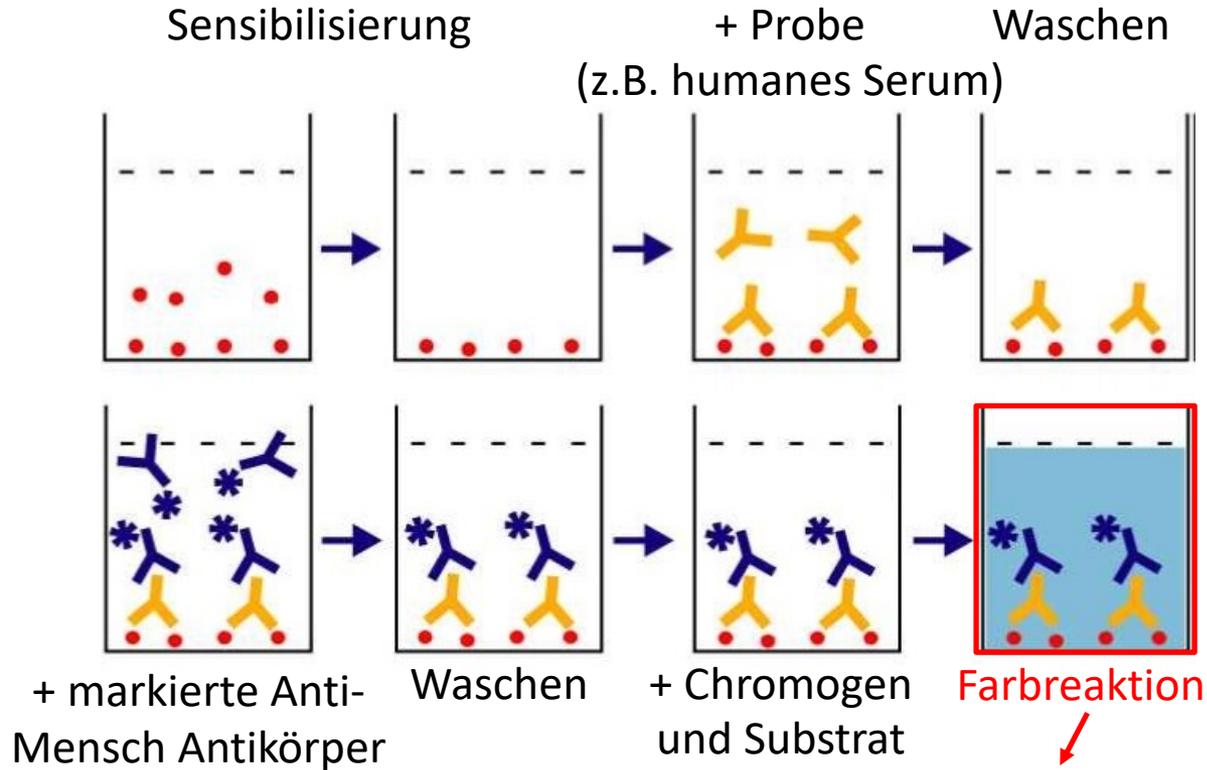


Es ist eine **quantitative** Methode, die exakte **Konzentration des Antigens** kann auf Basis der Intensität der Farbreaktion bestimmt werden.

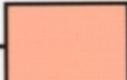
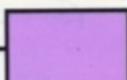
ELISA Grundlagen II.

- Es basiert auf der **Antikörper-Antigen Reaktion**, **beide** können **detektiert werden**.^[2.]
- **Sensibilisierung**: Einer der Teilnehmer wird an eine feste Oberfläche gebunden.
- **Blocken**: Blocken nicht-spezifischer Bindungsstellen.
- Der untersuchte Teilnehmer (entweder das Antigen oder der Antikörper) ist in einer **löslichen Form**. (z.B. Blutserum)
- Das Fang-Antigen/Antikörper wird seinen löslichen Liganden binden und **gebunden Immunkomplexe bilden sich**.
- Komponenten die nicht an die Oberfläche gebunden sind werden durch waschen entfernt.
- Die gebundenen Immunkomplexe können mit einer enzymatischen Farbreaktion entweder direkt oder indirekt detektiert werden.
- Das gefärbte Endprodukt des Chromogens ist löslich und diffundiert in die Lösung.
- Die **Konzentration** des untersuchten Teilnehmers **kann berechnet werden** indem man die **Lichtabsorption** der Lösung misst und **Standard-Proben** mit bekannten Konzentrationen nutzt. → **Es ist eine quantitative Methode!**

Prinzip des ELISA (indirektes ELISA)



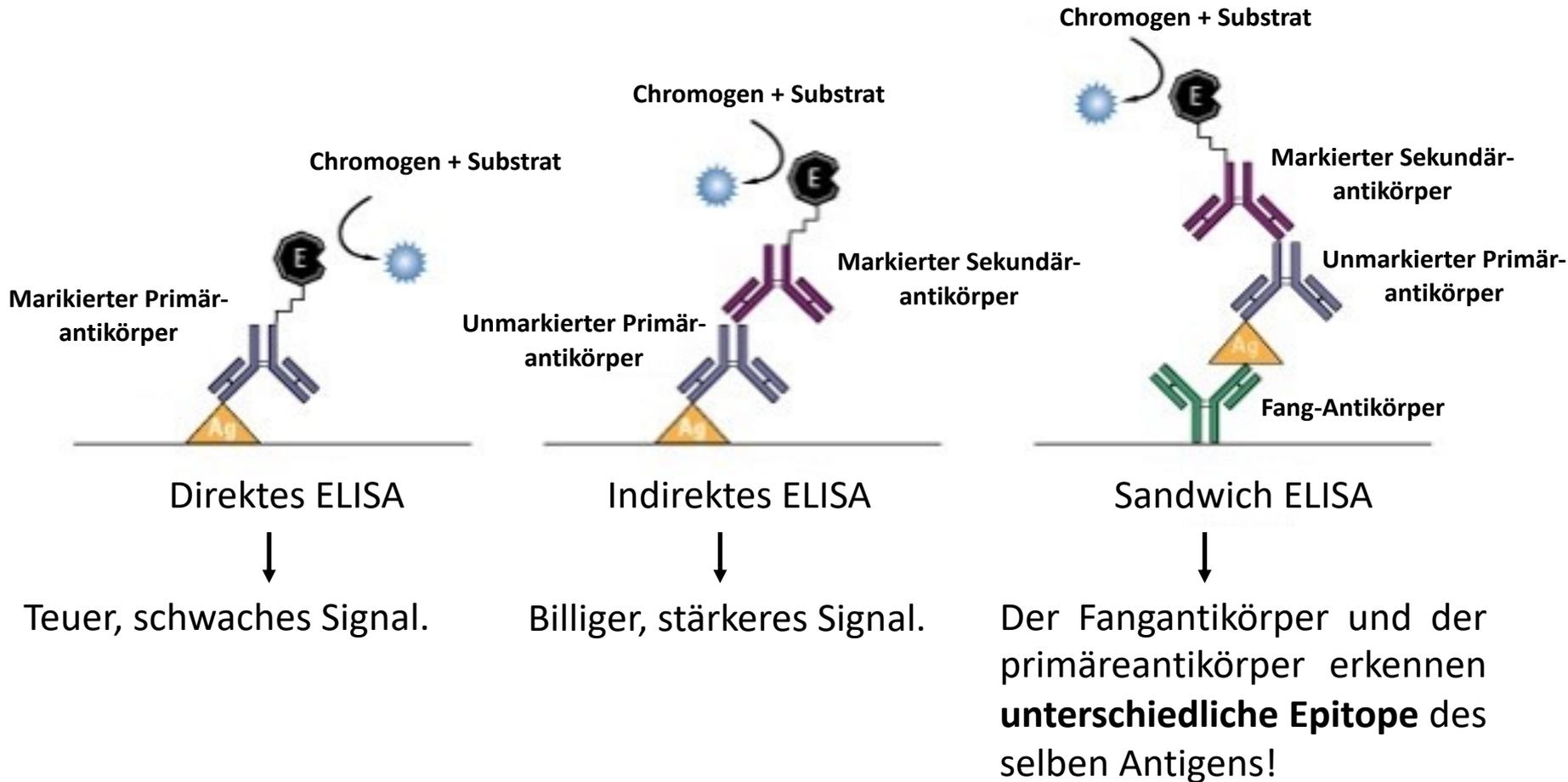
ALP	p-Nitrophenyl phosphat (pNPP)		soluble	ELISA
	Nitro blau Tetrazolium (NBT)		insoluble	histochemistry, immunoblotting
	Fast Red		insoluble	histochemistry, immunoblotting

Peroxidase	ABTS		soluble	ELISA
	o-phenylenediamine (OPD)		soluble	ELISA
	tetramethylbenzidine (TMB)		soluble	ELISA
	o-dianisidine		soluble	ELISA
	5-aminosalicylic acid (5-ASA)		soluble	ELISA
	diaminobenzidine (DAB)		insoluble	histochemistry, immunoblotting
	3-amino-9-ethylcarbazole (AEC)		insoluble	histochemistry, immunoblotting
	4-chloro-1-naphthol (4C1N)		insoluble	histochemistry, immunoblotting

Im Fall von **ELISA** muss das **gefärbte Endprodukt** des Chromogens **löslich** sein. Das Endprodukt wird zufällig in die Lösung **diffundieren** und die **lichtabsorbierenden** Eigenschaften ändern. Lichtabsorption wird dann Schicht für Schicht durch einen ELISA Leser gemessen. [2.]

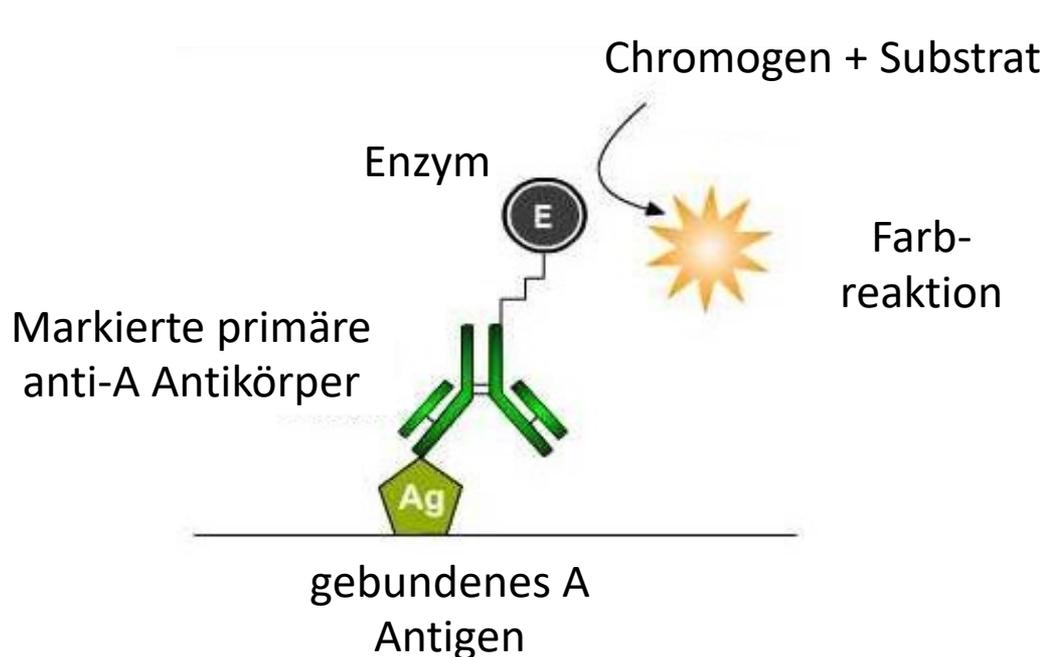
Im Fall von **Enzym IHC** und **Immunoblotting Techniken** (z.B. Westerb Blot) **muss** das Endprodukt **unlöslich** sein, andernfalls wird es wegdiffundieren. Ein unlösliches Endprodukt wird am Reaktionsort bleiben und erlaubt die Darstellung der Antigen-Antikörper Reaktion.

Wichtigste ELISA-Typen



Direktes ELISA

1. Antigen A der Probe wird an die Platte gebunden.
2. Das Antigen wird mit Enzym-markierten Anti-A Antikörpern detektiert. [3.]



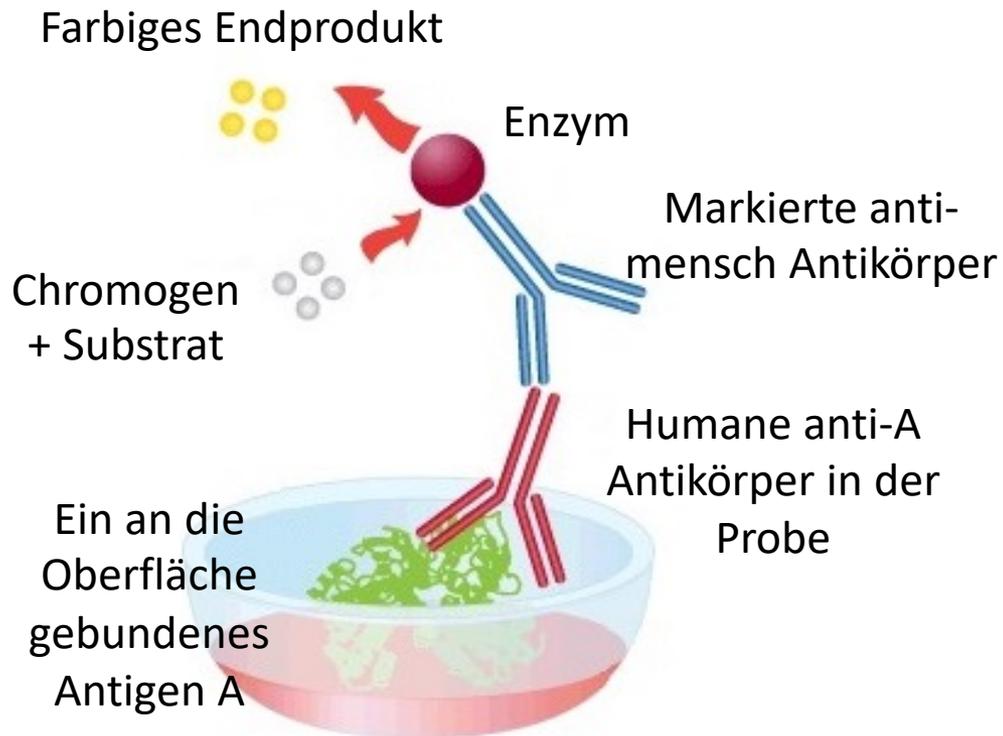
Vorteile:

- **Schnell**

Nachteile:

- **Teuer** (benötigt markierte Primärantikörper)
- **Das Signal ist schwach** weil die Proteine der Probe sich bei der Sensibilisierung kompetitiv hemmen. (Lösung: Sandwich ELISA)

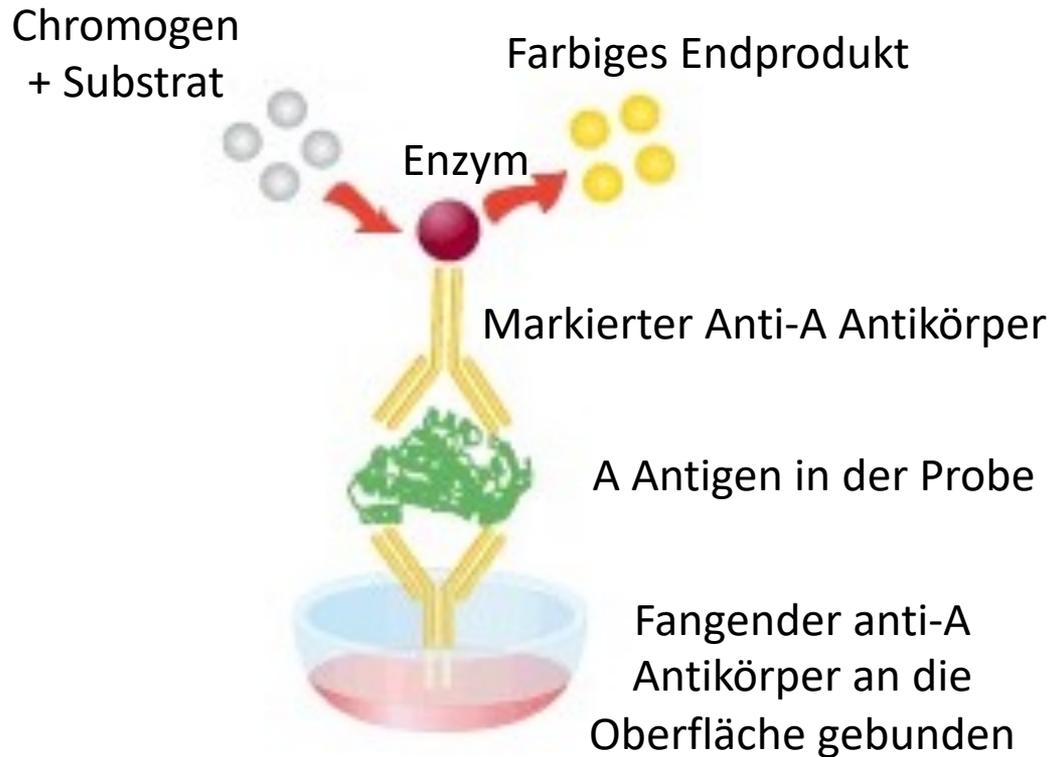
Indirektes ELISA



Anwendungen: Detektion von **Anti-körper** in der Probe, z.B.:

