Wie misst man das Immunsystem?

Thema | Immunzellen im Rampenlicht

Foto: ©Sebastian Kaulitzki - Fotolia.com

Dipl. Biol. Wolfgang Mayer

Eine der wichtigsten Untersuchungen des immunologischen Labors ist die Quantifizierung und Differenzierung der Lymphozyten, die den Durchbruch von universitärer Spezialanwendung in die immunologische Routinediagnostik mit dem Aufkommen der HIV-Erkrankung vollzogen hat. Unter dem Mikroskop lassen sich die Zellen der Immunabwehr auch durch Anfärbung nur bis zu einem gewissen Grad differenzieren, zudem bleibt die Anzahl der untersuchten Zellen gering. Mit automatisierten Zellzählgeräten, die auch für Blutbilder Verwendung finden, kann dagegen eine große Anzahl an Blutzellen in kurzer Zeit aufgrund der Größe und optischen Dichte (Granularität) differenziert werden. Die automatisierte Messung beruht auf einer Einzelzell-Abtastung mit einem Laserstrahl, während die Zellen nacheinander – wie auf einer Perlenkette aufgereiht – durch eine dünne Messkammer aus Glas fließen. Während das Vorwärtsstreulicht des Lasers eine Aussage über die Größe der Zelle erlaubt (Zellschatten), gibt die Ablenkung des Laserstrahles einen Hinweis auf die Granularität der Zelle (Seitwärtsstreulicht). Damit kann die Zellpopulation in Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten differenziert werden.

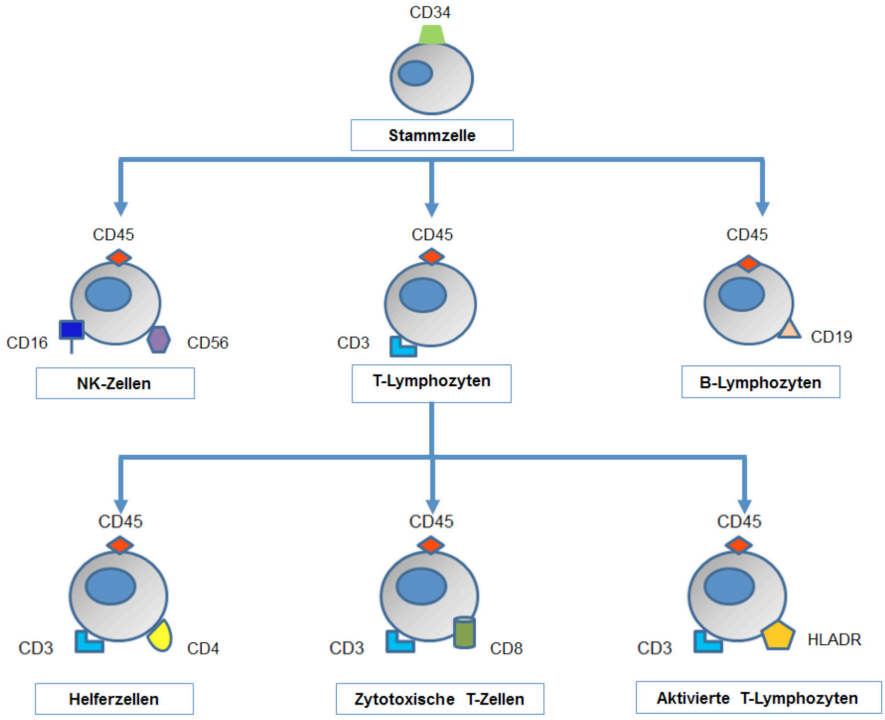
Ein modernes Durchflusszytometer (auch FACS: Fluorescence Activated Cell Sorter) basiert auf dem gleichen Grundprinzip, kann aber viel mehr: Die zusätzliche Detektion von Fluoreszenzlicht erlaubt es, eine Vielzahl von Merkmalen auf den Blutzellen zu differenzieren. Diese Technologie der fluoreszenzbasierten Durchflusszytometrie wurde 1968 in Münster und zeitgleich

in Stanford/USA entwickelt. Die Messgeschwindigkeit beträgt bei modernen Geräten faszinierende mehrere tausend Zellen pro Sekunde. Bei der Messung eines einfachen Lymphozytenprofils werden ca. 50.000 bis 70.000 Zellen analysiert, bei Spezialanwendungen bis zu einer Million oder mehr – und damit wird eine unvorstellbare Datenmenge erfasst, gespeichert und ausgewertet. Die Untersuchung ist unter unterschiedlichen Begriffen verbreitet: Immunstatus, Lymphozytentypisierung, Lymphozytendifferenzierung, Immune Staging oder auch Mikroimmunstatus. Lymphozytentypisierungen werden aus EDTA-stabilisiertem Vollblut des Patienten durchgeführt. Andere Materialien wie Serum oder auch Citrat stabilisiertes Vollblut sind nicht geeignet. Das Zeitfenster nach Blutentnahme, in dem die Untersuchung sinnvoll durchgeführt werden kann, beträgt ca. 24 Stunden.

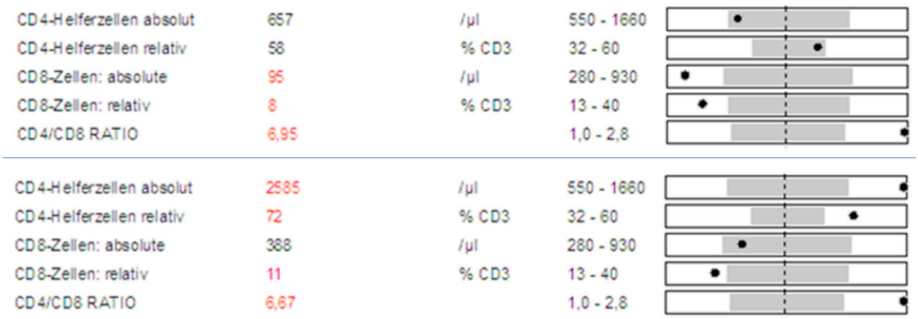
Die Bestimmung der Subpopulationen im Durchflusszytometer eröffnet einen Einblick in die quantitativen Verhältnisse im peripheren Blut. Defizite oder Expansionen einzelner Zellpopulationen sowie abweichende Relationen können erkannt werden. Heute gibt es neben der HIV-Infektion noch eine Vielzahl an anderen Indikationen, bei denen diese Diagnostik sinnvoll eingesetzt werden kann. Die resultierenden Informationen können grundsätzlich bei primären oder sekundären Immundefekten, Autoimmunerkrankungen, Infektionen, Immuntherapien, Tumorerkrankungen, lymphoproliferativen Erkrankungen oder bei unklaren Diagnosen wertvolle Hinweise für Diagnosestellung, Therapieauswahl und Therapiemonitoring ermöglichen. Allerdings ist bei der Interpretation der Daten auch immer zu berücksichtigen, dass die Verhältnisse im peripheren Blut erfasst werden, wo sich nur ein Bruchteil aller lymphozytären Zellen aufhält. In der Regel wird aber ein repräsentatives Bild für die immunologische Gesamtsituation widergegeben. Veränderungen der Zellzahlen im peripheren Blut geben wertvolle Hinweise auf mögliche Erkrankungen, so findet man z.B. bei HIV-Infektion typischerweise selektiv die Anzahl der CD4-Zellen vermindert.

