

Diplomarbeit

**Bestimmung der Immunglobulinproduktion mittels
ELISPOT-Technik**

Detection of the immunoglobulin-production by using the ELISPOT - assay

eingereicht von

Daniel ULRICH

Geb.Dat.: 21.09.1987

zur Erlangung des akademischen Grades

**Doktor(in) der gesamten Heilkunde
(Dr. med. univ.)**

an der

Medizinischen Universität Graz

ausgeführt am

UKIM/Klin. Abtlg. f. Rheumatologie und Immunologie

unter der Anleitung von

Univ. Prof. Dr. Hans-Peter Brenzinsek

Ort, Datum

(Unterschrift)

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Graz, am

Unterschrift

Danksagung

Zu Beginn möchte ich mich ganz herzlich bei meinen Eltern für die langjährige Unterstützung bedanken, durch welche es überhaupt erst möglich wurde, dieses faszinierende Medizinstudium zu besuchen. Besonders bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Univ. Prof. Dr. Hans-Peter Brezinschek für die tatkräftige Unterstützung, die vielen Anregungen und Vorschläge für diese Arbeit und für die Einführung in die aufregende Welt der Forschung. Frau Evelin Spieß danke ich insbesondere für die engagierte Unterstützung bei der Planung und praktischen Umsetzung dieser Arbeit im Immunologie-Labor. Ohne ihre oft unverzichtbaren Ideen und Vorschläge, wäre diese Arbeit nicht so erfolgreich gewesen.

Abschließend möchte ich mich noch bei meiner Freundin Carola dafür bedanken, dass sie mir immer zur Seite gestanden ist und mich unterstützt hat.

Zusammenfassung

Der B-Zell „enzyme-linked immuno spot“ (ELISpot) ist noch kein Standardinstrument zur quantitativen Messung von antigenspezifischen B-Zellen. Schuld daran ist der Mangel an entsprechenden Reagenzien und die fehlende Standardisierung bezüglich der Zellanzahl, Art der Zellen und die Konzentration des Antigens. Ziel dieser Arbeit war es diese Variablen, auf Basis eines kommerziell erhältlichen ELISpot Kits, zum Nachweis Immunglobulin G (IgG)-produzierender peripherer B-Zellen bei 6 Probanden näher zu charakterisieren.

Zur Bestimmung eines spezifischen IgG wurde das Antigen Tetanus Toxoid (TT) in einer Konzentration von 5µg/ml verwendet, zur Bestimmung der Anzahl von IgG-produzierenden B-Zellen wird anti-IgG (algG) auf die ELISpot Platten gebunden.

Die Zellkonzentration wurde abhängig vom Liganden (TT oder algG) gewählt und lag bei 200.000 und 400.000 Zellen/Well (TT) beziehungsweise 50.000 und 100.000 Zellen/Well (algG). Es wurden sowohl eingefrorene PBMC als auch frisch isolierte periphere mononukleäre Zellen (PBMC) verwendet. Die Zählung der positiven Spots erfolgte durch einen ELISpot Reader.

Beim spezifischen TT B-Zell ELISpot zeigt sich wie erwartet ein höheres positives Ergebnis, je kürzer die letzte Auffrischungsimpfung zurückliegt. Um die Spotzahl zu ermitteln, die Positiv von Negativ trennt, wurde eine Grenzwertoptimierungskurve erstellt. Bei einer Spotzahl von über 3,5 lag die Sensitivität bei 44% und die Spezifität bei 100%, weshalb Wells mit ≥ 4 Spots als positiv gewertet wurden. Weiters kann durch die Verwendung einer höheren Zellzahl (400.000 Zellen für den Nachweis von TT-spezifischen B-Zellen und 100.000 Zellen zur Bestimmung aller IgG-produzierender B-Zellen), eine bessere Trennung zwischen negativ und positiv erzielt werden. Zuletzt zeigte sich auch, dass die Voraktivierung der B-Zellen über Toll-like Rezeptor 7 (TLR-7) und Interleukin 2 (IL-2) die Spotzahl deutlich erhöht. Aufbauend auf diesen Daten konnte nun eine Anleitung zur routinemäßigen Durchführung eines B-Zell-ELISpot erstellt werden.

Abstract

The B-cell „enzyme-linked immuno spot“ (ELISpot) is still not routinely used to determine antigen-specific B-cells. Responsible for this situation are the lack of respective reagents and standardization in terms of cell count utilized in the test, the type of cells and the concentration of the specific antigens. The aim of this study was, to characterize these variables using a commercial ELISpot-kit which measures the number of peripheral blood IgG-secreting B-cells in 6 healthy individuals. To determine the frequency of specific IgG-secreting B-cells, the antigen tetanus toxoid (TT) in a concentration of 5µg/ml was used. To analyze the frequency of all IgG-producing B-cells, anti-IgG (algG) was utilized as a capture antibody on the ELISpot plates. Depending on the ligand (TT or algG) the cell concentration was adjusted between 200.000 and 400.000 cells/well (TT) or 50.000 and 100.000 cells/well (algG). Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were either freshly isolated or cryopreserved. The plates were analyzed using a ELISpot Reader. As expected, individuals who have been recently vaccinated had a higher number TT-specific B-cells in the peripheral blood. To determine the number of spots, that discriminate positive from negative results a Receiver Operating Characteristic (ROC)-curve was generated. Value above 3,5 spots/well had a sensitivity of 44% and a specificity of 100%. Thus wells with ≥ 4 spots were reated positive. Utilizing higher cell concentrations (400.000 cells for TT-specific B-cells and 100.000 cells for IgG-producing B-cells), a better discrimination between negative and positive results was achieved. Moreover, pre-activating B-cells via Toll-like receptor 7 (TLR-7) and Interleukin-2 (IL-2) further increased the number of spots per well. Using the informations generated in this study it was possible to generate a standard operating procedure for the B-cell ELISpot.

Inhaltsverzeichnis

Danksagungen	II
Zusammenfassung	III
Abstract	IV
Inhaltsverzeichnis	V
Abkürzungen	VII
Abbildungsverzeichnis	X
Tabellenverzeichnis	XI
1 Einleitung.....	S 1
2 Literaturrecherche	S 3
2.1 Das Immunsystem.....	S 3
2.1.1 Immunantwort.....	S 4
2.1.2 Das angeborene Immunsystem.....	S 5
2.1.3 das adaptive (erworbene) Immunsystem.....	S 5
2.1.4 CD Nomenklatur	S 7
2.1.5 B-Lymphozyten.....	S 7
2.1.6 B-Zell Rezeptor.....	S 7
2.1.7 Aktivierung.....	S 8
2.1.7.1 TLR bei der Aktivierung von B-Zellen	S 8
2.1.7.2 Stimulation der B-Zellen	S 10
2.1.7.3 Alternative B-Zell Aktivierung.....	S 10
2.1.8 Antikörper	S 11
2.1.8.1 Eigenschaften der Antikörper	S 12
2.2 Immunsuppressive Therapie	S 14
2.2.1 Immunsuppressiva Einführung	S 14
2.2.2 Immunsuppressiva bei Autoimmunerkrankungen.....	S 15
2.2.3 Immunsuppressiva bei rheumatoider Arthritis	S 17
2.3 Primäre und sekundäre Immundefizienz	S 18
2.3.1 Primäre Immundefizienz.....	S 18
2.3.2 B-Zell Immundefizienz.....	S 18
2.3.2.1 Agammaglobulinämie	S 18
2.3.2.2 Hypogammaglobulinämie	S 19
2.3.2.3 CVID.....	S 19

2.3.2.4	IgA-Mangel	S 20
2.3.3	Kombinierte Immundefekte.....	S 20
2.3.3.1	SCID.....	S 20
2.3.4	Sekundäre Immundefizienz	S 21
2.3.4.1	Immunparalyse nach Rückenmarksverletzungen	S 22
2.4	Impfungen	S 23
2.4.1	Passive Immunisierung	S 23
2.4.2	Aktive Immunisierung	S 23
2.4.3	Simultan Impfung.....	S 24
2.4.4	Tetanus	S 24
2.4.4.1	Tetanus-Impfungen	S 25
2.4.5	Impfung bei Immundefizienz.....	S 26
2.5	B-Zell ELISpot	S 27
2.5.1	Die zwei Wege des B-Zell ELISpot.....	S 28
2.5.2	Methodologische Aspekte	S 30
2.6	Ausgewählte bisherige Studien und Forschungen	S 33
2.6.1	Immunsystemreaktionen gegen Tetanus Toxoid [32]	S 33
2.6.2	Identifikation von Antigen-spezifischen B-Zell Populationen [33].....	S 33
2.6.3	Antikörper-bildende Zellen und Plasmablasten im peripheren Blut bei CVID Patienten nach Impfung [34]	S 34
2.6.4	Vergleich eines “limiting dilution assay“ (LDA) und eines ELISpot für die Feststellung der Memory B-Zelle vor und nach einer Immunisierung mittels eines Protein- Polysaccharid konjugierten Impfstoffes bei Kindern [35]	S 35
2.6.5	Untersuchung über die Antigen-spezifische Immunität nach Diphtherie- und Tetanus-Schutzimpfung mit dem B-Zell ELISpot [36]	S 35
2.6.6	Optimierung eines humane IgG B-Zell ELISpot Assays für die Analyse von impfinduzierten B-Zell Antworten [37].....	S 37
3	Material und Methoden	S 38
3.1	Vorstellung des Projektes.....	S 38
3.2	B-Zell ELISpot zur Beurteilung der B-Lymphozyten Funktion.....	S 39
3.3	Erforderliche Geräte	S 40

3.4	Erforderliche Reagenzien	S 41
3.5	Allgemeine Vorbereitungen	S 42
3.5.1	Probegewinnung, Zellisolierung und Einfrieren	S 42
3.5.2	Auftauen der eingefrorenen Zellen	S 43
3.5.3	Bestimmung der Viabilität	S 44
3.6	Tetanus Toxoid in geeigneter Dosis herstellen	S 45
3.7	B-Zell ELISpot von Mabtech [1], [29]	S 45
3.7.1	In Vitro Stimulierung	S 46
3.8	B-Zell ELISpot Durchführung	S 47
4	Ergebnisse und Resultate	S 49
4.1	Studienpopulation	S 49
4.2	Anordnung der Probanden auf der PVDF-Platte	S 50
4.3	Testdurchführung	S 50
4.3.1	Spotauswertung des B-Zell ELISpot	S 51
5	Diskussion	S 61
6	Literaturverzeichnis	S 64

Abkürzungen

7-AAD	7-Amino-Actinomycin D
algG	Anti IgG
AP	Alkalische Phosphatase
APC	Antigenpräsentierende Zelle
BCIP/NBT	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolylphosphatase p-Toluidinesalt/ Nitro Blue Tetrazolium Chloride
CD	Cluster of Differentiation
CR	Komplementrezeptor
CRP	C-reaktives Protein
CTL	Cytotoxischer Lymphozyt
CVID	Common variable immundeficiency
DCARDs	Disease controlling anti-rheumatic drugs
DMARDs	Disease modifying anti-rheumatic drugs
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ELISpot	Enzyme-linked Immuno Spot
FCS	Fetales Kälberserum
HLA	Human leukocyte antigens
HSP	Hitzeschockprotein
I.E.	Internationale Einheiten
IF	Interferon
IgA	Immunglobulin A
IgD	Immunglobulin D
IgE	Immunglobulin E
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IL	Interleukin
kDA	Kilodalton
LDA	Limiting dilution assay
LF	Limit of flocculation
LPS	Lipopolysaccharid
LTS	Lipoteichonsäure

MALT	Mukosaassoziiertes lymphatisches Gewebe
MASP	Mannose binding lectin associated serine protease
MBL	Mannosebindendes Lektin
MD-2	Myeloid differentiations factor 2
MenC	Meningokokken C
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
MPS	Myeloproliferatives System
mTOR	Mammalian target of rapamycin
MTX	Methotrexat
NFAT	Nuclear factor of activated T-cells
NK	Natürliche Killerzelle
NLR	Nucleotide-binding oligomerization domain receptors
NOD	Nucleotidbindungs-Oligomerisierungsdomäne
NSAR	Nichtsteroidale Antirheumatika
PAMPs	Pathogenassoziiertes molekulares Muster
PBMC	Peripheral blood mononuclear cells
PBS	Phosphate buffered saline
PML	Progressive multifokale Leukenzephalopathie
PRR	pattern recognition receptor
PVDF-Platte	Polyvinylidenfluorid-Platte
PWM	Kermesbeerenmitogenen
R848	Resiquimod
RA	Rheumatoide Arthritis
RES	Retikuloendotheliales System
RKI	Robert Koch-Institut
RNA	Ribonukleinsäure
SAC	Staphylococcus aureus Cowan
SAP	Signaling lymphocyte activation molecule associated protein
SCID	Severe combined immundeficiency
STIKO	Ständige Impfkommission
TLR	Toll-ähnlicher Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
ZNS	Zentralnervensystem

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Immunglobulin	S. 11
Abbildung 2: Immunglobulinklassen	S. 13
Abbildung 3: Schematische Darstellung aller B-Zell ELISpot Varianten [31]	S. 29
Abbildung 4: B-Zell ELISpot mit immobilisiertem Antigen [29]	S. 31
Abbildung 5: B-Zell ELISpot mit biotinyliertem Antigen und total IgG ELISpot [29]	S. 32
Abbildung 6: Schematische Darstellung der wichtigen Arbeitsschritte	S. 39
Abbildung 7: Überblick über die Sekretion von IgG	S. 53
Abbildung 8: Verteilung der IgG-Antikörper auf TT in Abhängigkeit der Zellkonzentration	S. 54
Abbildung 9: Verteilung der IgG-Antikörper auf coating-mABs in Abhängigkeit der Zellkonzentration	S. 54
Abbildung 10: Grafische Darstellung der Spotverteilung bei 400.000 Zellen auf TT (Boxplot).....	S. 56
Abbildung 11: Grafische Darstellung der Spotverteilung bei 200.000 Zellen auf TT (Boxplot).....	S. 56
Abbildung 12: Grafische Darstellung der Spotverteilung bei 100.000 IgG produzierenden Zellen auf coating-mABs (Boxplot).....	S. 57
Abbildung 13: Grafische Darstellung der Spotverteilung bei 50.000 IgG produzierenden Zellen auf coating-mABs (Boxplot)	S. 57
Abbildung 14: Verhältnis von TT-spezifischen IgG auf gesamt-IgG	S. 58
Abbildung 15: Prozent von TT-spezifischen IgG im Verhältnis zum gesamt-IgG.....	S. 58
Abbildung 16: Korrelation der Spotzahl in Abhängigkeit der letzten Auffrischungsimpfung	S. 59
Abbildung 17: Vergleich von 100.000 voraktivierten Zellen pro Well mit 200.000 nicht voraktivierten Zellen pro Well auf gesamt IgG	S. 59
Abbildung 18: Vergleich von 50.000 voraktivierten Zellen pro Well mit 200.000 nicht voraktivierten Zellen pro Well auf gesamt IgG	S. 60

Tabellenverzeichnis

Tabelle1: Antigenerkennung im angeborenen Immunsystem durch TLRs .	S. 10
Tabelle2: Die 3 Arten von Immunsuppressiva [10], [11]	S. 14
Tabelle3: Ausgewählte Liste der Biologika [12]	S. 16
Tabelle4: Auflistung der wichtigsten angeborenen Immundefekte [17].....	S. 18
Tabelle5: Ursachenliste der sekundären Immundefekte [19]	S. 21
Tabelle6: Liste der Tetanusimpfstoffe in Österreich (St. 08.11.2012) [26]...	S. 25
Tabelle7: Allgemeine Vorbereitungen zur Durchführung eines IgG B-Zell ELISpot [39]	S. 42
Tabelle8: Auftauen der PBMC mit C.T.L.-Anti-Aggregate™ Wash Supplement [39]	S. 44
Tabelle9: Bestimmung der Viabilität	S. 45
Tabelle10: In Vitro Stimulierung und Plattenvorbereitung [1]	S. 46
Tabelle11: Inkubation der Zellen auf die Platten und ermitteln der Punkte [1]	S. 47
Tabelle12: Studienpopulation	S. 49
Tabelle13: Anordnung der 6 Probanden auf den PVDF-Platten	S. 50
Tabelle14: Spotauswertung des B-Zell ELISpot	S. 53
Tabelle15: Sekretion von IgG in Abhängigkeit der Zellkonzentration	S. 55

1 Einleitung

Das Immunsystem ist eines der wichtigsten Systeme des menschlichen Körpers. Ohne Immunsystem wäre der Mensch nicht in der Lage, zu überleben. Auf und in unserem Körper leben zirka eine Billion Mikroorganismen (das entspricht 0,5 bis 1 Kilogramm unseres Körpergewichts), die unser Körper in jeder Sekunde bekämpfen oder eindämmen muss. Die meisten davon sind sogenannte kommensale Bakterien, die zur natürlichen Flora des Körpers gehören und sogar äußerst notwendig sind, um vor Infektionserregern zu schützen. Dazu kommen unzählige Mikroorganismen, die sich in unsere Umgebung befinden. Deshalb ist eine primäre (angeborene) oder sekundäre (erworbene) Immundefizienz eine ernstzunehmende Erkrankung. Diese Patienten haben ein vielfach erhöhtes Risiko an einer Infektion zu erkranken. Für sie kann jeder banale Infekt lebensbedrohliche Komplikationen mit sich bringen. Deshalb ist es umso wichtiger, dass diese Patientenpopulationen, prophylaktischen Schutz bekommen. Die beste Prophylaxe, um Erkrankungen vorzubeugen, ist die Impfung. Für die Langzeitimmunität sind die B-Lymphozyten am bedeutendsten. Aber wie funktioniert das Immunsystem? Welche immunsupprimierenden Medikamente gibt es und wie wirken sie? Wann werden diese Medikamente angewandt? Wie überprüft man den Impfschutz? Mit welchem Verfahren kann man die B-Zell Funktion kontrollieren? Um diese Fragen zu beantworten habe ich vor, die B-Zell Funktion mit einem B-Zell Enzyme-linked Immuno Spot (ELISpot) zu evaluieren. Ich möchte dafür die Referenzbereiche für die Produktion von IgG-Antikörpern nach spezifischer und unspezifischer Aktivierung von B-Lymphozyten zunächst einmal aus dem peripheren Blut von gesunden Probanden erstellen. Ohne einen Normalbereich für die Anzahl und Frequenz von IgG-sezernierenden B-Lymphozyten nach einer in-vitro-Stimulation ist es nicht möglich pathologische Bereiche zu definieren. Ich hoffe, dass ich mit dieser Arbeit dazu beitragen kann, die Immunantwort immunsupprimierter Patienten und die Auswirkungen eines immunmodulierenden Medikamentes besser zu verstehen. Außerdem hoffe ich, dass ich mit meiner Arbeit den B-Zell-ELISpot für die Antikörperdiagnostik in den Klinikalltag etablieren kann.

Die Diplomarbeit ist in verschiedene Abschnitte gegliedert:

Nach der Einleitung befindet sich im Kapitel 2 die Literaturrecherche, die ich sorgfältig aus dem Internet, verschiedensten Büchern und medizinischen Datenbanken, wie PubMed, zusammengetragen habe. Am Anfang dieses Kapitels wird der Aufbau des Immunsystems erklärt. Hier werden vor allem die Unterschiede des angeborenen beziehungsweise des erworbenen Immunsystems aufgezeigt. Anschließend werden die unterschiedlichen Arten der Immundefizienz und die Immunsuppressive Therapie thematisiert. Auch die unterschiedlichen Arten der Impfungen, die Tetanusimpfung im speziellen, werden in diesem Kapitel besprochen. Am Ende dieses Kapitels wird das B-Zell-ELISpot Verfahren und der bisherige Forschungsstand dieser wunderbaren Technik erläutert.

Die Kapitel 3 und 4 befassen sich mit dem praktischen Verfahren dieser B-Zell-ELISpot Technik zur Messung der IgG-Antikörper bildenden B-Zellen, wobei ein kommerziell erhältlicher Human IgG ELISpot^{Plus} Kit (Firma Mabtech) [1] verwendet wurde. Am Anfang des Kapitels 3 werden neben der Vorstellung des Projektes, die Zielsetzung, die benötigten Materialien und allgemeinen Vorbereitungen sowie auch die technischen Details dieses Vorgangs aufgezeigt. Anschließend folgt die Auswertung und die Interpretation der Daten. Die gesamte praktische Arbeit wurde im Labor der Immunologie der medizinischen Universität Graz durchgeführt.

Im Kapitel 5 werden schlussendlich die Ergebnisse diskutiert, die wichtigsten Aspekte noch einmal zusammengefasst und die zukünftig möglichen Ausgangspunkte für weiterführende Arbeiten dieses Verfahrens aufgezeigt.

Gleichheitsgrundsatz: Um die Lesbarkeit zu vereinfachen sind personenbezogene Bezeichnungen in dieser Arbeit nur in männlicher Form angeführt. Diese gelten aber unabhängig davon für beide Geschlechter.

