

# Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

## Institut für Medizinische Immunologie

Direktorin: Prof. Dr. rer. nat. habil. Barbara Seliger



### Praktikum 2010

#### GRUNDVERSUCHE DER IMMUNOLOGIE UND MODERNE IMMUNOLOGISCHE ARBEITSMETHODEN

unter Mitarbeit von

Dr. med. Wolfgang Altermann

Dr. rer. nat. Jürgen Bukur

Dr. rer. nat. Rudolf Lichtenfels

PD Dr. med. Dagmar Riemann

Dr. rer. nat. Gerald Schlaf

## Inhaltsverzeichnis

I. Arbeitsschutzbelehrung	2
1. Ringpräzipitationstest	3
2. Radialer Immundiffusionstest nach Ouchterlony (Präzipitation in einer Gel-Phase)	4
3. Mikrohämagglutinationstest	6
4. Nachweis von Autoantikörpern mittels indirekter Immunfluoreszenz	7
5. Lymphozytendifferenzierung aus dem Vollblut mittels Durchflusszytometrie	11
Normwerte	15
Wichtige Indikationen zur durchflusszytometrischen Analyse von Blutzellen	16
Vergleich der Durchflusszytometrie gegenüber der Lichtmikroskopie	17
6. HLA-Genotypisierung mittels SSP-PCR	18
7. Serologische HLA-Typisierung mittels Mikrolymphozytotoxizitätstest (MLCT)	20

## **Arbeitsschutzbelehrung über sicheres Arbeiten im Labor**

1. Beachten der Notfallmaßnahmen (Fluchtweg, Informationspflicht, Verhalten in Notfällen und bei Unfällen)
2. Beachten der spezifischen Gegebenheiten des Labors (persönliche und allgemeine Schutzmaßnahmen, mögliche Gefahrenquellen)
3. Beachten nachfolgender Anweisungen:

In den Arbeitsräumen darf weder gegessen, getrunken noch geraucht werden! Es ist ein Laborkittel aus Baumwolle zu tragen sowie festes, trittsicheres Schuhwerk. Für alle Arbeiten mit Blut (potentiell infektiös) sind Handschuhe zu tragen. Die Handschuhe sind bei Verlassen des Labors auszuziehen. Telefon nicht mit Handschuhen anfassen!

Unbefugten ist das Betreten der Laborräume untersagt. Besucher werden vor Eintritt ins Labor empfangen.

Mundpipettieren ist untersagt, Pipettierhilfen nutzen!

Auftreten von vermeidbaren Aerosolen (z.B. Desinfektion) vermeiden!

Laborräume aufgeräumt und sauber halten! Auf den Arbeitstischen sollen nur tatsächlich benötigte Geräte und Materialien stehen!

Nicht mehr benötigtes biologisches Material und benutztes Einwegmaterial sind sachgerecht zu entsorgen. Kontaminierte Geräte sind zu desinfizieren bzw. zu autoklavieren.

Abfälle organischer Lösungsmittel sowie als Gifte eingestufte Substanzen müssen gesondert gesammelt und der speziellen Entsorgung zugeführt werden.

Spritzen und Kanülen sollten nur wenn unbedingt nötig, verwendet werden. Sie sind in besonderen Gefäßen zu sammeln.

Vor Beginn und nach Abschluss der Arbeiten ist der Arbeitsplatz zu desinfizieren.

Nach Beendigung der Arbeit die Hände waschen!

Besondere Vorkommnisse und Zwischenfälle sind unverzüglich dem Laborleiter zu melden.

## Ringpräzipitationstest (Präzipitation in der flüssigen Phase)

### Prinzip

- Methode zur Bestimmung von Antikörpern (Ak) bzw. löslichen Antigenen (Ag) bei relativ geringem Materialverbrauch. Durch direktes Überschichten einer Ak-haltigen (Antiserum) über eine Ag-haltige Lösung kommt es innerhalb kürzester Zeit infolge der direkten Berührung an der Grenzschicht zur Präzipitation, die als ringförmige Trübung beobachtet werden kann.
- Präzipitierende Ak vernetzen lösliche Ag zum Präzipitat, führen also nach der Erkennung und Wechselwirkung zwischen beiden zur Präzipitation des Immunkomplexes.

### Problemstellung

Stellen Sie mit Hilfe der Proben A und B Ringpräzipitate dar. Beschreiben Sie die Bildung der Ringpräzipitate (Zeitintervall bis zur Bildung, Stärke, Lage, sonstiges) und vergleichen Sie mit den Befunden aus dem radialen Immundiffusionstest (Ouchterlonytest). Überprüfen Sie, ob Ihre Probe C präzipitierende Ak enthält oder nicht.

### Material

- Anti-IgA-Antiserum (Probe 1) als Ak
- Anti-IgG-Antiserum (Probe 2) als Ak
- Anti-IgM-Antiserum (Probe 3) als Ak
- A,B-Mischserum vom Menschen als Ag  
(5 %ige Saccharoselösung in PBS zum Erhöhen der Dichte in der unteren Phase)

### Gerätschaften

- Reagenzglasständer mit 3 kleinen Probengläschen
- 4 Spitzröhrchen (Eppendorf-Röhrchen) für Probe 1 bis 3
- 0,1-ml-Kolbenhubpipette und Spitzen

### Durchführung

Mit der Kolbenhubpipette werden unter Beachtung des Spitzenwechsels je 0,1 ml A,B-Mischserum in die vorbeschrifteten Reagenzgläschen gegeben und nach erneutem Wechsel der Spitze vorsichtig unter Schräghaltung des Reagenzgläschens 0,1 ml Antiserum (Proben A, B, C) überschichtet. Um Vermischungen zu vermeiden, lässt man die Probe in das schräg

gehaltene Reagenzgläschen entlang der Innenwand auf die dichtere, mit Saccharose versetzte Ag-Lösung laufen (nicht tropfen).