Es sind aber mit der Lymphozytentypisierung nur bedingt Aussagen hinsichtlich der funktionellen Integrität der vorhandenen Zellen möglich. Allenfalls die gesteigerte Expression von Aktivierungsmarkern oder die verminderte Expression funktionell essentieller Marker (z.B. co-stimulatorischer Moleküle/CD28) gibt darauf einen Hinweis. Hier liegt dann der Stellenwert von weiterführenden speziellen Immunfunktionstests (NK-Check®, ITT®), mit denen echte Funktionalität und Reagibilität von T- und NK-Zellen in-vitro überprüft werden kann.

Die Markierung der Zellen mit fluoreszierenden Antikörpern anhand ihrer spezifischen Oberflächenmerkmale ist ein zentrales Merkmal einer Lymphozytentypisierung (Abbildung 1). So tragen z.B. alle T-Zellen den T-Zell-Rezeptor, über den diese eindeutig identifiziert werden können. Um die unterschiedlichen Oberflächenmoleküle auf Immunzellen einfach zu strukturieren, wurde das CD-System (Cluster of Differentiation) eingeführt, mit dem die Zellmarker nummeriert wurden. Diese können bei der Immunphänotypisierung als Zielstrukturen für farbmarkierte Antikörper verwendet werden. Der T-Zell-Rezeptor wurde z.B. mit der Nummer 3 gekennzeichnet, so



1 Differenzierungsmöglichkeiten von Immunzellen anhand von Oberflächenmarkern



CD4-Helferzellen absolut	657	/µl	550 - 1660
CD4-Helferzellen relativ	58	% CD3	32 - 60
CD8-Zellen: absolute	95	/µl	280 - 930
CD8-Zellen: relativ	8	% CD3	13 - 40
CD4/CD8 RATIO	6,95		1,0 - 2,8
CD4-Helferzellen absolut	2585	/µl	550 - 1660
CD4-Helferzellen relativ	72	% CD3	32 - 60
CD8-Zellen: absolute	388	/µl	280 - 930
CD8-Zellen: relativ	11	% CD3	13 - 40
CD4/CD8 RATIO	6,67		1,0 - 2,8

2 Zwei Befunde mit ähnlicher Erhöhung der CD4/CD8-Ratio, aber mit unterschiedlicher Ursache: Oben liegt eine deutliche Verminderung der CD8-Poulation vor, unten eine Expansion der CD4-Zellen!

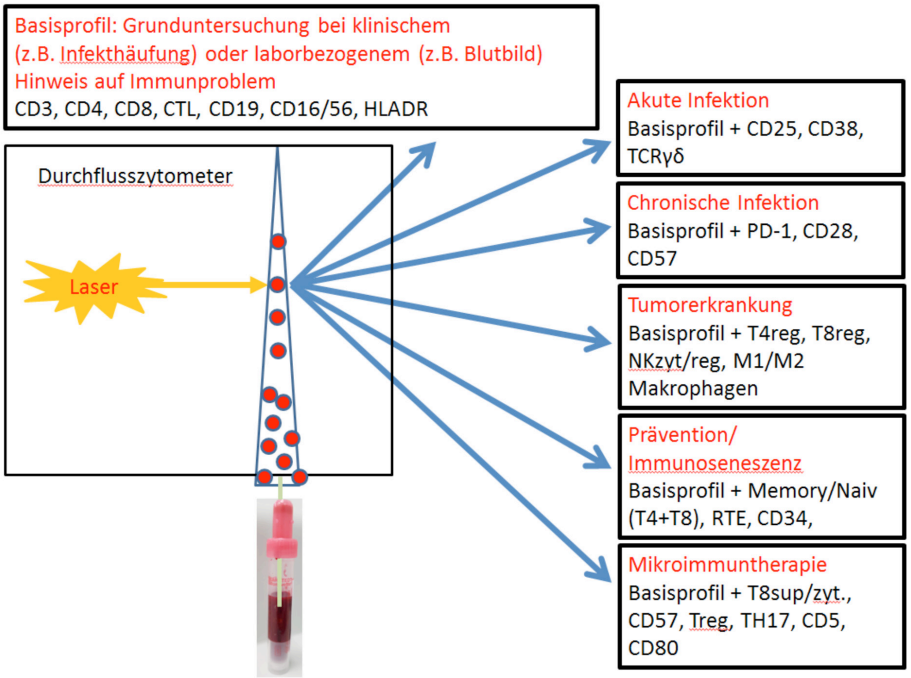
Cluster of Differentiation (CD)	Merkmal/Funktion	Wird exprimiert von
CD3	T-Zell-Rezeptor	T-Zellen
CD4	Co-Rezeptor für MHC II	T-Helferzellen, Makrophagen, B-Zellen, Granulozyten
CD8	Co-Rezeptor für MHC I	Zytotoxische T-Zellen, NK-Zellen, dendritische Zellen
CD19	Co-Rezeptor für BCR	B-Zellen
CD25	Interleukin-2-Rezeptor	Aktivierten Zellen (T-, B-, NK-Zellen, Monozyten)
CD16	Rezeptor für Fc-Teil von Antikörpern	NK-Zellen, T-Zellen, B-Zellen
CD34	Serin-Phosphorylase	Hämatopoetische Stamm- und Progenitorzellen
CD45	Tyrosinphosphatase	Alle Leukozyten
CD56	Neurales Zell-Adhäsions-Molekül 1 (NCAM1), Funktion auf Immunzellen nicht geklärt	NK-Zellen, T-Zellen

1 Charakteristische Oberflächenmerkmale von Immunzellen für die Durchflusszytometrie. Die Marker können entweder einzeln oder in sinnvoller Kombination Zelltypen identifizieren (z.B. ist CD3 in Kombination mit CD4 spezifisch für Helferzellen; Zellen ohne CD3, aber mit CD16 und CD56 sind NK-Zellen).

dass es sich bei CD3-positiven Zellen um T-Zellen handelt. Andere typische Erkennungsmerkmale sind z.B. CD45 für Leukozyten oder CD19 für B-Zellen (Tab. 1).