2 Literaturrecherche

2.1 Das Immunsystem

Die ersten Barrieren für Krankheitserreger sind eine intakte Haut oder Schleimhaut mit funktionierenden Zilien.

Des Weiteren sind auch chemische Barrieren, wie Phospholipase A, Histatine, Lysozym im Speichel, der saure pH-Wert im Magen, Cryptidine oder α -Defensine die von Paneth-Zellen im Dünndarm produziert werden, β -Defensine, die von der Haut und den Epithelien des Atem- und Urogenitaltraktes produziert werden, ein hervorragender Schutz gegen eindringende Mikroorganismen.

Diese Teile der Erregerabwehr betrachtet man jedoch nicht als eigentlichen Teil des Immunsystems. Erst nach Überwindung dieser Barrieren, kommt es zur Immunreaktion [2].

Auch psychische Faktoren spielen eine Rolle in der Entstehung von Krankheiten. Dies wird auch die Psychoneuroimmunologie genannt. Nicht nur das nervöse und endokrine System beeinflussen via Neurotransmitter oder Hormonen das Immunsystem, sondern auch das Immunsystem beeinflusst mittels Zytokinen und Chemokinen das Nervensystem [3].

Die zwei wichtigsten Komponenten des Immunsystems jedoch, sind die zellulären Bestandteile des angeborenen und erworbenen (adaptiven) Immunsystems, und die humoralen Bestandteile, spezielle Plasmaproteine, die als Antikörper bezeichnet werden. In dieser Arbeit beschäftigte ich mich hauptsächlich mit dem humoralen und zellulären Immunsystem, da ein grundlegendes Wissen für den praktischen Teil der Arbeit notwendig ist.

Diese Zellen verteilen sich im gesamten Körper in Form von freien Immunzellen oder in spezialisiert zusammengesetzten lymphatischen Geweben. Deshalb bemerkt man zunächst nicht, dass das Immunsystem zu den größten Organen im menschlichen Körper gehört (2-3kg) [4].

Reagiert der Körper auf ein eingedrungenes Pathogen, wird dies als Immunantwort oder Immunreaktion bezeichnet. Löst das Pathogen eine spezifische Immunantwort im Körper aus, so wird dies als adaptive oder erworbene Immunantwort bezeichnet. Diesen Effekt nennt man auch immunologisches Gedächtnis. Aufgrund dieser Gedächtnisleistung des Immunsystems kommt es zu lebenslanger Immunität gegenüber demselben

Pathogen. Dem adaptiven Immunsystem gegenüber steht das angeborene Immunsystem, das ein breites Band von Erregern bekämpfen kann und auch immer zur Verfügung steht, aber jedoch nicht für einzelne Erreger spezifisch ist und auch kein immunologisches Gedächtnis ausbilden kann [2].

Der Körper ist in der unglaublichen Lage ein riesiges Spektrum von Substanzen zu erkennen. Wenn diese Substanzen die Produktion von spezifischen Antikörpern auslösen, nennt man sie Antigene. Die Proteine, Glykoproteine und Polysaccharide von Krankheitserregern sind nicht die einzigen Antigene, die das Immunsystem erkennen kann. Auch chemische und organische Verbindungen können erkannt werden. Das angeborene und erworbene Immunsystem ergeben zusammen ein effektives Abwehrsystem. Schafft es das angeborene Immunsystem, wie in seltenen Fällen, nicht, den Krankheitserreger zu beseitigen, löst dies eine adaptive Immunreaktion aus [2].

2.1.1 Immunantwort

Damit die Immunantwort so effektiv wie möglich funktionieren kann, müssen vier Hauptaufgaben vom Immunsystem bewältigt werden. Zuerst müssen die weißen Blutzellen des angeborenen Systems und die Lymphozyten des adaptiven Immunsystems die Infektion erkennen (*immunologische Erkennung*). Als nächstes ist es wichtig, die Infektion einzudämmen oder komplett zu blockieren. Dafür sind das Komplementsystem der Blutproteine, Antikörper und die destruirenden Möglichkeiten der Lymphozyten zuständig (*Immuneffektorfunktionen*). Aber zugleich könnte ein unkontrolliertes Immunsystem den eigenen Körper schädigen. Deshalb ist die Selbstregulation des Immunsystems eine sehr wichtige Funktion (*Immunregulation*). Eine Störung in dieser Regulation führt zu Allergien oder Autoimmunerkrankungen. Und die vierte wichtige Aufgabe des Immunsystems ist das immunologische Gedächtnis, um den Körper von bereits bekannten Eindringlingen zu schützen [2].

Nach Eindringen von Krankheitserregern reagiert das angeborene Immunsystem ohne zu zögern. Parallel dazu aktiviert sich das adaptive Immunsystem, das mehrere Tage benötigt, um sich zu entwickeln, aber Infektionen viel effektiver beseitigen kann. Das erworbene Immunsystem basiert auf einer exzellent spezifischen Erkennungsfunktion der Lymphozyten. Diese Zellen reagieren durch hoch spezialisierte Antigenrezeptoren auf ihrer Oberfläche, die dadurch

spezifische Antigene erkennen können. Aufgrund der hohen Lymphozytenanzahl im Körper (einige Milliarden) besitzen sie eine unvorstellbar hohe Anzahl an Antigenrezeptoren. Entgeht oder umgeht ein Antigen nun das angeborene Immunsystem, so ist das adaptive Immunsystem in der Lage, den Krankheitserreger zu bekämpfen [2].

2.1.2 Das angeborene Immunsystem

Das angeborene Immunsystem besteht aus Makrophagen/Monozyten, Granulozyten und dendritischen Zellen. Sie sind die drei phagozytierenden Zellen des Immunsystems. Zusätzlich zählen zum angeborenen Immunsystem noch die Mastzellen und die natürlichen Killerzellen (NK-Zelle) [2].

2.1.3 Erworbenes (adaptives) Immunsystem

Lymphozyten besitzen einen großen, runden Zellkern und der Zytoplasmasaum ist sehr schmal. Unterscheiden kann man zwischen T- und B-Lymphozyten. Sie sind die Zellen des erworbenen Immunsystems. Beide besitzen eine große Anzahl von Rezeptoren, um Antigene zu binden. Dank der Verteilung der unterschiedlichen Rezeptoren und deren Klone, existiert diese erkenntnisfähige Vielfalt, Krankheitserregern gegenüber [4].

Entscheidend für die erworbene Immunität ist die antigenspezifische T-Zell Aktivierung durch antigenpräsentierende Zelle. Dies geht im Lymphgewebe und in den Organen vonstatten, die durchgehend von naiven T-Zellen durchwandert werden. Die Expression von costimulierenden Faktoren an der Zelloberfläche ist das besondere Merkmal von antigenpräsentierenden Zellen. Von diesen Faktoren sind die B7-Moleküle (CD80 und CD86) für die natürlichen Reaktionen auf Infektionen am wichtigsten. Diese homodimeren Vertreter der Immunglobulinsuperfamilie gibt es ausschließlich auf Oberflächen von Zellen, die die T-Zell Proliferation anregen (zum Beispiel auf dendritischen Zellen). Der B7-Moleküle-aktivierende Rezeptor auf der T-Zelle ist CD28. Naive T-Zellen können Jahre überleben. Nach ihrer Aktivierung gehen sie wieder in den Zellzyklus über und bilden sehr schnell viele Tochterzellen, die sich in T-Effektorzellen weiterdifferenzieren. Gesteuert wird diese Differenzierung durch das Zytokin IL-2, das von der aktivierten T-Zelle selbst aktiviert wird und somit autokrin wirkt. T-Zellen die nicht zugleich costimulierende Signale an ihre Liganden binden,

synthetisieren kein IL-2 und sterben somit. Diese doppelte Vorbedingung, also Rezeptorbindung und Costimulation durch die gleiche antigenpräsentierende Zelle, soll verhindern, dass naive T-Zellen auf körpereigene Antigene reagieren. Naive T-Zellen können in zwei große Gruppen eingeteilt werden. Die Zellen der einen Gruppe tragen den CD8-Corezeptor an der Oberfläche, die Zellen der zweiten Gruppe tragen den CD4-Corezeptor. CD8-T-Zellen differenzieren sich weiter zu zytotoxischen CD8-T-Effektorzellen (zytotoxische Lymphozyten, CTL). Diese Effektorzellen zerstören ihre Zielzellen. Deshalb sind sie ausgesprochen wichtig für intrazellulären Krankheitserreger (Viren). Virusinfizierte Zellen präsentieren Virusproteine als Peptid: MHC-Klasse-I-Komplexe (Haupthistokompatibilitätskomplex) an der Oberfläche und werden von der CTL erkannt. CD4-T-Zellen differenzieren sich zu verschiedenen T-Effektorzellen, die viele unterschiedliche Funktionen haben. Die wichtigsten CD4-T-Effektorzellen sind die T_H1 - T_H2 -, T_H17 -Zellen und regulatorischen T-Zellen. Diese wurden nach den verschiedenen Zytokinen definiert, die von der jeweiligen Zelle freigesetzt wird. Eine B-Zell gerichtete Funktion der T_H1 -Zellen ist es, die Produktion von Antikörpern gegen extrazelluläre Erreger zu stimulieren. Dies geschieht, in dem die T_H1 -Zellen costimulierende Signale für die antigenaktivierenden naiven B-Lymphozyten aussenden. Außerdem führen die T_H1 -Zellen auch zu dem Klassenwechsel bei aktivierten B-Zellen, die dann unterschiedliche Antikörperisotypen produzieren. Auch T_H2 - Zellen haben eine sehr ähnliche Funktion. Insbesondere stimulieren sie die Bildung von IgE-Antikörper. Die Subpopulation T_H17 werden bei extrazellulären Bakterien schon sehr früh aktiviert und helfen bei der Stimulierung der Neutrophilenreaktion mit [2].

T-Zellen werden T-Zellen genannte, weil die Differenzierung von Vorläuferzellen auf funktionell reife T-Lymphozyten im Thymus (T) stattfinden. Die B-Zellen haben ihren Namen eigentlich von Bursa Fabricii, einem Immunorgan bei Vögeln, das der Mensch jedoch nicht besitzt. Da beim Menschen die Reifung der B-Zellen im Knochenmark stattfindet (bone marrow), wird das B beibehalten [5].

Lymphozyten haben keine Funktion solange sie keinen Kontakt zu einem Antigen haben. Inaktive Lymphozyten bezeichnet man auch als naive (ungeprägte) Lymphozyten. Wenn sie durch ein Antigen aktiviert werden bezeichnet man sie als Effektorlymphozyten. Die B-Lymphozyten differenzieren sich nach ihrer Aktivierung dann zu Plasmazellen die Antikörper freisetzen. Im Laufe der

Immunreaktion bilden sich viele der B- und T-Zellen zu Gedächtniszellen. Dies erzeugt die langjährige Immunität gegenüber einem Antigen. Diesen Effekt nutzt man bei der Impfung [2].

2.1.4 CD-Nomenklatur

Lymphozyten kann man alleine von der Form her nicht unterscheiden. Man fand jedoch heraus, dass sie je nach Differenzierungs- oder Aktivierungszustand verschieden abhängige Oberflächenmoleküle exprimieren, mit denen man sie diagnostisch differenzieren kann. Deshalb nennt man sie auch Differenzierungsmarker. Um diese Marker sichtbar zu machen, stellen Immunologen bestimmte monoklonale Antikörper her, die nur einen einzigen Marker binden. Diese spezifische Antikörperbindung kann man dann sichtbar machen. Verschiedenste Reagenzien von verschiedensten Immunologen aus verschiedenen Ländern mussten verglichen werden, um eine Nomenklatur herzustellen. Jene Antikörper, die die gleichen Moleküle auf den Oberflächen der Immunzellen binden, wurden in einem Cluster zusammengefasst. Die verschiedenen Cluster bekamen fortlaufende Nummern. Cluster determinant (CD) wird ein Molekül genannt, das von Antikörpern eines "cluster of differentiation" gebunden wird. Immunologen können anhand der CD-Nomenklatur sofort feststellen, welches Molekül von welchem Antikörper gebunden wird.

2.1.5 B-Lymphozyten

Wie bereits erwähnt wurden die B-Zellen von der Bursa fabricius, einem lymphatischen Organ bei Vögeln, benannt. Beim Menschen reifen die B-Zellen jedoch im Knochenmark (**b**one-**m**arrow) heran. Die Antigenrezeptoren der B-Zellen sind die B-Zell-Rezeptoren. Genauer betrachtet sind diese Rezeptoren verankerte Antikörper. Nach der Aktivierung der B-Zellen differenzieren sie sich zu Plasmazellen. Plasmazellen können eine große Menge Immunglobuline synthetisieren (bis 2000 Antikörper pro Sekunde) und ins Plasma sezernieren [4].

2.1.6 B-Zell-Rezeptoren

Wie bereits erwähnt sind die B-Zell-Rezeptoren genaugenommen verankerte Antikörper. Diese sind Immunglobuline des Typs IgD oder IgM. Der B-Zell-Rezeptor von einer bestimmten B-Zelle hat eine variable Domäne und damit kann

er nur ein passendes Antigen erkennen. Sie erkennen nicht nur MHC präsentierte Moleküle sondern auch ganze Proteine [6].

2.1.7 Aktivierung

Die Aktivierung der B-Zellen kann T-Zell-unabhängig geschehen, wenn das passende Antigen am B-Zell-Rezeptor der B-Zelle bindet und die B-Zelle dadurch aktiviert. Bei der T-Zell-abhängigen Aktivierung bindet das Antigen ebenfalls am Rezeptor. Aber anders als bei der direkten Aktivierung wird der Antikörper-Antigen-Komplex in die B-Zelle eingeschleust und in den Lysosomen in Peptidfragmente zersetzt. Diese werden auf MHC-II-Moleküle gebunden und auf der B-Zell-Oberfläche für CD4-T-Zellen präsentiert. Diese CD4-T-Zellen aktivieren dann über bestimmte Rezeptoren und Zytokinen die B-Zelle. Daraufhin proliferiert die B-Zelle und sezerniert IgM- und IgG-Antikörper [6].

Oft reicht die Affinität des IgG nicht aus, um viele der Antigene zu beseitigen. Die Affinität kann dann durch somatische Hypermutation erhöht werden. Hierbei wird der variable Teil der Antikörper zufällig mutiert. Ob die Veränderungen zur besseren Bindung des Antigens führen oder nicht, wird im Keimzentrum des Lymphfollikels, wobei nur die B-Zellen überleben, die das Antigen schneller und besser binden können, gebildet. Diese werden dann wieder von T-Zellen stimuliert. Nach mehreren dieser Hypermutationsrunden entsteht eine B-Zelle, die ein hochaffines, neutralisierendes IgG produziert. Ein Teil dieser Zellen differenziert sich dann zu Plasmazellen und wandern ins Knochenmark, um Antikörper zu sezernieren. Ein kleiner Teil der aktivierten B-Lymphozyten wandern als Gedächtnis-B-Zellen in die Milz [6].

2.1.7.1 Toll-like Rezeptoren (TLR) bei der Aktivierung von B-Zellen

TLRs dienen der Unterscheidung unterschiedlicher Krankheitserreger, damit das Immunsystem optimal darauf reagieren kann [2].

Benannt wurde der Rezeptor von der Nobelpreisträgerin Nüsslein-Volhard, der den Rezeptor in einem Gen der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* bei der Embryonalentwicklung entdeckte. Durch die Begeisterung der Entdeckung nannten sie das Gen in der Fliege „Toll“ [6]. Da der Rezeptor in Säugtieren und im Menschen ähnlich ist heißt der Rezeptor somit TLR [2]. Makrophagen,

Granulozyten und Monozyten verfügen über diese ausgeklügelten Rezeptoren-Systeme [6]. Mittlerweile hat man schon elf Mitglieder der TLR Familie beim Menschen gefunden [4]. Jedes der zehn Gene dient zur Erkennung verschiedener molekularer Muster, die jeweils charakteristisch für bestimmte Erreger in verschiedenen Stadien sind. Da es nicht so viele unterschiedliche TLRs gibt, ist ihre Spezifität im Gegensatz zu den Antigenrezeptoren begrenzt. Und obwohl ihre Mustererkennung begrenzt ist, sind sie in der Lage die meisten pathogenen Mikroorganismen zu erkennen. Viele der TLRs wirken als Zelloberflächenrezeptoren und andere entfalten ihre Aktivität endosomal, in der Zelle [2]. Manche werden aber auch durch mikrobielle Nukleinsäuren aktiviert, welche nach Aufnahme der Mikroorganismen freigesetzt werden [4]

TLR-4 ist ein sehr wichtiger Rezeptor auf Makrophagen, denn er wird von vielen Bakterien, die Lipopolysaccharid (LPS) produzieren, aktiviert. Er ist auch sehr häufig mit CD14, MD-2 und weiteren zellulären Proteinen verknüpft. Wird TLR-4 aktiviert, wird vor allem TNF- α (Tumor Nekrose Faktor) ausgeschüttet. Eine übermäßige Produktion von TNF- α , aufgrund unkontrollierter bakterieller Infektion durch LPS produzierenden Bakterien, kann schnell zu einer lebensbedrohlichen Sepsis führen. Um LPS zu erkennen, reicht der TLR-4 alleine nicht aus. CD14 muss das LPS binden, MD-2 muss in der Zelle zunächst TLR-4 binden und den Rezeptor dann an die Oberfläche bringen. Erst dadurch kommt es dazu, dass TLR-4 das LPS erkennen kann. Jetzt sendet der TLR-4 ein Signal an den Zellkern, damit die Transkription von NF κ B aktiviert wird. Der NF κ B-Signalweg wird auch oft als Toll-Signalweg bezeichnet. Entdeckt wurde der Signalweg bei der Embryogenese der Taufliege. NF κ B stimuliert in T-Zellen gemeinsam mit AP-1 und NFAT Interleukin-2 (IL-2). IL-2 ist essenziell für die Proliferation von T-Zellen [2]. Wichtig ist auch der TLR-2, der Lipoteichonsäure (LTS) von grampositiven Bakterien und Lipoproteine von gramnegativen Bakterien erkennen kann. TLR-3 erkennt doppelsträngige Ribonukleinsäuren (RNA) von Viren und daraufhin werden antivirale Zytokine aber auch Interferone ausgeschüttet [4]. Bestimmte Bestandteile bakterieller Desoxyribonukleinsäure (DNA) können über TLR-9 binden und zu ähnliche Signalwege wie TLR-4 oder TLR-2 zur Zellaktivierung führen. TLR-5 binden Flagelin. TLR-6 dient der Bindung bestimmter bakterieller Lipoproteine [6]. TLR-7 bindet ssRNAs. Wenn B-Zellen über den TLR-7 den Liganden Resiquimod (R848), einen Immunantwort-Modifizierer reagieren, dann

induziert er die Proliferation von polyklonalen naiven B-Zellen und die Differenzierung zu Ig-produzierenden Plasmazellen [7].

Tabelle 1: Antigenerkennung im angeborenen Immunsystem durch TLRs [2]:

Toll-like Rezeptor	Ligand
TLR-1:TLR-2-Heterodimer	Proteoglykane, Lipoproteine, Lipoarabinomannan (Mykobakterien)
TLR-2:TLR-6-Heterodimer	
TLR-3	dsDNA
TLR-4-Dimer (+MD2, + CD14)	LPS (gram- Bakterien), Lipoteichonsäuren (gram+ Bakterien)
TLR-5	Flagellin
TLR-7	ssRNA
TLR-8	Oligonucleotide
TLR-9	Nichtmethylierte CpG-DNA

2.1.7.2 Stimulation der B-Zellen

Für die Stimulation von B-Zellen sind IL-2, IL-4, IL-6, IL-7 und IL-13 am wichtigsten [5]. IL-2 ist ein entscheidendes Zytokin für die Entwicklung einer adaptiven Immunantwort. Es wird von einer aktivierten naiven T-Zellen produziert und stimuliert zusätzlich auch das Wachstum und die Synthese der J-Ketten der B-Zellen. Die T_H1-Zelle, die durch Zytokine, wie IL-2 aus den CD4-T-Effektorzellen entstehen, stimulieren die Produktion von Antikörpern gegen extrazelluläre Erreger. Dies geschieht, in dem die T_H1-Zellen costimulierende Signale für die antigenaktivierten naiven B-Lymphozyten aussenden. Auch der Klassenwechsel bei aktivierten B-Zellen, die dadurch unterschiedliche Antikörperisotypen produzieren, wird durch diese T_H1-Zellen ausgelöst [2].