### **Praktische Bedeutung**

Kein klinischer Test, dient mehr Demonstrationszwecken. Die Einfachheit, Empfindlichkeit und Schnelligkeit des Testes macht diesen geeignet, ohne großen Aufwand eine schnelle Information darüber zu erhalten, ob präzipitierende Ak in einem Serum enthalten sind oder nicht. Weiterhin ist der Nachweis von verschiedenen Antigenen in der gleichen Lösung (Ag-Gemisch) möglich.

## **2. Radialer Immundiffusionstest nach Ouchterlony (Präzipitation in einer Gel-Phase)**

### **Prinzip**

Dient der Darstellung von präzipitierenden Antikörpern als Antikörper gegen lösliche Antigene. Die im Antiserum (Mitteldepot) enthaltenen Antikörper diffundieren radial ins Agargel (festes Trägermedium mit großen Poren). Die Antigenmoleküle aus den Antigendepots (Außenlöcher) diffundieren ebenfalls radial ins Agargel. Antikörper und Antigen diffundieren somit aufeinander zu und treffen sich zwischen dem äußeren und dem inneren Depot. Wenn die Antikörper ihre spezifischen Antigenmoleküle treffen, kommt es zur Ausbildung von Antikörper-Antigen-Komplexen, die im "Äquivalenzbereich" der Mischungszone präzipitieren. Die Komplexe wachsen und präzipitieren, da sie zu groß werden. Schwache Präzipitate, die bei Raumtemperatur nur temporär auftreten würden, können bei Kühlschranktemperatur erhalten werden (Temperaturabhängigkeit der Komplexbildung). Treffen sich hingegen Antikörper und Antigene, die nichts miteinander zu tun haben, so diffundieren sie ohne zu präzipitieren aneinander vorbei. Bei Überkonzentrationen von Antigen oder Antikörpern kann sich die Präzipitation bis zum Wegfall vermindern, vgl. die "Heidelberger-Gesetzmäßigkeit".

### **Material**

- Antigenlösung in Eppendorfröhrchen
- Antiserum in Eppendorfröhrchen
- 1,5 % Agar in isotonischem Puffer in Erlenmeyerkolben
- Streichhölzer

### Gerät

- Objektträger
- horizontale Tischplatte oder Tariertischchen
- 10-ml-Plastikpipette
- Bunsenbrenner, Ständer, Becherglas mit Wasser oder Mikrowelle
- Ouchterlony-Stanze
- Wasserstrahlpumpe mit Absaugstutzen für ausgestanzte Agarstücke oder Kanüle
- Kühlschrank (zum Erstarren des Agars)
- Kolbenhubpipette (0,01 ml; 0,02 ml)
- feuchte Kammer (z. B. Petrischale mit feuchtem Filterpapier ausgelegt)

### Durchführung

- Agar wird durch Erhitzen verflüssigt und 2,5 ml mit vorgewärmter Pipette auf waagrecht liegende fettfreie Objektträger aufgebracht. Nach dem Verfestigen wird der mit Agar beschichtete Objektträger in eine feuchte Kammer überführt (Austrocknungsgefahr) und 20 min im Kühlschrank zum endgültigen Erstarren aufbewahrt.
- Ein beschichteter Objektträger wird zweimal mit der Ouchterlonystanze ausgestanzt und die Agarreste mit der Kanüle (evtl. an Wasserstrahlpumpe) entfernt.
- Mittels Kolbenhubpipette werden nach dem folgenden Schema einpipettiert:

Rosette A innen: 20 µl Anti-IgG-Antiserum oder als Alternative 20 µl Anti-IgA-Antiserum  
 außen (im Uhrzeigersinn, oben beginnen): je 10 µl AB-Mischserum in den  
 Verdünnungen 1 : 4, 1 : 8, 1 : 16, 1 : 32, 1 : 64

Rosette B innen: 20 µl Anti-Human-Serumalbumin-Antiserum  
 außen (im Uhrzeigersinn, oben beginnen): je 10 µl AB-Mischserum in den  
 Verdünnungen 1 : 8, 1 : 16, HSA, RSA und Ova

Der Objektträger wird in einer feuchten Kammer zunächst bei Raumtemperatur aufbewahrt. Nach 3 bis 5 Stunden erscheinen die Präzipitationslinien. Beurteilen Sie die Spezifität der Antikörper! Gegebenenfalls über Nacht im Kühlschrank stehenlassen.

### **3. Mikrohämagglutinationstest**

#### **Prinzip**

- Mikromethode zum Nachweis von agglutinierenden Ak (Agglutinine) durch Partikel mit bekanntem Antigenmuster und zur Titration der Agglutinine
- Mikromethode zum Nachweis korpuskulärer Ag (Agglutinogene) mittels Ak bekannter Spezifität
- Ak-Ag-Reaktion, die zur Netzwerkbildung (Vernetzung der Partikel) führen kann
- Agglutinine binden sich spezifisch an Partikel mit den entsprechenden Antigen-determinanten, was zur Netzwerkbildung (Vernetzung der Partikel) und damit zur Verklumpung und Sedimentation der Partikel führen kann
- Sowohl IgG- als auch IgM-Antikörper können als Agglutinine wirken.
- Entsprechend erkennen Hämagglutinine spezifisch Erythrozyten-Ag und führen zur Verklumpung der Trägerpartikel (Erythrozyten)
- Erythrozyten (Ag) stoßen sich infolge ihrer negativen Summaroberflächenladung (Zeta-Potential) voneinander ab. Spezifisch gebundene Ak stören dieses Potential, indem sie Brücken zwischen Partikeln bilden (IgM) und/oder das negative Potential verringern (IgG, IgM). Dieser Effekt verstärkt die Agglutination.
- Iso (Allo)-Agglutinine spielen als sogenannte Serumeigenschaften bei der Blutgruppenbestimmung eine Rolle