Mit derzeit über 300 bekannten Oberflächenmarkern lässt sich eine Vielzahl von Immunzellen erkennen. Da die meisten Marker gleichzeitig auf verschiedenen Zellen vorkommen können, ist eine sinnvolle Kombination der Marker miteinander wichtig, um eine Zellpopulation eindeutig zu identifizieren. Dabei kann das Fehlen eines Merkmales ebenso herangezogen werden wie die Expression, z.B. werden NK-Zellen u.a. über den Ausschluss CD3-positiver Zellen charakterisiert. In der gängigsten Variante beinhaltet eine Lymphozytentypisierung die Erfassung der wichtigsten Immunzellen in Form von Gesamtlymphozyten, T-Zellen, CD4-Zellen, CD8-Zellen, B-Zellen und NK-Zellen. CD4-Zellen werden als Helferzellen bezeichnet, die CD8-Zellen beinhalten primär zytotoxische Lymphozyten, wurden aber früher oft falsch als Suppressorzellen auf den Laborbefunden angegeben.

Die Darstellung der Ergebnisse erfolgt typischerweise als Angabe der jeweiligen Population in zweifacher Form: als absoluter Wert/Volumen und als prozentualer Wert einer übergeordneten Bezugspopulation, häufig der Lymphozyten (z.B. CD4 relativ: % von Lymphozyten) (Abbildung 2). Eine spezielle Darstellungsvariante wird im sogenannten Mikroimmunstatus realisiert, einer zentralen Untersuchung im Rahmen der Mikroimmuntherapie. Hier wird zusätzlich zu den beiden Werten ‚absolut' und ‚relativ' eine Balken-Grafik mit einer dritten Ergebnisdarstellung als Prozent des Normalwertes umgesetzt. Für die Interpretation von Abweichungen sind immer der prozentuale und der relative Ergebniswert zusammen zu betrachten, bei relativen Werten insbesondere auch die Bezugspopulation. So können relative Erhöhungen von Populationen sowohl an einer Erhöhung des eigentlichen Zelltyps liegen als auch an einer Verminderung der Bezugspopulation! Ebenso sind bei der Beurteilung von Relationen, z.B. der CD4/CD8-Ratio, immer die Bezugswerte mit zu betrachten. Eine Erhöhung einer Ration kann immer an zwei Ursachen liegen, ebenso eine Verminderung (s. Abb. 2).



3 Sinnvolle Inhalte einer Lymphozytentypisierung für verschiedene Fragstellungen

Sinnvolle Inhalte einer Lymphozytentypisierung

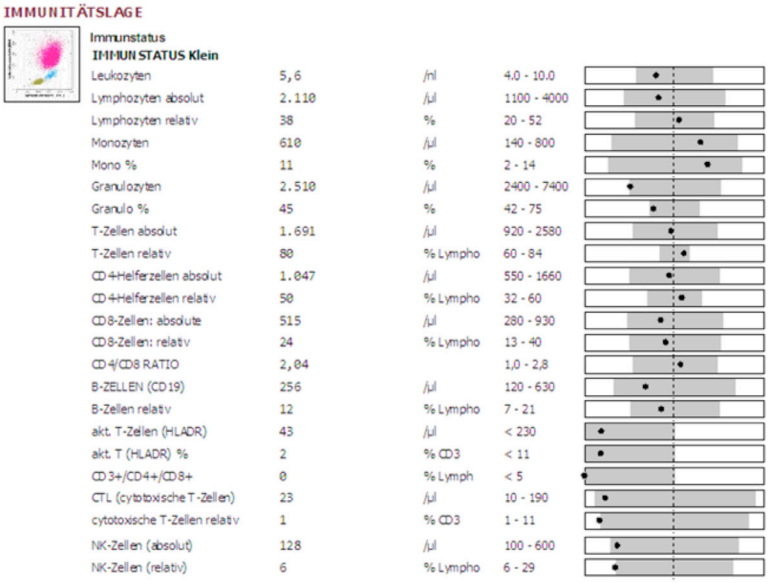
Im Folgenden werden sinnvolle Bestandteile von Typisierungen für häufige Fragestellungen vorgestellt (Abb. 3). Dabei wird bewusst auf die besondere Anwendung von Lymphozytentypisierungen bei hämatologischen Erkrankungen (Lymphome) verzichtet, da dies ein eigenes Spezialgebiet darstellt, welches in der Regel hämatologischen Spezialambulanzen vorbehalten ist:

Grundprofil (Hauptpopulationen)
Indikationen:
- Mit Immunglobulinen im Serum Basisdiagnostik des Immunsystems
- Unklare Lymphozytose oder Lymphopenie im Blutbild
- Immundefekte, Immunmangelsyndrome, Infektanfälligkeit
- Verlaufskontrollen bei chronischen Infektionen, Autoimmunerkrankungen, immunsuppressiver Therapie

In der einfachsten Form werden durch eine Lymphozytentypisierung die wichtigsten lymphozytären Populationen (T-Zellen, T4, T8, B-Zellen) und die natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) erfasst. (Abbildung 4)