2.1.7.3 Alternative B-Zell Aktivierung

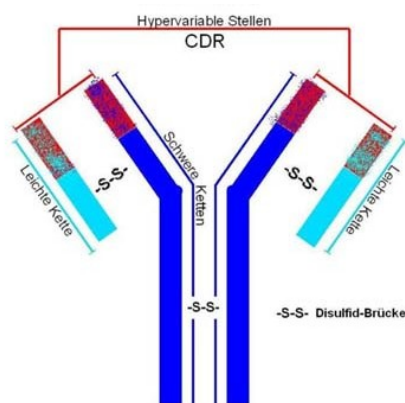
CpG Oligonukleotid (einzelsträngige künstlich hergestellte DNA-Oligonukleotide): In einer Studie aus dem Jahre 1998 von Wendy C. Brown et al. [8] fand man heraus, dass CpG Oligonukleotide Derivate direkt mitogen auf Rinder B-Zellen wirken. Dadurch ließen sich periphere mononukleäre Blutzellen aktivieren.

Staphylococcus Aureus und Pokeweed mitogen (PWM): Bei einer Studie im Jahre 1985 fanden K Oen et al. [9] heraus, dass Staphylococcus Aureus Cowan I, Kermesbeere (PWM) und eine Mixture aus beiden, die B-Zellen stimulieren und vor allem die Produktion von IgA fördern. Getestet wurden Patienten, die an einem IgA Mangel litten.

2.1.8 Antikörper

Antikörper werden von B-Zellen gebildet. Sie können Erreger binden und diese neutralisieren, sowie durch Opsonisierung die Phagozytose des Erregers begünstigen oder durch die klassische Komplementaktivierung zerstören. Immunglobuline werden in fünf Klassen unterteilt: IgM, IgG, IgA, IgD und IgE. Alle besitzen einen ähnlichen Aufbau. Sie bestehen aus vier mit Disulfidbrücken vernetzten Proteinketten. Es gibt zwei schwere Ketten, die ein Molekulargewicht von 50kDa (Kilodalton) haben und aus zwei leichten Ketten, die ein Molekulargewicht von 30kDa haben. Aufgrund ihrer Proteinsegmente unterscheidet man weiters einen konstanten bzw. variablen Abschnitt. Der konstante Teil der schweren Ketten bestimmt den Iso-Typ des Immunglobulins und ist für die Effektorwirkung des Antikörpers verantwortlich. Der variable Teil bindet das Antigen [6].

Abbildung 1: Immunglobulin



<http://www.cyberdokter.de/cgi-bin/wwwthreads/showflat.pl?Cat=&Board=Kinder&Number=48444&page=&view=&sb=>

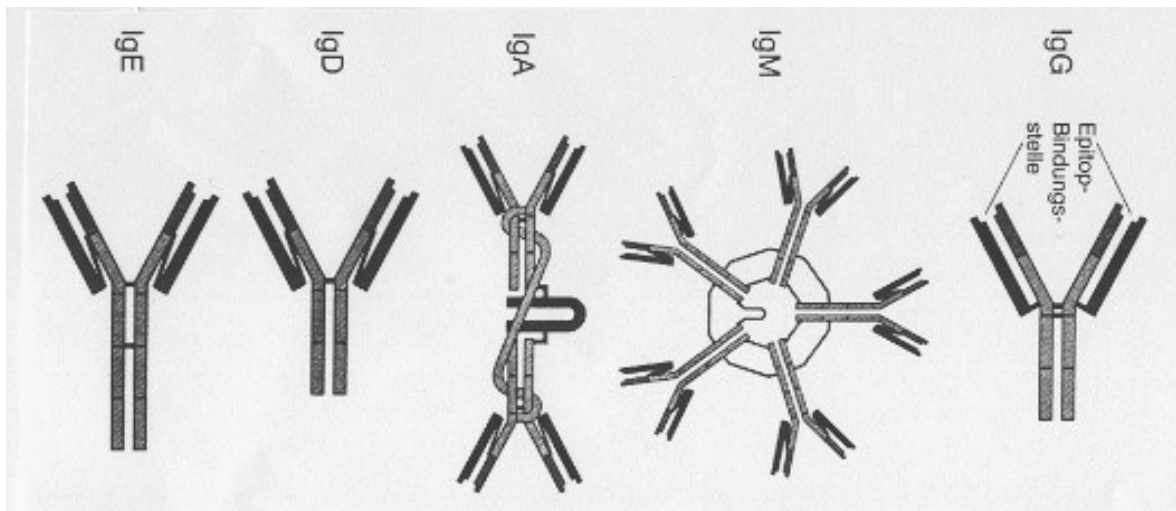
[07.06.2012, 14:18]

2.1.8.1 Eigenschaften der Antikörper

Die Verschiedenen Antikörperklassen weisen auch unterschiedliche Eigenschaften auf:

- **IgM:** Alle B-Zellen, die noch keinen Kontakt zu Antigenen hatten, tragen IgM als B-Zell-Rezeptor. IgM ist das wichtigste Immunglobulin für den Erstkontakt und wird somit auch zuerst sezerniert. IgM ist durch eine J-Kette (Joining) zu einem Pentamer oder Hexamer verbunden. Sie besitzen somit eine Masse von 1000kDa und bleiben hauptsächlich in der Blutbahn. IgM löst die Komplementaktivierung aus. Eine einzige Bindung mit einem Antigen reicht aus, um die Kaskade in Gang zu setzen [4].
- **IgD:** Die Funktion des IgD ist bisher leider noch unbekannt [4].
- **IgG:** 75% aller Immunglobuline im Serum sind IgG. Da es ein Monomer mit nur 150kDa ist, kann es auch in die Extrazellulärflüssigkeit gelangen. Es besitzt zudem auch die längste Halbwertszeit (3 Wochen), als alle anderen Immunglobuline. Es ist auch das einzige Immunglobulin, das durch die Plazenta hindurch dem Fetus einen Immunschutz leisten kann (Nestschutz). Die wichtigste Funktion des IgG ist die Neutralisation der Erreger [4].
- **IgA:** IgA gibt es in drei verschiedenen Formen: als Monomer, als Dimer mit J-Kette und als sekretorisches IgA. Es ist das einzige Immunglobulin das auf äußeren Oberflächen unseres Organismus vorkommt. Nämlich in den Schleimhäuten, in der Muttermilch, in der Tränenflüssigkeit und auch im Darm. Sie schützen somit schon an der äußersten Front, um den konstant großen Ansturm von Mikroorganismen abzufangen [4].
- **IgE:** Im Serum ist IgE nur sehr gering vorhanden. Denn es gibt auf Mastzellen einen Rezeptor für diese Ig-Klasse. Aber auch eosinophile Granulozyten exprimieren diesen Rezeptor. Auf Mastzellen und eosinophilen Granulozyten spielen sie eine wichtige Rolle bei der Abwehr von Parasiten. Außerdem ist IgE für die allergische Soforttypreaktion verantwortlich [4].

Abbildung 2: Immunglobulinklassen



<http://www.zum.de/Faecher/Materialien/hupfeld/Referate/immunsystem/immunsystem-manja.html>

[07.06.2012, 14:54]

2.2 Immunsuppressive Therapie

2.2.1 Immunsuppression Einführung

Bei der Immunsuppression versucht man die Immunzellen antigenunspezifisch auszuschalten. Aber neben dem erwünschten Effekt können auch vermehrt Infektionen als Nebenwirkung entstehen. Eine ausreichende Immunsuppression erreicht man durch eine Verminderung der Lymphozytenzahl. Die drei wichtigsten Immunsuppressiva sind IL-2 Synthese Inhibitoren, IL-2 induzierte Zellproliferationsinhibitoren und die immunologischen (monoklonalen) Immunsuppressiva [10].

Tabelle 2: Die 3 Arten von Immunsuppressiva [10], [11]

Inhibitoren der IL-2 Synthese	
Glucocorticoide (Hemmung der T-Zellen, in hoher Dosis auch die Antikörpersynthese)	<ul style="list-style-type: none"> - Prednison - Prednison - Methylprednison - Dexamethason - Betamethason
Calcineurin Inhibitoren	<ul style="list-style-type: none"> - Ciclosporin A (T-Zellen Hemmer) - Tacrolimus (T-Zellen Hemmer)
Inhibitoren der IL-2 induzierten Zellproliferation	
Zytostatika	<ul style="list-style-type: none"> - Cyclophosphamid (T- und B-Zellen) - Azathioprin (T-Zellen > B-Zellen) - Methotrexat (MTX) (B-Zellen > T-Zellen)
mTOR (mammalian target of rapamycin) Inhibitoren	<ul style="list-style-type: none"> - Sirolimus (T-Zelle) - Everolimus (T-Zelle)
Inosinmonophosphat-Dehydrogenase	<ul style="list-style-type: none"> - Mycophenolatmofetil (T- und B-Zellen)
*Immunologische Immunsuppressiva	

*Nähere Beschreibung im Kapitel 2.2.2 und Tabelle 3

2.2.2 Immunsuppression bei Autoimmunerkrankungen

Bei Autoimmunerkrankungen sind nicht nur Entzündungs- und Schmerzmittel wichtig, sondern auch die immunsuppressive Therapie. Die klassischen Basistherapeutika werden auch DMARDs genannt (Disease-Modifying Anti-Rheumatic Drugs) [12].

Liste der wichtigsten DMARDs [11]:

- Gold oral, parenteral
- Azathioprin
- Chlorambucil
- Cyclophosphamid
- Cyclosporin
- Hydroxychloroquin/Chloroquin
- Lefunomid
- MTX
- Minocyclin
- Mycophenolatmofetil
- Sulfasalazin
- Tofacitinib

Die Basistherapeutika der neuen Generation sind die Biologika, auch DCARD (Disease-Controlling-Anti-Rheumatic Drugs) genannt. Alle Immunsuppressiva unterdrücken an irgendeiner Stelle spezifisch das Immunsystem. Sie können entweder die Botenstoffe, die T-Zellen oder die B-Zellen blockieren. Die herkömmlichen Basistherapeutika greifen unselektiv und nicht nur in den Immunzellen ein. Zytostatika hemmen zum Beispiel nicht nur die Zellteilung des Immunsystems, sondern auch anderen Zellen, die eine hohe Zellteilungsrate besitzen. Biologika zielen stattdessen ausschließlich auf Zellen des Immunsystems, sie werden biotechnisch in gentechnisch veränderten Organismen hergestellt. Durch das selektive Eingreifen in die immunologischen Geschehnisse, werden die Nebenwirkungen minimiert. Leider sind die Preise dieser Biologika noch sehr hoch. Es gibt 3 Gruppen von Biologika, die nach ihrer Wirkungsweise eingeteilt werden. [12]

1. Biologika gegen Zytokine oder deren Rezeptoren (TNF α , IL-1, IL-6)
2. Stoffe, die die Kostimulation bei der Aktivierung der Lymphozyten hemmen.
3. Monoklonale Antikörper, die bestimmte Zellgruppen (z.B.: B-Zellen) ausschalten. [12]

Tabelle 3: Ausgewählte Liste der Biologika [12]

Proteine gegen Zytokine	
TNFα-Blocker	<ul style="list-style-type: none"> - Infliximab (Remicade®) - Adalimumab (Humira®) - Golimumab (Simponi®) - Etanercept (Enbrel®) - Certolizumab (Cimzia®)
Interleukin-Blocker	<ul style="list-style-type: none"> - Tocilizumab (ROActemra®) - Anakinra (Kineret®) - *Basilixumab (Simulect®) [13] - *Daclizumab (Zenapax®) [13]
Kostimulations-Hemmer	
	<ul style="list-style-type: none"> - Abatacept (Orencia®)
Antikörper die bestimmte Zellgruppen hemmen	
B-Zell Blocker	<ul style="list-style-type: none"> - Rituximab (MabThera®) - *Belimumab (Benlysta®) [14]

*weitere ergänzte monoklonale Antikörper

Biologika werden nach dem Aufbau unterschieden. Sie können Proteine oder aber auch Nukleinsäuren sein. Wenn es ein Protein ist, dann kann es ein ganzer Antikörper oder es können nur Teile davon sein. Monoklonale Antikörper sind gentechnisch hergestellt und modulieren das Immunsystem, sie richten sich nur gegen ein einziges Epitop. Von Natur aus gibt es nur polyklonale Antikörper. Der Name des monoklonalen Antikörpers ist herkunftabhängig, kann murin, chimär, humanisiert oder human sein, und endet immer auf „mab“ [12].

Die Buchstaben vor dem „mab“ verraten die Herkunft:

- omab = murine Antikörper (Maus)
- ximab = chimärer Antikörper (nur der variable Teil ist Mausprotein)

- zumab = humanisierter Antikörper (nur die Antigenbindungsstelle sind Mausproteine)
- umab = humaner Antikörper (Mensch)
- imab = Antikörper von Primaten (Affe)

Die Verträglichkeit des monoklonalen Antikörpers ist ebenfalls von der Herkunft abhängig. Murine Antikörper können selbst Immunantworten auslösen [12].

Biologika hemmen das Immunsystem sehr stark, deshalb betreffen die meisten Nebenwirkungen das Immunsystem. Unter anderem können opportunistische Infektionen auftreten. Häufige opportunistische oder rezidivierende Infektionen unter einer Biologika-Therapie können sein: Tuberkulose, Herpes Zoster, Hepatitis B und C oder PML (Progressive multifokale Leukenzephalopathie). Das Risiko einer Sepsis ist durch diese Therapie nicht erhöht. [12]

2.2.3 Immunsuppression bei rheumatoiden Arthritis

Neben der Firstline Therapie, die NSAR (nichtsteroidale Antirheumatika), Analgetika und Corticosteroide beinhaltet, ist auch die DMARDs und DCARD Therapie entscheidend.

Standard DMARDs bei der rheumatoiden Arthritis sind [15], [16]:

- MTX
- Lefunomid
- Sulfasalazin
- Gold oral/parenteral
- Hydroxy-, Chloroquin
- Minocyclin
- D-Penicillamin
- Azathioprin
- Cyclophosphamid
- Cyclosporin
- DCARD: Biologika

2.3 Primäre und sekundäre Immundefizienz

2.3.1 Primäre Immundefizienz

Es gibt eine Vielzahl an primären, angeborenen, Immundefekten. Betroffen sein kann das angeborenen Immunsystem, aber auch das erworbenen Immunsystem. Beim erworbenen Immunsystem kann man noch unterscheiden zwischen dem zellulären (T-Zell), dem humoralen (B-Zell) und dem kombinierten Immundefekt [17].

Tabelle 4: Auflistung der wichtigsten angeborenen Immundefekte [17]

Betroffenes System	Erkrankung
*Kombinierte Immundefekte	<ul style="list-style-type: none">- SCID (severe combined immunodeficiency)
*B-Zelldefekte	<ul style="list-style-type: none">- Agammaglobulinämie- Hypogammaglobulinämie- CVID (common variable immunodeficiency/variables humorales Immundefektsyndrom)- IgA-Mangel
Phagozytendefekte	<ul style="list-style-type: none">- Septische Granulomatose- Neutropenie- IFN-γ assoziierte Immundefekte- Komplementdefekte
Andere gut definierte Immundefekte	<ul style="list-style-type: none">- Ataxia teleangiectatica- DiGeorge Syndrom- Wiskott-Aldrich Syndrom- Chronische mukokutane Candidiasis (CMC)

*in den Kapiteln 2.3.3 und 2.3.2 noch näher beschrieben

2.3.2 B-Zell Immundefekt

2.3.2.1 Agammaglobulinämie

Die Agammaglobulinämie ist eine X-chromosomal vererbte Erkrankung die 1952 das erste Mal von Dr. Ogden Bruton beschrieben wurde. Zugleich war sie auch die allererste Immundefizienz, die in der Literatur vorkam. Bei dieser Erkrankung fehlt die Fähigkeit, Antikörper zu bilden. Alle Antikörper sind bei der

Agammaglobulinämie verringert. Die Prävalenz liegt bei bis zu 1:100.000. Hauptsächlich sind Männer betroffen, da sie nur ein X-Chromosom besitzen. Patienten mit dieser Erkrankung neigen dazu, vermehrt schwere bakterielle oder virale Infekte zu bekommen. Die meisten Störungen sind HNO- oder Lungeninfektionen. Auffällig wird die Erkrankung meist im 6. bis 9. Lebensmonat, wenn die mütterlichen IgG-Antikörper verbraucht sind. Kinder die nicht ausreichend behandelt werden, wachsen langsam, haben kleine Mandeln, kleine Lymphknoten und bekommen oft chronische Hautinfektionen und Arthritis. Die beste Therapie besteht aus einer häufigen Antibiotika- und Immunglobulingabe [17].

2.3.2.2 Hypogammaglobulinämie

Es gibt mehrere Erkrankungen bei denen die Antikörper vermindert sind [17]:

1. Agammaglobulinämie (siehe 2.3.2.1)
2. CVID (siehe 2.3.2.3)
3. Transiente Hypogammaglobulinämie: Die Antikörper sind vermindert, weil die Reifung des Immunsystems verlangsamt ist. Es ist dies eine zeitlich begrenzte Erkrankung, die bei Kindern zwischen dem 6. Monat und dem 4. Lebensjahr auftritt. Sie verschwindet, sobald das Immunsystem ausgereift ist.
4. Hyper-IgM Syndrom: Bei dieser Erkrankung ist das IgG vermindert, aber das IgM erhöht. Außerdem ist die Funktion der T-Zelle gestört.
5. IgG-Subklassenmangel: Eines der vier Subklassen IgG1, IgG2, IgG3 und IgG4 ist vermindert. Diese Mangelzustände treten oft in Kombination mit einem IgA Mangel auf.
6. IgA Mangel (siehe 2.3.2.4)

2.3.2.3 CVID

Der CVID ist charakterisiert durch einen fehlenden oder verminderten Antikörperspiegel. Betroffene leiden an rezidivierenden Infektionen, vor allem im Magendarmtrakt und im Bereich der Atemwege. Männer und Frauen sind gleich häufig betroffen. Der Unterschied zur Agammaglobulinämie ist, dass B-Zellen zwar vorhanden sind, aber die Antikörperproduktion gestört ist. Das Wort „variabel“ bedeutet, dass der Grad und die Art des Immunglobulinmangels, aber

auch die Symptome variabel sein können. Immer betroffen sind jedoch die Antikörperklassen IgG, IgA und IgM. Bis heute weiß man noch nicht genau, welche und wie viele Gene betroffen sind. Man findet zwar familiäre Häufigkeiten, erblich ist die Erkrankung aber dennoch nicht. Oft entsteht zusätzlich bei CVID eine Autoimmunerkrankung und ein erhöhtes Risiko für bösartige Erkrankungen des lymphatischen Systems. Die wichtigste Therapie ist wie bei allen Immundefekten, die intravenöse und subkutane Gabe von Antikörpern (IgG). IgA und IgM können nicht substituiert werden. Antibiotika werden wieder zur Bekämpfung schon vorhandener Infektionen verabreicht [17].

2.3.2.4 IgA-Mangel

Beim selektiven IgA-Mangel fehlt nur IgA, das vor allem für die Abwehrfunktion der Schleimhäute und Körpersekrete wichtig ist. IgG und IgM werden ausreichend produziert. Der IgA-Mangel ist mit einer Prävalenz von 1:500 der häufigste Immundefekt überhaupt. Bei vielen Betroffenen ist dieser Befund ein Zufallsbefund. Eine familiäre Häufung ist bekannt, jedoch wurde noch keine genetische Ursache erforscht. Die häufigsten Erkrankungen betreffen die Atemwege oder den Magendarmtrakt. Zusätzlich treten oft Autoimmunerkrankungen, wie Asthma oder Nahrungsmittelallergien gehäuft auf. Die einzige Therapie ist die Gabe von Antibiotika bei Auftreten von Infektionen. Wichtig zu wissen ist auch, dass es häufig zu heftigen allergischen Reaktionen bei Bluttransfusionen kommen kann, weil der Körper das fremde IgA als Fremdeiweiß erkennt [17].

2.3.3 Kombiniertes Immundefekt

2.3.3.1 SCID

Es gibt drei Hauptmerkmale eines kombinierten Immundefektes:

1. B-Zellen können vorhanden aber deutlich gestört, oder komplett fehlend sein.
2. T-Helferzellen können schwerwiegend gestört oder fehlend sein.
3. Die Lymphknoten und Thymusdrüse der Betroffenen können stark unterentwickelt sein.

Die Prävalenz dieser Erkrankung liegt bei 1:100.000. Verschiedenste Gendefekte können zu dieser Krankheit führen. Wenn sie autosomal rezessiv von beiden

Eltern vererbt werden sind Männer und Frauen gleich häufig betroffen. Ist sie jedoch X-chromosomal von der Mutter vererbt, dann sind hauptsächlich Männer betroffen. Jedoch gibt es auch die Möglichkeit einer Neumutation. Patienten mit einer SCID haben die schwersten Symptome aller Patienten mit angeborenen Immundefizienzen. Trotz Nestschutz erkranken die Neugeborenen oft schon im ersten Monat an bedrohlichen Infektionen, wie Lungenentzündungen, Durchfällen oder Infektionen der Haut. Da es kein ausreichendes Immunsystem gibt, kommt es häufig zur Sepsis. Häufig treten auch Infektionen durch opportunistische Erreger auf. Das Wachstum dieser Kinder ist schwer eingeschränkt, da es durch die ständigen Infektionen gehemmt wird. Behandelt werden können die Betroffenen durch Antibiotika und Immunglobuline. Die rezidivierenden lebensbedrohlichen Infektionen können nur durch eine Stammzellen- oder Knochenmarktransplantation verhindert werden [17].