#### **Material**

- Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS), pH 7,4 (Probe 1)
- Kaninchen-Anti-Schaferythrozyten-(SRBC)-Antiserum (unbehandelt/inaktiviert: 30 min bei 56 °C im Wasserbad) (Proben T/V)
- A,B-Mischserum vom Menschen (unbehandelt/inaktiviert)
- Komplement aus Kaninchen

### Gerätschaften

- 1 Mikrotiterplatte (Rundboden, 8 x 12 Kavitäten)
- 1 Multipipette (0,025 ml)
- 1 Pipette (0,025 ml)
- 50-ml-Becherglas mit Wasser und leeres 50-ml-Becherglas

### Problemstellung

Überprüfen Sie die Proben T, V bzw. AB parallel auf hämagglutinierende Antikörper gegen Schaferythrozyten. Geben Sie die Titer (letzte erkennbare Agglutination) der Proben an. Überprüfen Sie, ob das AB-Serum ein Serum mit oder ohne Ak gegen SRBC darstellt. Wie verhält sich die Agglutinationsstärke zur Verdünnungsstufe?

### Durchführung

- *Vorbereitung der Mikrotiterplatte:* Eintropfen von 0,025 ml (1 Tropfen) PBS pro Kavität der Mikrotiterplatte mit Multipipette
- *Verdünnung der Proben (Ak):* Zugabe der zu untersuchenden Proben in die jeweils erste Kavität der betreffenden Testreihen. Dazu werden 0,025 ml der Probe aus dem betreffenden Serumröhrchen entnommen und in die 0,025 ml PBS der ersten Kavität überführt und dann durch mehrmaliges pipettieren die Probe im Verhältnis 1 : 2 gemischt (verdünnt). Das weitere Verdünnen erfolgt analog durch schrittweises Überführen von jeweils 0,025 ml Probe (1 : 2) in die mit PBS vorbeschickte Kavitäten der Verdünnungsreihe bis zur 12. Kavität. Die letzte Verdünnungsstufe wird verworfen.
- *Zugabe des Ag:* Nach Herstellung der Verdünnungsreihen für die Proben werden mittels Multipipette 0,025 ml (bzw. 1 Tropfen, Tropfflasche) einer 3 %igen SRBC-Suspension (in PBS) als Antigen auf die in den Kavitäten befindlichen Verdünnungen getropft.
- *Test:* Zur Antikörper-Antigen-Reaktion wird die Platte für 1 - 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Die Platte darf während dieser Zeit nicht bewegt werden.

*Bewertung:* Es gibt verschiedene Reaktions-/Agglutinations-(Verklumpungs)-Stärken, die folgendermaßen zu bewerten sind:

- L - Lyse der Erythrozyten
- T - Teppichbildung
- P - Pelletbildung

## **Praktische Bedeutung**

1. Hämagglutinine (und Hämolytine) spielen bei Unverträglichkeitsreaktionen nach Bluttransfusionen eine Rolle (Kreuzprobe, Blutgruppen).
2. Agglutinine (und Lysine) helfen bei der Erkennung und Beseitigung von fremden, korpuskulären Antigenen (z.B. Bakterien) im Organismus.
3. Einsatz in der Infektionsserologie zum Nachweis von Adeno-, Arbo-, Entero-, Influenza-, Masern-, Mumps- und anderen Viren. In diesen Fällen findet der indirekte Hämagglutinationstest oder die Hämagglutinations-Hemmung Anwendung. Indirekte Hämagglutination: Bindung von Antigenen an Erythrozyten, damit Nachweismöglichkeit von Antikörpern über die Hämagglutination möglich.
4. Wegen der Einfachheit der (halb)quantitativen Auswertung über die Hämagglutinationsreaktion auch Einsatz in Tierversuchen zum Studium von Gesetzmäßigkeiten bzw. Beeinflussungsmöglichkeiten der Antikörperbildung.

## **4. Nachweis von Autoantikörpern mittels indirekter Immunfluoreszenz**

### **Prinzip**

Humane Auto-Antikörper binden gewebe- bzw. organspezifisch an autologe, aber auch kreuzreaktiv an xenogene Antigene. Man kann für den Nachweis von Antikörpern gegen humane Zellstrukturen also Gewebeschnitte von Tierorganen verwenden.

Ratten-Gewebeschnitte (von jeweils Magen, Leber, Niere) werden mit Seren von Patienten mit einer möglichen Autoimmunerkrankung inkubiert. Liegt eine Autoimmunerkrankung vor, enthalten diese Seren Auto-Antikörper, welche spezifisch an die gewebeständigen Antigene (z.B. Zellkerne, Mitochondrien, glatte Muskulatur) binden und mittels fluoreszenzmarkierter Anti-Human-Antiseren (FITC-markierte Antikörper) identifiziert werden können.

### **Problemstellung**

Nachweis von humanen Auto-Antikörpern gegen Kernstrukturen, Mitochondrien und glatte Muskulatur.