T-Zellen und B-Zellen sind die wichtigsten Zelltypen des spezifischen Immunsystems, eine Reaktion erfolgt hier abhängig von der Antigenprägung. **B-Zellen (CD19)** sind die Produzenten von Antikörpern (Immunglobulinen), wichtigen spezifischen Faktoren der humoralen Abwehr, und können neben Monozyten und dendritischen Zellen zudem als antigenpräsentierende Zellen (APC) wirken. Den **T-Zellen (CD3)** kommt eine zentrale immunregulatorische Funktion zu. Der Subtyp der **Helferzellen (CD4)** steuert über Immunbotenstoffe (Zytokine, Interleukine, Interferone) die Charakteristik der zellulären Immunantwort. Die Untergruppe der CD8-T-Zellen dagegen beinhaltet die Träger der spezifischen (antigenabhängigen) zytotoxischen Immunantwort insbesondere gegen virusinfizierte Zellen und Tumorzellen. Die zytotoxische Reaktion wird durch sezernierte Moleküle (Perforin und Granzyme) oder über Rezeptor-Ligand-Interaktionen (Fas-FasL: Apoptoseinduktion) ausgelöst. CD8-T-Zellen ergänzen damit die unspezifische Zytotoxizität der NK-Zellen und stellen damit mit diesen die wichtigste Verteidigungslinie gegen infizierte oder entartete Zellen dar. Das Verhältnis der CD4-Zellen zu den CD8-Zellen (**Ratio CD4/CD8**) ist ein Marker für die Integrität der T-Zell-Population, einen Anstieg der Ratio findet man in der Anfangsphase von Virusinfekten, bei akuten Autoimmungeschehen oder T-Zell-Lymphomen; einen Abfall dagegen in der Spätphase von Infektionen, bei HIV und chronischen Infekten. **Natürliche Killerzellen** (NK-Zellen, CD16/CD56) tragen kein CD3-Antigen und werden der unspezifischen Abwehr zugeordnet. Sie spielen eine Schlüsselrolle bei der Elimination infizierter Zellen oder Tumorzellen.

Häufig wird in dieser Grundversion der Lymphozytentypisierung auch ein typischer Marker einer nachhaltigen Aktivierung des spezifischen T-zellulären Immunsystems mit erfasst, dies ist die gesteigerte Expression des Oberflächenmoleküls **HLA-DR (MHCII) auf T-Zellen**. Ein weiterer Read-Out der Basisversion kann die Population der **unreifen T-Zellen** sein, die sowohl das CD4 als auch das CD8-Antigen tragen (CD3+/CD4+/CD8+). Diese Zellen kommen normalerweise nur in sehr geringer Anzahl im peripheren Blut vor, ein Anstieg kann auf eine Virusinfektion oder eine lymphoproliferative Erkrankung hindeuten.



IMMUNITÄTSLAGE

Immunstatus
IMMUN STATUS Klein

Leukozyten	5,6	/nl	4.0 - 10.0
Lymphozyten absolut	2.110	/µl	1100 - 4000
Lymphozyten relativ	38	%	20 - 52
Monozyten	610	/µl	140 - 800
Mono %	11	%	2 - 14
Granulozyten	2.510	/µl	2400 - 7400
Granulo %	45	%	42 - 75
T-Zellen absolut	1.691	/µl	920 - 2580
T-Zellen relativ	80	% Lympho	60 - 84
CD4+Helferzellen absolut	1.047	/µl	550 - 1660
CD4+Helferzellen relativ	50	% Lympho	32 - 60
CD8-Zellen: absolute	515	/µl	280 - 930
CD8-Zellen: relativ	24	% Lympho	13 - 40
CD4/CD8 RATIO	2,04		1,0 - 2,8
B-ZELLEN (CD19)	256	/µl	120 - 630
B-Zellen relativ	12	% Lympho	7 - 21
akt. T-Zellen (HLADR)	43	/µl	< 230
akt. T (HLADR) %	2	% CD3	< 11
CD3+/CD4+/CD8+	0	% Lymph	< 5
CTL (cytotoxische T-Zellen)	23	/µl	10 - 190
cytotoxische T-Zellen relativ	1	% CD3	1 - 11
NK-Zellen (absolut)	128	/µl	100 - 600
NK-Zellen (relativ)	6	% Lympho	6 - 29

4 Basisprofil einer Lymphozytentypisierung mit normgerechter Situation für alle Zelltypen ohne Anzeichen einer T-zellulären Immunaktivierung

Profil bei akuter Infektion
Indikationen:
- Überprüfung der adäquaten Reaktion bei akuter Immunaktivierung (Infektion, Tumorerkrankung)
- Indikation und Verlaufs-/Erfolgskontrolle immunstimulierender Therapien

Zusätzlich zum Grundpanel wird eine erweiterte Charakterisierung mit Fokus auf eine umfangreiche Analyse des Aktivierungszustandes der T-Zellen durchgeführt. Als typische Aktivierungsmarker werden CD25, HLADR, CD69, CD71 oder auch eine bestimmte Variante des T-Zell-Rezeptors (gamma-delta) verwendet. (Abbildung 5)

T-Zellen mit gamma-delta Rezeptor sind primär intraepithelial in der Schleimhaut des Magen-Darm-Traktes und der Atemwegschleimhaut lokalisiert, dienen dort u.a. der Virusabwehr und erlauben die Erkennung von Nonprotein-Antigenen/Glykolipiden über den CD1-Rezeptor. Der Anteil in der peripheren Zirkulation ist normalerweise gering, einen Anstieg findet man hier vor allem bei viralen Infektionen, insbesondere des Gastrointestinaltraktes, bei immunsuppressiver Therapie und bei Lymphomen (selten).

CD25-positive Zellen, exprimieren im akuten/subakuten Zustand der Aktivierung verstärkt Rezeptoren für IL-2 (CD25) und potenzieren dadurch den Interleukin-2-vermittelten Aktvierungsprozess parakrin.

HLADR(MHCII) steigt bei länger bestehender, chronischer Aktivierung der T-Zellen an, da durch verstärkte Expression der HLA-Antigenpräsentationsmoleküle die T-Zellreaktion verbessert wird.

Leukozyten		4.9	4.0-10.0	/nl
Lymphozyten		2100	1100-4000	/µl
Lymphozyten rel	+	42	20-40	%
Monozyten	-	100	140-800	/µl
Monozyten rel		3	2-14	%
Granulozyten		2700	2400-7400	/µl
Granulozyten rel		55	42-75	%
T-Zellen		1677	920-2580	/µl
T-Zellen rel		80	60-84	%Lympho
GammaDelta T-Z.	+	225	< 100	/µl
GaDe T-Zell rel	+	13	< 5	%CD3
CD4 Helfer		1225	550-1660	/µl
CD4 Helfer rel		58	32-60	%Lympho
CD8 Zellen		440	280-930	/µl
CD8 Zellen rel		21	13-40	%Lympho
Zytotox T-Zellen	+	255	10-190	/µl
ZytotoxT-Z rel	+	13	1-11	%CD3
CD4/CD8 Ratio		2.78	1.00-2.80	
B-Zellen		163	120-630	/µl
B-Zellen rel		8	7-21	%Lympho
NK-Zellen		272	210-740	/µl
NK-Zellen rel		13	6-29	%Lympho
akt.T-Zell HLA	+	277	< 230	/µl
akt.T-Z. HLA rel	+	17	< 11	%CD3
akt.T-Zell CD38	+	678	102-554	/µl
akt.T-Z.CD38 rel	+	40	6-28	%CD3
akt.T-Zell CD25	+	193	< 180	/µl
akt.T-Z.CD25 rel	+	11	< 10	%CD3
akt.T-Zell CD71		126	< 190	/µl
akt.T-Z CD71rel		8	< 11	%CD3