- Testen von **Hybridom Überständen**^[4.]
- Detektion von Antigen-spezifischen Antikörpern in Körperflüssigkeiten (z.B. Detektion von Autoantikörpern im Serum bei **autoimmunen Störungen**, siehe später)

Sandwich ELISA



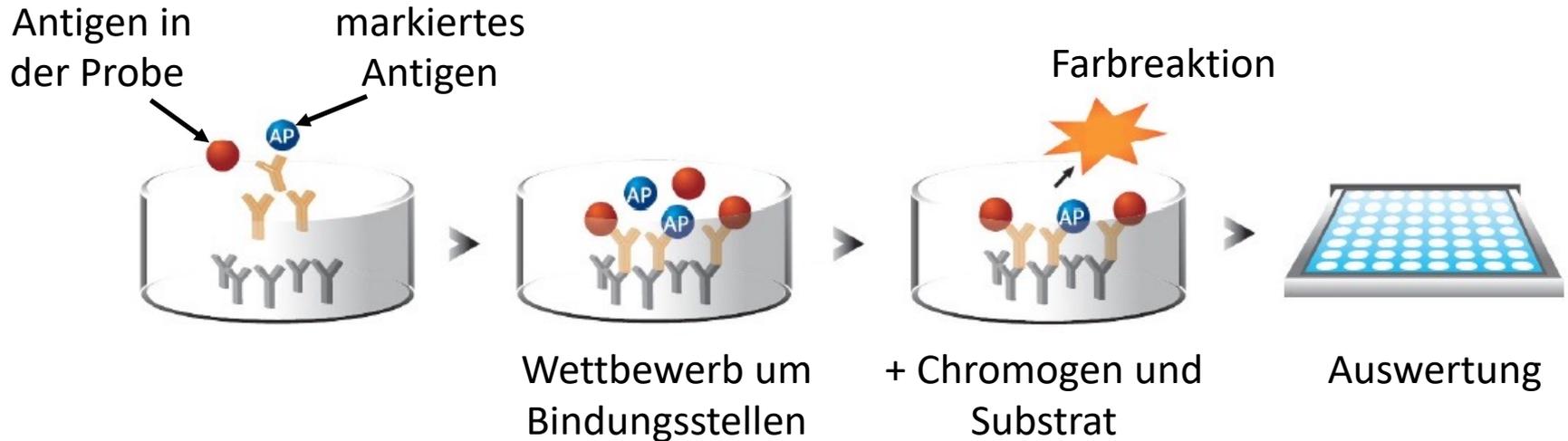
Anwendungen: Detektion spezifischer Antigene in der Probe.

z.B.:

- Zytokine
- Tumormarker
- Hormone
- Etc.

Voraussetzungen: der Fang- und der Primärantikörper müssen **verschieden Epitope** des gleichen Antigens erkennen.

Kompetitives ELISA



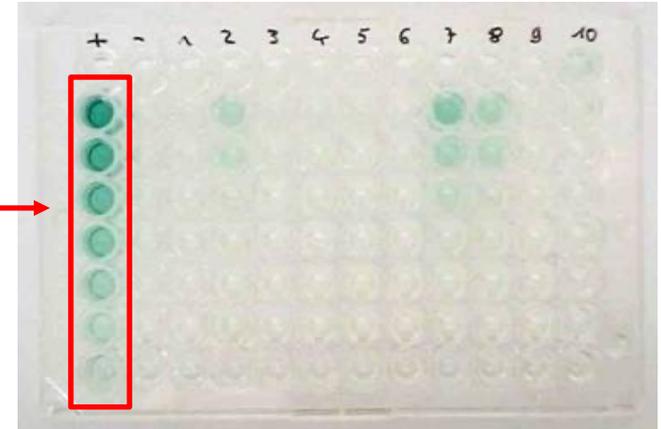
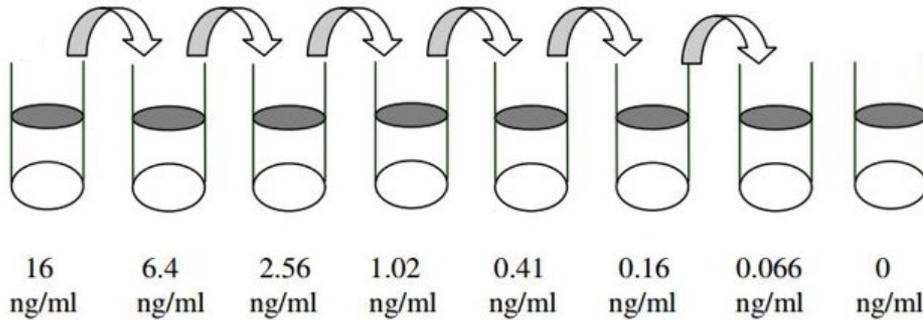
Anwendung: Detektion eines **spezifischen Antigens** in der Probe.

Prinzip:

1. Binden des anti-A Antikörpers zur Platte.
2. Eine bekannte menge des markierten Antigens wird zur Probe hinzugegeben.
3. Das unmarkierte Antigen der Probe wird mit dem **markierten** um die Bindungsstellen im Wettbewerb sein.
4. Die ungebundenen Komponenten werden durch Waschen entfernt.
5. Die Intensität der Farbreaktion ist Antiproportional zur Konzentration des Antigens in der Probe. (Je weniger Antigen in der Probe ist, desto mehr enzymmarkiertes Antigen kann die Antikörper binden.)

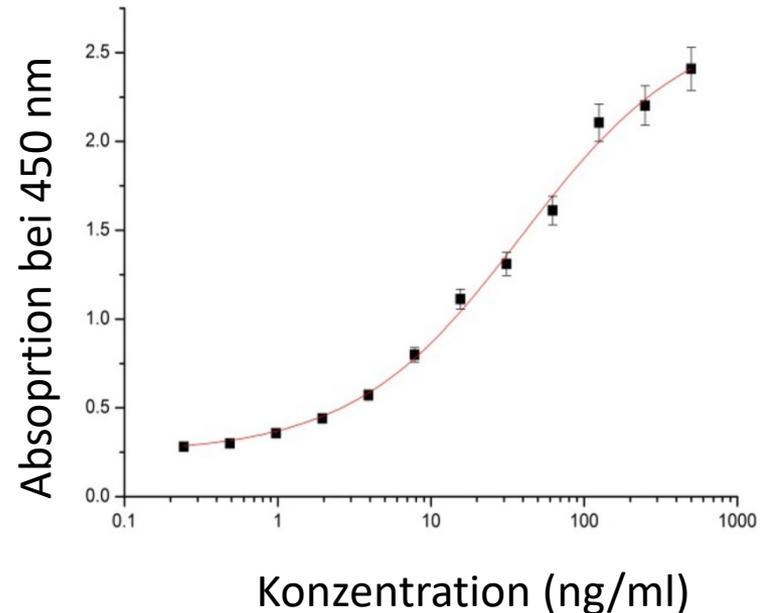
ELISA Auswertung I.

Standards mit bekannten Konzentrationen erstellen



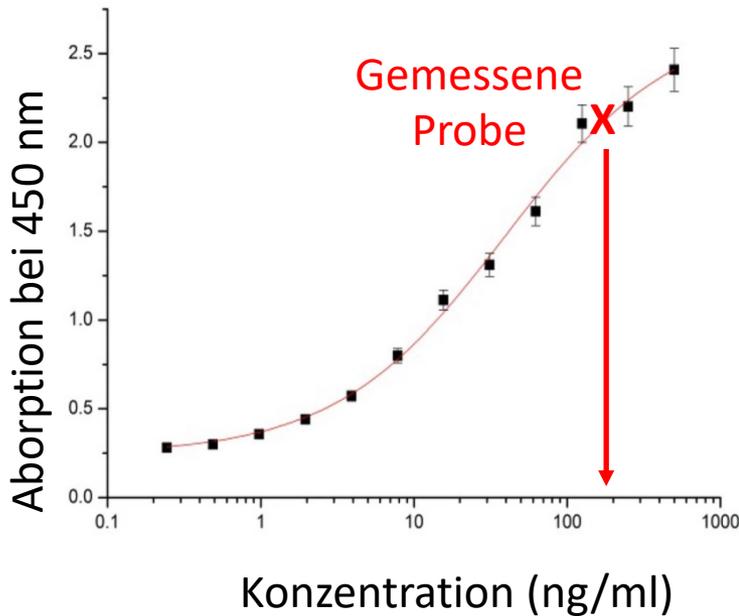
Ein ELISA Leser der die **Lichtabsorption** im Schacht der ELISA-Platte misst.

ELISA Standard Kurve:



ELISA Auswertung II.

Standard Kurve:



Die Konzentration des Antigens wird auf Basis der Lichtabsorption der Probe mithilfe der Standardkurve berechnet.

Qualitätskontroll-Zertifikat / Quality Control Certificate
Rheumatoid Factor Screen

Art-Nr. / Cat. No. ORG 522S Ch-B / Lot 522S81746 Verw. bis / Expiry Date 2010-04-28

Prüfwert / Test Value Sollbereich / Range

Standard A 0,015 A_{max} < 0,150
 Standard E 2,086 A_{min} > 1,300

Kontrollen / Control Sera: Lot K522845

Sollbereich / Range U/ml
 Control + 1 75 - 125
 Control - 2 < 25

Standardsurve / Calibration Curve Example:
 Curve fit: Vier-parameter (lin-log) / 4 parameter logistic fit
 Rheumatoid Factor Screen

ER limit: 3.000
 velengths: 450nm/620nm

2008-11-19
 Protokoll / Test Date: 2008-11-19
 Qualitätskontrollreferent / Quality Control Manager: M. Müller

ORGENTEC Diagnostika GmbH, Postfach 103032, D-50334 Meerbusch

Orgentec stoppig
 Probenpuffer ANA/ENA 0012
 Orgentec WP 0013

Quantitative Results
 4-Parameter data model
 A = 0.04734 B = 1.088 C = 121.4 D = 3.426

Rheumatoid Factor Screen

Well Location	Patient ID	O.D. Data	U/ml Data	Flag
B1	S1	0.044	*****	
C1	S2	0.367	15.2	
D1	S3	0.966	49.1	
E1	S4	1.939	151.4	
F1	S5	2.831	500.9	

Well Location	Patient ID	O.D. Data	U/ml Data	Flag
G1	PC1	1.590	103.4	

BEP2000 Version 1.23.4
 RFS2090320

BEP2000: 9163000452

Ergebnis einer ELISA Routinediagnostik (Rheuma Faktor Messung)

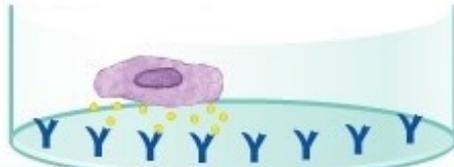
Die Bedeutung von ELISA

- Medizinische Diagnostik:
 - Diagnostik der **autoimmunen Störungen**^[5.] (Detektion von Autoantikörpern)
 - Diagnostik von **infektösen Krankheiten**^[6, 7.] (Detektion von entweder mikrobiellen Antigenen oder Antikörpern die dagegen produziert werden, z.B. Detektion von anti-HIV Antikörpern im **HIV Screening**)
 - Messen der Konzentrationen spezifischer **Serumproteine**, z.B. CRP, Hormone ^[8.] (β -hCG, TSH, usw.), Zytokine, Tumormarker^[9, 10.] (z.B. AFP, PSA, CEA, usw.)
- Industrieller Nutzen:
 - Detektion von **Lebensmittelallergenen**^[11, 12.] (z.B. Gluten, Erdnuss, Milchproteine, usw.)
 - Detektion von **Toxinen** in Lebensmitteln^[13.]
 - Testen der Antikörperproduktion von **Hybridomen**^[4.]
 - Detektion bestimmter industrieller Schadstoffe in Industrieabfällen ^[14.]
- Forschung

ELISPOT

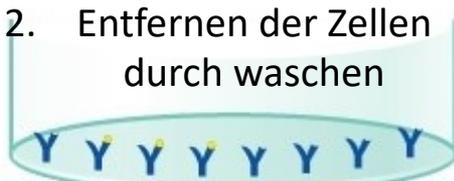
ELISPOT Test^[15.]

1. Tag

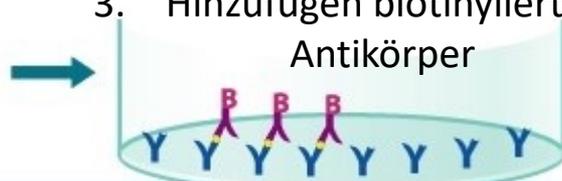


1. Inkubation der antigenproduzierenden Zellen auf einer Platte die mit spezifischen Fangantikörpern bedeckt ist.

2. Tag



2. Entfernen der Zellen durch waschen



3. Hinzufügen biotinylierter Antikörper

3. Tag



4. Hinzufügen von enzym-markiertem Streptavidin



5. Hinzufügen von Chromogen

- Y Fang-Antikörper
- Untersuchtes Antigen
- B biotinylierter Antikörper
- ◆ enzym-markiertes Streptavidin
- Farbiges Endprodukt
- Chromogen

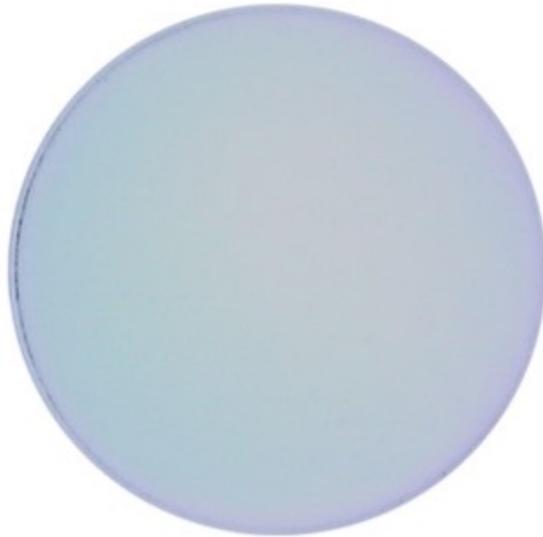


6. Bildung eines **unlöslichen Endprodukts** am Ort der Antigenproduktion.

Es wird zur Messung der **Antigensekretion** von Zellen genutzt.
z.B.:
Zytokinproduktion

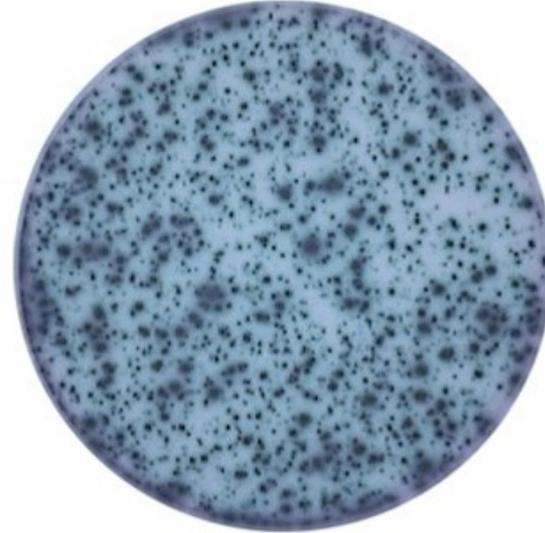
IFN γ Produktion in T Zellen

unbehandelte T Zellen:



0 Spots

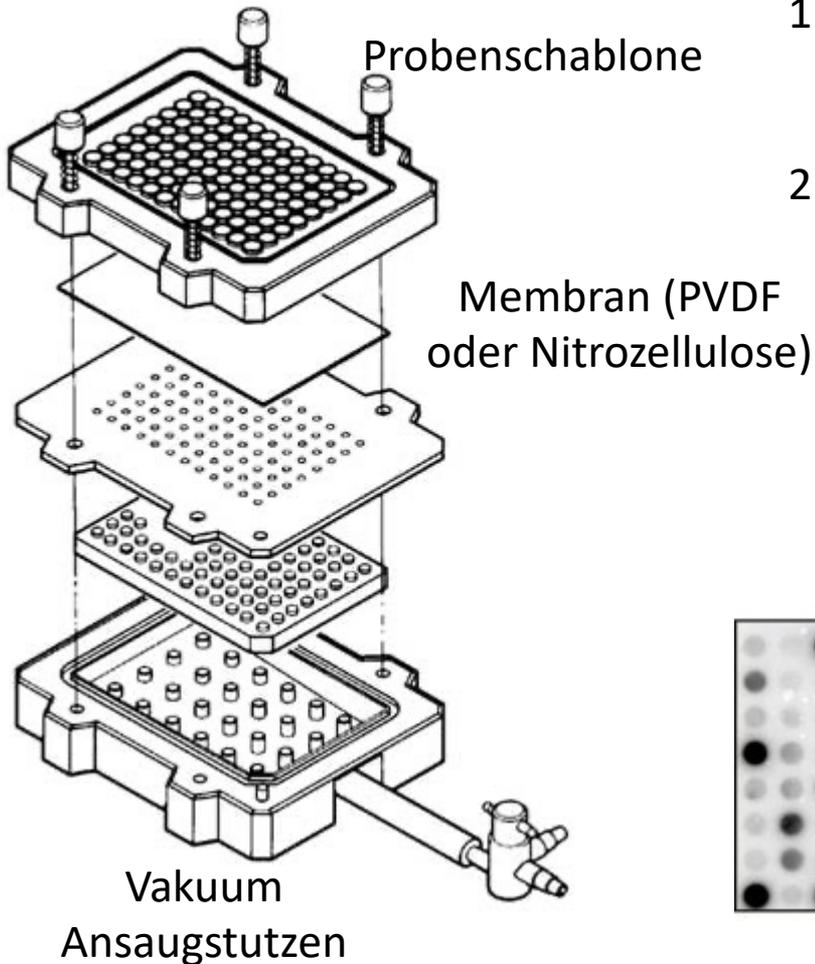
T Zellen stimuliert mit
anti-CD3 Antikörpern.



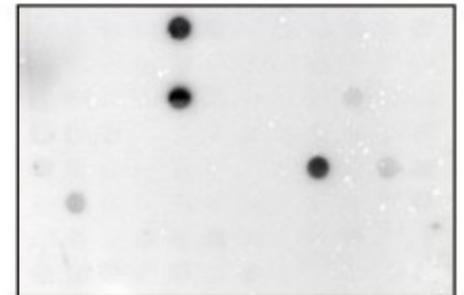
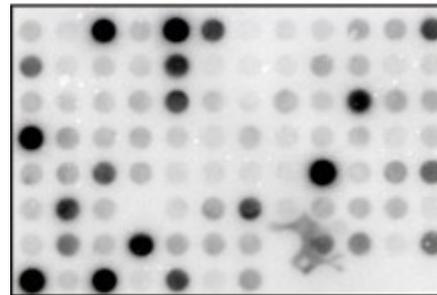
760 Spots

Erkennung des Interferon Gamma (IFN γ) mit **ELISPOT**. Die Zellen wurden in eine Platte gelegt. Das IFN γ das sie produzierten wurde sofort von Fang-Antikörpern gebunden. Das gebundene IFN γ wurde mithilfe einer enzymatischen Reaktion detektiert. Die stimulierten T Zellen wurden aktiviert und produzierten große Mengen IFN γ .

Dot blot

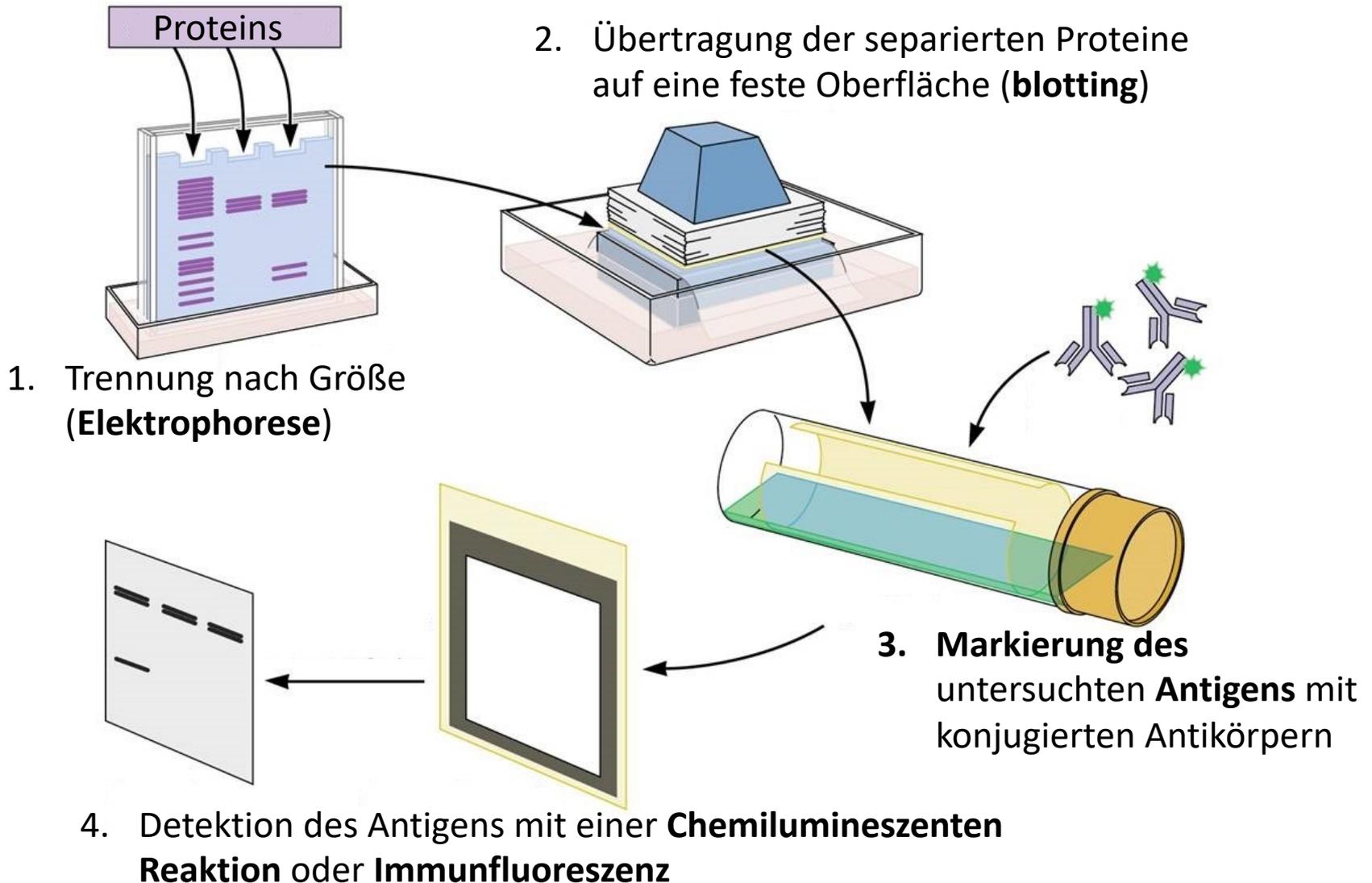


1. Man tut einen Tropfen der Antigen-enthaltenden Probe auf eine feste Fläche (Membran).
 2. Das Antigen das an die Fläche gebunden ist wird durch markierte Antikörper detektiert, entweder mit einem Chromogen oder einer Chemilumineszenten Reaktion (siehe später).
- Anwendung:** Detektion von spezifischen Proteinen in einer Probe gemischter Proteine.



Vergleich zweier unterschiedlicher Proben für die gleiche Proteine mit Dot blot.

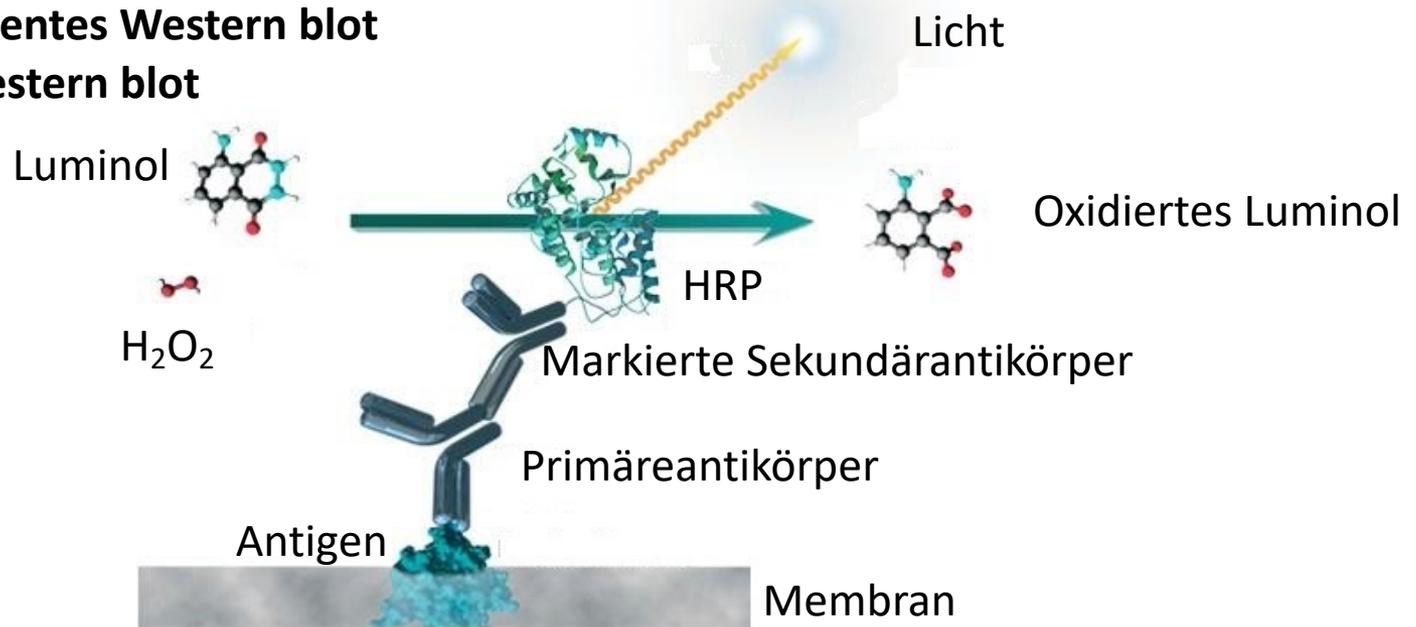
Western Blot^[16.]



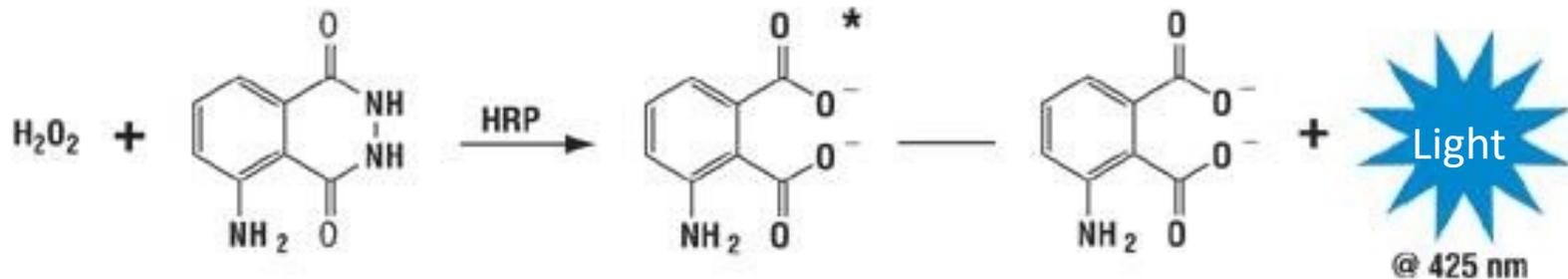
Detektion des Antigens

Es gibt mehrere Methoden zur Darstellung gebundener Antigene, am häufigsten genutzt sind [17.]:

- Chemilumineszentes Western blot
- Fluoreszenz Western blot

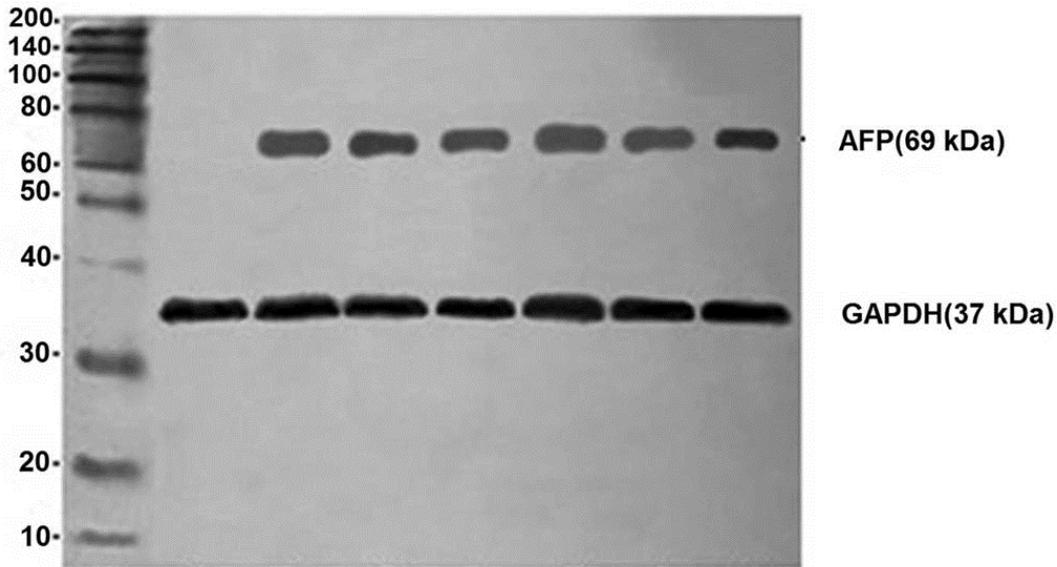


Die chemilumineszente Reaktion des Luminols:

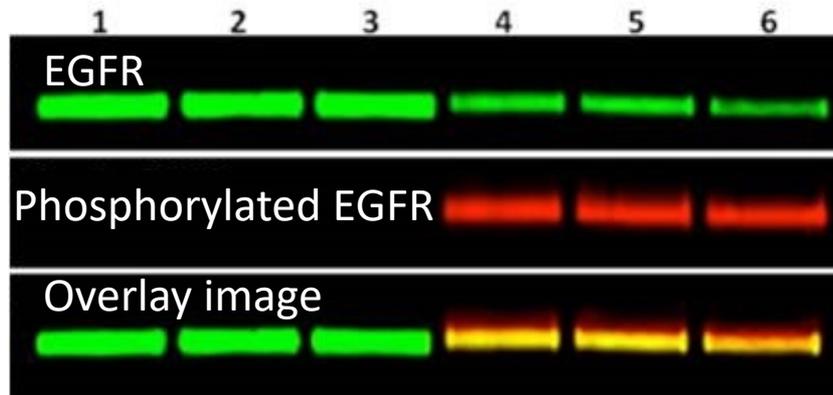


Beispiele

Simultane Detektion des AFP und GAPDH (Quantitätskontrolle) mit **chemilumineszenter Technik**:



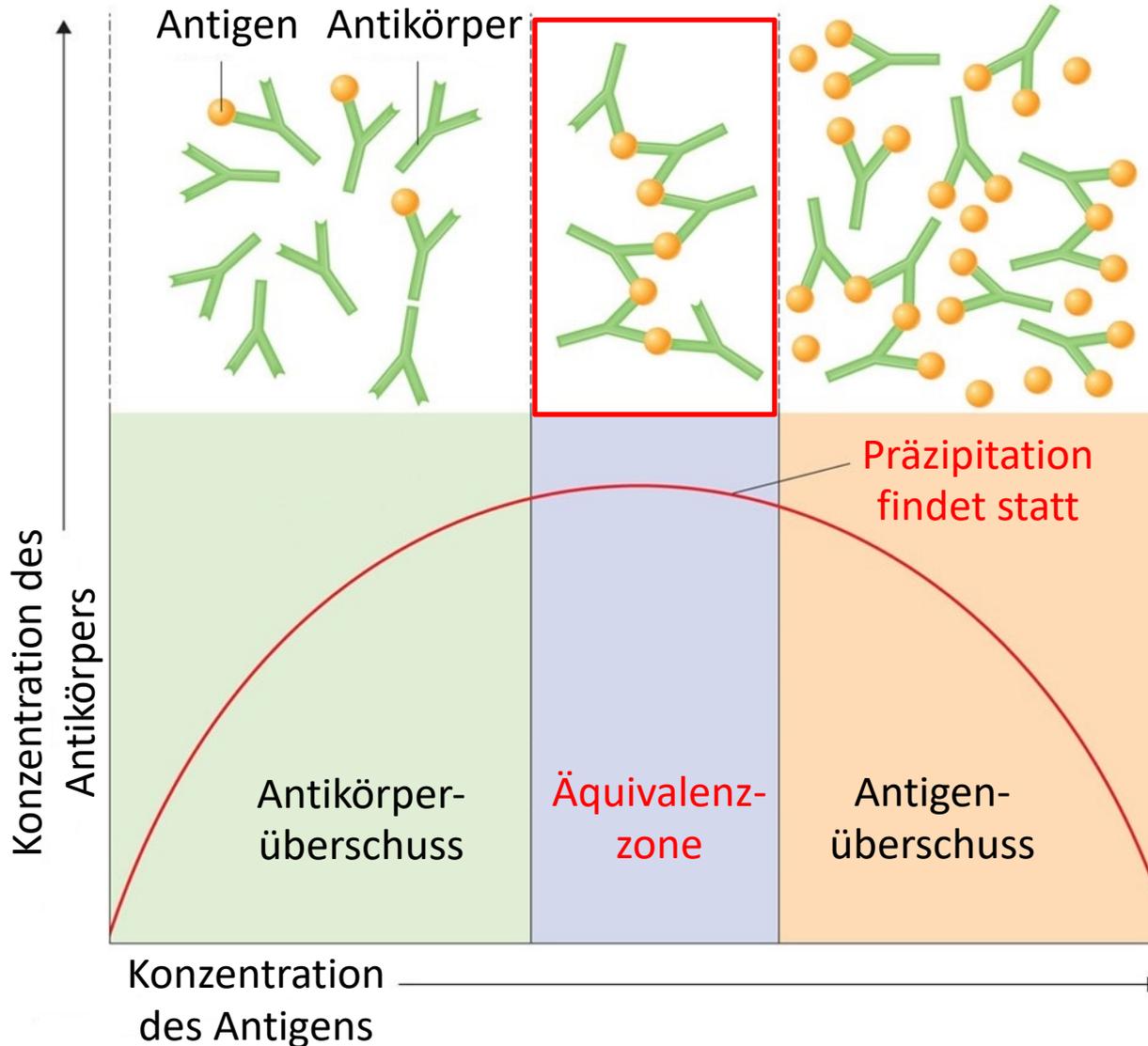
Untersuchung der EGFR Phosphorylierung mit **Fluoreszenz Western blot**:



Bedeutung des Western Blot:

- Zu was ist es in der Lage?
 - Es **kann spezifisch Proteine** in einer **gemischten Proteinprobe detektieren** und gibt auch Information über **Größe** und **Menge** des untersuchten Proteins. (**Semiquantitative** Methode)
 - **Protein-Protein Interaktionen** können mit Immunpräzipitation detektiert werden.
 - Kann für **funktionelle Tests**, wie die untersuchung der Proteinphosphorylierung in Zellen, genutzt werden.
- Wird extensive in der Forschung verwendet.
- Der Nutzen für diagnostische Zwecke ist begrenzt da es **schwer zu standardisieren** ist.^[18.]
- Einige Beispiele diagnostischer Nutzung:
 - Bestätigung bestimmter **infektöser Krankheiten** z.B.:
 - Lyme-Borreliose^[19.]
 - BSE (Bovine Spongiform Enzephalopathie, „mad cow disease“)^[20.]
 - Bestätigung einer HIV Infektion im Fall eines positive ELISA screening Tests.^[21.]

Präzipitation



Wenn das Antigen und der erkennende Antikörper in der gleichen Lösung im richtigen Verhältnis (Äquivalenzzone) vorhanden sind bilden sich größere Immunkomplexe.

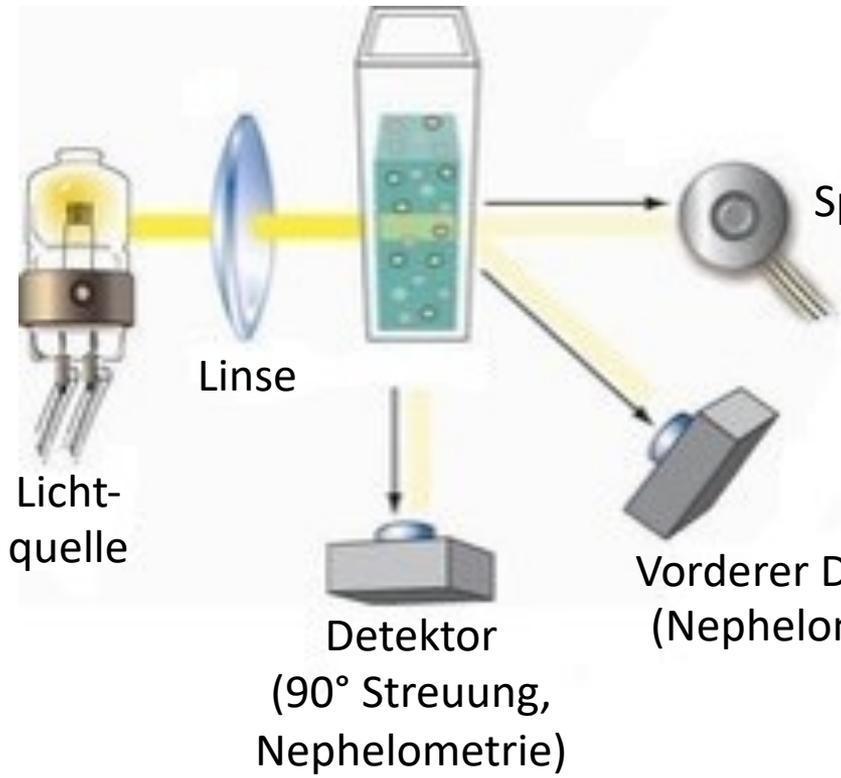


Die Löslichkeit dieser Komplexe sinkt und sie präzipitieren.

Methoden die auf Immunpräzipitation basieren:

- **Immundiffusion**
- **Immunelektrophoresis**

Nephelometrie, Turbidimetrie



Makromoleküle (z.B. Immunkomplexe) in **Lösungen streuen Licht**. Die Streuung ist proportional zur Größe der Partikel



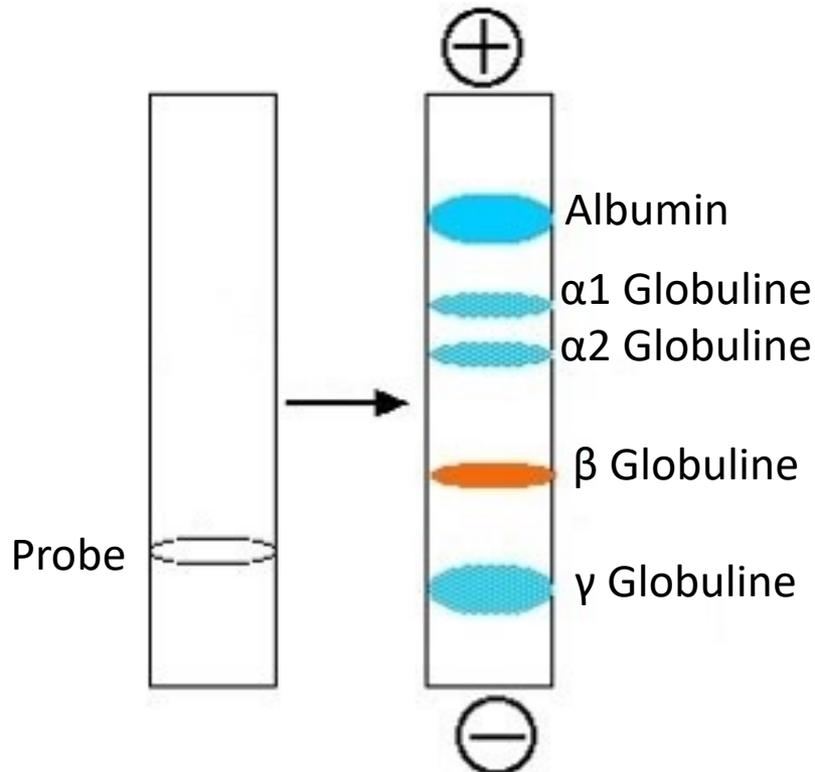
Der Analyt kann mit Nephelometrie durch **Lichtstreuung** identifiziert werden. Während Licht die Küvette durchtritt **sinkt die Intensität des Lichts** was durch Turbidimetrie detektiert wird.^[14.]



Anwendungen: Messen der Konzentration von Immunkomplexen, z.B. IgA, IgM, IgG Spiegel oder die Spiegel der Leichtketten (z.B.. Multiples Myelom), Komplementspiegel

Serumproteinelektrophorese

- Die Elektrophorese des Serums wird bei alkalischem pH ausgeführt. Der Großteil der Proteine migriert zur positive Elektrode bei diesen Bedingungen. Die Proteine können mit unspezifischem Färbemittel detektiert werden.



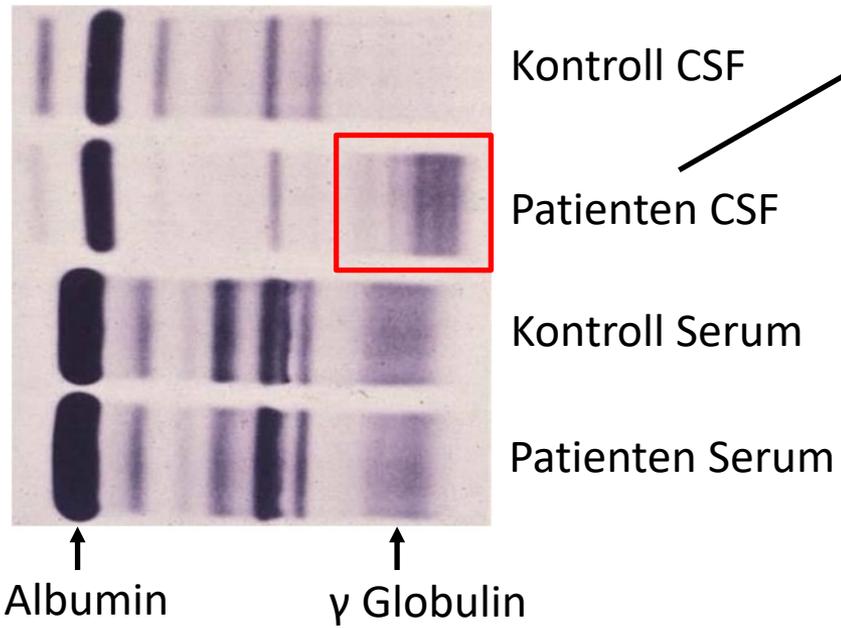
Arne Tiselius

Erhielt 1948 den Nobelpreis für Chemie:

„für seine Forschung über die Elektrophorese und Adsorptionsanalyse, besonders für seine Entdeckungen bezüglich der komplexen Natur der Serumproteine.“^[5.]

Elektrophorese anderer Körperflüssigkeiten

Zerebrospinalflüssigkeit (CSF)

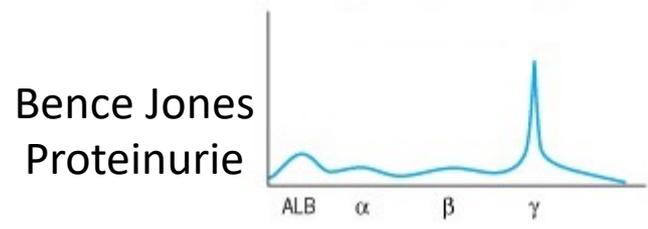
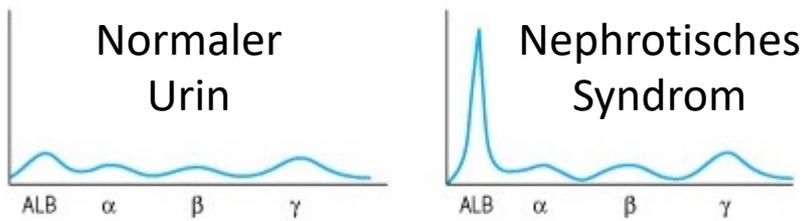


In der CSF des Patienten können individuelle Bänder in der gamma Globulin Fraktion gesehen werden. Die detektierten Muster unterscheiden sich von denen im Patientenserum.

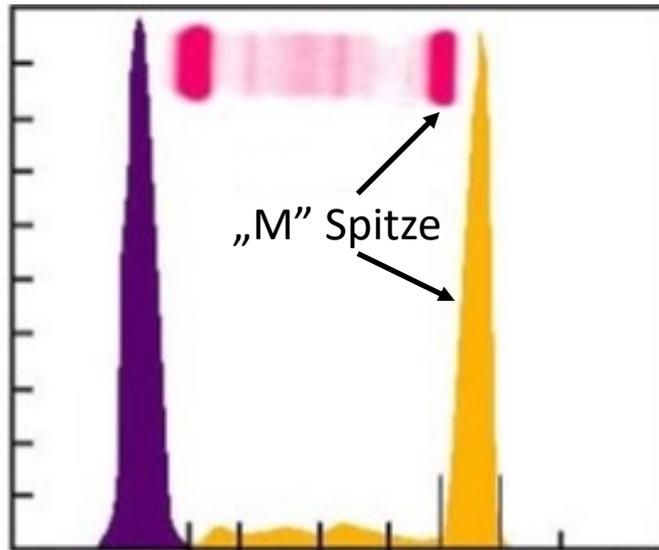
↓
 Immunglobuline werden local im ZNS des Patienten produziert. (**oligoklonale Gammopathie**, z.B. bei **Multiple Sklerose**^[9.])

Urin Elektrophorese:

Wird parallel zur Serumelektrophorese durchgeführt wenn **Multiples Myelom** vermutet wird. Man versucht die Immunoglobulin Leichtkette (Bence Jones Protein^[10.]) im Urin zu finden.



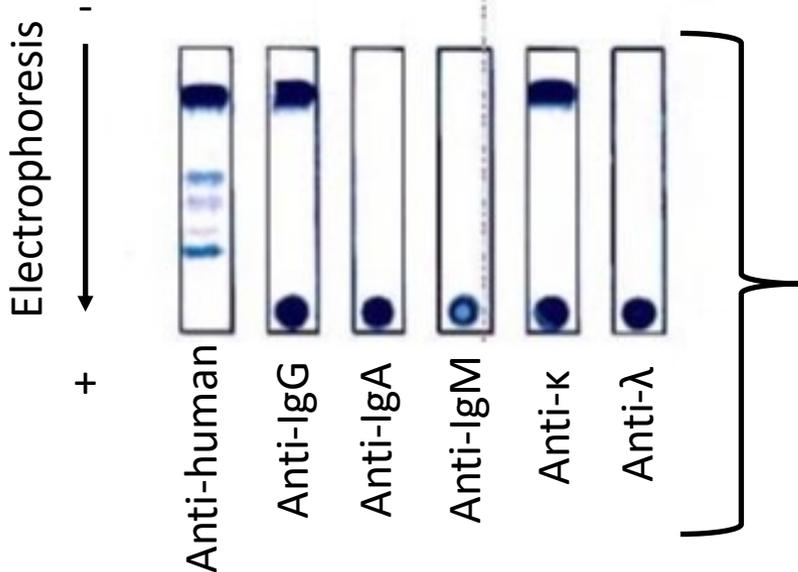
Immunfixation



1. Die Elektrophorese wird simultan durchgeführt indem das Serum parallel in mehrere Proben unterteilt wird.^[12.]
2. Bestimmte Proteine werden durch Nutzung verschiedener Antikörper in unterschiedlichen Gelen detektiert. (Die hinzugefügten Antikörper präzipitieren mit dem Antigen, was normalerweise mit Färbemittel detektiert wird. Die Antigene sind meistens selbst die humanen Immunglobuline.)