### **Durchführung**

## Material und Geräte

- Kombiblockschnitte (Magen/Leber/Niere Präparat aus Ratte )
- feuchte Kammer und Färbe-Küvetten
- Fluoreszenzmikroskop
- Gebrauchsverdünnung von Patientenserum
- Anti-human-IgG, FITC-markiert
- Eindeckmaterialien

## Herstellung der Lösungen

\* PBS: Phosphate buffered saline ( Phosphatgepufferte Kochsalzlösung)

8 g NaCl

1,15 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2H<sub>2</sub>O

0,2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ad 1000 ml Aqua bidest. pH: 7,4

\*\*Mounting Medium (Eindeckmittel):

100 mg ortho-Phenylendiamin

10 ml PBS

90 ml Glycerin 87 % ig p.a.

\*\*\* Evans blue: 15 Tropfen Evans blue auf 60 ml PBS

## Fixierung

Die Objektträger mit Magen/Leber/Nieren-Gewebeschnitten aus Ratte werden bis zu ihrer Verwendung bei -18°C gelagert. Vor der Färbung werden die Präparate 5 min in Aceton fixiert und 2-3 min luftgetrocknet.

## Bindung der Antikörper aus Patientenserum

Auf die Objektträger werden pro Patient 100 µl der Patientenserum-Gebrauchsverdünnung aufgetragen, über den gesamten Schnitt verteilt und 30 min bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert.

## Waschen

Nach Entfernung des verdünnten Patientenserums vom Schnitt mit ca. 1 ml PBS (bitte nicht direkt auf den Schnitt tropfen), wird dieser in einer Küvette in PBS gewaschen und anschließend in einer zweiten, mit PBS-Lösung gefüllten Küvette für weitere 10 min bei Raumtemperatur belassen, um ungebundene humane Antikörper zu entfernen. Nach dem Herausnehmen der Objektträger aus der Küvette, lässt man den Puffer abtropfen und

entfernt um den Schnitt herum anhaftende PBS-Reste mit einem saugfähigen Lämpchen, wobei der Schnitt selbst weder berührt noch trocken werden darf.

### **Konjugat-Reaktion**

Unverzöglich werden 50 µl einer 1:128 in PBS verdünnten Lösung von Anti-human-Immunglobulin G-FITC auf dem Schnitt verteilt, um den/die gebundenen Patienten-Auto-Antikörper mit FITC zu markieren. Dabei wird eine unmittelbare Berührung des Schnittes mit der Pipettenspitze vermieden. Zur Komplettierung der Bindung des markierten, sekundären Antikörpers werden die Objektträger 30 min in einer feuchten Kammer - dunkel bei Raumtemperatur - belassen.

### **Waschen**

In einem 2. Waschschrift werden die Objektträger wie oben gewaschen, anschließend 10 min bei Raumtemperatur mit Evans blue\*\*\* zur besseren Kontrastierung der Fluoreszenz gegengefärbt und die Schnitte mit einem Mull- Lämpchen nach dem Abtropfen an den Geweberändern trockengewischt.

### **Eindecken**

Nach Zugabe von 25 µl Mounting Medium \*\* werden die Schnitte mit einem Deckgläschen eingedeckt und bis zur Begutachtung am Mikroskop dunkel bei Raumtemperatur gelagert.

### **Auswertung**

Begutachten und beschreiben Sie die von Ihnen angefärbten Präparate!

### **Praktische Bedeutung**

Die Bestimmung von Auto-Antikörpern spielt in der medizinischen Praxis eine große Rolle bei der Diagnostik von Auto-Immunerkrankungen (z. B. Rheumatooidarthritis, Hashimoto-Thyreoiditis, Lupus. erythematodes visceralis, Goodpasture-Syndrom u. a.).

### **Weiterführende Fragen**

Machen Sie sich mit Aufbau und Wirkungsweise eines Fluoreszenzmikroskops bekannt. Wie gewährleistet das Immunsystem das Tolerieren von Selbstantigenen?

Wie kann es zum Bruch der immunologischen Toleranz kommen?

Nennen Sie organbezogene und systemische Autoimmunerkrankungen!

Nennen Sie Autoantigene und das zugehörige Krankheitsbild!

Wie können Autoantikörper gegen Kernstrukturen krank machen?

## **5. Lymphozytendifferenzierung aus dem Vollblut mittels Durchflusszytometrie**

**Definition:** Durchflusszytometrie ist die automatisierte Messung von Streulicht- und Fluoreszenzeigenschaften von Zellen/Partikeln in Suspension.

Basierend auf morphologischer und klinischer Verdachtsdiagnose wird ein Panel an monoklonalen Antikörpern (mAk) gegen Differenzierungsantigene auf Leukozyten ausgewählt (sog. CD-Antigene, Cluster of Differentiation). Der Begriff "zellulärer Immunstatus" hat sich in der Praxis für diese Untersuchung fest eingebürgert, was jedoch nicht darüber hinwegtäuschen darf, dass diese Untersuchung allein nicht zur Beurteilung der zellulären Immunität ausreicht!

### **Indikationen**

Klassische Indikationen sind der Verdacht auf angeborene zelluläre Immundefekte, HIV-Infektion auch unter Therapie (halb-jährlich), Abklärung unklarer Lymphozytenerhöhungen (Lymphozytose) oder Lymphozytenverringierungen (Lymphopenie). In der heutigen Diagnostik hat sich das Anwendungsgebiet der durchflusszytometrischen Diagnostik jedoch sehr stark erweitert (siehe Tabelle S. 14).