5 Bei unauffälligem Blutbild und klinischen Erschöpfungszeichen zeigt die Typisierung mit Aktivierungsmarkern eine massive, schon länger andauernde (kein CD71) Aktivierungssituation mit zytotoxischer Charakteristik (CD38, Gammadelta-Zellen und zytotoxische Zellen erhöht). Der Befund wäre vereinbar mit einer viralen Infektion, bemerkenswerterweise ist jedoch keine Expansion der Hauptpopulationen (Gesamt T3, CD4 und/oder CD8) zu erkennen. Ohne die Erweiterung mit Aktivierungsmarkern wäre die Situation nicht erkannt worden.

CD38 ist ein multifunktionales Oberflächenprotein, welches u.a. an Zelladhäsion, Signaltransduktion und Synthese von zyklischer ADP-Ribose beteiligt ist. CD38 kann die lytische und sekretorische Antwort von NK-Zellen unterstützen und wird von T-Zellen bei Aktivierung, vor allem bei Virusinfekten und T-zellulären Autoimmunerkrankungen, exprimiert. Bei HIV-Infektion wurde CD38 als Prognosemarker beschrieben, ein Anstieg der Expression auf T-Zellen geht einer CD4-Verminderung und Progression der Erkrankung voraus.

CD71 (Transferrinrezeptor) wird von allen proliferierenden Zellen exprimiert und bei einer antigeninduzierten Immunantwort stark hochreguliert. CD71 wird von Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus exprimiert und kann daher ähnlich wie CD69 als früher Aktivierungsmarker angesehen werden.

Profil bei chronischer Infektion

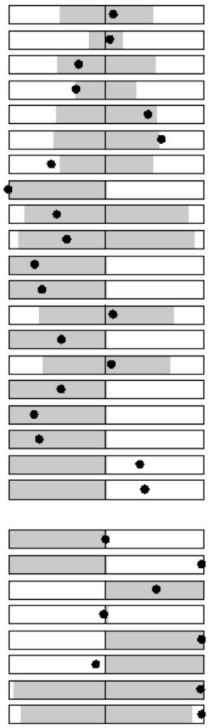
Indikationen:

- Überprüfung der Erschöpfung der Immunabwehr durch chronische Aktivierung/Überstimulation
- V.a. Immunparalyse / „Immun-Burnout“

Ergänzend zum Basispanel werden durch gezielte Bestimmung ausgewählter Lymphozytenmarker T- und NK-Zellen sowie antigenpräsentierende Zellen hinsichtlich ihres Aktivierungszustandes und ihres Reaktionspotenzials charakterisiert.

Anzeige

T-Zellen absolut	1887	/µl	920 - 2580
T-Zellen relativ	75	% Lympho	60 - 84
CD4-Helferzellen absolut	799	/µl	550 - 1660
CD4-Helferzellen relativ	32	%CD3	32 - 60
CD8-Zellen: relativ	38	%CD3	13 - 40
CD8-Zellen: absolute	951	/µl	280 - 930
CD4/CD8 RATIO	0,84		1,0 - 2,8
CD3+/CD4+/CD8+	0	% Lymph	< 5
cytotoxische T-Zellen relativ	3	% CD3	1 - 11
CTL (cytotoxische T-Zellen)	60	/µl	10 - 190
akt. T (CD71) %	3	% CD3	< 11
akt. T-Zellen (CD71)	66	/µl	< 190
akt. T-Zellen (CD38) absolut	353	/µl	102 - 554
akt. T (HLADR) %	6	% CD3	< 11
akt. T (CD38) relativ	18	% CD3	6 - 28
akt. T-Zellen (HLADR)	125	/µl	< 230
akt.T-Zellen (CD25/IL-2)	107	/µl	< 400
akt.T(CD25) %	7	% CD3	< 22
gamma/delta T-Zellen	135	/µl	< 100
gamma/delta T %	7	% CD3	< 5
Panel chronische Aktivierung			
T-Zellen PD1:relativ	2	% CD3	< 2
CD8-Zellen PD1:relativ	5	% CD8	< 1
CD4/costim/CD28 abs	836	/µl	> 550
CD4/costim/CD28 relativ	97	% CD4	98 - 100
CD8/costim/CD28 abs	508	/µl	> 150
CD8/costim/CD28 relativ	45	% CD8	> 50
CD8-Zellen senesc (CD57)	382	/µl	10 - 387
senCD8-Zellen (CD57) %	41	% T-Zellen	1 - 15



6 Der Befund zeigt eine typische Situation bei Immunparalyse („Immun-Burnout") durch „inflamm-aging": erhöhter Anteil an funktionell reduzierten PD-1- und CD57-positiven CD8-Zellen, die Expression des costimulatorischen Moleküls CD28 ist dementsprechend vermindert. Außer den gamma-delta-Zellen sind keine Aktivierungszeichen mehr erkennbar, die CD8-Zellen sind auch quantitativ vermindert. Der Befund ist vereinbar mit einer langandauernden Aktivierungssituation und dadurch bedingter funktioneller Rückregulation der Immunabwehr.

CD28 gilt als wichtiger costimulatorischer Rezeptor, der zusätzlich zum T-Zell-Rezeptor von der antigenpräsentierenden Zelle über CD80 oder CD86 angesprochen werden muss, um eine Aktivierung der T-Zelle zu bewirken. Ohne dieses Co-Signal führt die Aktivierung über den T-Zell-Rezeptor zu Anergie der Zelle, damit läuft die Immunreaktion ins Leere. Deshalb kommt der CD28-Expression eine wichtige Rolle bei der Beurteilung des zellulären Reaktionsvermögens zu. CD4-Zellen exprimieren bei gesunden Personen zu nahezu 100% CD28, bei den CD8-Zellen sollte die CD28-Expression bei mehr als der Hälfte der Zellen nachweisbar sein.