2.3.4 Sekundäre Immundefizienz

Sekundäre (erworbene) Immundefekte sind noch viel häufiger. Sie treten in Folge anderer Geschehen und anderer Erkrankungen auf [18].

Tabelle 5: Ursachenliste der sekundären Immundefekte [19]

Erworbene unspezifische Immundefekte	
Immundefekte als Begleiterkrankung	Zelluläre und humorale Immundefekte: <ul style="list-style-type: none"> - Unter-/Überernährung - Polytrauma, Verbrennungen - Renaler Eiweißverlust (dadurch mangelnde Proteinsynthese) - Tumore (Durch Metastasen gehemmte Hämatopoese) - Infektionskrankheiten - Exzessiver Stress - Alter
Iatrogen/Extern induzierter Immundefekt	Durch ärztliche Behandlung (versehentlich oder bewusst) oder durch externer Einflussnahme: <ul style="list-style-type: none"> - Immunsuppressive Therapie - Chemotherapie

	<ul style="list-style-type: none"> - Bestrahlungen - Belastende operative Eingriffe - Entfernung von Immunorganen
Erworbene spezifische Immundefekte	
Spezifischer Defekt der angeborenen Immunität	Bei permanenter Überforderung der Phagozytoseleistung kommt es zu einer Blockade des retikuloendothelialen Systems (RES) und des Myeloproliferativen Systems (MPS)
Spezifischer Defekt der Adaptiven Immunität	Es gibt wenige Infektionskrankheiten, die einen spezifischen Immundefekt verursachen: <ul style="list-style-type: none"> - AIDS (HIV)
latrogen durch spezifischen Therapeutika	Monoklonale Antikörper gegen bestimmte Zelloberflächenmoleküle des Immunsystems: <ul style="list-style-type: none"> - Alemtuzumab (gegen CD52) - Apolizumab (gegen HLA-DR) - Muronomab (gegen CD3) - Daclizumab (gegen CD25) - Rituximab (gegen CD20) - Natalizumab (gegen CD49d)

2.3.4.1 Immunparalyse nach Rückenmarksverletzung

Bei Patienten, die an einer akuten Rückenmarksverletzung leiden, sind Infektionen die Hauptursache für die Morbidität und Mortalität. Man fand heraus, dass eine Rückenmarksverletzung die Infektionsanfälligkeit durch neurogene Mechanismen erhöht. Bei einer Verletzung des Rückenmarks werden nicht nur die sensiblen und motorischen Bahnen zerstört, sondern auch das fein ausbalancierte Zusammenspiel zwischen dem ZNS und dem Immunsystems. Dadurch entsteht ein sekundäres Immundefizit. Diese Immunsuppression nach einer Rückenmarksverletzung setzt innerhalb von 24 Stunden nach diesem Ereignis ein und betrifft das erworbene und das angeborenen Immunsystem. Sie ist jedoch qualitativ unabhängig von der Hochdosiscorticosteroidtherapie. Die Ausprägung dieser sekundären Immundefizienz ist abhängig von der Höhe der Rückenmarksverletzung [20].

2.4 Impfungen

Impfungen sind heutzutage die wichtigste primäre Prophylaxe gegen Infektionskrankheiten. Durch Impfung entsteht aber nicht nur ein individueller Schutz für die geimpfte Person, sondern auch der Herdschutz für die Gesellschaft ist ein sehr wichtiger Effekt. Das beste Beispiel ist der Pockenerreger, der durch die Impfung eradiziert wurde. Auch die Poliomyelitis gilt in Österreich seit 20 Jahren, dank der Impfung, als ausgerottet.

Nebenwirkungen sind sehr selten, können aber möglich sein. Als erwünschte Nebenwirkung zählt die gebildete Abwehr gegenüber dem Erreger. Die häufigsten Nebenwirkungen sind lokale Rötungen und Schwellungen an der Impfstelle. Auch subfebrile Temperaturen können vorkommen. Selten kommt es zu schwereren Entzündungsreaktionen oder allergischen Reaktionen. Auch Nerven- oder Gefäßschäden gehörten zum seltenen Nebenwirkungsspektrum. Bei Lebendimpfstoffen kann es zum abgeschwächten Ausbruch der Erkrankung kommen (z.B.: Hautausschlag bei Masernimpfung).

Kontraindikationen für Impfungen sind akute Infektionen, Allergien gegen einen im Impfstoff enthaltenen Inhaltsstoff oder bei Lebendimpfstoffen sollte der Nutzen und das Risiko bei Immundefizienz abgewogen werden [21].

2.4.1 Passive Immunisierung

Eine passive Impfung wird bei Verdacht einer bereits geschehen Infektion verabreicht. Durch diese passive Immunisierung werden dem Patienten fertige Immunglobuline verabreicht. Diese Immunglobuline werden aus dem Blutserum von Menschen gewonnen, die bereits einen Immunschutz gegen den erwünschten Erreger haben. Die Schutzfunktion dieser Impfungen tritt sofort ein, hält jedoch nur 2 bis 4 Wochen an [22].

2.4.2 Aktive Immunisierung

Die aktive Impfung soll das Immunsystem dazu anregen, selbst Antikörper zu produzieren, um dadurch einen Langzeitschutz auszubilden. Dies geschieht durch eine gewollte kleine abgeschwächte Infektion. Kommt es Jahre nach so einer Impfung zu einem Kontakt mit dem Erreger, werden von den Gedächtniszellen sofort wieder die benötigten Antikörper gebildet. Eine aktive Immunisierung kann

durch abgetötete (Totimpfstoffe), durch abgeschwächte Krankheitserreger (Lebendimpfstoffe) oder durch kleine Erregerfragmente erzeugt werden [21], [22].

2.4.3 Simultan Impfung

Die Simultanimpfung ist zusammengesetzt aus einem aktiven und aus einem passiven Impfstoff. Dadurch hat man beide Vorteile kombiniert, denn der Schutz setzt sofort ein und gleichzeitig wird eine Dauerimmunität ausgebildet [22].

2.4.4 Tetanus

Tetanus, auch Wundstarrkrampf genannt, wird durch ein im Erdreich vorkommendes Bakterium, dem *Clostridium tetani* verursacht. Minimalste Verletzungen können ausreichen, um sich mit diesen Bakterien zu infizieren [23]. Der Erreger vermehrt sich bei anaeroben Bedingungen und produziert zwei Exotoxine: Tetanospasmin und Tetanolysin. Dieses Tetanospasmin, welches eines der drei giftigsten Toxine der Welt ist, löst tonische Krämpfe aus. Das produzierte Tetanolysin wirkt hämolytisch und möglicherweise auch kardiotoxisch. Die Toxine binden an die Rezeptorganglioside der Neuronen und beginnen dort mit 5mm pro Stunde entlang den peripheren Nerven Richtung ZNS (Zentralnervensystem) zu wandern. Die Exotoxine wirken hemmend auf die Vorderhornzellen des Rückenmarks und verhindern die reziproke Innervation, so dass die Impulse übertriebene Reaktionen verursachen. Die Gehirnnerven werden, weil sie sehr kurz sind, sehr früh betroffen und verursachen zunächst Muskelspasmen in deren Bereichen. Die generalisierte Form beginnt meist afebril oder subfebril mit tonischen Spasmen der Skelettmuskulatur. Es kommt zu typischen Gesichtsspasmen, die einem fixiertem Lächeln ähnlich sind. Des Weiteren kommt es zu einer Kiefersperre, zu Dysphagien und auch zu Laryngospasmen, die lebensbedrohlich (Atemstillstand) werden können. Nun entstehen auch plötzliche, schmerzhafte Kontraktionen ganzer Muskelgruppen. Die Extremitäten sind oft unbeteiligt. Durch gleichzeitige Krämpfe der Flexoren und Extensoren können Wirbelsäulenfrakturen entstehen. Das Bewusstsein ist weitgehend erhalten. Auch das sympathische Nervensystem ist betroffen. Auf der Intensivstation liegt die Letalität bei 20%, sonst um einiges höher. Todesursache sind hauptsächlich kardiovaskuläre und respiratorische Komplikationen [24], [25].

Eine Tetanusschutzimpfung verhindert sicher und effektiv diese dramatische Erkrankung [23].

Die Therapie erfolgt größtenteils symptomatisch. Zur Neutralisation des noch nicht gebundenen Tetanus-Toxins kann ein Gegengift, das humane Tetanus-Immunglobulin bis 10.000IE intramuskulär injiziert werden. Ist das Toxin bereits an dem Nerv gebunden, kann das Tetanus-Immunglobulin nicht mehr helfen. Zusätzlich sollte die infizierte Wunde schnellstmöglich chirurgisch gereinigt werden. Außerdem wird eine antibiotische Behandlung gestartet, um die Tetanusbazillen abzutöten. Das Wichtigste ist jedoch, eine Intensivtherapie einzuleiten, um die Muskulatur zu relaxieren und um die vitalen Funktionen zu erhalten (Freihalten der Atemwege) [24].

2.4.4.1 Tetanus-Impfungen

Die ständige Impfkommission (STIKO) am Robert Koch-Institut empfiehlt eine Grundimmunisierung gegenüber Tetanus in den ersten 15 Lebensmonate, sowie zwei weitere Auffrischungsimpfungen im Kindes- bzw. Jugendalter. Als Erwachsener sollte man sich alle 10 Jahre um eine Auffrischungsimpfung kümmern [23].

Tabelle 6: Liste der Tetanusimpfstoffe in Österreich (Stand 08.11.2012) [26]

IMPfstOFF	PRODUKTNAME und HERSTELLER
reine Auffrischungsimpfungen	
Di, Tet, Pert	Boostrix (GSK)
Di, Tet, Pert, Polio	Boostrix Polio (GSK)
Di, Tet	diTeBooster (SSI)
Di, Tet, Pert, Polio	Repevax (SPMSD)
Di, Tet, Polio	Revaxis (SPMSD)
Grundimmunisierung und Auffrischung	
Di, Tet	dT-reduct „Merieux“ (SPMSD)
Di, Tet, Pert	dTaP-Vakzine SSI (SSI)
Di, Tet, Pert, Polio	dTaP-IPV-Vakzine SSI (SSI)
Di, Tet, Pert, Polio, HepB, HiB	Infanrix Hexa (GSK)
Di, Tet, Pert, Polio, HepB	Infanrix Penta (GSK)
Di, Tet, Pert, Polio, HiB	Pendiacel (SPMSD)
Di, Tet, Pert, Polio, HiB	Pentavac (SPMSD)
Di, Tet	Td-pur (Nov)
Tet	Tetanol pur (Nov)
Tet	Tetanus-Adsorbat „Merieux“ (SPMSD)
Di, Tet, Pert, Polio	Tetravac (SPMSD)
Di, Tet, Pert, HepB	Tritanrix HepB (GSK)

*Di=Diphtherie, Tet=Tetanus, Pert=Pertussis, Polio=Poliomyelitis, HepB=HepatitisB, HiB=HaemophilusInfluenzaB; GSK=GlaxoSmithKline, SPMSD=SanofiPasteurMSD, Nov=Novartis, SSI=StatensSerumInstitut

Der Tetanus Impfstoff (z.B.: Tetanol pur) besteht aus einem Tetanus Toxin, das durch Formaldehyd deaktiviert wurde. Außerdem enthält es ein Aluminiumhydroxid als Adjuvans, um das Immunsystem besser und schneller zu aktivieren. Dieser Impfstoff regt somit das Immunsystem aktiv dazu an, Antikörper gegen das Tetanus Toxin zu bilden. Mögliche Nebenwirkungen der Impfung können lokale Schwellungen, Rötungen und Verhärtungen, Abgeschlagenheit, grippeähnliche Symptome, allergische Reaktionen, Kopfschmerzen oder Gelenkschmerzen sein. Der Impfstoff sollte unbedingt intramuskulär und darf nicht intravasal verabreicht werden, denn dies könnte Kreislaufprobleme auslösen. Zur Auffrischungsimpfung werden Kombinationsimpfstoffe mit Diphtherie und Pertussis empfohlen [27].

2.4.5 Impfung bei Immundefizienz

Die Infektionsprophylaxe ist bei Personen, die eine Immundefizienz haben noch bedeutender. Wichtig ist vor der Impfung alles über die immunologische Störung des Betroffenen zu wissen, um die Infektionsrisiken, den zu erwartenden Impferfolg und auch die erhöhten Impfrisiken abschätzen zu können. Zu bedenken ist jedoch, dass es durch die kleine Patientenzahl nicht ausreichend prospektive randomisierte Studien gibt, sondern das Wissen zu meist aus retrospektiven Studien erstellt wird. Wichtig zu beachten ist auch, dass die Impferfolg-Kontrolle mittels der serologischen Titerbestimmung nur in sehr engen Grenzen und nicht für jeden Impfstoff eine ausreichende Aussage liefert (Überprüfung des Tetanus Impferfolges erfolgt mittels eines ELISA: $\geq 0,1 \text{ IE/ml}$). Bei gestörter Immunabwehr besteht bei der Durchführung von einem Lebendimpfstoff ein erhöhtes Impfrisiko. Totimpfstoffe sind hingegen nicht mit einem erhöhten Risiko behaftet. Bei besonderen Fällen können Konjugat-Impfstoffe bevorzugt sein. Der Vorteil des Konjugat-Impfstoffes ist die Rekrutierung einer T-Helfer Antwort, die die Entwicklung einer B-zellulären Gedächtnisantwort unterstützt. Somit kann bei einer eingeschränkten humoralen Immunfunktion ein Konjugat-Impfstoff sehr hilfreich sein. Generell ist es ratsam den Wunsch eines ausreichenden

Immunschutzes immer gegenüber der möglichen Impfkomplicationen abzuwägen [28].

2.5 B-Zell ELISpot

Obwohl es eine Vielzahl an Untersuchungsmethoden zur Messung der Antikörperreaktionsfähigkeit und Antikörperspezifität (z.B. ELISA, Immunoblot oder Flowzytometrie) gibt, gibt es allerdings nur ein paar wenige Methoden, die direkt die antikörpersekretierenden Zellen fokussieren. Eines dieser wenigen Untersuchungsmethoden ist der B-Zell ELISpot. [29]

Dieser wurde 1983 das erste Mal von Czerkinsky und Mitarbeitern beschrieben. Damals inkubierte Czerkinsky Milzzellen von immunisierten Mäusen auf antigen-bedeckten (coated) Polystyrenplatten. Nach dem Entfernen der Zellen, zeigten sich fixierte Antikörper mittels eines Immunenzymverfahrens bei dem eine Enzym-Substrat-Reaktion in Agarosegel verrichtet wurde. Dabei entstanden in den Zonen, in denen die Antikörperproduktionen stattgefunden haben, dunkelbraune Punkte (Spots), die mit bloßem Auge ausgezählt wurden. Er schlug jedoch vor, für eine spektrophotometrische Beurteilung der enzymgebundenen Aktivität, das Gel durch einen flüssigen Puffer auszutauschen, denn dies würde eine exaktere Beurteilung der Gesamtanzahl der sekretierenden Antikörper ermöglichen [30].

Diese B-Zell ELISpot Methode ist hochsensitiv, um die Art und die Anzahl der gesamten antikörpersekretierenden Zellen, aber auch um spezifische Antikörper auf bestimmte Antigene zu bestimmen. Dieser Weg ermöglicht es, ohne eine andere Untersuchungsmethode zu benötigen, die Anzahl und die Häufigkeit von Langzeit-Memory B-Zellen, aufzuzeigen.

Auch wenn der B-Zell ELISpot die sensitivste Methode ist, um die Antwort spezifischer Antikörper festzustellen, wird der B-Zell ELISpot bei Weitem nicht so häufig verwendet wie der verwandte Zytokin-ELISpot, der sich zu einem Standardwerkzeug für die Analyse der antigenspezifischen T-Zell Antwort etabliert hat. Es gibt mehrere Gründe für die bereits etablierte Methode des Zytokin-ELISpot. Zum Beispiel der Fokus auf die T-Zelle, für die Entwicklung von Impfungen im Gegensatz zu der Fülle von anderen üblichen Methoden, um die Antikörper zu messen. Außerdem besteht ein Mangel an gültigen Reagenzien und Protokollen für den B-Zell ELISpot. Auch wenn einige selbstgemachte Reagenzien und Systeme effizient arbeiten, besteht noch immer eine Unsicherheit

gegenüber den optimalen Ergebnissen und in vielen Fällen sind auch die technischen Qualitäten der Resultate schlechter als jene der Zytokin-ELISpot Verfahren. [29]

2.5.1 Die zwei Wege des B-Zell ELISpot

Es gibt zwei Wege um den B-Zell ELISpot durchzuführen. Seit seiner Beschreibung im Jahre 1983 kam es beim B-Zell ELISpot nur zu kleinen Modifikationen. Bei der ursprünglichen Variante wird ein Antigen zuerst auf den 96-Well ELISpot Platten immobilisiert. Dann werden die B-Zellen, die getestet werden sollen, zu diesen Platten hinzugefügt. Nach ausreichender Inkubationszeit, die eine suffiziente Sekretion und Bindung der Antikörper an den Antigenen ermöglicht, werden diese Antikörper mit einem zweiten Reagenz nachweisbar gemacht. Dieses Reagenz beinhaltet für gewöhnlich einen biotinylierten Anti-Ig-Antikörper gefolgt von einem enzymkonjugierenden Avidin oder Streptavidin. Schlussendlich werden durch ein komplexbildendes Substrat Punkte sichtbar gemacht, die, unter einem Mikroskop oder vorzugsweise ELISpot Lesegerät, gezählt werden können (Grafik A) [29].

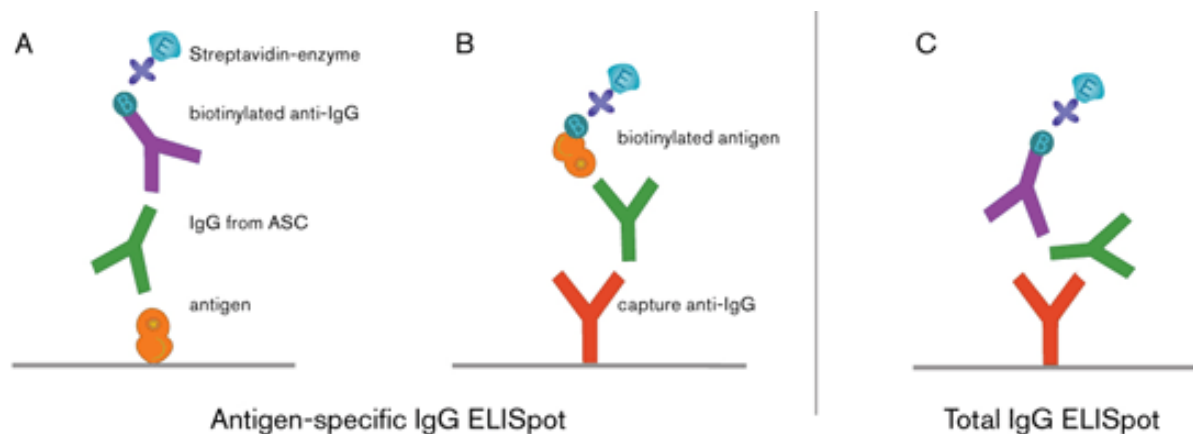
Obwohl diese Prozedur einfach und geradlinig ist, hat es so manch bestimmte Schwächen das Antigen betreffend. Um ausreichend gut definierte Punkte zu erhalten, muss das Antigen in einer relativ hohen Konzentration auf die Platten beschichtet werden, um zu einer relativen erfolgreichen Bindung zu führen. Auch ist es wichtig bei der Inkubation des Antigens ununterbrochen eine Temperatur von 37°C zu haben. In Realität ist der Zugang zu Antigenen oft limitiert und das Schicksal des Antigens auf den Platten ist schwer zu kontrollieren. Dies alles kann zu einer schwachen Punktqualität führen und wird dann von einem Verlust der Sensitivität begleitet.

Um manche dieser Probleme zu vermeiden, hat die Firma Mabtech aus Schweden eine neuartige B-Zell ELISpot Methode entwickelt, die das Antigen zum Nachweis verwendet. Hier startet man, in dem man das Capture-Anti-Ig-Antikörper auf die Platten inkubiert (Grafik B).

Dieser Antikörper kann verwendet werden, um einen spezifischen Antikörper (IgG, IgA, usw.), oder alle IgGs zu binden. Während dieser Kultivierung mit den Zellen werden alle Antikörper, unabhängig welche Ig-Spezifität, von den Capture-Anti-Ig-Antikörper gebunden. Um nun nur die gewollten, zu einem bestimmten Antigen

spezifischen Antikörper, feststellen zu können, muss es mit dem Streptavidin-Enzym inkubiert und schlussendlich mit einem Substrat sichtbar gemacht werden. (Grafik C) Bei vielen Experimenten der Firma Mabtech, bei welchen sie eine unterschiedliche Anzahl an Antigenen mit dem alternativen Weg (B) versuchten, waren die Ergebnisse der B-Zell ELISpots besser und man brauchte insgesamt 20-200 Mal weniger vom Antigen [29].