### **Prinzip**

Vollblut wird mit direkt fluoreszenzmarkierten mAk, die gegen Membranantigene auf T-, B- und NK-Zellen gerichtet sind, inkubiert. Nach Lyse der Erythrozyten mit gleichzeitiger Fixierung der Leukozyten erfolgt ein Waschschriff und anschließend die Messung am Durchflusszytometer.

### **Material und Geräte**

- Patientenblut
- 3 %ige Essigsäure (Lyse der Erys zur Bestimmung der Leukozyten-Zellzahl)
- pro Röhrchen jeweils ein FITC- und ein Phycoerythrin (PE)-markierter mAk (Kit der Firma BD Biosciences, Heidelberg)
- Erythrozytenlyselösung (muss 1:10 mit Aqua dest. Verdünnt werden)
- PBS

Handschuhe

Pipetten

Neubauer-Zählkammer

Durchflusszytometer FACScan (488 nm Laserlicht zur Fluoreszenzanregung; Messung FITC-Fluoreszenz bei 530 nm, Messung PE-Fluoreszenz bei 585 nm)

## **Durchführung**

*Methode:* Doppelmarkierung der Blutleukozyten mit jeweils 2 mAk (FITC- bzw. PE-markiert), Messung mittels Durchflusszytometrie nach Erythrozytenlyse und Waschen der Leukozyten.

1. Röhrchen: CD45-FITC/ CD14-PE (zur Bestimmung des Lymphozytenanteils)
2. Röhrchen: IgG1-Isotypkontrolle-FITC/IgG2a-Isotypkontrolle-PE
3. Röhrchen: CD3-FITC/CD19-PE
4. Röhrchen: CD4-FITC/CD8-PE
5. Röhrchen: CD3-FITC/HLA-DR-PE
6. Röhrchen: CD3-FITC/CD16+56-PE
7. Röhrchen: CD3-FITC/CD8-PE

### **1. Markierung**

100 µl Vollblut (20 °C)

+ 5 µl mAk-Gemisch, 15 min Inkubation im Dunkeln bei 20 °C

### **2. Erythrozytenlyse**

Zugabe von 2 ml fertigverdünnter Lyse-Lösung (20 °C)

vortexen,

10 min Inkubation im Dunkeln bei 20 °C

Zentrifugieren (5 min, 250 x g, 20 °C),

Überstand abgießen

### **3. Waschen**

Zugabe von 2 ml PBS, vortexen, zentrifugieren (min, 250 x g, 20 °C), Überstand abgießen

Waschvorgang ein weiteres Mal wiederholen

Zugabe von 0,2 ml PBS auf das Zellpellet; Proben bei 20 °C dunkel aufbewahren bis zur Messung

### **4. Messung am Durchflusszytometer**

Lymphozyten werden über ihre Streulichteigenschaften von Monozyten und Granulozyten abgegrenzt. Die Kontrolle der Reinheit des Lymphozytengates erfolgt mit der mAk-Kom-

bination CD45/CD14 im Röhrchen 1.

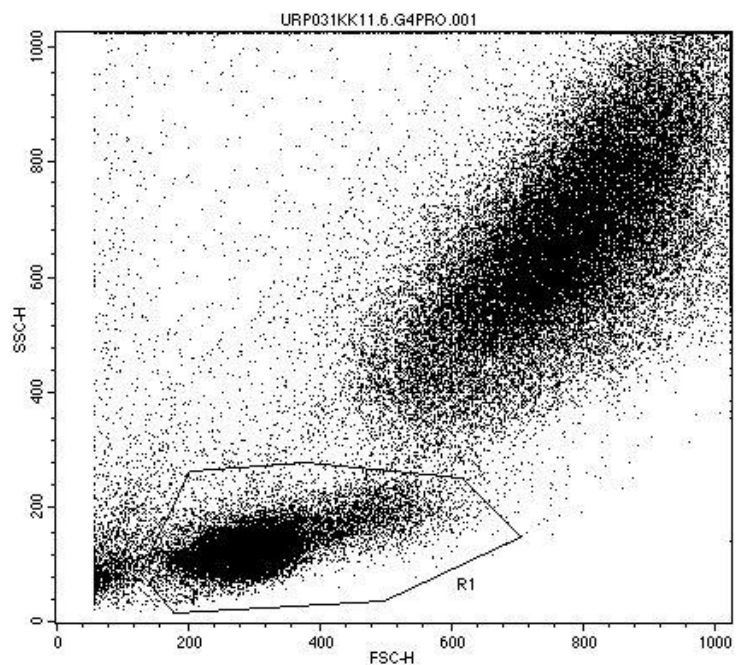


Abb.1: Zweiparameterdarstellung der Zellgröße (Vorwärtsstreulicht) auf der X-Achse und der Zellgranularität (Seitwärtsstreulicht) auf der y-Achse. Um die Lymphozyten (kleine und wenig granulare Zellen) wurde ein „Gate“ gesetzt.