CD80/CD86 positive APCs (Monozyten, B-Zellen, dendritische Zellen) sind korrespondierende Liganden des CD28-Moleküls auf T-Zellen, wichtige zweite Interaktion zusätzlich zum TCR-MHC-Kontakt, ohne die keine antigenabhängige T-Zell-Antwort stattfinden kann. Während CD86 primär auf Monozyten und dendritischen Zellen vorkommt, findet man CD80 eher auf B-Zellen. Eine verminderte Expression von CD80/CD86 auf APCs wurde z.B. bei Tumorerkrankungen beschrieben. Einen weiteren wertvollen Marker für pathogene Auswirkungen einer chronischen Immunaktivierung stellt die Zunahme an nicht mehr teilungsfähigen T8-Zellen mit verkürzten Telomeren dar (replikative Seneszenz), die über das Oberflächenantigen **CD57** bei verminderter CD28-Expression charakterisiert werden. Diese Zellen sind nicht mehr in der Lage zu proliferieren oder Effektorzytokine wie IFN-gamma zu bilden, und sie hemmen die zytolytische Aktivität von NKT- und NK-Zellen über ein lösliches Glykoprotein (ICF: Inhibitor of Cytolytic Function). Die spezifische Aktivierung dieser Zellen führt zum programmierten Zelltod (Apoptose). In diesem Zusammenhang steht auch der **PD-1-Rezeptor auf T-Zellen** (programmed cell death protein 1), der maßgeblich an regulatorischen Prozessen beteiligt ist, zur Apoptoseinduktion bei antigen-spezifischen T-Zellen führt und gleichzeitig aber die Apoptose regulativer T-Zellen (Treg) reduziert.

Profil bei Prävention/Immunoseneszenz

Indikationen:

- Prävention
- Erhöhte Infektanfälligkeit im Alter
- Chronische Entzündungen („inflamm-aging")

Das Grundpanel ist hier durch spezielle Parameter zur Erfassung von Immunoseneszenz-Phänomenen erweitert (Abbdilung 6). Immunoseneszenz ist durch eine Vielzahl an qualitativen und quantitativen Veränderungen der Immunabwehr gekennzeichnet. Die damit verbundenen Veränderungen von Immunorganen (Rückgang der Thymusdrüse) und der Zusammensetzung der zellulären Immunabwehr treten mit zunehmendem Lebensalter und bei einer zu starken und/oder chronischen Antigenkonfrontation/Immunaktivierung auf, z.B. bei chronischen Systemerkrankungen (CFS, MCS, Autoimmunerkrankungen, rheumatische Erkrankungen, chronische Virusinfektionen), auch bei HIV-Infektion.

Der Anteil der **naiven (ungeprägten) CD4-Zellen** nimmt zugunsten des Anteils an CD4-Gedächtniszellen ab. Die resultierende verminderte Anpassungsfähigkeit der Immunabwehr auf neue, unbekannte Erreger kann durch den Quotienten CD4memory/CD4naiv dargestellt werden, der dann über das 1,5-fache ansteigt. Auch bei dem schweren primären Immundefekt dem CVID (Common Variable Immuno-Deficiency) sowie bei HIV-Infektion ist insbesondere die Population der naiven CD4-Zellen vermindert. Ebenso findet man bei den CD8-Zellen eine Zunahme der Effektorzellen zu Lasten der reagiblen naiven Zellpopulation. Einen guten Überblick über diese Zunahme der CD8-Zellen in der Endphase des zellulären Lebenszyklus gibt das Verhältnis der CD8-Effektorzellen zu den naiven CD8-Zellen, bei Immunoseneszenz steigt diese Ratio deutlich über den Wert von 1,5.

Weitere wertvolle Marker für Immunoseneszenz stellen die oben schon im „Profil chronische Aktivierung" vorgestellte **CD57- und PD-1 Expression** dar.

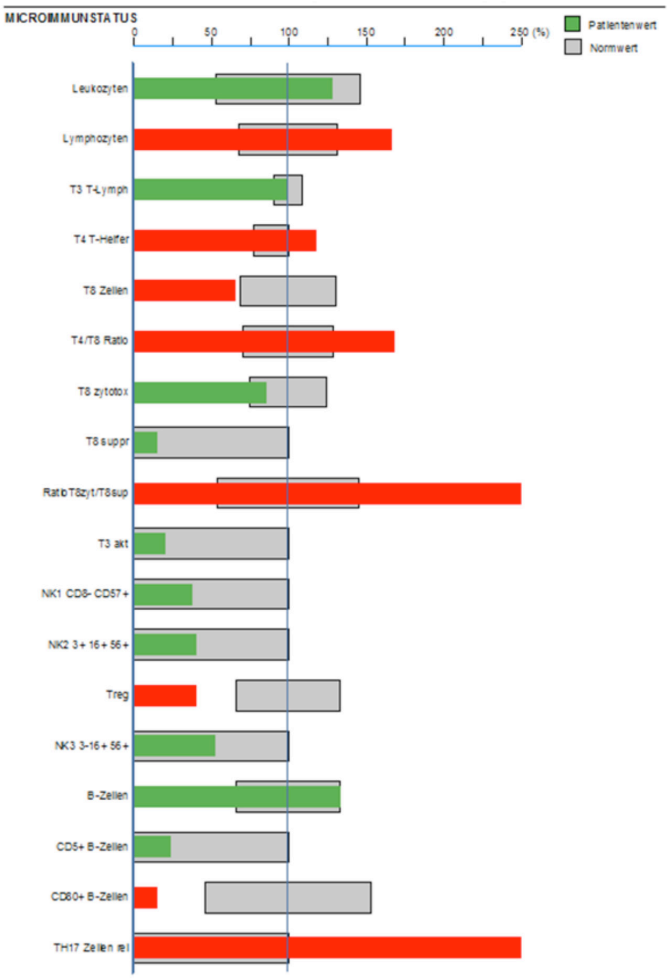
Die Thymusdrüse spielt bei der Reifung und Selektion von T-Zellen eine zentrale Rolle. Im Thymus werden u. a. autoreaktive T-Zellen eliminiert und damit eine wichtige Funktion der Eigentoleranz erbracht. Mit zunehmendem Alter degeneriert das Thymusgewebe und wird durch Fettgewebe ohne Funktion ersetzt (Thymusinvolution). Typische Alterserscheinungen der Immunabwehr, wie Infektanfälligkeit, prolongierte Infekte, Zunahme des autoimmunen Potenzials oder die Reaktivierung latenter Infektionen (z.B. VZV) werden auch mit dem Rückgang