Abbildung 3: Schematische Darstellung aller B-Zell ELISpot Varianten:



Quelle: Mabtech [31]

Quelle der B-Zellen:

Die meisten B-Zellen können beim B-Zell ELISpot getestet werden. Die Rahmenbedingungen sind abhängig von der Quelle und dem Stadium der Zellen. Zum Beispiel, wenn man Zellen aus Blut- oder Lymphgewebeproben dafür verwendet, könnten, durch eine Infektion oder durch eine kürzlich vorangegangene Immunisierung (Impfung), die Zellen aktiviert sein. Aber sie können auch in Form von Memory-Zellen vorhanden sein. Aktivierte Zellen sind für gewöhnlich in einem Stadium, in dem sie Antikörper sezernieren. Memory B-Zellen sollten vorher ein paar Tage mit polyklonalen Aktivatoren stimuliert werden, damit sie mit der Antikörpersezernierung beginnen. Für gewöhnlich verwendet man für den B-Zell ELISpot keine naiven B-Zellen. Wenn Zellen in-vivo aktiviert wurden, können sie ohne weiter Vorstimulierung zu den Platten hinzugegeben werden. Viele Studien haben gezeigt, dass das Zeitfenster, in welchem Antikörper sezernierende Zellen aus dem Blut nach der Impfung nachgewiesen werden können, mit 5 bis 10 Tagen überraschenderweise sehr eng ist. Memory B-Zellen benötigen eine in-vitro Stimulation, damit sie eine geeignete Anzahl an Antikörpern

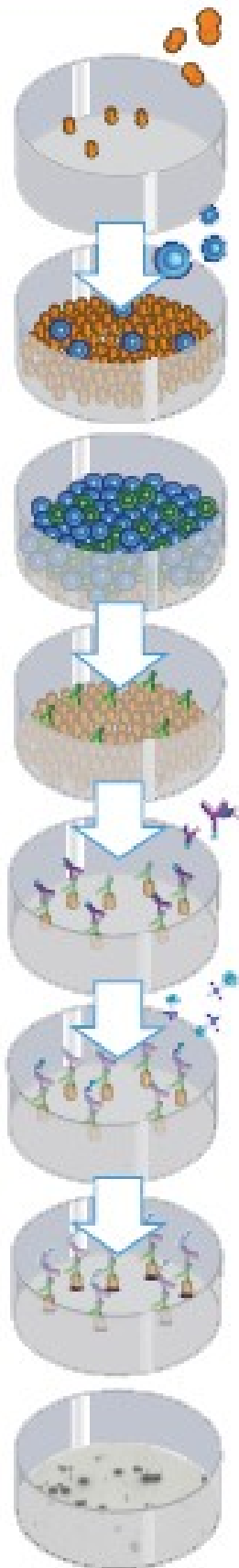
produzieren. Dies wird normalerweise in einem Vorstimulationsschritt unter Anwesenheit einer Mischung von IL-2 und R848 gemacht. Es gibt aber auch einige Protokolle, die es mit verschiedenen mitogenen Signalen, wie Kermesbeerenmitogenen (PWM), *Staphylococcus aureus* oder einem CpG Oligonukleotid-Derivat aus Berberis (einzelliger Parasit, die von Schildkröten übertragen werden können), aktivieren. Die Zeit der Aktivierung variiert, beträgt aber für gewöhnlich 3 bis 8 Tage, wobei die lange Aktivierungszeit bei wenig vorhandenen B-Zellen, zur Ausweitung der Anzahl, sinnvoll ist. Bevor die vorstimulierten Zellen zu den Platten hinzugefügt werden, werden die Zellen gewaschen, um im Medium vorhandene Antikörper zu entfernen.

Zellproben von Menschen sind für gewöhnlich in Form von peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC), können jedoch auch von Lymphorganen oder Schleimhäuten sein. Für gewöhnlich sind nur 12% der PBMCs, B-Zellen. Es besteht die Möglichkeit die nicht B-Zellen zu dezimieren oder die B-Zellen positiv mit Anti-CD-19-Magnetpartikel zu selektieren. Dies könnte die Sensitivität steigern [29].

2.5.2 Methodologische Aspekte:

Viele erfolgreiche methodologische Aspekte, die auf den Zytokin-ELISpot zutreffen, treffen auch auf den B-Zell-ELISpot zu. Mit eingeschlossen sind die PVDF 96-Well-Platten, die Voraktivierung der Plattenmembranen mit Ethanol und die Beschichtung der Platten mit einer relativ hohen Konzentration an Antigenen oder Antikörpern. Diese Maße kombinieren die gut abgrenzbaren Punkte mit einer hohen Intensität, die das Zählen ermöglicht und zusätzlich die Sensitivität steigert. Wie bei jedem immunologischen Versuch, ist es wichtig, dass alle Reagenzien in einer hohen Qualität vorhanden sind. Eine zu hohe aber auch eine zu niedrige Anzahl an Zellzahlen pro Well sollte vermieden werden [29].

Abbildung 4: B-Zell ELISpot mit immobilisiertem Antigen [29]:



Das Antigen wird auf den 96 Well-Platten immobilisiert

Nun werden die Zellen zu den zu dem Antigen hinzugegeben.

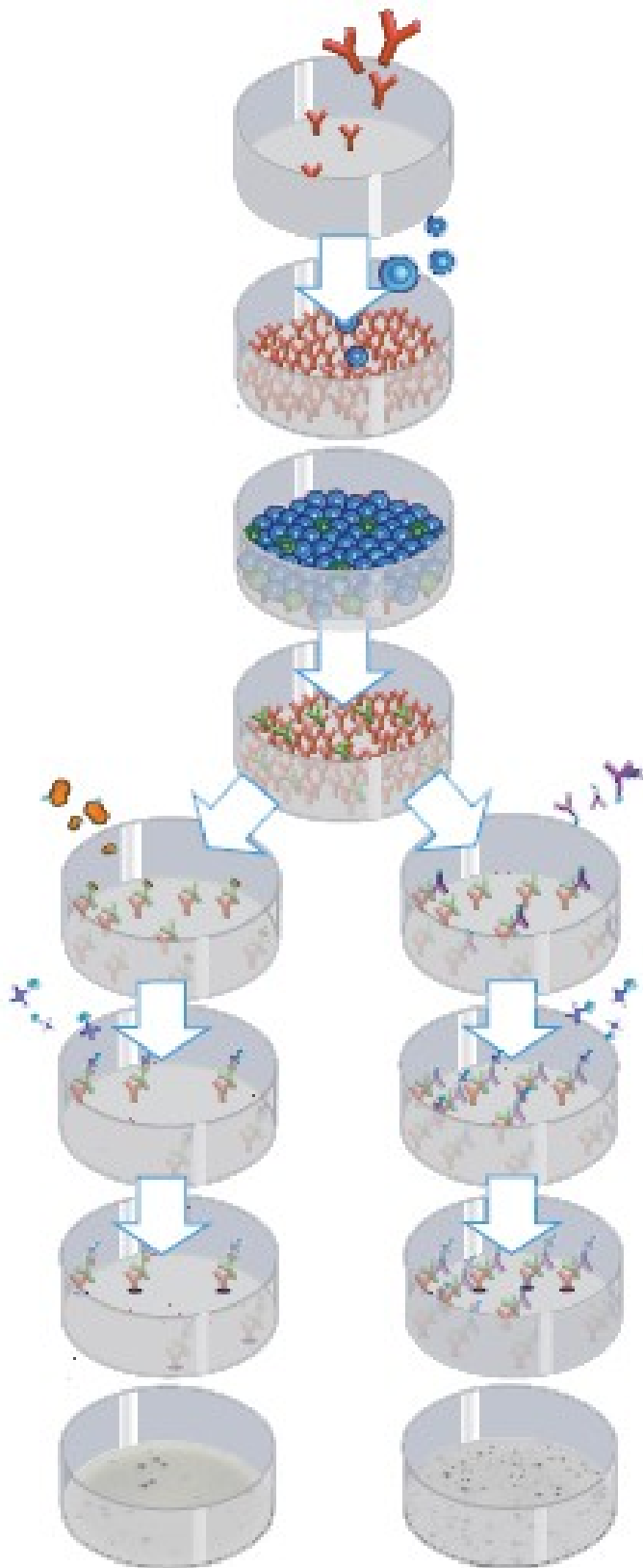
Diese Zellen werden 24 bis 48 Stunden auf den Platten gelassen, damit sie genug Zeit haben, um Antikörper zu sezernieren.

Nachdem alle Zellen entfernt wurden, werden die sezernierten Antikörper mit biotinylierten Anti-Ig-Antikörper gebunden.

Die Punkte werden nun mit dem Zufügen des Streptavidin-Enzyms und einem Substrat sichtbar gemacht.

Nun können die Punkte mit einem Mikroskop oder ELISpot Lesegerät gezählt werden.

Abbildung 5: B-Zell ELISpot mit biotinyliertem Antigen und total Ig ELISpot [29]:



Ein Capture Anti-Ig Antikörper wird auf den 96 Well-Platten gebunden.

Die Zellen werden zu den Platten hinzugefügt und 24 bis 48 Stunden auf den Platten gelassen, damit sie genug Zeit haben, Antikörper zu sezernieren.

Nach dem Entfernen der Zellen, werden die Antikörper entweder mit biotinyliertem Antigen zum Feststellen der Antigen-spezifischen Zellen, oder mit biotinyliertem Antig-Ig zum Feststellen aller sezernierten Zellen, versetzt.

Die Punkte werden nun mit der Beifügung von Streptavidin-Enzym und einem Substrat sichtbar gemacht.

Die Punkte können nun mit dem Mikroskop oder ELISpot Lesegerät ausgezählt werden.

2.6 Ausgewählte bisherige Studien und Forschungen:

2.6.1 Immunsystemreaktionen gegen Tetanus Toxoid [32]

In einer Studie von Stephanie Mayer et. Al [32] aus dem Jahre 2001 versuchten sie die Immunantwort gegen Tetanus Toxoid (TT) zu analysieren. Sie entschieden sich die spezifischen T-Helfer-Zellen über einen ELISpot Assay aufzuzählen. TT ist bekannt dafür, eine starke spezifische T-Zell Antwort nach Impfungen hervorzurufen. Bei dieser Arbeit versuchten sie die Anzahl der TT spezifischen Interferon- γ (IFN- γ) sekretierenden T-Zellen von Spender über zwei Jahre zu beurteilen. Bei allen 22 Freiwilligen konnten TT-spezifische T-Zellen festgestellt werden. Sechs von sieben getesteten Spendern zeigten eine konstante Anzahl an TT-spezifischen IFN- γ sekretierenden T-Zellen über sieben Monate. Ein Spender zeigte einen kurzen Anstieg der Zellen während eines grippalen Infekts. Drei gesunde Spender zeigten einen signifikanten Anstieg der TT-spezifischen IFN γ sekretierenden T-Zellen, vier Wochen nach einer Auffrischungsimpfung. Man stellte immunomagnetisch fest, dass für die TT-spezifische IFN- γ Sekretion hauptsächlich die CD4⁺ T-Zellen verantwortlich sind. Auch fand man heraus, dass die IFN- γ Produktion auf HLA Klasse II Zellen beschränkt ist. Die Studie stellte im Weiteren fest, dass der ELISpot Assay zuverlässig verwendet werden kann, um die Anzahl der TT-spezifischen CD4⁺ IFN- γ produzierenden Zellen zu beurteilen und dass es deshalb auch zur Beurteilung der Reaktion der anderen T-Helfer Antigenen nützlich sein könnte [32].

2.6.2 Identifikation von Antigen-spezifischen B-Zell Populationen [33]

Die Schwierigkeit bei der Charakterisierung von Antigen-spezifischen B-Zellen, die aus den naiven B-Zellen entstehen, ist die enorme Behinderung, die schützende und die krankmachende Antikörper Antwort zu verstehen. Jeffrey Newman et al [33] entwickelten eine Tetramer-basierte Technik für die Identifikation von Antigen-spezifischen B-Zellen. Biotin markierte Antigene wurden unter Interaktion mit Streptavidin zu Tetramere geformt. Dies verbesserte die Avidität dieses antigenetischen Gemisches für die B-Zell Membran und erlaubt die Visualisierung, Charakterisierung und Isolierung der antigenspezifischen B-Zellen [33].

2.6.3 Antikörper-bildende Zellen und Plasmablasten im peripheren Blut bei CVID Patienten nach Impfung [34]

CVID ist die häufigste primäre Antikörper Fehlfunktion, die durch eine Hypogammaglobinämie und beeinträchtigte Antikörperproduktion, charakterisiert ist. Eine schwache Impfantwort ist notwendig für die Diagnose der CVID. Es bleiben sehr viele ungeklärte Ursachen dafür. Die Routinefeststellung der Antikörperproduktion im Serum von CVID Patienten nach einer Impfung und die Erforschung der B-Zell Funktion in-vivo ist kompliziert während der Substitutionstherapie. Deshalb erforschten Zita Chovancova et al [34] im Jahre 2010 die Antikörperproduktion je nach B-Zell Stadium durch einen ELISpot und charakterisierten in B-Zell Subpopulationen bei CVID Patienten Plasmablasten eingeschlossen. Siebenunddreißig CVID Patienten und acht gesunde Freiwillige wurden durch eine TT- und durch eine Pneumokokken-Polysaccharid Impfung immunisiert. Spezifische Antikörperstadien und B-Zell Untergruppen wurden vor der Impfung und am siebten Tag nach der Impfung mittels einem ELISpot Assay und einer Flowzytometrie gemessen. Von den siebenunddreißig gut definierten CVID Patienten, fehlten bei dreißig Patienten erkennbare Punkte, die durch IgG-, IgA oder IgM-Antikörper produzierenden Zellen, gegen die Impfung entstehen sollten. Sieben der CVID Patienten hatten eine schwache Immunantwort. In der Kontrollgruppe korrelierte am siebten Tag nach der Impfung der Anstieg der zirkulierenden Plasmablasten mit dem Auftreten der antikörperbildenden Zellen. Im Gegensatz dazu, fehlten bei den CVID Patienten die Anstiege der signifikanten Plasmablasten im peripheren Blut, nach der Bereitstellung der Antigene. Deren Ergebnisse zeigen, dass CVID Patienten eine Blockade in der letzten B-Zell Differenzierung haben und dass die Flow-basierte Beurteilung der Plasmablasten im peripheren Blut nach der Impfung als diagnostischer Ersatzmarker zur Einschätzung der in-vivo entstandenen Antwort, der suspekten CVID Patienten dienen [34].

2.6.4 Vergleich eines „limiting dilution assay (LDA)“ und eines ELISpot für die Feststellung der Memory-B-Zellen vor und nach einer Immunisierung mittels eines Protein-Polysaccharid konjugierten Impfstoffes bei Kindern [35].

In einer Studie von Geraldine Blanchard-Rohner et al. [35] aus dem Jahre 2009 wurden die Fähigkeiten eines LDA und eines ELISpots miteinander verglichen. Dazu untersuchten sie mit diesen Methoden die Serogruppe-C Meningokokken (MenC)-spezifischen Memory B-Zellen im peripheren Blut bei 12 Monate alten Kindern, nach einer im Säuglingsalter verabreichten dreifachen Grundimmunisierung mit einem Serogruppe-C, Meningokokken konjugiertem Impfstoff. Nach 12 Monaten wurden MenC Memory B-Zellen beim ELISpot in 61% der Kinder und beim LDA in 5% der Kinder festgestellt. Im Kontrast dazu wurden trägerspezifische Memory B-Zellen bei 36% der Kinder bei der LDA und bei 78% der Kinder bei dem ELISpot gemessen. Einen Monat nach einer Auffrischung von MenC Viren wurden bei 89% der Kinder mit dem ELISpot und 65% der Kinder mittels LDA festgestellt. Diphtherie-Toxoid-spezifische Memory B-Zellen wurden bei 88% der Kinder mittels ELISpot und bei 74% der Kinder mittels LDA nachgewiesen. Für den LDA Assay wurden dann zwei statistische Methoden, die Poisson Methode und die Reed and Muench Methode, angewendet. Zum Vergleich dazu wurden die ELISpot Daten ausgewertet. Herausgefunden wurde, dass vor und nach der Immunisierung die statistischen Methoden Reed and Muench und Poisson für den LDA und die ELISpot Methode für MenC und für Diphtherie-Toxoid-spezifische Memory B-Zellen korrelieren. Eine moderate Korrelation bestand zwischen den Resultat des LDA (ohne statistischer Methode) und des ELISpot nach der Immunisierung, aber nicht davor [35].

2.6.5 Untersuchung über die antigenspezifische Immunität nach Diphtherie- und Tetanus-Schutzimpfung mit den B-Zell ELISpot [36]

Daniela Heinrich aus Würzburg [36] hat im Jahre 2002 in ihrer Doktorarbeit versucht mittels Diphtherie- und Tetanustoxoid das ELISpot Testverfahren zu standardisieren. Dazu untersuchte sie bei 13 Probanden den Langzeiteffekt von Impfungen auf die Frequenz spezifischer Memory B-Zellen und die Höhe spezifischer Antikörper-Titer. Sie wollte den Zusammenhang zwischen dem Antikörper-Titer und der Anzahl der Memory B-Zellen herausfinden. Außerdem

wollte sie erforschen, ob sich die Auffrischungsimpfung durch die Anzahl der Memory B-Zellen oder mehr durch die Höhe der Antikörper-Titer widerspiegelt. Auch der Zusammenhang zwischen den bisherigen Impfungen und der Stärke von Booster Auffrischungsimpfungen war eine Forschungsfrage von Daniela Heinrich. Alle 13 Probanden hatten keine chronischen Erkrankungen. 11 davon bekamen ihre Initialimpfung im Säuglingsalter. Im Durchschnitt lag die letzte Diphtherie- und Tetanusimpfung 66 Monate zurück.

Für die Durchführung des B-Zell ELISpot verwendete sie 150ml Blut, aus dem sie die PMBCs isolierte. Diese kryokonservierte sie dann bei -196°C (sie verglich frische und kryokonservierte Zellen miteinander und es bestanden keine Unterschiede). Nach einer Messung der Zellen mittels einer Durchflusszytometrie und einer Zellfärbung konnte der ELISpot durchgeführt werden. Daniela Heinrich beschichtete die Platten mit dem Diphtherie- oder mit dem Tetanustoxoid. Tetanustoxoid wurde in einer Konzentration von 20 LF/ml und Diphtherietoxoid in einer Konzentration von 30 LF/ml in 0.05 molarem Tris-Puffer, pH7.5 als Coating-Lösung benutzt (die optimale Konzentration lag zwischen 10 und 50 $\mu\text{g/ml}$). Die Platten wurden dann mit 1ml der Coating-Lösung über Nacht bei 4°C inkubiert. Die B-Zellen hat sie mit SAC (*Staphelococcus aureus* Cowan I) [1:5000] und IL2 [35IU/ml] über 5 Tage stimuliert (Die Anzahl der Antikörper sezernierenden B-Zellen hat sich um das 43-fache erhöht). 1ml der Zellsuspension wurde dann für 16 Stunden bei 37°C in den Platten eingesetzt.

Nach Abtropfen der Zellsuspension und mehreren Waschvorgängen wurden die plattengebundenen Antikörper mit einem Entwicklungs-Antikörper, an dem das Enzym alkalische Phosphatase (AP) gekoppelt wurde, detektiert. Nach vier Stunden und weiteren Waschvorgängen wurde 1ml von einem Substrat hinzugegeben. Nach zwei Stunden wurden die Spots sichtbar und konnten gezählt werden.

Zur Berechnung der B-Zellfrequenzen wurde die Anzahl der Spots dann von oben nach unten gezählt und ein Mittelwert gebildet. Nachdem die B-Zell Anzahl der PBMC durchflußzytometrisch bestimmt wurde, ließ sich die Anzahl der antikörpersezernierenden B-Zellen auf die Gesamtzahl der B-Zellen bezogen. Die ermittelte Frequenz des spezifischen Anti-Tetanustoxoid und Anti-Diphtherietoxoid IgG-sezernierenden B-Zellen, wurden mit der Gesamtanzahl aller IgG-

sezernierenden Zellen in Beziehung gesetzt und als Prozentwert (0.7%) angegeben.

Im spezifischen B-Zell ELISpot konnte eine ausreichende Spezifität nachgewiesen werden. Bei einem Probanden, der seit seiner Grundimmunisierung 6 Tetanus- und 3 Diphtherie Auffrischungsimpfungen erhalten hatte, wurde zu 4 verschiedenen Zeitpunkten Blut abgenommen und im ELISpot untersucht. Es stellte sich dadurch eine Reproduzierbarkeit des ELISpot Assay heraus.