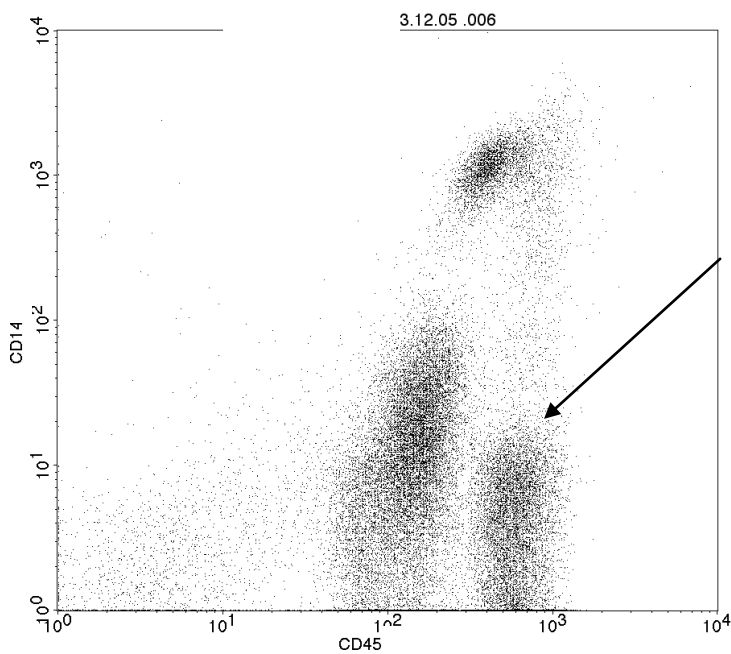


Abb. 2: Zweiparameterdarstellung der gemessenen Zellen des 1. Röhrchens als Fluoreszenz 1 (CD45FITC) gegen Fluoreszenz 2 (CD14PE). Diese Abbildung zeigt Lymphozyten, Monozyten (stark CD14+) und Granulozyten. Der Pfeil zeigt auf die Lymphozyten (viel CD45, kein CD14)

Zur Darstellung der Eigenfluoreszenz bzw. Kontrolle eventueller unspezifischer Bindung über Fc-Rezeptoren dient Röhrrchen 2 mit FITC- und PE-markierter Maus-IgG-Isotypkontrolle. CD3/CD19-mAk (3. Röhrrchen) dienen für die Darstellung von T- und B-Zellen, CD4/CD8-mAk (4. Röhrrchen) für Helfer- und zytotoxische T-Zellen (ohne CD3-Antikörper kann man CD8+ NK-Zellen nicht von CD8+ T-Zellen abgrenzen).

Im 5. Röhrrchen werden aktivierte T-Zellen (HLA-DR positive T-Zellen) gemessen.

6. Röhrrchen: Natürliche Killer (NK)-Zellen sind negativ für CD3 aber positiv für CD16 und/oder CD56.

Die CD3/CD8-Färbung (7. Röhrrchen) dient der korrekten Bestimmung des Anteils von zytotoxischen T-Zellen (CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>). Die Ratio CD4/CD8 wird mit den Helferzellen des 4.Röhrrchens und den zytotox. T-Zellen aus dem 7.Röhrrchen gebildet.

### **Praktische Bedeutung**

Zahlenmäßige Abweichungen der Lymphozytensubpopulationen im peripheren Blut findet man sowohl bei angeborenen und erworbenen Immundefekten (Beispiel: Rückgang der Helferzellen bei Virusinfektionen) als auch während einer immunsuppressiven Therapie (Beispiel: Organtransplantation). Ein Anstieg bzw. eine Veränderung des Phänotyps von Lymphozyten findet man bei Leukämien und Lymphomen.

Im peripheren Blut machen die Lymphozyten ca. 20-40% der Leukozyten aus. Aber nur etwa 2-4% der Lymphozyten des Körpers verweilen im Blut (bei Kindern ist dieser Anteil höher). Die restlichen Lymphozyten befinden sich in den Geweben.

Die Lymphozytenzahl unterliegt Schwankungen, so ist sie morgens niedriger als am späten Nachmittag und abends. Nach kurzer körperlicher Anstrengung kommt es zu einer Vermehrung der Lymphozyten im Blut (besonders NK-Zellen), die auf einen gesteigerten Lymphfluss zurückgeführt wird. Nach stärkerer Belastung wiederum erfolgt eine Verminderung der Lymphozyten bei stärkerem Anstieg der neutrophilen Granulozyten.

Altersgruppe	EDTA-Vollblut	
	absolut	
	Zellen/ $\mu$ l	$\times 10^9$ Zellen/l (Gpt/l)
<b>Neugeborene</b>	700 - 7300	0.7 - 7.3
<b>1 Wo - 2 Mo</b>	3500 13100	- 3.5 - 13.1
<b>2 - 5 Mo</b>	3700 - 9600	3.7 - 9.6
<b>5 - 9 Mo</b>	3800 - 9900	3.8 - 9.9
<b>9 - 15 Mo</b>	2600 10400	- 2.6 - 10.4
<b>15 - 24 Mo</b>	2700 11900	- 2.7 - 11.9
<b>2 - 5 J</b>	1700 - 6900	1.7 - 6.9
<b>5 - 10 J</b>	1100 - 5900	1.1 - 5.9
<b>10 - 16 J</b>	1000 - 5300	1.0 - 5.3
<b>Erwachsene</b>	1000 - 2800	1.0 - 2.8
<b>Quelle:</b>	Immunophenotyping of blood lymphocytes in childhood. Reference values for lymphocyte subpopulations. Comans-Bitter W.M. et al., The Journal of Pediatrics 1997; Vol 130; 3:388-393.	
Absolute Werte: 5-95 Perzentile		

### Normwerte für die Lymphozytensubpopulationen (Erwachsene):

		<u>% von Lymphozyten</u>	<u>absolut (Zellen/<math>\mu</math>l)</u>
B-Lymphozyten	CD19+	7-23	90-350
NK-Zellen	CD16+56+/ $\beta$ 2- 200	6-29	100-500
T-Lymphozyten	CD3+	60-85	900-2000

T-Lymphozytensubpopulationen:

	<u>% von Lymphozyten</u>	<u>absolut (Zellen pro <math>\mu</math>l)</u>
Helfer-T-Zellen CD3+ 4+	28 - 57	600 - 1000
zytotox. T-Zellen CD3+ CD 8+	10 - 39	400 - 800