der Thymusfunktion in Zusammenhang gebracht. T-Zellen verlassen den Thymus als jungfräuliche, naive Zellen. Diese T-Zellen tragen neben dem Oberflächenmolekül CD45RA auch den Oberflächenmarker **CD31 (PECAM-1)**, der charakteristisch für diese auch **Recent Thymic Emigrants (RTE)** genannten Zellen ist. Über das Adhäsionsmolekül CD31 lassen sich naive Zellen aus dem Thymus eindeutig von naiven Zellen in der Peripherie differenzieren, die durch postthymische Selektion entstehen und kein CD31-Glykoprotein tragen. Mit zunehmendem Lebensalter nimmt der Anteil an RTEs am Gesamtpool der peripheren naiven T-Zellen kontinuierlich von über 90% bis etwa 50% ab, entsprechend der Aktivität des Thymusgewebes. Damit sinkt auch die Anpassungsfähigkeit und Flexibilität der T-zellulären Immunabwehr gegenüber neuen, bisher unbekannten Erregern. Eine überproportionale Reduktion der RTEs unter 50% findet man bei chronischen Infektionen, sekundären Immundefekten, immunsuppressiver Therapie oder fortgeschrittener Immunseneszenz. Therapeutisch bietet sich bei vermindertem RTE-Anteil z.B. eine Substitution von Thymuspeptiden an, um die T-Zell-Differenzierung aus dem Thymus zu stimulieren.

Das regenerative Potential des Organismus kann über die Anzahl an **peripher zirkulierenden Stammzellen (CD34)** bzw. **endothelialen Progenitorzellen (EPZ, CD133/VEGFR2)** eingeschätzt werden. Insbesondere die Menge an endothelialen Progenitorzellen im peripheren Blut stellt ein Maß für die Reparaturkapazität von Endothelgewebe dar und hat sich als eigenständiger Risikomarker für kardiovaskuläre Erkrankungen bewährt.

Profil bei Tumorerkrankung (Karzinom)
Indikationen:

- Überprüfung der adäquaten Reaktion bei akuter Tumorerkrankung
- Indikation und Verlaufs-/Erfolgskontrolle immunstimulierender Therapien



7 Spezielle Darstellungsform des Mikroimmunstatus als Balkendiagramm mit Angabe als % vom Normalbereich

Anzeige

Wolfgang Mayer

begann 1995 nach Abschluss seines Diploms in Biologie mit Schwerpunkt Biochemie und Rechtsmedizin seine Tätigkeit in der Labormedizin mit Aufbau der Abteilung Immuntoxikologie bei den Medizinisch Immunologischen Laboratorien in München, gegründet und geleitet von Herrn PD Dr. Wilfried Bieger. Die folgenden Jahre waren geprägt von enger Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Bieger und damit verbundenen intensiven und umfassenden Erfahrungen in der angewandten immunologischen Labordiagnostik für Fragestellungen der Infektiologie, von Unverträglichkeitsreaktionen sowie der Immunfunktion. 2003 trat er als Geschäftsführer in die Gesellschaft für angewandte Immunologie IMMUMED in München ein und hat diese in den Folgejahren zu einem medizinischen Laborbetrieb für endokrinologische und immunologische Spezialdiagnostik sowie zu einem Dienstleister für immunologische Auftragsforschung aufgebaut. Heute ist er nach wie vor als Geschäftsführer für die Immumed tätig, leitet den Laborbereich des MVZ Bavariahaus und die Abteilung Forschung und Entwicklung der Lab4more GmbH in München, dort ist er auch Mitglied der Geschäftsführung.

Kontakt: wm@lab4more.de

- Überprüfung des Regenerationszustandes nach Chemo-/ Strahlentherapie

Ergänzend zum Basispanel werden Marker in Assoziation mit typischen Veränderung bei Karzinomen untersucht, z.B. der Aktivierungszustand der T-Zellen, das costimulatorische Potenzial der zellulären Abwehr sowie die zytotoxischen Zellpopulationen. Der wesentlichste Bestandteil des speziellen Immunstatus bei Tumorerkrankungen ist die Quantifizierung der Population sogenannter **regulativer T-Zellen (Treg)**, die eine wichtige Information über die Aktivität der TH3-Achse liefern. Die regulativen T-Zellen sind ein Subtyp der CD4-Zellen, charakterisiert durch CD25 und Foxp3-Expression. Sie werden auch als TH3-Zellen, Tregs oder Tr1-Zellen bezeichnet. Die physiologische Funktion dieser Zellen ist die Aufrechterhaltung der Immunhomöostase mit dem Schutz vor Autoimmunreaktionen und der Entgleisung von Entzündungsreaktionen. Die Zellen vermitteln ihre suppressive Wirkung durch die Freisetzung von Botenstoffen wie TGFß und IL-10 oder durch direkten Zell-Zell-Kontakt. Es konnte gezeigt werden, dass die Anwesenheit von Tregs die NK-Zell-Zytotoxizität, die Freisetzung von TH1-Zytokinen und die Zellproliferation hemmt. Der Anteil an der CD4-Population beträgt bei gesunden Personen maximal ca. 10%, bei Tumorpatienten wird ein erhöhter Anteil dieser Population beschrieben, mit der Korrelation zu einem progressiven Krankheitsverlauf.

Analog zur Unterteilung der Helferzellen in zytotoxisch-assoziierte TH1-Zellen und hemmende regulative T-Helferzellen (Treg) hat sich in den letzten Jahren auch bei den Makrophagen eine solche Polarisierung in **M1- und M2-Makrophagen** zeigen lassen, die u.a. über die Expression von CD163 bei M2-Makrophagen durchflusszytometrisch differenziert werden können. Dabei wird bei Tumorerkrankungen ein progressionsfördernder Shift in Richtung M2-Makropahgen beschrieben, die über Botenstoffe und Zell-Zell Kontakt eine zytotoxische Antwort gegen die Tumorzellen hemmen.