Anwendungen:

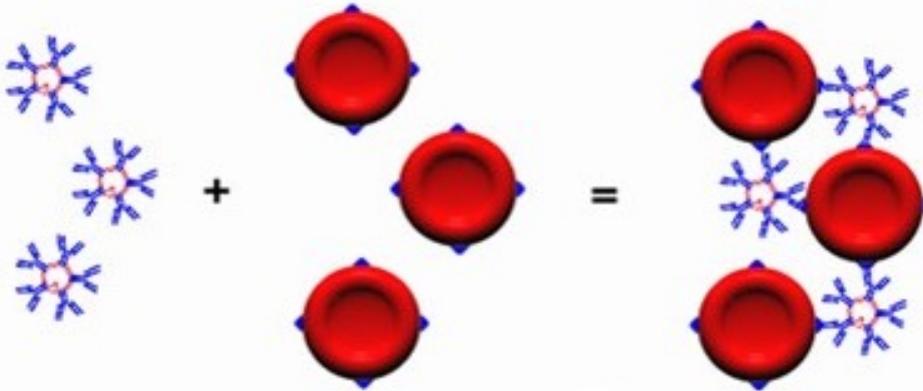
- Diagnostik von Plasmazellneoplasien durch Erkennung abnormaler monoklonaler Antikörper („**Paraproteins**“) im Serum die sie produzieren.^[13.]



Multiples Myelom produziert monoklonale Antikörper des IgG κ Isotyps.

Agglutination

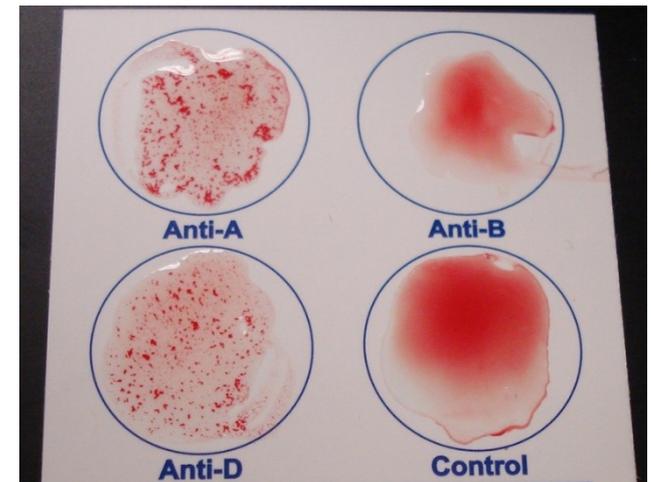
- Falls Antikörper größere Partikel verbinden und zu aggregation dieser Partikel führen = **Agglutination** (im Fall von Erythrozyten wird es **Hämagglutination** genannt)
- Agglutination ist eine der **physiologischen Funktionen** der Antikörper, Agglutination von Pathogenen verhindert die Ausbreitung von Infektionen. [15.]
- Kann **direkt** oder **indirekt** und **aktiv** oder **passiv** sein.
- Viele diagnostische Tests basieren auf Agglutinationsreaktionen wobei die klumpenden Partikel direkt sichtbar werden.



Anti-„A“ IgM

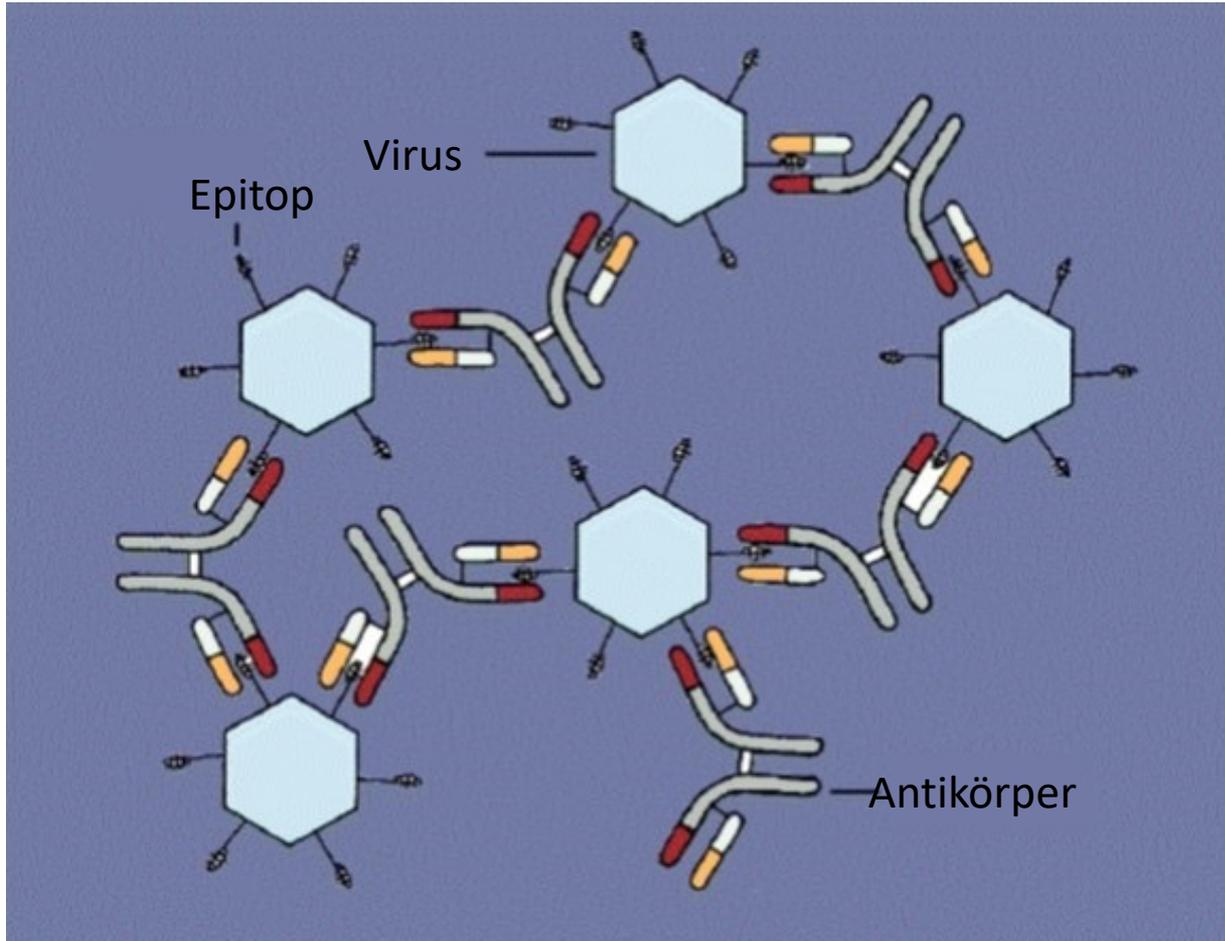
RBC mit „A“
Antigen

Hämagglutination



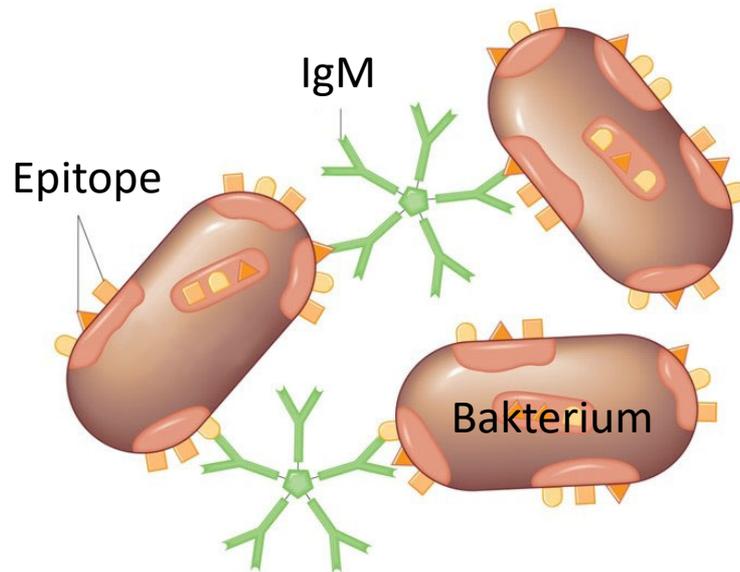
Blutgruppentest: A, Rh(D)
positiv

Physiologische Rolle der Agglutination



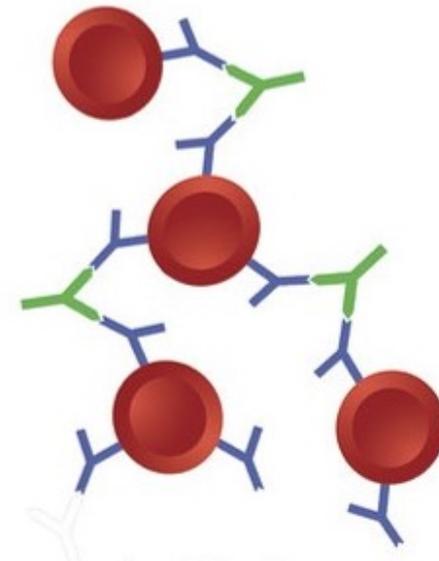
Direkt oder indirekt

Direkte Agglutination:



- Die Partikel werden durch primäre Antikörper miteinander verbunden.
- Antikörper des **IgM** isotyps können effektiv Partikel agglutinieren.

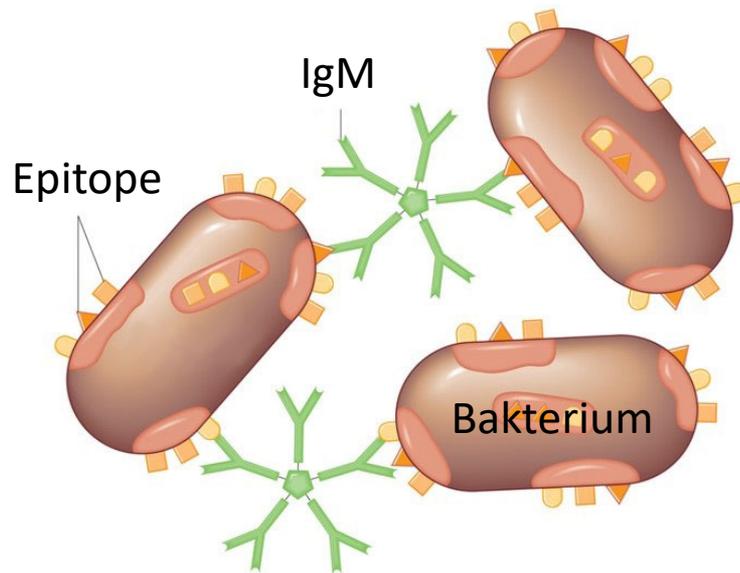
Indirekte Agglutination:



- Sekundäre Antikörper verbinden die Partikel.

Aktiv oder passiv

Aktive agglutination:



Passive agglutination:

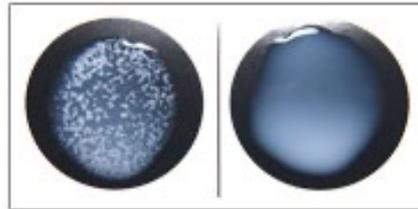


- Die/das Zelle/Partikel nimmt an der Reaktion mit **eigenen Oberflächenantigenen** teil.
- Beispiele:
 - Blutgruppenbestimmung
 - Bestimmung bakterieller Zelloberflächenantigene
- Das Antigen wird **künstlich** an Partikel **gebunden** die an der Reaktion teilnehmen. Beispiel:
 - Latexagglutination Reaktionen (siehe die nächsten Folien)

Die klinische Bedeutung der Agglutination

- Eine der physiologischen Funktionen der Antikörper zum Schutz vor Pathogenen.
- In vivo Hämagglutination kann bei bestimmten Krankheiten stattfinden. (z.B. **Autoimmune hämolytische Anämie, AIHA**)
- Diagnostische Tests:
 - **Latexagglutinations Tests:**
 - **Autoimmune Störungen** (Detektion von Autoantikörpern)
 - **Infektionen** (Detektion mikrobieller Antigene oder der Antikörper die diese erkennen)
 - Detektion anderer Proteine (z.B. CRP, hCG, D-Dimer)
 - **Tests die auf Hämagglutination basieren:**
 - **Bestimmung von Blutgruppen**
 - **Coombs Test (Antiglobulin Test)**
 - Hämagglutinations Assay
 - Hämagglutination-Inhibitions-Assay:
 - Identifikation viraler Hämagglutinine
 - Testantikörper die virale Hämagglutinine hemmen können.

Latexagglutinations Test



Positiv Negativ

Das/Der Antigen/Antikörper das am der Reaktion teilnimmt wird an die Oberfläche von **Latexkugeln** gebunden.

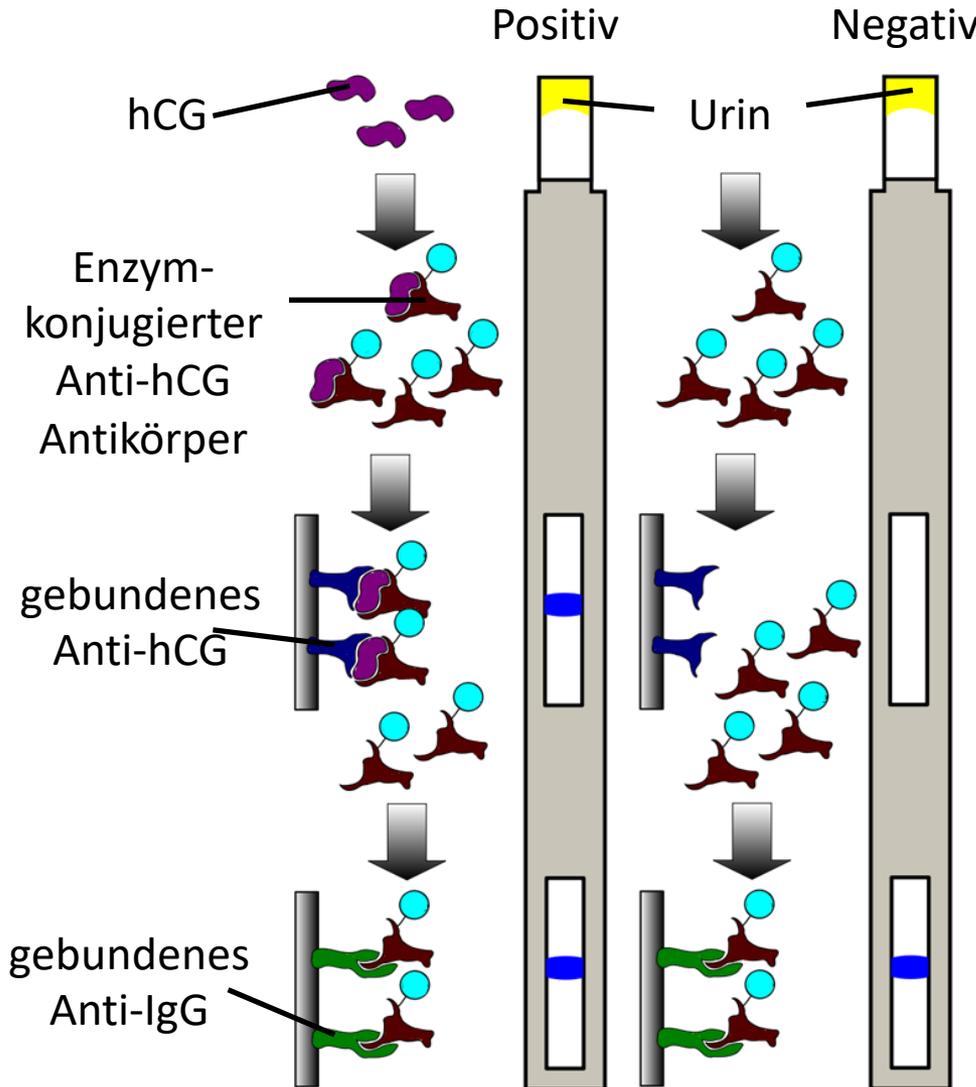


Falls der untersuchte Antikörper/Antigen in der Probe ist, kommt es zur Aggregation der Kugeln.