Quotient CD 4+/CD 8+T                      0,9 - 2,5

Aktivierungsmarker  
CD 3+/  
HLA-DR+                      % der T-Zellen  
3 - 15

### Wichtige Indikationen zur durchflusszytometrischen Analyse von Blutzellen\*

<b>Hämatologie</b>	
Unklare Anämie	Retikulozyten und Normoblasten, Progenitorzellen
Paroxysmale nächtliche Hämoglobinurie	Phosphoinositol-verankerte Membranproteine (CD55 und CD59 auf Erythrozyten, CD14 auf Monozyten, CD24 u. CD59 auf Neutrophilen)
Thrombozytopenie (ITP)	Thrombozytenzählung und -Autoantikörper, RNS-haltige Plättchen
Akute Leukämien	Immunphänotypisierung (ALL, AML)
CML-Blastenschub	Immunphänotypisierung
Leukämische Lymphome	Hilfe bei der Zuordnung zur REAL-Klassifikation, CLL
autologe Stammzellen	CD34-Zellen im peripheren Blut und Leukaphereseprodukt
<b>Immunologie</b>	
HIV	Bestimmung der T-Helfer-Zellen, zytotox. Antwort, Virämie
CVID	Analyse der B-Zell-Reifung
Chronic Fatigue Syndrom	Analyse der NK-Zellen und nicht MHC-beschränkten T-Zellen
perinatale Neutropenie	Autoantikörper gegen neutrophile Granulozyten
Immunschwäche (Kinder)	T-/B-Zellen (SCID), Lymphozytentransformationstest (Mitogenstimulation)
Chronische Granulomatose	fehlender oxidativer Burst der Granulozyten, Überträgerstatus (Mutter)
Sarkoidose (M. Boeck)	CD4-Zellen in der bronchoalveolären Lavage (BAL, CD4/8 >3)
Exogen-allergische Alveolitis	CD8-Lymphozytose in der BAL (CD4/8-Quotient <1,2)
seronegat. Spondylarthritiden	HLA-B27-Bestimmung
rheumatoide Arthritis	HLA-DR4-Subtypisierung für die Verlaufsprognose
Allergie, atopische Dermatitis	
	Basophilen- bzw Eosinophilendegranulation
CMV-Infektion	Nachweis virusspezifischer T-Zellen mittels Tetramertechnik (abhängig vom HLA-Typ des Patienten)
Immunparalyse	Nachweis des Abfalls von HLA-DR auf Monozyten

<b>Hämostaseologie</b>	
Thrombozytenaktivierung	präthrombotische Expression von CD62 (besondere Entnahmebedingungen)
Thrombozyten-funktionsstörungen	Bernard-Soulier-S., Fehlen von CD42b (Glykoprotein Ib) Thrombasthenie Glanzmann, Fehlen von CD41 (gpIIb/IIIa)

Modifiziert nach: [http://knm1.ibe.med.uni-muenchen.de/kn\\_home/InfoAerzte/Immunphaenotypisierung/diagnostik\\_immunphaeno.htm](http://knm1.ibe.med.uni-muenchen.de/kn_home/InfoAerzte/Immunphaenotypisierung/diagnostik_immunphaeno.htm)

## **Vergleich der Durchflusszytometrie gegenüber der Lichtmikroskopie**

### ***Durchflusszytometrie***

#### Vorteile

Schnelle Methode; Analyse von 500 bis zu 4000 Zellen pro Sekunde  
 statistische Sicherheit  
 geringes Ausbleichen, da die Zellen den Laser sehr schnell passieren  
 gleichzeitig mehrere Fluoreszenzen messbar (abhängig von der Laserlichtquelle)  
 gute Quantifizierung der Fluoreszenz einzelner Zellen (mehr als 1000 Teilabstufungen möglich)  
 Korrelation der Streulichteigenschaften mit Fluoreszenzsignalen

#### Nachteile

Fluoreszenzverteilung auf einer Zelle nicht detektierbar  
 nur Einzelzellsuspension messbar, kein Gewebe

### ***Lichtmikroskopie***

#### Nachteile

Langsame, zeitraubende Methode; Analyserate (100 Zellen pro Minute)  
 schlechte Statistik  
 Quantifizierbarkeit der Fluoreszenz begrenzt wegen niedriger Sensitivität des Auges  
 (hohe Subjektivität, nur 4 Teilabstufungen, neg./schwach pos./pos./stark pos.)  
 Bleichen der Probe

#### Vorteil

Teilfluoreszenz und Zellmorphologie können beurteilt werden  
 Gewebezuordnung einer fluoreszierenden Zelle ist möglich

## **6. HLA-Geno-Typisierung mittels SSP-PCR**

### **Prinzip**

Als Alternative zur serologischen HLA-Phänotypisierung wird die HLA-Genotypisierung (Nachweis der Allele) für die Bestimmung der HLA Klasse-II-Merkmale genutzt. Im Gegensatz zur Phänotypisierung unter Verwendung eines Systems aus 3 biologischen Komponenten, werden bei der Genotypisierung synthetisch hergestellte, standardisierbare Komponenten für das Testsystem eingesetzt. Dabei werden die bekannten, genetischen Unterschiede der einzelnen HLA-Allele untersucht und daraus die HLA-Typisierung des Probanden erstellt.