Die **zytotoxischen und regulatorischen Subpopulationen der NK-Zellen** können über die Häufigkeit des Oberflächenmoleküls CD56 auf den Zellen unterschieden werden. Die normale menschliche NK-Zell-Population besteht zu etwa 90% aus Zellen mit hoher natürlicher zytotoxischer Aktivität, aber geringer Zytokinproduktion. Die restlichen 10% der NK-Zellen zeigen eine geringere unspezifische zytotoxische Aktivität, aber eine stärkere Sekretionskapazität für Zytokine (regulatorische NK-Zellen). Regulatorische NK-Zellen zeigen eine starke Expression von CD56, während auf NK-Zellen mit hoher natürlicher zytotoxischer Aktivität CD56 schwächer exprimiert wird. Bei Tumorpatienten mit verminderter Aktivität der NK-Zellen wurde eine signifikante Veränderung des Verhältnisses der beiden NK-Subpopulation gegenüber gesunden Vergleichspersonen festgestellt. Durch eine Verminderung der CD56 stark exprimierenden NK-Population kommt es zu einem Anstieg der Ratio zytotoxische / regulatorische NK-Zellen über den Normalwert von etwa 10 hinaus.

Profil bei Mikroimmuntherapie

Indikationen:

- Diagnostik und Therapiemonitoring im Rahmen der Mikroimmuntherapie

Das Therapiekonzept der Mikroimmuntherapie wurde vor ca. 40 Jahren durch den belgischen Arzt Dr. Maurice Jenaer entwickelt und basiert auf den Grundlagen der Homöopathie. Das Besondere der Mikroimmuntherapie ist die Anwendung von ultra-low-dose-Verdünnungen auf immunologische Botenstoffe (Zytokine) und miRNA. Das Konzept beinhaltet maßgeblich immunologische Labordiagnostik als ein wesentliches Kriterium zur Stellung der Diagnose und Auswahl der Therapeutika. Von der Medizinischen Gesellschaft für Mikroimmuntherapie (MeGeMit) wird eine spezielle Immunphänotypisierung empfohlen („Mikroimmunstatus"), die in der Zusammensetzung, der Anordnung der Parameter und v. a. der besonderen grafischen Darstellung (Abbildung 7) der Werte als Prozent vom Normalbereich gekennzeichnet ist. Der Immunstatus beinhaltet neben den klassischen Hauptpopulationen CD3/CD4/CD8 und B-Zellen auch eine Differenzierung der CD8-Zellen in Zytotoxische-Zellen und Suppressor-Zellen, die Darstellung regulativer CD4-Zellen (Tregs), eine Berücksichtigung einer Subpopulation der B-Zellen (CD5+) und aktivierter B-Zellen sowie 3 verschiedene, NK-assoziierte Zellpopulationen. Dabei wird zwischen den echten NK-Zellen (CD3-/CD16+/CD56+), NKT-Zellen (CD3+/CD16+/CD56+) und CD8-/CD57+-Zellen unterschieden. Die modernste Variante des Mikroimmunstatus beinhaltet auch die TH17-Zellen, für die eine pathogene Bedeutung bei Autoimmunreaktionen, chronischen Infektionen und rheumatischen Erkrankungen beschrieben ist. Bei der Darstellung werden die Ergebnisse in einer definierten Abfolge grafisch prozentual vom Mittelwert des Normalbereiches angegeben. Die sich ergebenden Muster sind für den ausgebildeten Therapeuten charakte-

ristische und therapierelevante Anhaltspunkte.

Bei der Interpretation von Ergebnissen einer Lymphozytentypisierung sollten grundsätzlich folgende Punkte beachtet werden:

- Altersabhängige Normalwerte, insbesondere Säuglinge, Kinder und Jugendliche, unterscheiden sich untereinander (und von Erwachsenen).
- Individuelle Werte in mäßigen Abweichungen von Normwerten ohne klinische Konsequenzen möglich – wenn möglich Vorwerte bei der Beurteilung heranziehen
- Auch grenzwertige Befunde können eine pathogene Bedeutung haben, insbesondere bei Hauptpopulationen!
- Vergleichbarkeit der Ergebnisse zwischen verschiedenen Laboren für Standardmessungen gut (Ringversuche), für spezielle Parameter nur bedingt vergleichbar
- Bei Relativwerten Bezugspopulation beachten, bei Absolutwerten Einheit beachten!
- Laborinterne Normalwerte beachten (Absolut und Relativ)
- In der Regel keine relevante zirkadiane Rhythmik – Ausnahme: NK-Zellen, Eosinophile (Tag/Nacht)
- Akute und chronische körperliche Be-/Überlastung beeinflusst die Messwerte!
- Leichte Verschiebungen bei Hauptpopulationen können durch gravierende Veränderungen einzelner Subpopulationen bedingt sein!
- Zur Beurteilung der Relativwerte (z.B. Aktivierungsmarker) immer Absolutwerte mit heranziehen!

Typische Indikationen für die Anforderung einer Lymphozytentypisierung im Immunlabor sind:

- Prävention
- Immunologische Basisdiagnostik!
- Unklare Symptomatik
- Auffälligkeiten im Blutbild (Cave: grobes Raster!)
- Gehäufte Infektionen
- Chronische Infektion
- Immunsuppressive Therapie
- Monitoring von Immuntherapien
- Tumorerkrankung
- HIV-Erkrankung
- Verdacht auf Lymphomerkrankung
- Geplante Mikroimmuntherapie

Fazit

Lymphozytentypisierungen sind heute wichtiger als je zuvor und nicht nur im Verlauf einer HIV-Erkrankung indiziert. Sie sollten sowohl einen zentralen Baustein einer differenzierten Diagnostik gerade bei chronischen Erkrankungen, aber auch eine Basisuntersuchung bei unklaren Beschwerdebildern darstellen. Nicht selten können dadurch schwerwiegende Erkrankungen wie Infektionen (HIV!) oder Lymphome frühzeitig erkannt werden.

Spezielle Therapieformen wie die Mikroimmuntherapie basieren auf der Kenntnis des quantitativen Zustandes der zellulären Immunabwehr und kommen ohne diese Untersuchung nicht aus. Nur Lymphozytentypisierungen mit sinnvollen Erweiterungen der Hauptpopulationen ermöglichen es, auch Defizite bei Fragestellungen wie „Tumorerkrankung oder Immunoseneszenz?“ zu erkennen und gezielt zu behandeln. Damit gehören diese Immuntuntersuchungen zwingend in das Repertoire jedes modernen und ganzheitlichen Therapeuten im Sinne einer patientenorientierten, umfassenden und personalisierten Diagnostik.

AKOM