Anwendungen:

- **Diagnostik autoimmuner Störungen**, z.B.:
 - Rheumatoide Arthritis (Rheuma Faktor, RF^[16.]) , SLE (verschiedene autoantibodies)
- **Diagnostik infektiöser Krankheiten**, z.B.:
 - Erkennung von Antikörpern gegen mikrobielle Antigene (z.B. Anti-Streptolysin O Antikörper, ASO/AST^[17.])
 - Detektion bakterieller Antigene
- Detektion anderer Proteine, z.B.:
 - **C-reaktives Protein** (CRP, akut Phase Protein^[18.]), D-Dimer^[19.] (indiziert Blutkoagel Bildung), **humanes chorion Gonadotropin** (hCG, bei Schwangerschaft)

Heim Schwangerschaftstest



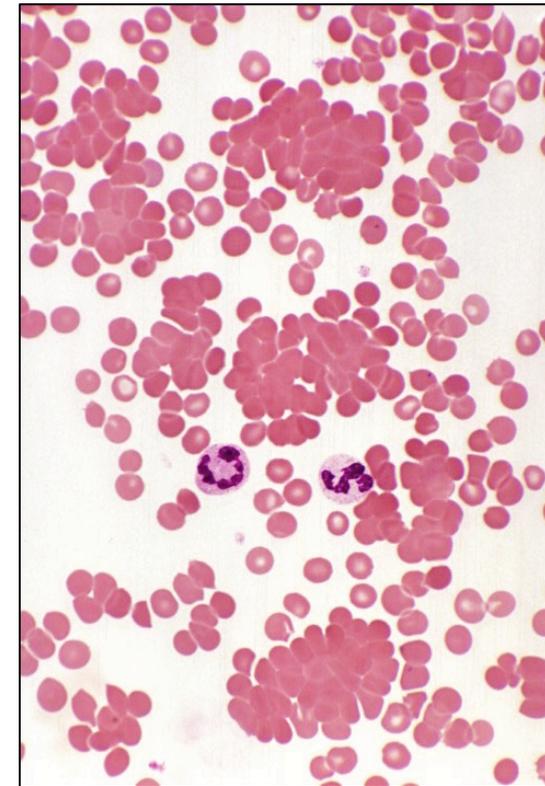
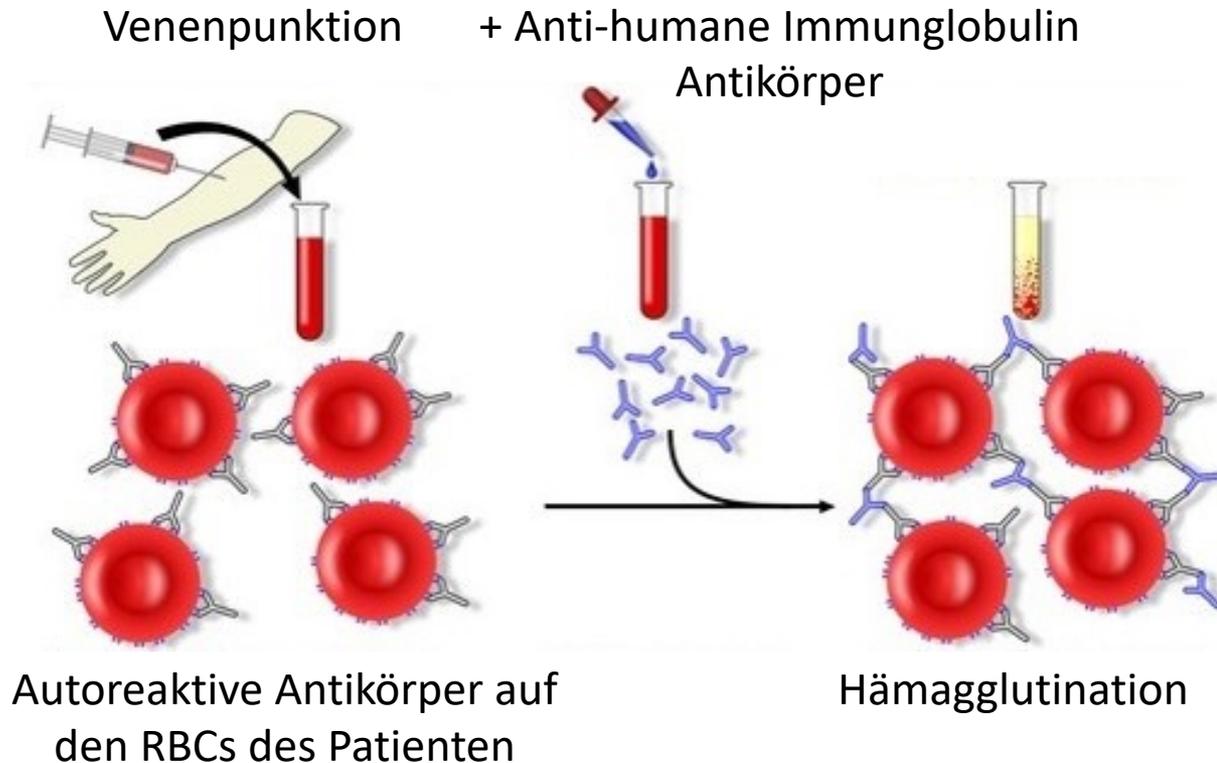
Nach der Befruchtung taucht hCG das von Trophoblasten produziert wird im Urin der Mutter auf.

hCG kann durch mehrere immunologische Methoden (wie ELISA oder Agglutination) detektiert werden aber der Heimtest basiert auf **Chromatographie**.^[20.]



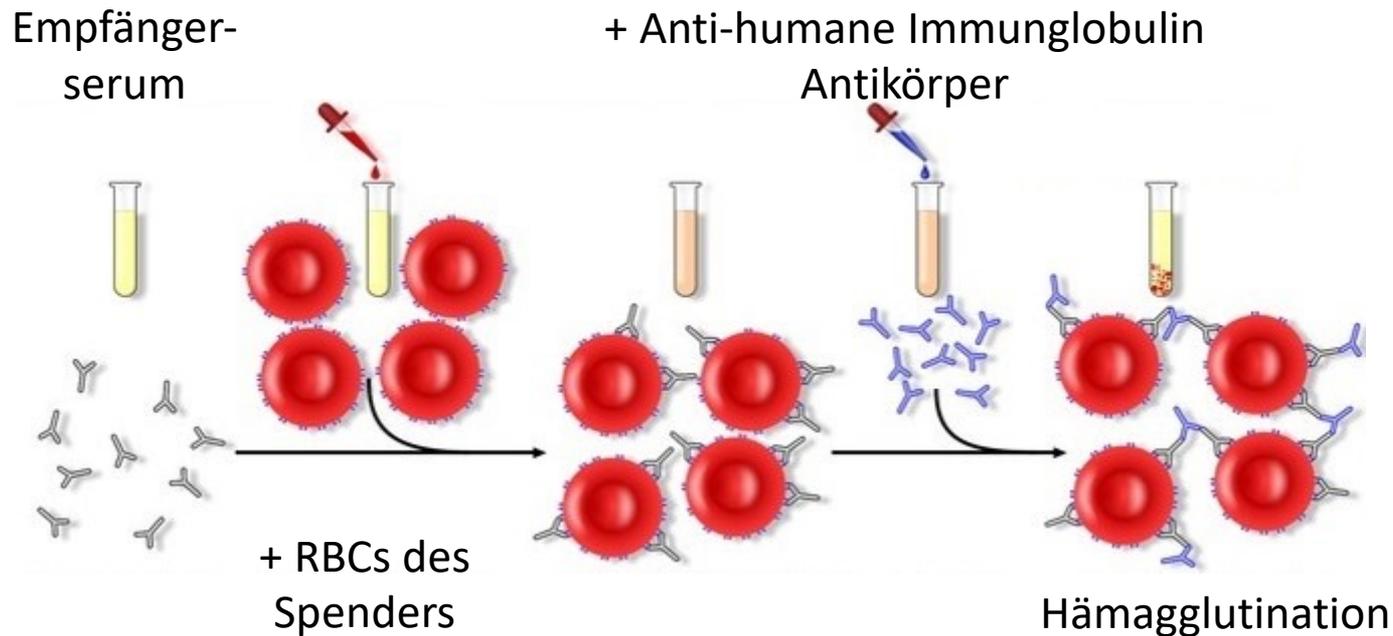
Streifen bilden sich nur wenn der enzyme-konjugierte Antikörper gebunden wird. Ist hCG nicht im Urin dann wird nur anti-IgG die markierten Antikörper binden und nur ein Band (die Kontrolle) wird erscheinen.

Direkter Coombs Test (Direkter Antiglobulin Test^[21.])



- Anwendungen: Diagnostik der **Immun-medierten Hämolyse**,^[22.] z.B.:
- AIHA (Autoimmune Hämolytische Anämie, Anämia= RBC Zahl ↓)
 - Erythroblastosis Foetalis (Hämolytische Krankheit des Neugeborenen, HDN)
- In vivo Hämagglutination in einem Patient mit AIHA.

Indirekter Coombs Test (Indirekter Antiglobulin Test)

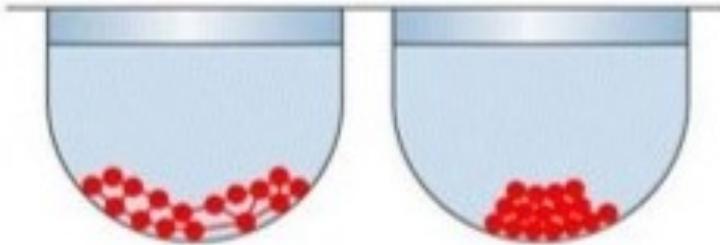
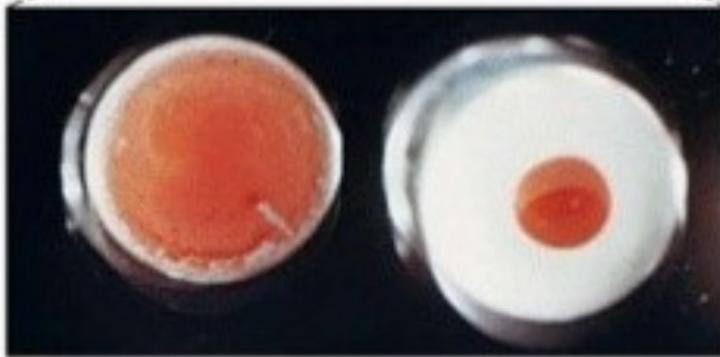


Anwendungen:

- Antikörper-screening vor einer **Bluttransfusion**.^[23.] (um Antikörper zu detektieren die mehrere seltene Blutgruppen außerhalb des ABO oder Rh Systems erkennen)
- Um **schwängere Frauen** auf anti-Rh(D) Antikörper zu **screenen**, die die Plazenta überqueren können und zu Erythroblastose führen. ^[24.]

Hämagglutinations assay

1:20 1:40 1:80 1:160 1:320 1:640 Kontrolle

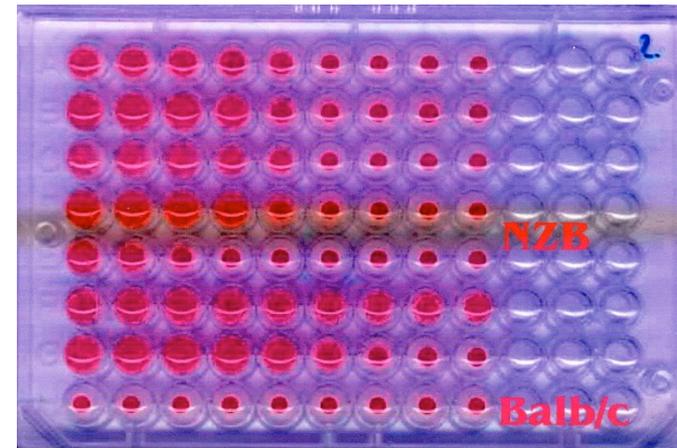


Hämagglutination

Negativ

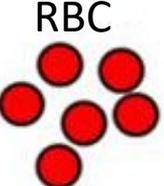
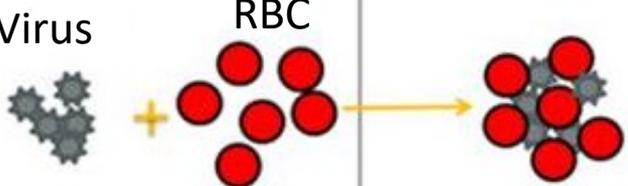
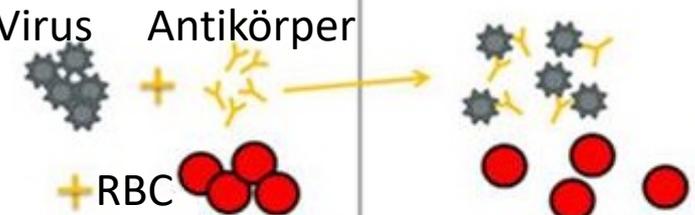
Gleiche Mengen von RBCs werden in jeden Schacht gegeben. 2-Fache verdünnungen der Probe werden dann erstellt und in die Schächte gegeben. ↓

Im Fall einer **positiven Reaktion** aggregieren die RBCs und können folglich nicht am Boden des Brunnens ruhen. (HA Titer: die kleinste Konzentration der Probe die noch Agglutination verursacht)



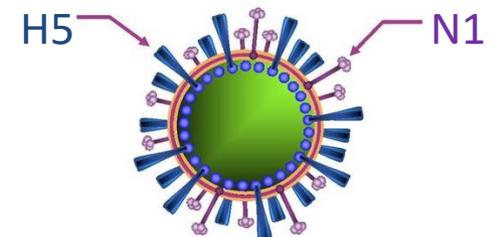
- NZB: Neu Seeland Black Mausspezies^[25.] (Maus Model der AIHA)
- BALB/c: Albino Gattung der Hausmaus (Kontrolle)

Hämagglutinations Inhibitions Assay

Komponenten	Reaktion	Ergebnis
RBC		Keine Reaktion 
Virus + RBC		Hämagglutination 
Virus + Antikörper + RBC		Keine Reaktion 

Einige Viren verfügen über Proteine die in vitro Hämagglutination verursachen können („Hämagglutinine“) z.B.:

- **Influenza Hämagglutinin**
- Masern Hämagglutinin
- Mumps Hämagglutinin

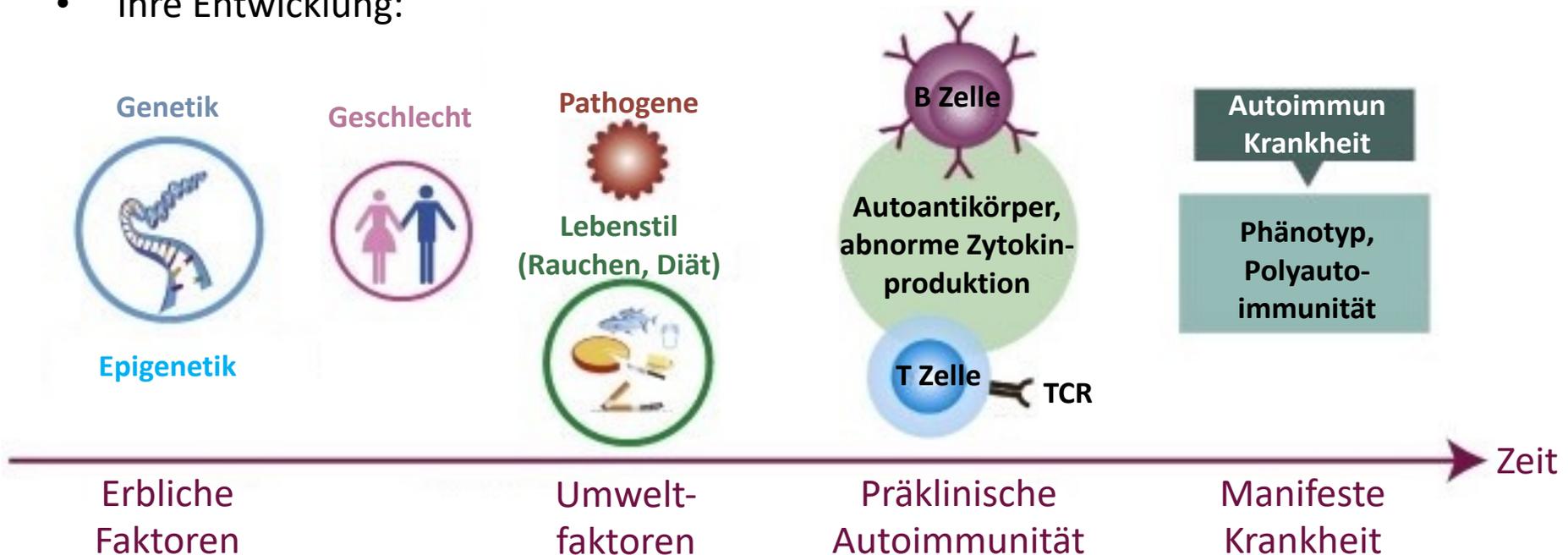


- Diese Methode kann genutzt werden um **Viren** auf basis ihrer **viralen Hämagglutinantigene zu klassifizieren.**^[26.] z.B.: H5N1 = Influenza Virus mit Typ 5 Hämagglutinin (und Typ 1 Neuraminidase).
- Kann auch genutzt werden um die Spiegel der Anti-Hämagglutinin Antikörper in Personen die Impfungen gegen solche Viren bekommen haben zu bestimmen. ^[26.]