Zur Untersuchung der allelen Varianten wird die SSP-PCR (SSP = sequence specific primer) eingesetzt. Die SSP-PCR basiert darauf, dass Primer nur dann eine Vervielfältigung der Zielsequenz ermöglichen, wenn sie sich komplementär anlagern können und insbesondere ihr 3'-Ende exakt passt. Analog einer HLA-Phänotypisierung wird für jede Allelgruppe (Antigen) ein spezifisches Primerpaar eingesetzt. Nach einer Gelelektrophorese, in der die einzelnen Amplifikate aus den Reaktionsmischen aufgetrennt werden, kann dann entsprechend den positiven Reaktionen (Bildung des spezifischen Amplifikats) der HLA-Typ des Probanden definiert werden.

### **Problemstellung**

Extrahieren Sie die DNA aus Zitratblut und führen Sie eine HLA Klasse II-Genotypisierung (DRB) durch!

### **Material**

- humanes Zitratblut oder EDTA-Blut
- DNA-Extraktionskit
- HLA-DRB1\*, -DRB3\*-5\* Cyclerplate
- Mastermix
- Aqua dest. (reinst für PCR)
- Taq-Polymerase (5 Units/µl)
- Pipettenspitzen
- 1,5 ml Eppendorfröhrchen
- Combitip (500 µl, Eppendorf)
- 1, 5% Agarose-Gel mit Ethidiumbromid (Vorsicht! Kanzerogen + Mutagen)
- 1x TBE-Puffer
- Handschuhe !

### **Geräte**

- Eppendorfzentrifuge

- Thermoschüttler
- Vortexer
- Multistepper (Eppendorf)
- Pipetten (0,2-10,0 µl; 20-200 µl und 100-1.000 µl)
- 8-Kanalpipette (0,2-10,0 µl)
- Stromversorgungsgerät
- Elektrophoresekammer
- UV-Transilluminator mit Photoeinrichtung

## **Durchführung**

### **DNA Extraktion**

- entsprechend dem Firmenprotokoll

### PCR Ansatz (pre-PCR-Bereich)

- Herstellen des PCR Mastermixes (DNA, Aqua dest., Puffermix, Taq Polymerase)
- Ansetzen einer HLA-DRB Typisierung
- Cyclerplatte an Praktikums-MTLA abgeben

### **Gelelektrophorese (post-PCR-Bereich)**

- Ansatz der Gelelektrophorese und Lauf  
  Übung zum Ansetzen der Gelelektrophorese
- Photodokumentation

### **Seminarraum**

- Auswertung der SSP-PCR und Bestimmen des HLA-Genotyps

## **7. Serologische HLA-Typisierung mittels Mikrolymphozytotoxizitätstest (MLCT)**

### **Prinzip**

Nach der Bindung von Antikörpern vom IgM- oder IgG-Isotyp an zelluläre Antigene erfolgt die Komplementaktivierung und die Zerstörung der Zelle mittels membrangebundener Komplementkomplexe (MAC – Membrane Attack Complex / C5b-C9), die eine Pore in der Zellmembran bilden. Dieser Mechanismus der humoralen Immunantwort wird genutzt, um unbekannte Antigene oder im Umkehrverfahren Antikörper unbekannter Spezifität im Lymphozytotoxizitätstest (LCT) nachzuweisen.

Der erste Schritt im LCT ist die Inkubation eines Antikörpers mit den Lymphozyten, welche das entsprechende Oberflächenantigen besitzen (Antigen-Antikörper-Reaktion). Nach der Zugabe der Komplementkomponenten (Kaninchenserum) erfolgt nach positiver Antigen-Antikörper-Reaktion im zweiten Schritt die Aktivierung der Komplementkaskade über den klassischen Weg und die Zerstörung der Zelle. Zum Schluß erfolgt eine Vitalfärbung, um die zytotoxischen Reaktionen sichtbar zu machen.

### **Problemstellung**

Beurteilen Sie die Reaktionsstärke durch Schätzen der Zahl toter Lymphozyten (x %) pro Lymphozytengesamtzahl (100 %) in jeder Kavität.

Erstellen Sie den HLA Klasse I-Phenotyp entsprechend dem Reaktionsprotokoll.

### **Material**

- mit vorbereiteten Zellen (Blutspender) getropfte Terasaki-Kammer mit anti-HLA Klasse I Testseren (72-er Platte)

### **Geräte**

- Inverses Fluoreszenzmikroskop (Okulare 10x, Objektiv 10x/F) mit Sperrfilter 0 - 510 nm, Anregungsfilter G 247, KP 490 mit Phasenkontrasteinrichtung

### **Durchführung**

#### **Teil 1 (erfolgt durch die MTLA)**

- Tropfen von je 1 µl Zellsuspension in jede Kavität mittels Hamiltonspritze
- 30 min Inkubation bei Raumtemperatur (Ak-Ag-Reaktion)
- Zugabe von je 5 µl Kaninchen-Komplement mittels 6-Kanal-Hamiltonspritze „Kamm“
- 60 min Inkubation bei Raumtemperatur (Komplementreaktion)
- Zugabe von Ethidiumbromid/Acridinorange-Farbstoff (2 µl pro Kavität) und Hämopath (2µl)

**Teil 2**

- Ablesung am Fluoreszenzmikroskop (Achtung! UV-Licht!) und Eingeben der Reaktionsstufen
- Auswertung der Reaktionen

**Praktische Bedeutung**

Der MLCT erlangte vor allem in der Transplantationsimmunologie bei der HLA-Phänotypisierung von Rezipienten und Donoren sowie bei der Verträglichkeitsprobe (cross match) vor der Transplantation solider oder fluider Organe mittels Donorlymphozyten und Rezipientenserum zum Ausschluß von Inkompatibilitäten Bedeutung. Auch bei forensischen Untersuchungen (z.B. Vaterschaftsnachweis) findet er vielfachen Einsatz.