Sie entdeckte, dass der spezifische Antikörper-Titer nicht mit der Frequenz der tetanus- bzw. der diphtherietoxidspezifischen IgG sezernierenden B-Zellen ($r=0.31$, $p=0.3$) korreliert. Es kam nach der Booster-Impfung bei den Grundimmunisierten parallel zu einem Anstieg der spezifischsezernierenden B-Zellen und des Antitoxin-Titers, mit einem Höchstwert am Tag 12. Am Tag 90 nach der Diphtherie-Auffrischungsimpfung blieben die impfspezifischen B-Zellfrequenzen und die Antikörper konstant oder sanken ein wenig ab. Bei der Tetanus-Auffrischungsimpfung blieben sie am Tag 90 auf gleicher Höhe. Je niedriger die prävakzinale Frequenz der antigenspezifischen B-Zellen, desto stärker stiegen die impfspezifischen IgG-sezernierenden Zellen am Tag 12 bzw. am Tag 90 hochsignifikant an ($p=0.0001$ bzw. $P=0.0047$). Dasselbe stellte sie auch beim Antitoxin-Titer fest. Je niedriger der prävakzinale Antitoxin-Titer war, desto höher war der Anstieg nach Boosterimpfung [36].

2.6.6 Optimierung eines humane IgG B-Zell ELISpot Assays für die Analyse von impfinduzierten B-Zell Antworten [37].

In einer Studie von Jahnmatz M et. Al [37] wurde mit fünf verschiedenen Antigenen und mehreren B-Zell Aktivierungsmixturen versucht, den B-Zell ELISpot zu optimieren. Außerdem wurden beide Varianten des B-Zell ELISpots, der B-Zell ELISpot mit dem biotinyliertem Antigen und dem ELISpot mit dem coated Antigen, verglichen. Für die Aktivierung stellte sich heraus, dass eine Mixture aus IL-2 und R848 die besten Ergebnisse hervorbringt. Bei den zwei unterschiedlichen Varianten stellte sich bei Diphtherie ein Vorteil bei dem biotinylierten Antigen heraus und bei TT stellt man keine Unterschiede fest. Getestet wurde auch die Höhe der impfinduzierte B-Zell Antwort, im Abstand von 0, 1, 2, 4 und 12 Wochen. Überraschenderweise gab es in allen fünf getesteten Antigenen die höchste Immunantwort nach 2 Wochen. Nach 12 Wochen ist die Antwort noch immer

deutlich höher als in Woche 0. Bei dem total-IgG ELISpot wurde eine PMBC-Zahl von 100.000 und bei den antigenspezifischen ELISpot wurde je nach Zeitspanne zur Auffrischungsimpfung eine PBMC-Zahl von 200.000 am Tag 0 und Tag 28-42, 100.000 am Tag 7 und 14 und 400.000 im 3. Monat, gewählt. Es zeigte sich auch ein kontinuierlicher Anteil von 20% der im Blut zirkulierenden antigenspezifischen B-Zellen im Vergleich zu dem total-IgG-ELISpot. In dieser Studie konnten sie ein neues Protokoll entwickeln, um in-vivo aktivierte B-Zellen mit einer höheren Sensitivität bei einer mit geringeren Antigenmenge in einem B-Zell ELISpot zu testen [37].

3 Material und Methoden

3.1 Vorstellung des Projektes

Ziel meiner Arbeit ist es den B-Zell ELISpot als Standardverfahren im Routinelabor zu etablieren. Als Antigen verwende ich das Tetanus Toxoid, da nahezu jeder Mensch bereits einen Kontakt mit diesem von Clostridium Tetani erzeugten Gift hatte. Sei es bei einer Verletzung oder durch die Schutzimpfung, die man ja üblicherweise schon als Kind bekommt. Als Positivkontrolle wird das Gesamt-IgG kontrolliert.

Zur Erhebung der Referenzwerte werden Blutproben von mindestens 5 gesunden Probanden an der Abteilung für klinische Immunologie analysiert und ausgewertet. Die isolierten mononukleären Zellen werden mit einem unspezifischen und einem spezifischen B-Lymphozytenstimulanz inkubiert und anschließend wird mittels ELISpot die Frequenz von IgG-produzierenden B-Lymphozyten ermittelt. Die ELISpot-Technik ist derzeitige einer der wichtigsten Methoden um die Funktion von B-Lymphozyten beurteilen zu können.

Das Alter, das Geschlecht und die Medikamenteneinnahme werden mitberücksichtigt. Wichtig dabei ist, dass die Probanden keine immunologische Erkrankung aufweisen. Außerdem sollten die Probanden älter als 18 Jahre alt sein. Auch die letzte Auffrischungsimpfung wird bei der Auswertung beachtet.

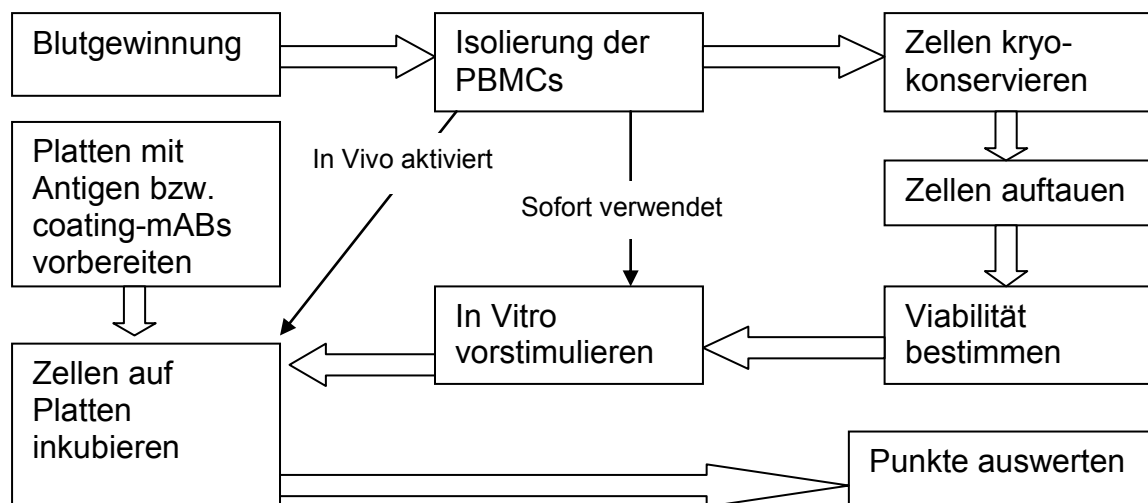
Die Daten werden mittels Prism6, GraphPad Software aber auch mittels Microsoft Excel ausgewertet und der Frequenzbereich IgG-produzierender B-Lymphozyten

ermittelt. Zusätzlich zum Mittelwert und zum Median wurden die Ergebnisse deskriptiv erläutert.

3.2 B-Zell ELISpot zur Beurteilung der B-Lymphozyten Funktion

Die Laborarbeit ist in mehreren Schritten und auf mehrere Tage aufgeteilt. Die Arbeit kann erst beginnen, wenn die gewünschte Anzahl an Blutproben von freiwilligen Probanden gesammelt ist. Als nächstes müssen bei all diesen Proben die PBMC isoliert werden. Bis die gewünschte Anzahl an Probanden gesammelt ist, empfiehlt es sich, die Zellen zu kryokonservieren. Bei einer geringen Anzahl an Probanden kann das Einfrieren und Auftauen auch übersprungen werden. Nun werden die Zellen zunächst in-vitro stimuliert, damit sie angeregt sind ausreichend Antikörper zu sezernieren. Bei kürzlich geimpften Probanden kann man auch auf die Aktivierung verzichten, denn bei ihnen sind die Antikörper in-vivo aktiviert. Nun werden die aktivierten Zellen auf die zuvor vorbereiteten Platten inkubiert. Nach 16 bis 24 Stunden können die entstandenen Spots abgelesen werden.

Abbildung 6: Schematische Darstellung der wichtigen Arbeitsschritte



3.3 Erforderliche Geräte

1. Pipettierhelfer Accu-jet® pro BRAND
2. Serologische Pipetten: 10ml Stripette® Disposable Serological Pipette Corning Incorporated Costar®
3. Pipetten: Eppendorf Research 100-1000µl
 Eppendorf Research Plus 50µl
 Finnipipette® 20-200µl Labsystems G13486
 Finnipipette® 50-300µl Labsystems G11143
4. Sterile Pipettenspitzen: ART® 10 REACH™ Molecular Bio Products
 ART® 200 Molecular Bio Products
 Finntip® 100µl Thermo Scientific
 Finntip® Thermo Scientific 1000µl
 Labsystems Finntip 300µl Code 9401230
5. Falcon® Blue Max™ 50ml Konische Röhrchen aus Polypropylen
6. Falcon® 14ml Rundbodenröhrchen aus Polypropylen
7. BD Falcon™ 5ml Rundbodenröhrchen aus Polystyrol und Falcon® 5ml Deckel für Rundbodenröhrchen
8. Cryovials® Simport, PK/100
9. Transferpipetten 3,5ml Sarstedt AG&Co, Lot 1051501
10. Lithium-Heparin Blutabnahmeröhrchen, Blutabnahmekanülen und Standardröhrchenhalter von VACUETTE®
11. Sicherheitswerkbank Heraeus Instruments, Kendro Laboratory Products, Typ HSP 9,1/PE AC, Lasse II
12. CO₂ Inkubator Kendro Laboratory Products Hera cell N40903
13. Wasserbad GFL® N40920
14. Vortex Heidolph REAX top
15. Carl Roth Entsorgungsbeutel 200x300mm
16. Zentrifuge Thermo Electron Corporation Labofuge 400R
17. Durchflusszytometer BD FACSCanto™ II
18. Einfriergerät Nalgene® Mr. Frosty™ Cryo 1°C Freezing Container
19. Tiefkühlschrank Forma Scientific Bio-Freezer, N270895
20. Automatisiertes Zählverfahren Coulter HmX, Hematology Analyzer Beckman Coulter

21. ELISpot-Reader (C.T.L. Analyzer N64554) und entsprechende Software (C.T.L. ImmunoSpot®)

3.4 Erforderliche Reagenzien

1. ELISpot^{PLUS} for Human IgG Kit (Mabtech Product Code: 3850-2AW-Plus), bestehend aus [1]:
 - Monoklonale Antikörper MT91/145, eine Kombination aus zwei verschiedenen Antikörpern (1.2ml zu einer Konzentration von 0.5mg/ml)
 - Biotinylierte monoklonale Antikörper MT78/145, eine Kombination von zwei verschiedenen Antikörpern (100µl zu einer Konzentration von 0.5mg/ml)
 - Streptavidin-Alkaline Phosphatase (50µl)
 - Polyklonaler Aktivator: R848 (100µl zu einer Konzentration von 1mg/ml)
 - Lyophilisiertes rekombinates humanes IL-2 (1µg)
 - ELISpot Platten (4 PVDF Platten)
 - BCIP/NBT Substrat (2x25ml)
2. Sigma® Histopaque®-1077, steril gefiltert, Lot RNBB8230
3. Tetanus Toxoid, Clostridium tetani 25µg, Calbiochem®, Katalognr. 582231
4. Pufferlösung PBS („Phosphate buffered saline“), GIBCO®, pH 7.4; frei an Magnesium- und Kalziumchlorid, 10010
5. Steriles Zellkulturmedium: AIM-V® Medium CTS™ GIBCO®
6. Steriles Zellkulturmedium: RPMI 1640, GIBCO® 31870, frei an L-Glutamin
7. Bidestilliertes Wasser: Aqua bidest „Fresenius“
8. C.T.L. Cellular Technology Ltd. CTL-Wash supplement, Katalognr. CTLW-010
9. C.T.L. Cellular Technology Ltd. CTL-Cryo ABC, Katalognr. CTLC-ABC
10. BD Pharmingen™ FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I, Katalognummer. 556547
11. 1% L-Glutamin
12. C.T.L.-Anti-Aggregate™ Wash Supplement 20x (1ml) und C.T.L. Test™ Medium

3.5 Allgemeine Vorbereitungen

3.5.1 Probegewinnung, Zellisolierung und Einfrieren

Die erforderlichen Vorbereitungen bzw. die PBMC-Isolierung zur Durchführung des ELISpot^{Plus} for Human IgGTM von Mabtech [1] laufen ident zu den Vorbereitungen der Durchführung des T-Spot.TBTM der Herstellerfirma Oxford Immunotec [38]. Die dafür notwendigen Materialien und Geräte sind auf den vorherigen Seiten aufgezeigt.

Am Anfang wird von fünf Studienteilnehmern venöses Blut mit jeweils zwei 6ml Lithium-Heparin-Röhrchen oder zwei 8ml CPT Röhrchen abgenommen. Laut Hersteller sollte dieses Blut innerhalb von acht Stunden verarbeitet werden oder die Isolierten PBMCs korrekt eingefroren werden. Die Verarbeitung des Blutes sollte unter der sterilen Werkbank erfolgen. Zuerst werden die PBMCs durch das Sigma® Histopaque® Medium aus dem Vollblut isoliert und gewaschen, um verfälschende, bereits sezernierte Antikörper zu entfernen. Danach werden die Zellen aller 5 Studienteilnehmer korrekt eingefroren, um zu einem späteren Zeitpunkt den B-Zell-ELISpot durchführen zu können. Von einem Proband wurde dann vor der Durchführung noch einmal Blut abgenommen, um den Unterschied zwischen kryokonserviertem und frischem Blut festzustellen.

Tabelle 7: Allgemeine Vorbereitungen zur Durchführung eines IgG-B-Zell-ELISpot [39]

Blutgewinnung
- Zwei 6ml Lithium-Heparin- Röhrchen verwenden, oder zwei 8ml CPT Röhrchen venös entnehmen
Isolierung der PBMC
- Steril arbeiten!
- Blutprobe bei Zimmertemperatur lagern (Verarbeitung innerhalb von 8 Stunden)
- Notwendige Zellkulturmedien auf 37°C vorwärmen
- Blut 1:2 mit Ca/Mg-freien PBS verdünnen
- 25-30ml verdünntes Blut über 15ml Sigma® Histopaque® im Ficoll überschichten
- 30min bei 740g (1900U/min) zentrifugieren – ohne Bremse
- Abheben der PBMC und in zwei 50ml Falcons® und bis zu 30ml

Markierung mit PBS auffüllen

- Bei **330g** (1300U/min) für 10 Minuten zentrifugieren – mit Bremse
- CTL-Wash™ mit **RPMI 9:1** verdünnen (insgesamt 10ml)
- Abgießen, Zellen aufschütteln, mit **5ml** CTL-Wash™ pro Falcon resuspendieren und anschließend Zellen poolen
- Die Zellzahl muss nun mit einem automatisiertem Zählverfahren bestimmt werden; um nicht zu viele Zellen zu verschwenden Zellsuspension z.B.: 1:6 mit PBS verdünnen (erwarteter Wert: **1-2 Millionen PBMC/ml**)
- Bei **330g** (1300U/min) zentrifugieren

Zellen einfrieren

- CTL-Cryo ABC Kit™ verwenden
- Die Zellkonzentration muss mit CTL-Cryo C auf **20 Millionen Zellen pro ml** eingestellt werden
- CTL-Cryo **AB** im Verhältnis **4:1** herstellen; insgesamt muss die gleiche Menge wie CTL-Cryo C verwendet werden
- Nach dem zentrifugieren (waschen) Überstand abgießen; PBMC mit **CTL-Cryo C auf 20 Millionen Zellen pro ml** resuspendieren
- CTL-Cryo AB langsam innerhalb von **2 Minuten** hinzugeben; immer wieder gut mischen
- PBMC- Suspension in beschriftete Cryovials geben (1ml pro Cryovial), dann ins Gefriergerät (sog. „Mr. Frosty“) geben und für mindestens 12 Stunden in den -80°C Freezer stellen.
- (Anschließend eventuell in flüssigen Stickstoff überführen)

3.5.2 Auftauen der eingefrorenen Zellen

Da alle Blutproben der Studienteilnehmer an unterschiedlichen Tagen gesammelt wurden, mussten diese tiefgefroren werden. Deshalb erfolgte unmittelbar vor dem B-Zell ELISpot das Auftauen der PBMCs und die Bestimmung der Viabilität (Die Bestimmung der Anzahl an lebenden Zellen mittels Durchflusszytometrie). Das Auftauen der PBMCs soll mit C.T.L.- Anti- Aggregate™ Wash Supplement der Firma C.T.L. Cellular Technology Ltd. [39] erfolgen. Der ganze Auftauprozess sollte schonend vollzogen werden, um Scherkräfte oder osmotischen Stress zu

vermeiden und um dadurch erfolgreichere und untrüglichere Ergebnisse zu erhalten.

Tabelle 8: Auftauen der PBMC mit C.T.L.- Anti- Aggregate™ Wash Supplement [39]

Auftauen der Zellen
<ul style="list-style-type: none">- Pro Cryovial je 1 Fläschchen CTL- Anti- Aggregate – Wash™ Supplement in 27°C warmen Wasserbad auftauen und 1:20 mit RPMI 1640 verdünnen- CTL- Test™ Medium vor der Verwendung mit 1% frischem L-Glutamin versetzen (aufgrund der Instabilität von CTL-Test™ Medium bei 4°C)- Die Temperatur der Cryovials rasch auf 37°C erhöhen (angewärmte Luft oder warmes Wasserbad) und die PBMC von bis zu maximal 4 Cryovials in ein 50ml konisches Röhrchen überführen- In jedes Cryovial vorsichtig tröpfchenweise 1ml 37°C warme Auftaulösung geben- Langsam über eine Minute verteilt, 37°C warme Auftaulösung hinzufügen und das originale Volumen zirka vierfach verdünnen- Dann nochmals dasselbe Volumen an warmer Auftaulösung innerhalb von 30 Sekunden hinzugeben- 10min bei Raumtemperatur und 330g mit Bremse zentrifugieren- Überstand abgießen und pro Cryovial 10ml 37°C warme Auftaulösung hinzugeben- Zellzahl mit einem automatisiertem Zählverfahren bestimmen- Die aufgetauten Proben im Inkubator belassen und unmittelbar vor Einsetzen in die PVDF-Platte für 10min bei 330g zentrifugieren – mit Bremse- Überstand abgießen, die optimale Zellkonzentration mit 37°C warmen, mit 1% L-Glutamin versetzten CTL-Test™ Medium einstellen.

3.5.3 Bestimmung der Viabilität

Nach dem achtsamen Auftauen der PBMCs werden die Zellen mit Annexin und 7-AAD (7- Amino- Actinomycin D) aus dem Annexin V Apoptosis Detection Kit I der Firma BD Pharmingen™, angefärbt, um den Prozentanteil an lebenden Zellen zu bestimmen.

Tabelle 9: Bestimmung der Viabilität [40]

Viabilität Bestimmung mittels Apoptose-Assay [BD Bioscience]

- PBMC zwei Mal mit **3ml** eiskaltem PBS waschen und fünf Minuten bei **1500** Umdrehungen zentrifugieren
- Herstellen der „Binding buffer working solution“: **100µl** Binding buffer mit **900µl** destilliertes Wasser mischen und auf Eis legen
- Gewaschene Zellen mit der hergestellten Binding buffer solution versetzen; wobei die Zellzahl auf **1 Millionen Zellen pro ml** eingestellt werden soll
- Je **5µl Annexin und 5µl 7-AAD zu 100µl** der Zellsuspension hinzufügen und **15 Minuten** im Dunkeln auf Eis inkubieren
- **400µl** Binding buffer w.s. hinzupipettieren, fünf Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubieren und die Apoptoserate innerhalb einer Stunde am Durchflusszytometer bestimmen

3.6 Tetanus Toxoid in geeigneter Dosis herstellen

Die Anleitung des Kits schlägt vor, ein gewünschtes Antigen in einer Konzentration von 1-50µg/ml zu verwenden. Für diesen Versuch wurden 25µg Tetanus Toxoid von der Firma Merck Millipore (Calbiochem®) [41] bestellt und auf 5µg/ml verdünnt. Benötigt wurden 100µl pro Well für 50 Wells. Füllt man die 25µg mit 5ml PBS auf, hat man genau die gewünschte Konzentration von 5µg/ml.

3.7 B-Zell ELISpot von Mabtech

An dieser Stelle sollen die ersten Arbeitsschritte zur Durchführung des B-Zell ELISpot aufgezeigt werden, die sich auf die Vorgaben der Firma Mabtech AB [1] stützen. Wie bereits im Kapitel 2.5.1 (Seite 28+f) erwähnt, gibt es zwei unterschiedliche Wege, einen B-Zell ELISpot auszuführen. Ich entschied mich zunächst für den konventionellen Weg, bei dem ich das TT als Antigen auf die Platte ansetzte. Um die alternative Methode durchzuführen benötigt es zunächst eine Biotinylierung des Antigens. Dazu benötigt man ein Sulfo-NHS-LC-Biotin [1], das man in Österreich zum Beispiel bei Fisher Scientific [42] (Prod. Nr. 10538723) bestellen kann.