AUTOANTIKÖRPER DIAGNOSTIK

Autoimmune Störungen

- Betreffen 7-8% der Bevölkerung.
- Zeigen starke **weibliche Dominanz**. (z.B. das Mann:Frau Verhältnis in SLE ist 1:9)
- Viele betreffen **junge Erwachsene**.
- Mehrere können zusammen im Gleichen Patienten auftreten. → **Polyautoimmunität** (z.B. eine zweite autoimmune Krankheit tritt in 41% aller SLE Patienten auf)
- **Es sind chronische Krankheiten!**
- Ihre Entwicklung:



Klassifikation der Autoimmunkrankheiten

Autoimmune Störungen
(siehe klinischer Teil)

Systemische Krankheiten
(betreffen den ganzen Körper)

Organspezifische Krankheiten
(betreffen ein bestimmtes Organ)



Rheumatoide Arthritis



Morbus Addison



Myasthenia gravis



Sklerodermie
(Systemische Sklerose)



SLE (Systemischer Lupus
Erythematosus)



Morbus Graves-Basedow

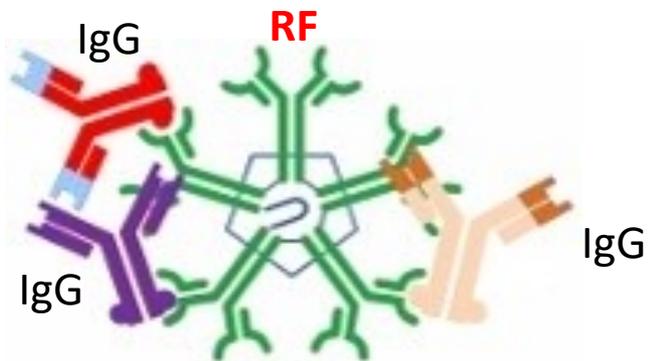


Organspezifische Autoantikörper

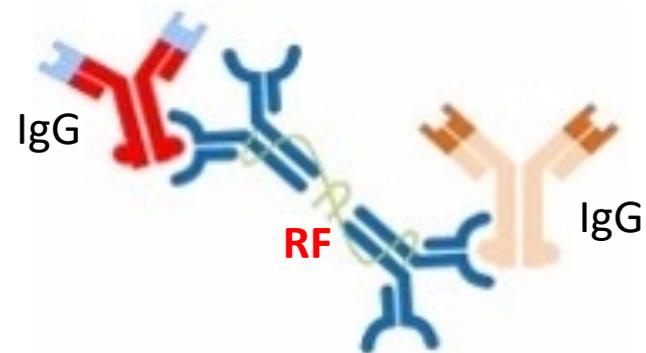
- Tauchen in organspezifischen autoimmunen Krankheiten auf.
- Einige Beispielziele von organspezifischen Autoantikörpern:
 - Typ I Diabetes Mellitus (T1D): Glutamat Decarboxylase (GAD), Tyrosin Phosphatase-like Protein (IA-2)
 - **Autoimmune Schilddrüsen Erkrankungen: Thyroperoxidase (TPO), Thyroglobulin (Hashimoto) oder TSH-Rezeptor (Graves-Basedow)**
 - Goodpasture Syndrome: Typ IV Kollagen (Basalmembran in den Glomeruli und der Lunge)
 - **Myasthenia gravis:** postsynaptische nikotinische **Acetylcholin Rezeptoren** (neuromuskuläre Junktion)
 - **Zöliakie: tissue Transglutaminase (tTG)**, Endomysium, Gliadin (letzteres ist eine Komponente des Gluten das u.a. in Weizen zu finden ist, und deswegen kein Autoantigen!)
 - Primäre biliäre Zirrhose: mehrere mitochondriale Antigene
- Nachweis solcher Autoantikörper kann **diagnostisch** genutzt werden und auch eine **prognostische Bedeutung** haben. Ihre Spiegel können auch gemessen werden um die **Effektivität der Behandlung zu überprüfen**.

Autoantikörper in Systemischen Krankheiten

- Beispiele:
 - **Antinukleäre Antikörper (ANA)**
 - Anti-citrullinierte Protein Antikörper (ACPA)
 - **Anti-Neutrophil Zytoplasmatische Antikörper (ANCA)**
 - **Rheumafactor (RF, anti-IgG Antikörper, normalerweise vom IgM Isotyp aber kann auch IgG oder IgA sein)**
 - Antiphospholipid Autoantikörper (pl. anti-Kardiolipin, anti- β 2 Glykoprotein I)
- Nachweis solcher Autoantikörper kann **diagnostisch** genutzt werden und auch eine **prognostische Bedeutung** haben. Ihre Spiegel können auch gemessen werden um die **Effektivität der Behandlung zu überprüfen**.



Rheumafaktor des IgM Isotyps



Rheumafaktor des IgA Isotyps

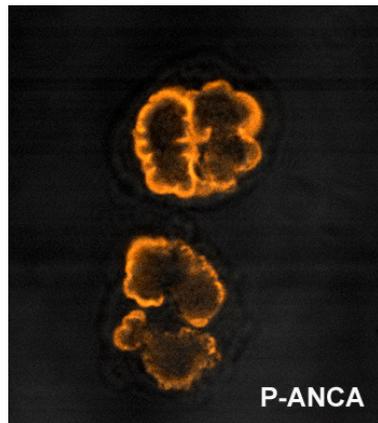
Antinukleäre Antikörper (ANA)

- Sie erkennen verschieden **nukleäre Strukturen** wie:
 - **Anti-doppelsträngige DNA Antikörper** (anti-dsDNA) → Vor allem in **SLE**
 - Anti-Smith (anti-SM), gegen Ribonukleoproteine → **SLE**
 - **Anti-Scl-70**, gegen Topoisomerase I → **Sklerodermie**
 - **Anti-Zentromer** Antikörper → **Sklerodermie**, primäre biliär Zirrhose
 - Anti-Ro (anti-SSA) und anti-La (anti-SSB) → Sjögren Syndrome, SLE
 - **Anti-Jo-1** gegen Histidyl-tRNA Synthetase → **Polymyositis, Dermatomyositis**
 - Anti-Histon Antikörper → Medikamenten-induzierte SLE

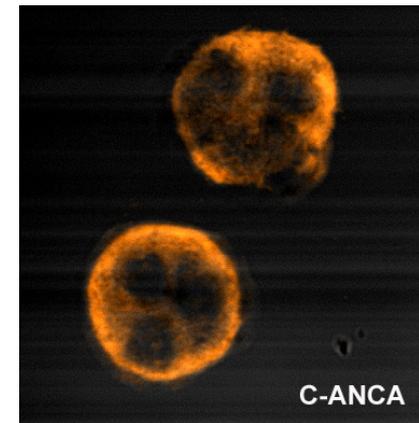
Anti-Neutrophil Zytoplasmatische Antikörper (ANCA)

Zwei Haupttypen:

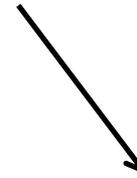
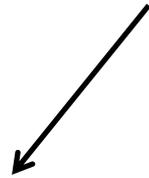
Perinukleäres Muster (p-ANCA)



Zytoplasmatisches Muster (c-ANCA)



Indirekte Immunfluoreszenz
Mikroskopie



- Antigen: v.a. **Myeloperoxidase (MPO)**

- Beispiele:

- Colitis Ulzerosa
- Churg-Strauss Syndrom
- Microscopische Polyangitis
- Primäre sklerotisierende Cholangitis

- Antigen: v.a. **Proteinase 3 (PR3)**

- Beispiele:

- Wegener Granulomatose (GPA: Granulomatose mit Polyangitis)

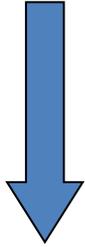
Nachweis von Autoantikörpern

- **Screening:**
 - **Direkte Immunfluoreszenz:** Bei Gewebeproben des Patienten genutzt. (z.B. Dermatologische oder nephrologische Krankheiten, siehe klinische Phase)
 - **Indirekte Immunfluoreszenz:** Das Patientenserum wird in verschiedenen Zellkulturen oder Gewebstypen auf Autoantikörper getestet.
 - Unterschiedliche Autoantikörper produzieren spezifische Muster mit bestimmten Zellen oder Geweben (z.B. homogen nukleär, nucleolär, zentromerisch, mitochondrial, zytoplasmatisch, etc.)
- **Antigenspezifische serologische Methoden:**
 - Genutzt **um die Diagnose** nach einem positive Screeningtest **zu bestätigen** oder nach der Auswertung der klinischen Zeichen und Symptome der Krankheit.
 - Methoden:
 - **ELISA**
 - **Western Blot**

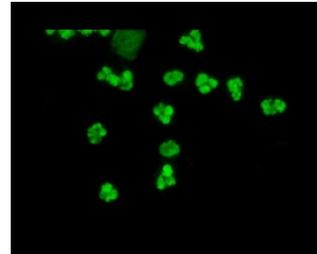


Eigenschaften der Tests

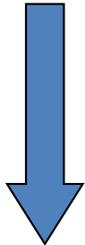
Immunfluoreszenz: nicht spezifisch, zeigt Muster, multiplex Bild, manuell, viele Autoantikörper können nicht nachgewiesen werden



Was ist das?



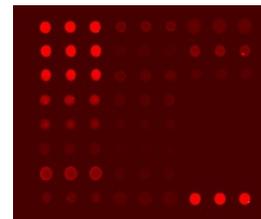
ELISA: antigenspezifisch, kann individuelle Autoantikörper messen, Kann automatisiert werden , kann neue Autoantigene identifizieren



Zeit?

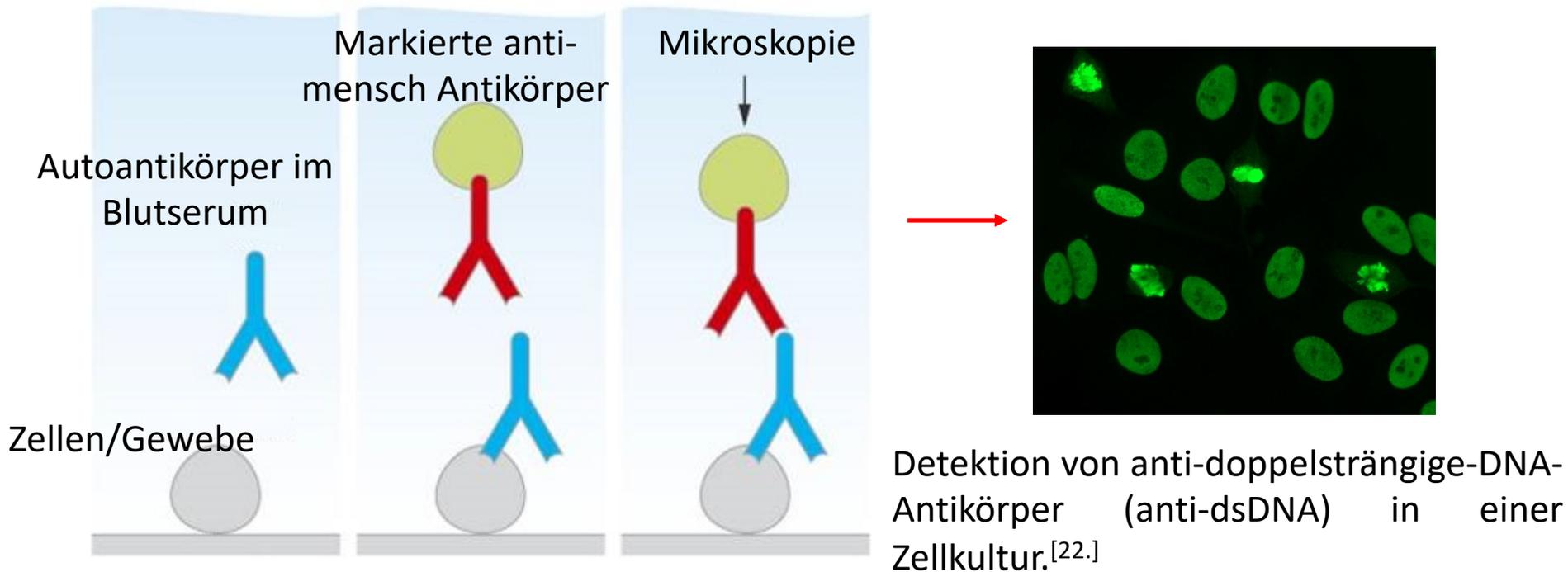
Multiplex microarray Technologie: antigenspezifisch, komplexe Autoantikörper Muster, kann automatisiert werden

Schnell und spezifisch

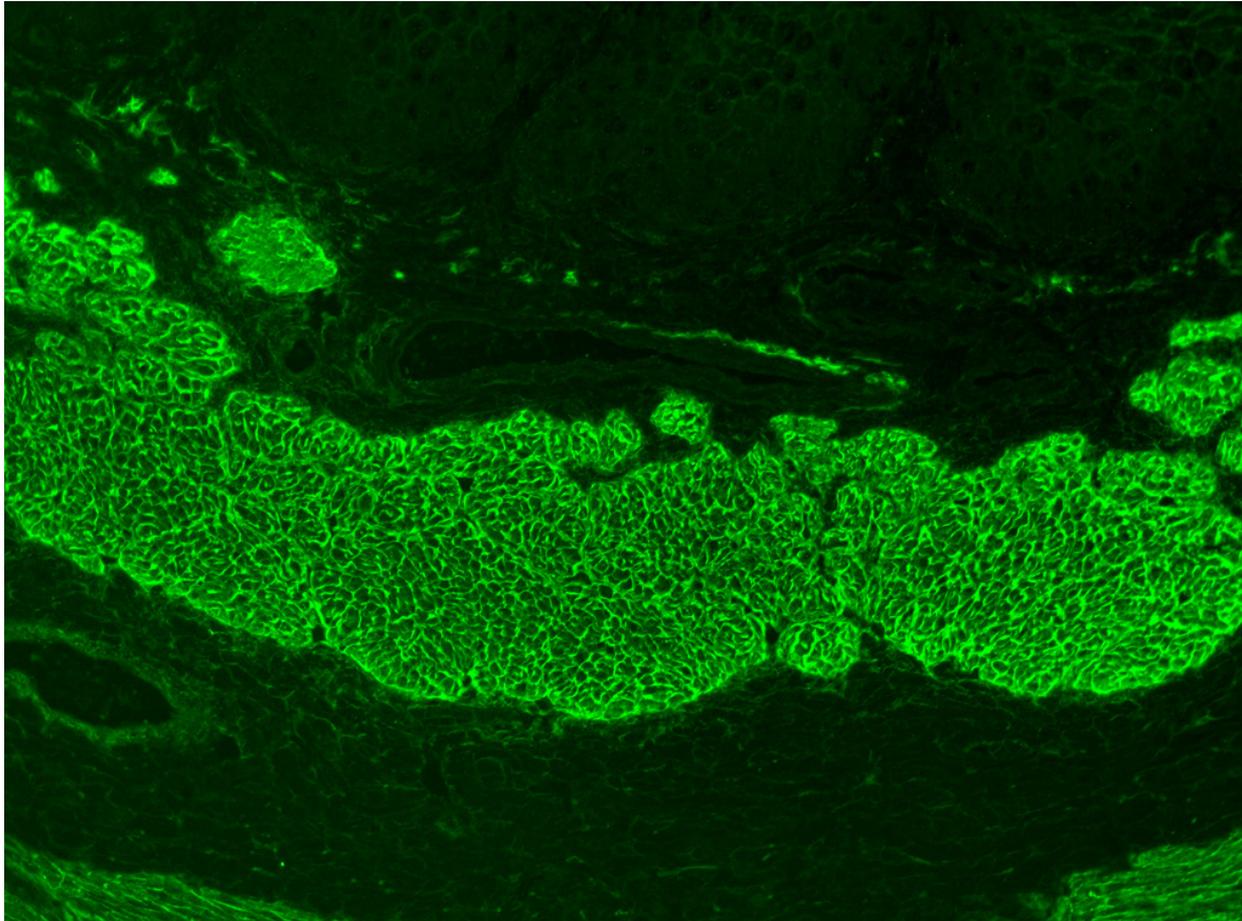


Indirekte immunofluoreszenz-Mikroskopie als serologischer Test

- Immunfluoreszenz-Mikroskopie
- Anwendung: **Diagnostik autoimmuner Störungen** Das Serum des Patienten wird zu einer Zellkultur oder einem Gewebe gegeben. Autoantikörper im Serum verursachen eine Kreuzreaktion mit dem Gewebe oder den Zellen die mit Fluorochrom-konjugierten anti-mensch Antikörpern detektiert werden kann.