Nach der Vorbereitung, die in den vorherigen Kapiteln (Kapitel 3.5 „Allgemeine Vorbereitungen“ auf Seite 42+f) beschrieben wurden, erfolgt nun die Vorstimulierung der Memory B-Zellen mittels einer Mixtur von R848 und IL2, die beide in dem ELISpot^{Plus} for Human IgG Kit [1] (Product Code: 3850-2AW-Plus)

enthalten sind. Diese Mischung muss zunächst selbst miteinander vermengt werden. Alle anderen Materialien in diesem Kit (PVDF Platten, monoklonaler Antikörper, biotinylierter monoklonaler Antikörper, Streptavidin-Alkalin Phosphatase, R848, IL-2, BCIP/NBT Substrat) sind gebrauchsfertig vorhanden. Außerdem müssen auch die Platten mit Ethanol voraktiviert werden. Auf diese Platten werden dann entweder das TT als Antigen für den spezifischen IgG ELISpot, oder die monoklonalen Antikörper (MT91/145) für den totalen IgG ELISpot aufgebracht.

3.7.1 In-vitro Stimulierung

Tabelle 10: In Vitro Stimulierung und Plattenvorbereitung [1]

Vorbereitung – In Vitro Stimulierung
<ul style="list-style-type: none"> - Memory B-Zellen benötigen eine polyklonale Stimulation bevor sie eine geeignete Anzahl an Antikörper produzieren - Füge zum rhIL-2 einen ml PBS hinzu um eine 1µg/ml Lösung zu erhalten - Lasse diese rhIL-2 Lösung für 15 Minuten bei Raumtemperatur stehen und mische es am Ende durch - Verwende diese Lösung sofort oder friere es bei -20°C ein - Füge nun eine Mischung aus R848 zu 1µg/ml und die rhIL-2 Lösung zu den Zellen, in einem eigenen Röhrchen oder Platten hinzu - Lasse dieses Röhrchen/Platten für 48-72h bei 37°C bei 5% CO₂ stehen - Sammle die aktivierten Zellen in ein Röhrchen und um alle sekretierenden Antikörper zu entfernen, wasche die Zellen einmal mit einem Medium, dass 10%FCS enthält (um die Reaktion zu blocken) - Fülle die Zellen nochmals mit einem Medium auf - Diese Zellsuspension kann nun in den ELISpot Platten zu einer gewünschten Konzentration eingefügt werden
Vorbereitung – ELISpot Platten
<ul style="list-style-type: none"> - Antigen-spezifisches IgG: Verdünne das Antigen zu einer geeigneten Konzentration (z.B.: 1-50µg/ml in sterilen PBS, pH7.4): z.B.: 100µl Antigen (5µg/ml) in PBS. Total IgG: Verdünne die Coating-mABs MT 91/145 zu 15µg/ml in sterilen PBS, pH7.4 - Packe die Platten aus und feuchte die Membranen mit 50µl 70%igem

Ethanol pro Well für maximal **2 Minuten** an.

- Wasche die Platten **5mal** mit sterilen Wasser, **200µl/Well**.
- Füge **100µl/Well** von der Antigenlösung hinzu und lass es über Nacht bei **4-8°C** stehen.

3.8 B-Zell ELISpot Durchführung

Nun werden die voraktivierten Zellen gewaschen, die überschüssige Reaktion mit 10% FCS geblockt und wieder mit einem Medium aufgefüllt. Jetzt können die Zellen zu den Wells in einer gewünschten Konzentration hinzugefügt werden. Pro Proband werden Triplets in vier verschiedenen Verdünnungsgraden angelegt. Zwei niedrigere Verdünnungsgrade für den spezifischen IgG ELISpot und zwei höhere Verdünnungsgrade für den totalen IgG ELISpot. Die totalen IgG ELISpot werden zugleich als Positivkontrolle verwendet. Als Negativkontrolle werden aktivierte Zellen auf eine leere Pufferlösung oder Zellkulturmedium AIM-V® verwendet. Zugleich werden nicht voraktivierte Zellen auf Antigen bzw. Total-IgG aufgebracht. Pro Platte kann man bis zu sechs Probanden zugleich testen. Nach ausreichender Sekretionszeit der Zellen werden die Platten wieder gewaschen und mit einem biotinyliertem Antikörper versetzt. Nach einem weiteren Waschvorgang wird die Streptavidin-Alkalin-Phosphatase dazugegeben und danach wieder gewaschen. Nun kommt das Substrat auf die Platte um die vorhandenen Punkte sichtbar zu machen. Die nun vorhandenen IgG-Antikörper, die sich als Punkte auf der Platte festgesetzt haben, werden mit Hilfe eines automatisierten ELISpot-Readers ausgewertet, wobei die Anzahl der Punkte direkt mit der IgG Produktion gegenüber dem TT und der gesamten Produktion (Total-IgG ELISpot) korreliert. Als positiv gilt ein Testergebnis mit mehr als 4 Punkten.

Tabelle 11: Inkubation der Zellen auf die Platten und ermitteln der Punkte [1]

Inkubiere die Zellen auf die Platten

- Wasche die Platten (die das TT und die coating-mABs enthalten) **5mal** mit sterilen PBS, **200µl/Well**
- Sammle die aktivierten Zellen aus der Aktivierungsplatte in ein eigenes Röhrchen und wasche sie einmal mit einem Medium, das 10% FCS enthält.
- Für die Analyse von in-vivo aktivierten B-Zellen, fülle die Zellen in einer

geeignete Konzentration wieder mit einem Medium auf und füge **300µl/Well** dieser Zellsuspension zu den PVDF Platten hinzu. (Zellen, die in-vivo aktiviert wurden, können nun ebenfalls zu den Platten hinzugefügt werden). Mache Triplets zu zwei Verdünnungsgraden (z.B.: **400.000 Zellen und 200.000 Zellen bei spezifischen IgG, 100.000, 50.000 bei Gesamt-IgG**).

- Außerdem braucht man pro Proband zwei Negativkontrollen. Das Gesamt-IgG ist zugleich die Positivkontrolle
- Stelle die Platte in **37C°** befeuchteten Inkubator mit **5% CO₂** und lasse es **16-24h** inkubieren. Bewege die Platten in dieser Zeit nicht mehr. Vermeide eine Austrocknung (z.B: die Platte in Alufolie einwickeln!!!)

Ermittlung der Punkte

- Um die Zellen zu entfernen, leere die Platten aus und wasche sie anschließend **5mal** mit PBS, **200µl/Well**
- Verdünne den Detection mABsMT78/145 zu **1µg/ml** in PBS, das **0,5%** fetal calf serum (PBS-0.5%FCS) beinhaltet. Füge **100µl/well** hinzu und inkubiere dies für **2 Stunden** bei Raumtemperatur.
- Wasche die Platten wieder **5mal** mit PBS **200µl/Well**
- Verdünne Streptavidin-ALP (**1:1000**) in PBS-0.5%FCS und füge **100µl/Well** hinzu. Inkubiere für **1 Stunde** bei Raumtemperatur.
- Wasche die Platten wieder **5mal** mit **PBS 200µl**.
- Filter die Ready-to-use Substrat Verdünnung (BCIP/NBT-Plus) durch einen **0.45µm Filter** und füge **100µl/Well** hinzu. Warte bis sich eindeutige Punkte ausbilden. (zirka 10min)
- Stoppe die Farbreaktion mit destilliertem Wasser (stark Waschen). Entferne die Platte von der Plattenablage und wasche die Unterseite der Membran ab.
- Lasse die Platte trocknen. Betrachte und zähle die Punkte in einem Elispot Reader oder in einem Sektionsmikroskop.
- Lagere die Platte im dunklen bei Raumtemperatur.
- Relevante Anzahl von Punkten: Positiv bei **4 Spots**

4 Ergebnisse und Resultate

4.1 Studienpopulation

Die Auswahl der Studienteilnehmer erfolgte per Zufall und ohne Geschlechterpräferenz. Jedoch mussten die Teilnehmer volljährig und gesund sein. Alle Namen und personenbezogenen Daten wurden aus Datenschutzgründen anonymisiert. Aufgrund der hohen Durchseuchungs- und Durchimpfungsrate wurde das Tetanus Toxoid als spezifisches Antigen getestet. Wichtig für die Auswertung des Testverfahrens war der Zeitpunkt der letzten Tetanusauffrischungsimpfung der Probanden. Ein Proband stellte sich zweimal zu Verfügung, um den Unterschied zwischen kryokonservierten und frischen Blutproben zu überprüfen. Als Positivkontrolle wurde das Gesamt-IgG gemessen. Als Negativkontrolle wurden aktivierte B-Zellen auf Medium aufgebracht. Um zu überprüfen, ob es auch ohne Voraktivierung zu einer Reaktion der IgG B-Zellen kommt, wurden auch nichtaktivierte B-Zellen auf jeweils einem coating-mABs und auf ein TT Well pro Proband aufgebracht.

Tabelle 12: Studienpopulation

	Frauen	Männer	Gesamt
Probandenanzahl	2	3	5
Durchschnittsalter	35 Jahre	32,33 Jahre	33,66 Jahre
Letzte Auffrischungsimpfung und Durchschnitt der letzten Auffrischungsimpfung	8 Jahre 15 Jahre	8 Jahre 12 Jahre 4 Wochen	Ø 9,09 Jahre
Durchschnittliche PBMC-Zellzahl pro ml	9,3 Millionen	10,1 Millionen	9,7 Millionen
Davon Lymphozyten (%)	87,6%	83,98%	85,79%
Kryokonservierte Zellen	2	3	5
Zeit der Kryokonservierung	6 Monate	8 Monate	7 Monate
Frische Zellen	0	1	1

4.2 Anordnung der Probanden auf der PVDF Platte

Vier Triplets in vier verschiedenen Verdünnungsgraden (400.000, 200.000, 100.000, 50.000) pro Proband, zwei Negativkontrollen mit aktivierten Zellen auf Zellmedium und zwei Kontrollen mit nichtaktivierten Zellen auf TT bzw. coating-mABs ermöglichen insgesamt 6 Probanden pro Platte.

Tabelle 13: Anordnung der 6 Probanden auf der PVDF Platte

400T	400T	400T	400T	400T	400T	400T	400T	400T	400T	400T	400T
200T	200T	200T	200T	200T	200T	200T	200T	200T	200T	200T	200T
100T	100T	100T	200T	100T	100T	100T	200T	100T	100T	100T	200T
50T	50T	50T	100T	50T	50T	50T	100T	50T	50T	50T	50T
400T	400T	400T	400T	400T	400T	400T	400T	400T	400T	400T	400T
200T	200T	200T	200T	200T	200T	200T	200T	200T	200T	200T	200T
100T	100T	100T	200T	100T	100T	100T	200T	100T	100T	100T	200T
50T	50T	50T	100T	50T	50T	50T	100T	50T	50T	50T	100T

*Anordnung der Probanden: Proband 1: oben links, Proband 2: oben Mitte, Proband 3: oben rechts, Proband 4: unten rechts, Proband 5: unten Mitte, Proband 6 (=Proband 1, nicht kryokonserviert) unten links. Die dicken Striche unterteilen die 6 Probanden, die strichlierte Linie unterteilen die Beschichtung mit TT (400T und 200T) bzw. mit coating-mABs (100T und 50T)

Blau.....Aktivierte Zellen auf TT bzw. auf coating-mABs

Grün.....Negativkontrolle: Aktivierte Zellen auf Medium

Rosa.....Nichtaktivierte Zellen auf TT bzw. coating-mABs

4.3 Testdurchgang

Der B-Zell ELISpot^{Plus} für Human IgG wird in Triplets zu vier Verdünnungsgraden für 6 Probanden parallel durchgeführt. Die mittels Annexinfärbung und Durchflusszytometrie gemessene Viabilität aller 6 Proben der 5 Studienteilnehmer beträgt nach dem Auftauen (5 von 6) und frisch nach Abnahme (1 von 6) durchschnittlich 94%.

4.3.1 Spotauswertung des B-Zell ELISpot

Ein erwartetes Testergebnis zeigt sich bei der Negativkontrolle mit keine bis 3 Spots auf Medium (RPMI1640) und mit durchschnittlich 92 bis 247 Spots bei der Positivkontrolle, die zugleich das Gesamt-IgG repräsentiert. Beim spezifischen TT B-Zell ELISpot zeigt sich wie erwartet ein positives Ergebnis, je kürzer die letzte Auffrischungsimpfung zurückliegt. Die Grenze eines positiven Ergebnisses errechnete ich aus dem arithmetischen Mittelwert der Negativkontrollen addiert mit der dreifachen Standardabweichung. Dies ergab den Grenzwert von ≥ 4 Spots. Bei einer Spotzahl von über 3,5 lag die Sensitivität bei 44% und die Spezifität bei 100%. Veranschaulicht wurde auch der Sinn der Voraktivierung der Zellen mit R848 und IL-2. Bei den Probanden 2 bis 5 ergab der Vergleich mit 100.000 aktivierten Zellen zu 200.000 nicht aktivierten Zellen einen Vorteil von 40% bis 92%. Selbst bei 50.000 aktivierten Zellen erkannte man bei Proband 2, 3 und 5 einen 58- bis 86%igen Vorteil gegenüber einer Nichtaktivierung. Nur Proband 1 ergab ein umgekehrtes Bild, dass in der Diskussion (Seite 61) noch näher behandelt wird.

Bei allen Probanden stellt sich heraus, dass man bei dem spezifischen TT-IgG 400.000 Zellen benötigt werden. Auch bei dem Gesamt-IgG sind die Ergebnisse bei 100.000 Zellen besser als bei 50.000. Proband 1 hatte seit 12 Jahren keine Auffrischungsimpfung und hat deshalb auch keinen ausreichenden Schutz gegenüber Tetanus. Bei allen Probanden zeigt eine ausreichend positive Reaktion auf das coating-mAB, dass dieser Durchgang funktioniert hat. Eine positive Reaktion auf coating-mABs trotz Nichtaktivierung der Zellen gibt es ebenfalls bei allen Probanden. Eine gleich hohe Reaktion der nichtaktivierten Zellen, wie bei den aktivierten Zellen, gibt es bei Proband 1. Bei Proband 2 lag die letzte Auffrischungsimpfung nur 4 Wochen zurück und hat daher bei diesem Versuch auch die stärkste IgG Reaktion auf TT, aber auch die stärkste Reaktion auf das coating-mAB. Interessant sind auch die Ergebnisse bei Proband 3 und Proband 4. Bei beiden war die letzte Auffrischungsimpfung 8 Jahre zuvor. Trotzdem entstand bei Proband 4 die zweithöchste Reaktion auf TT und auf coating-mAB. Proband 4 kann davon ausgehen, gegenüber Tetanus geschützt zu sein. Obwohl bei Proband 3 die Impfung auch im gleichem Zeitraum liegt, ergibt der Test, dass kein ausreichender Schutz mehr gegeben ist. Auffällig ist jedoch, dass die Gesamt-IgG Reaktion auch eher schwächer ausgefallen ist. Bei Proband 5 ist die Zeitspanne,

die seit der letzten Impfung vergangen ist, mit 15 Jahren am längsten. Trotzdem ergibt der Test mit 4 noch einen grenzwertig schwachen Schutz gegenüber Tetanus. Aber auch die Reaktion auf das coating-mAB bei Proband 5 ergibt einen richtig durchgeführten B-Zell ELISpot Durchgang. Die Spotanzahl des spezifischen B-Zell ELISpot im Verhältnis zur letzten Auffrischungsimpfung, ergeben einen negativen Trend von 8 auf 3 Spots, also durchschnittlich 5 Spots, in 15 Jahren (Abb. 16). Das heißt, nach 10 bis 12 Jahren sollte spätestens die nächste Auffrischungsimpfung erfolgen, um einen ausreichenden Schutz gegenüber Tetanus gewährleisten zu können.

Die automatischen Auswertungen mit dem ELISpot-Reader von C.T.L erfolgte bei allen 96 Wells mit den gleichen Berechnungseinstellungen (Minimum Spot Size: 0,0020mm; Maximum Spot Size: 9,6466mm; Sensitivity: 130, Counted Area 80%; Background Balance: 40). Bei den Auswertungen der ersten fünf Probanden zeigt sich ein konstanter prozentueller, spezifischer-TT-IgG Anteil von durchschnittlich 0,89% aus dem Gesamt-IgG (Abb. 14 + 15) heraus. Berechnet wurde dieser Wert durch eine rechnerische Gleichsetzung der PBMC Zahl von 400.000 auf 100.000. Dabei war bei einem höherem gesamt-IgG auch die Anzahl der im Blut zirkulierenden antigenspezifischen IgG Antikörper vermehrt. Der sechste Proband ist zugleich auch der erste Proband. Jedoch war die Probe 1 von diesem Probanden kryokonserviert und die Probe 6 von diesem Probanden frisch nach erneuter Tetanusauffrischungsimpfung ohne Kryokonservierung verwendet. Leider hat die frische Probe 6 wegen eines Fehlers nicht aussagekräftig funktioniert, auf den in der Diskussion auf Seite 61 noch näher eingegangen wird. Jedoch wird bei allen Auswertungen auf den folgenden Seiten (Seite 53 bis 60) auf die Probe 6 von Proband 1 verzichtet und nur die ersten 5 Proben ausgewertet.

Tabelle 14: Spotauswertung des B-Zell ELISpot

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	2	2	5	0	8	10	6	0	4	4	1	0
B	1	2	2	0	4	10	0	0	0	0	1	0
C	108	161	136	140	259	259	225	33	79	53	53	5
D	89	101	90	2	156	145	136	2	46	33	26	0
E	1	1	3	0	4	3	6	3	6	6	9	0
F	0	0	0	0	3	0	0	0	1	5	0	0
G	31	34	29	9	188	221	161	39	241	240	191	136
H	20	23	21	0	125	78	74	0	98	91	98	0

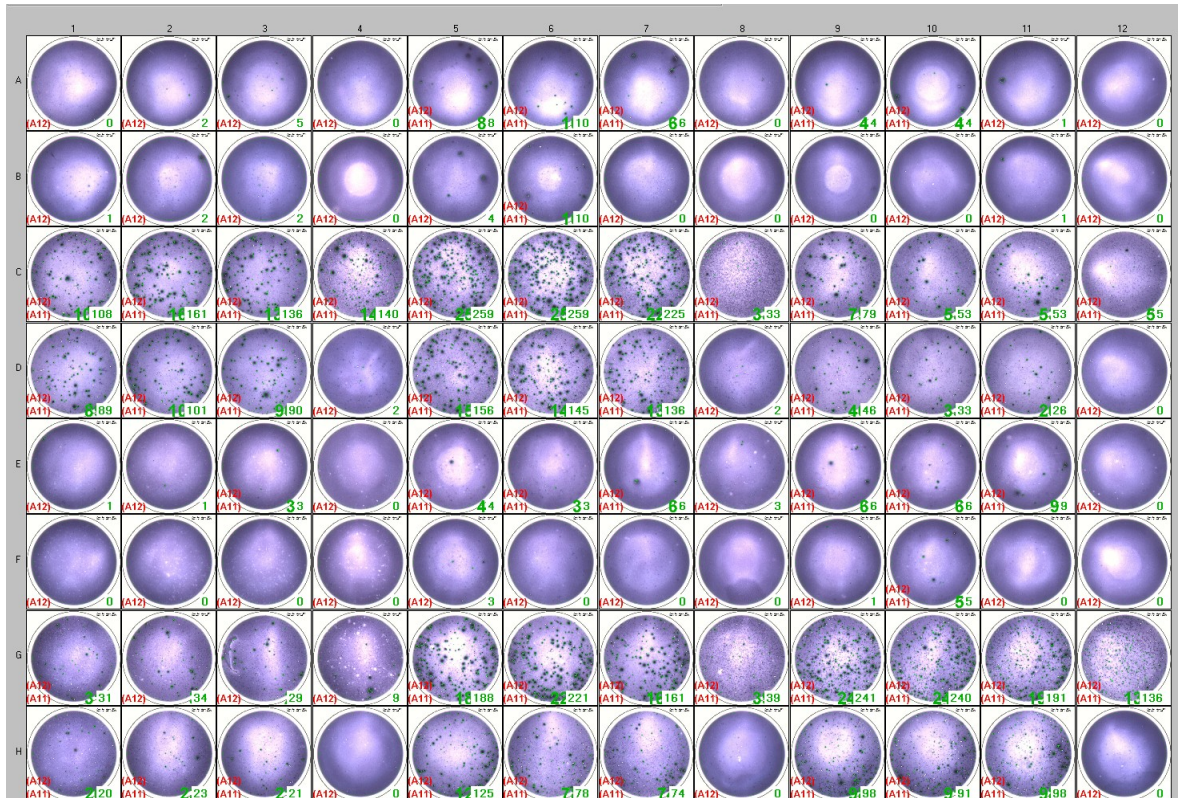
*Anordnung der Probanden: Proband 1: oben links, Proband 2: oben Mitte, Proband 3: oben rechts, Proband 4: unten rechts, Proband 5: unten Mitte, Proband 6 (=Proband 1, nicht kryokonserviert) unten links.