Indirekte Immunfluoreszenz Bsp.

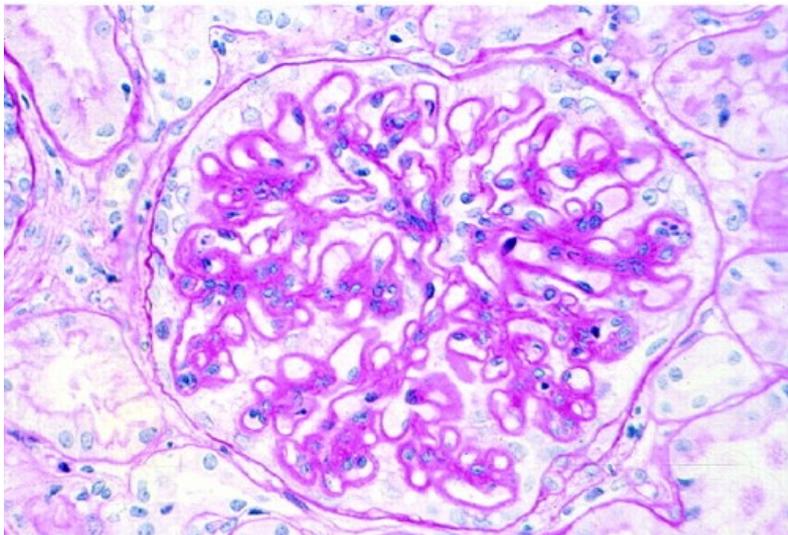


Detektion von anti-Endomysium Autoantikörpern (EMA) vom Serum eines Patienten mit Zöliakie in einem Affenösophagus. Der Ösophagusschnitt wurde erst mit Serum des Patienten inkubiert. Dann wurden Fluorochrom-konjugierte (**FITC**) Anti-mensch Antikörper hinzugefügt.^[23.]

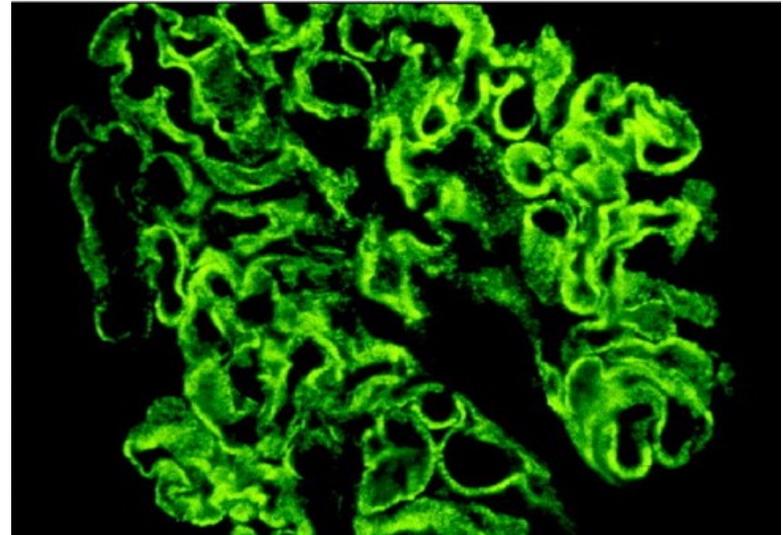
Immunfluoreszenz I.

Direkter Immunfluoreszenz Test aus der renalen Manifestation von SLE (Lupus Nephritis):
– Membranöse Glomerulonephritis (siehe Pathologie und Nephrologie)

1. Biopsie aus der Patientenniere

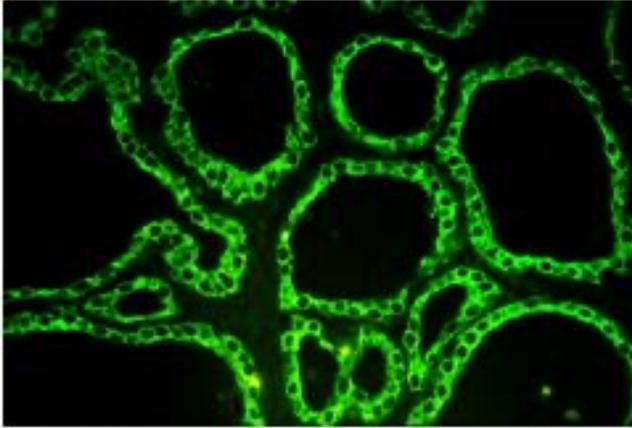


2. Glomerulus mit PAS Reaktion:
dickere Basalmembran

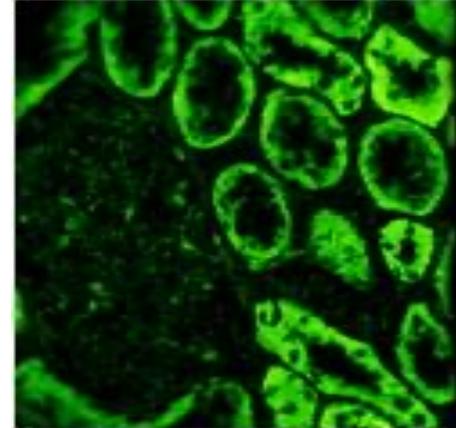


3. **Direkte IF** mikroskopisches Bild des Glomerulus:
Ablagerung von **IgG Immunkomplexe** bei GBM
(Type III. Hypersensitivität)

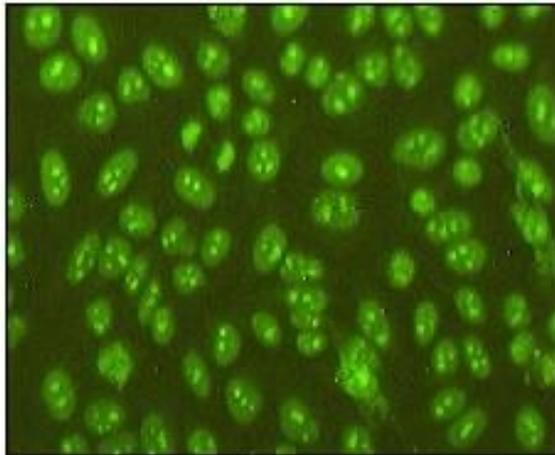
Immunfluoreszenz II.



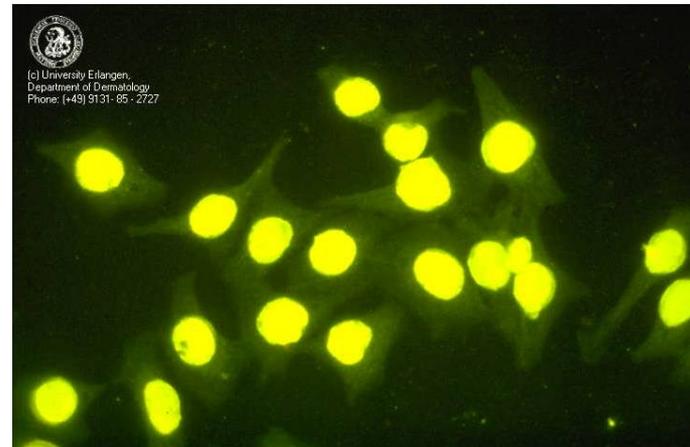
Anti-TPO Autoantikörper in einem
Schilddrüsen Gewebsschnitt



Mitochondriales Färbungsmuster
in Nierengewebe



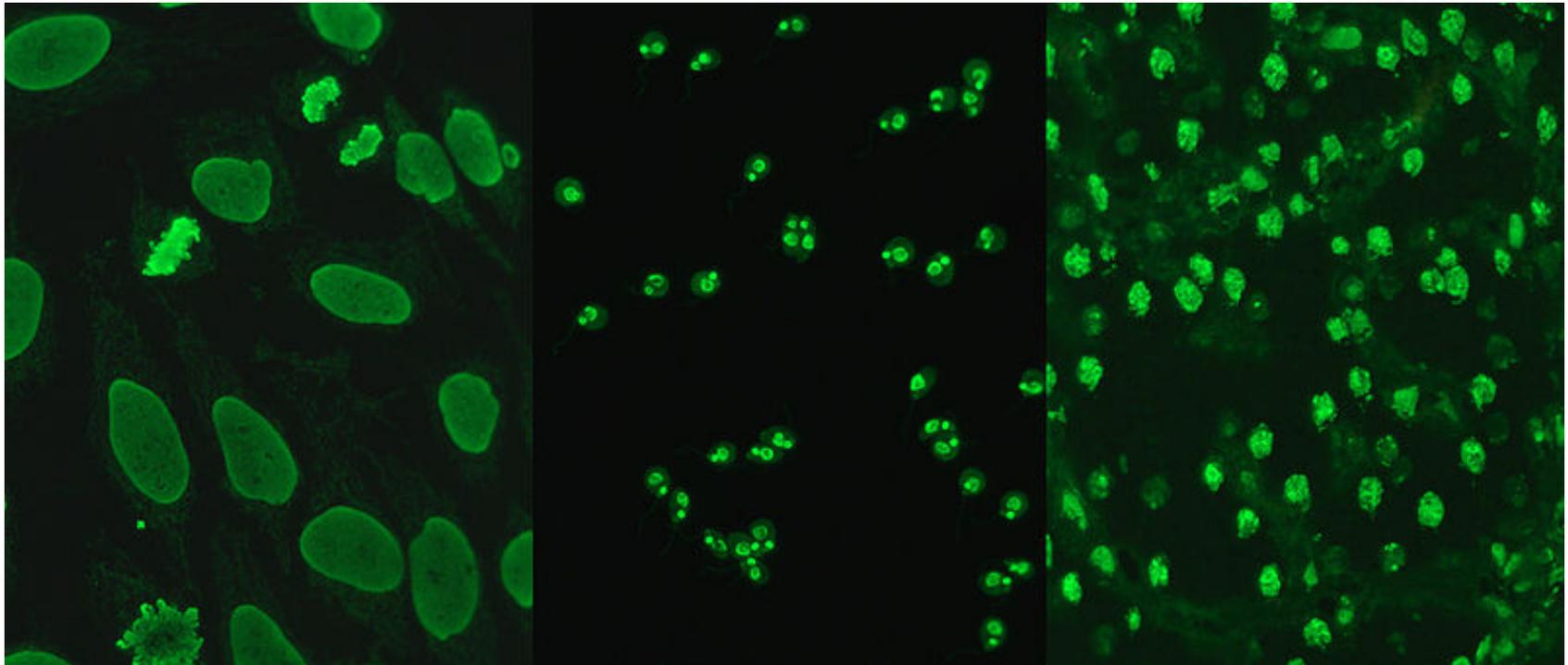
Nukleoläres Muster in
Hep2 Zellen (anti-SSA)



Homogene nukleäre Färbung
in Hep2 Zellen (anti-dsDNA)

Immunfluoreszenz III.

Nachweis von **Anti-dsDNA** aus Patientenserum mit **indirekter Immunfluoreszenz-mikroskopie** in verschiedenen Zelltypen:



HEp-20-10 Zellkultur
(humaner epithelialer Tumor)

Crithidia luciliae Zellen
(protist Parasit)

Rattenlebergewebe

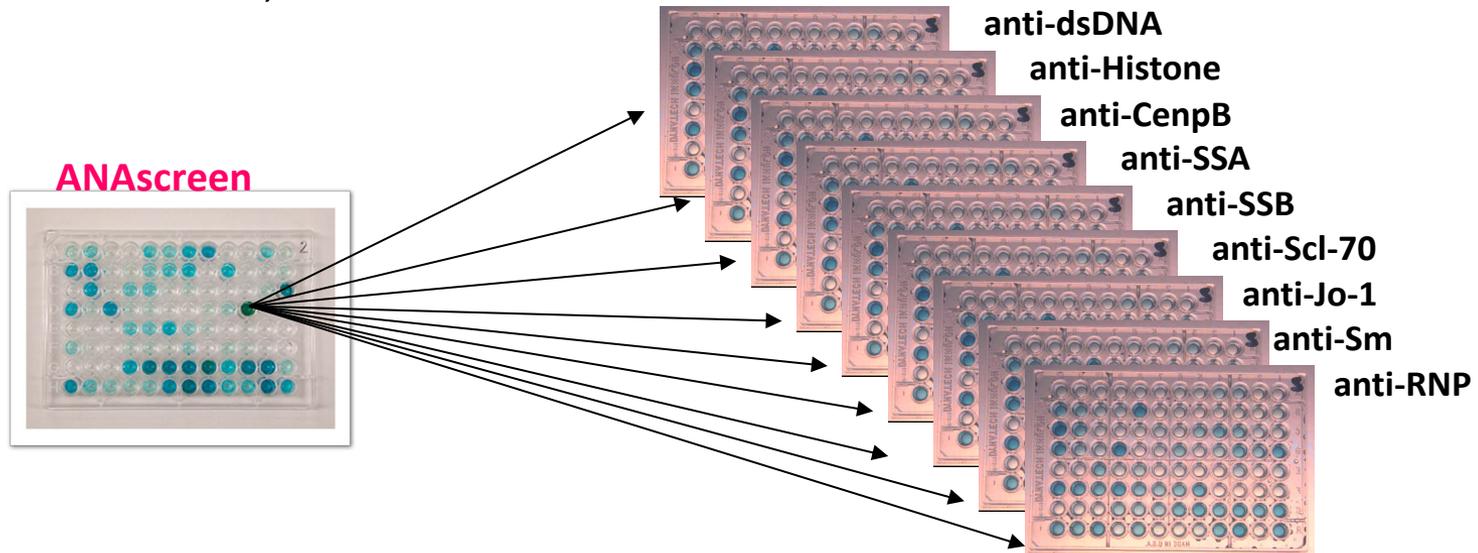
ANAscreen - Mikroplatten ELISA

Die ELISA platte ist mit einem **Antigenmix** aus den Nuklei von Hep2 Zellen sensitiviert:

- dsDNA
- Histone
- Zentromere
- SSA/Ro, SSB/La
- Sm, Sm/RNP
- Scl-70, Jo-1



Falls **positiv** wird der Test mit ELISA Platten wiederhold die **jeweils mit nur einem spezifischen Antigen sensitiviert sind** wiederholt.



Vergleich der Schwellenwerte verschiedener serologischer Methoden

Methoden	Geschätzte Sensitivität ($\mu\text{g Protein/ml Porbe}$)
Präzipitation in Flüssigkeiten	20-200
Ouchterlony Doppel- Immundiffusion	20-200
Immunelectrophorese	20-200
Mancini radiale Immundiffusion	10-50
Rocket Immunelectrophorese	2
Immunfluoreszenz	1
Direkte Agglutination	0,3
Passive Agglutination	0,006-0,06
ELISA	0,0001-0,01