Blau.....Aktivierte Zellen auf TT bzw. auf coating-mABs

Grün.....Negativkontrolle: Aktivierte Zellen auf Medium

Rosa.....Nichtaktivierte Zellen auf TT bzw. coating-mABs

Abbildung 7: Überblick über die Sekretion von IgG



*Anordnung der Probanden: Proband 1: oben links, Proband 2: oben Mitte, Proband 3: oben rechts, Proband 4: unten rechts, Proband 5: unten Mitte, Proband 6 (=Proband 1, nicht kryokonserviert) unten links.

Abbildung 8: Verteilung der IgG-Antikörper auf TT in Abhängigkeit der Zellkonzentration

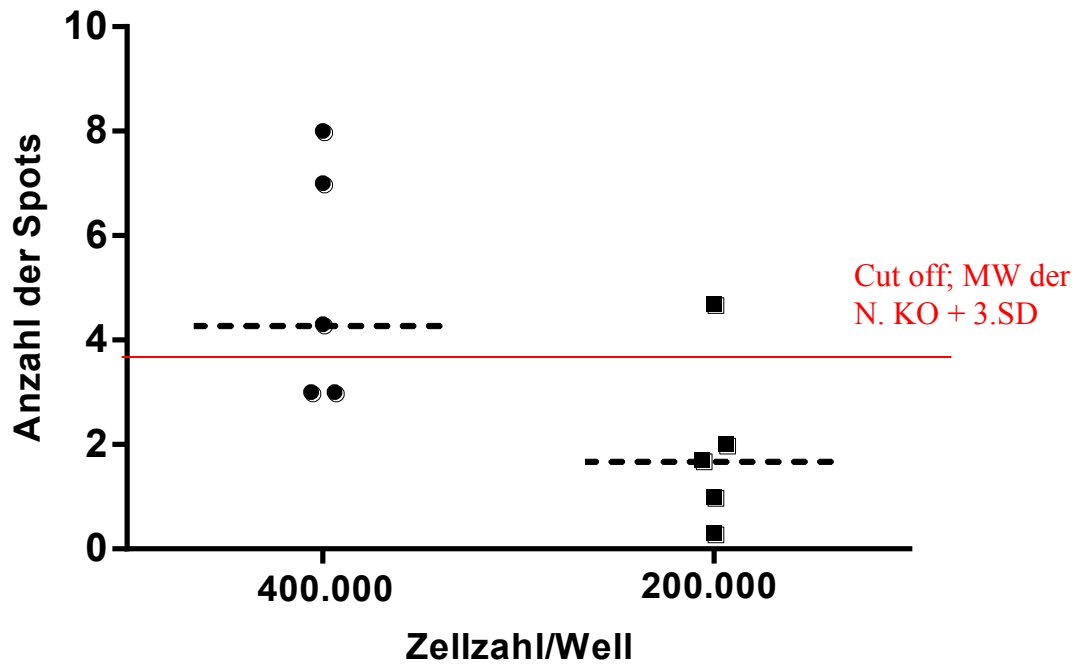


Abbildung 9: Verteilung der IgG-Antikörper auf coating-mABs in Abhängigkeit der Zellkonzentration

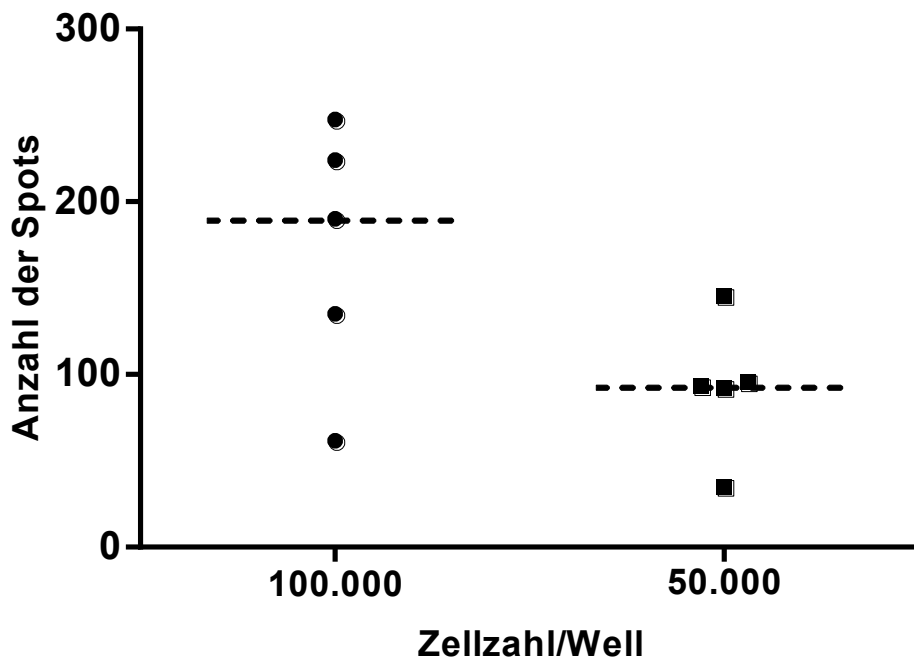


Tabelle 15: Sekretion von IgG in Abhängigkeit der Zellkonzentration

	Zellkonzentration pro Well	Anzahl der Spots pro Triplet	
		Median (Minimum, Maximum)	Mittelwert
Proband 1	400.000	2 (2, 5)	3
	200.000	1 (1, 2)	1,7
	100.000	136 (108, 161)	135
	50.000	90 (89, 101)	93,3
Proband 2	400.000	8 (6, 10)	8
	200.000	4 (0, 10)	4,7
	100.000	259 (225, 259)	147,7
	50.000	145 (136, 156)	145,7
Proband 3	400.000	4 (1, 4)	3
	200.000	0 (0, 1)	0,3
	100.000	53 (53, 79)	61,7
	50.000	33 (26, 46)	35
Proband 4	400.000	6 (6, 9)	7
	200.000	1 (0, 5)	2
	100.000	240 (191, 241)	224
	50.000	98 (91, 98)	95,7
Proband 5	400.000	4 (3, 6)	4,3
	200.000	0 (0, 3)	1
	100.000	188 (161, 221)	190
	50.000	78 (74, 125)	92,3

Abbildung 10: Grafische Darstellung der Spotverteilung bei 400.000 Zellen auf TT (Boxplot)

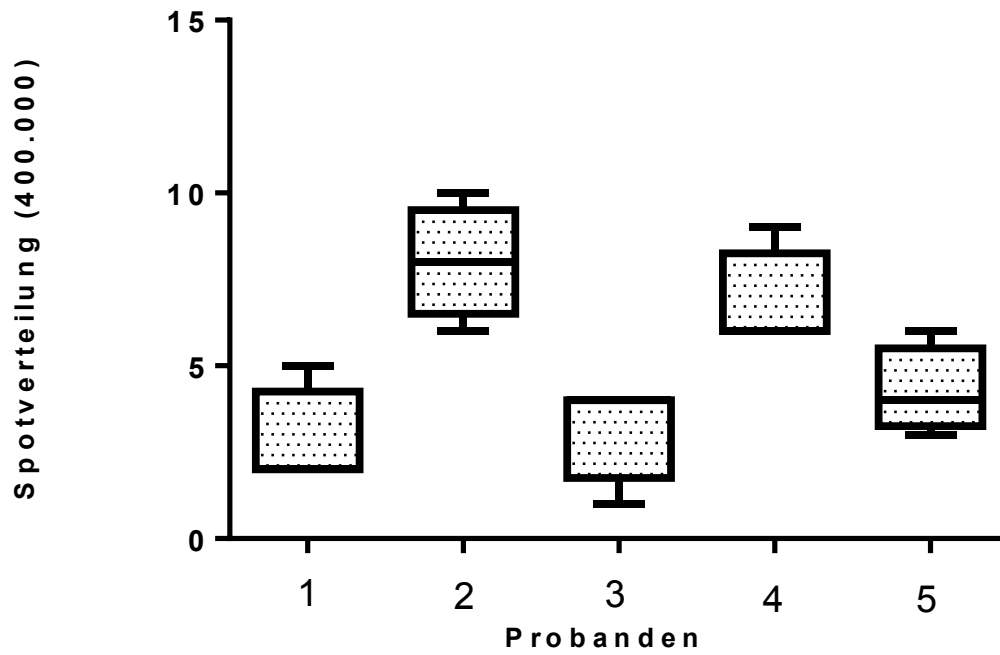


Abbildung 11: Grafische Darstellung der Spotverteilung bei 200.000 Zellen auf TT (Boxplot)

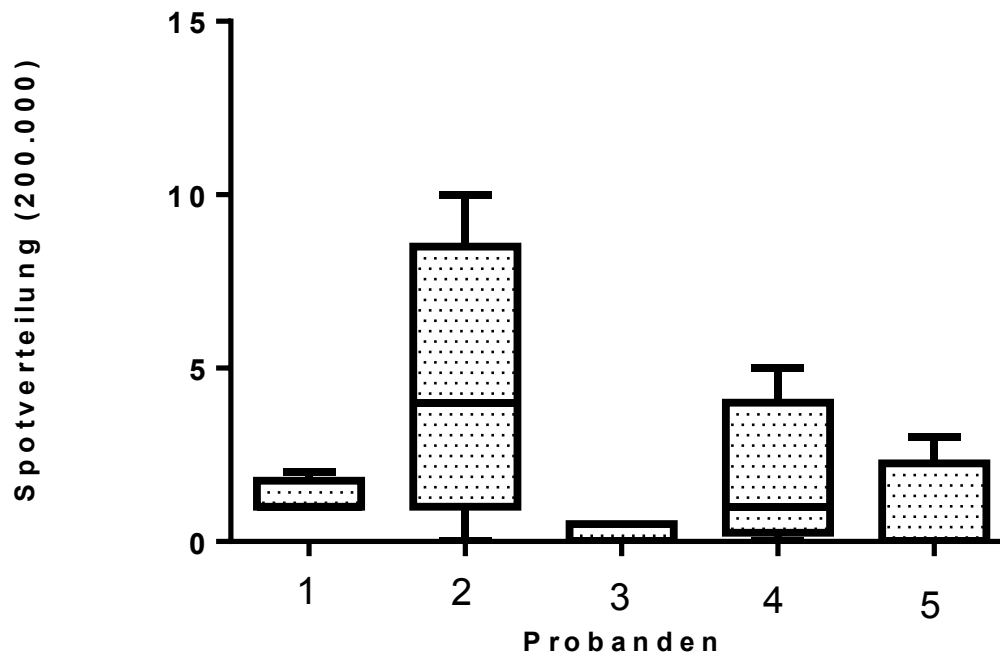


Abbildung 12: Grafische Darstellung der Spotverteilung bei 100.000 IgG produzierenden Zellen auf coating-mABs (Boxplot)

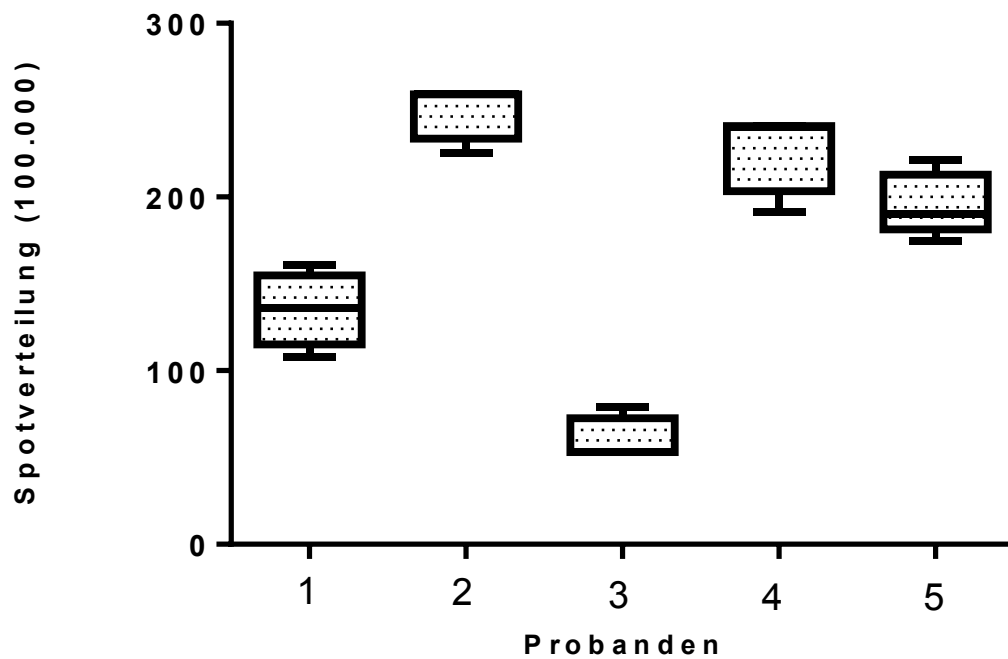


Abbildung 13: Grafische Darstellung der Spotverteilung bei 50.000 IgG produzierenden Zellen auf coating-mABs (Boxplot)

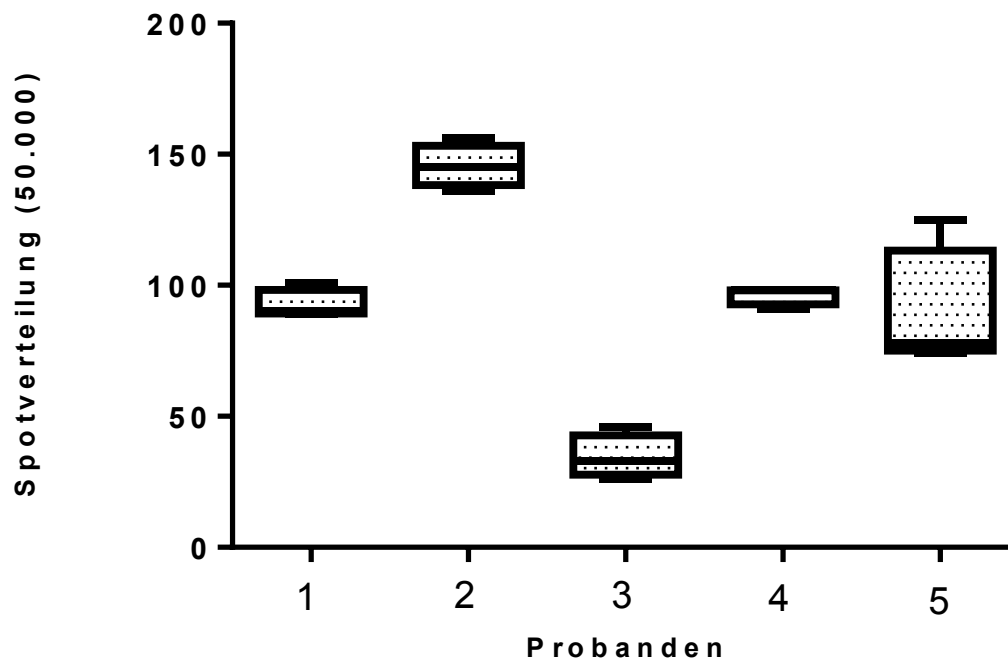
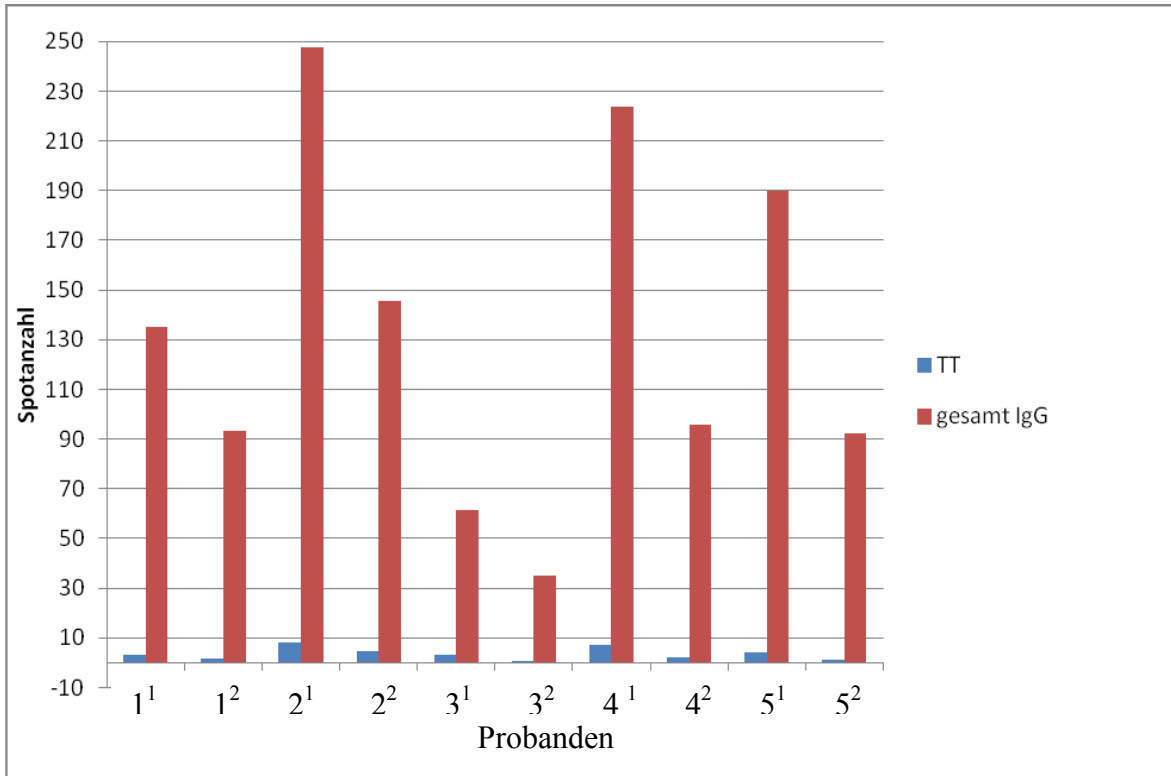


Abbildung 14: Verhältnis von TT-spezifischen IgG auf gesamt-IgG (Ungerade Zahl: 400.000 TT zu 100.000 gesamt-IgG; gerade Zahl: 200.000 TT zu 50.000 gesamt-IgG)



¹ Vergleich von 400.000 TT spezifischen-IgG mit 100.000 total-IgG;

² Vergleich von 200.000 TT spezirischen-IgG mit 50.000 total-IgG

Abbildung 15: Prozent von TT-spezifischen IgG im Verhältnis zum gesamt-IgG

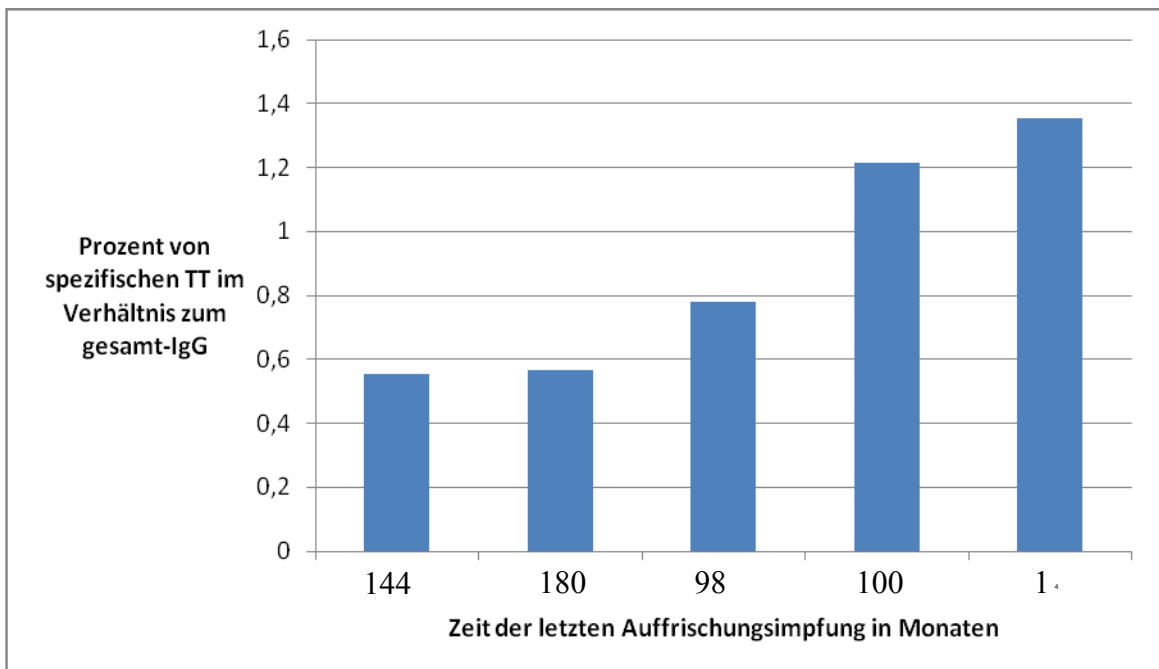
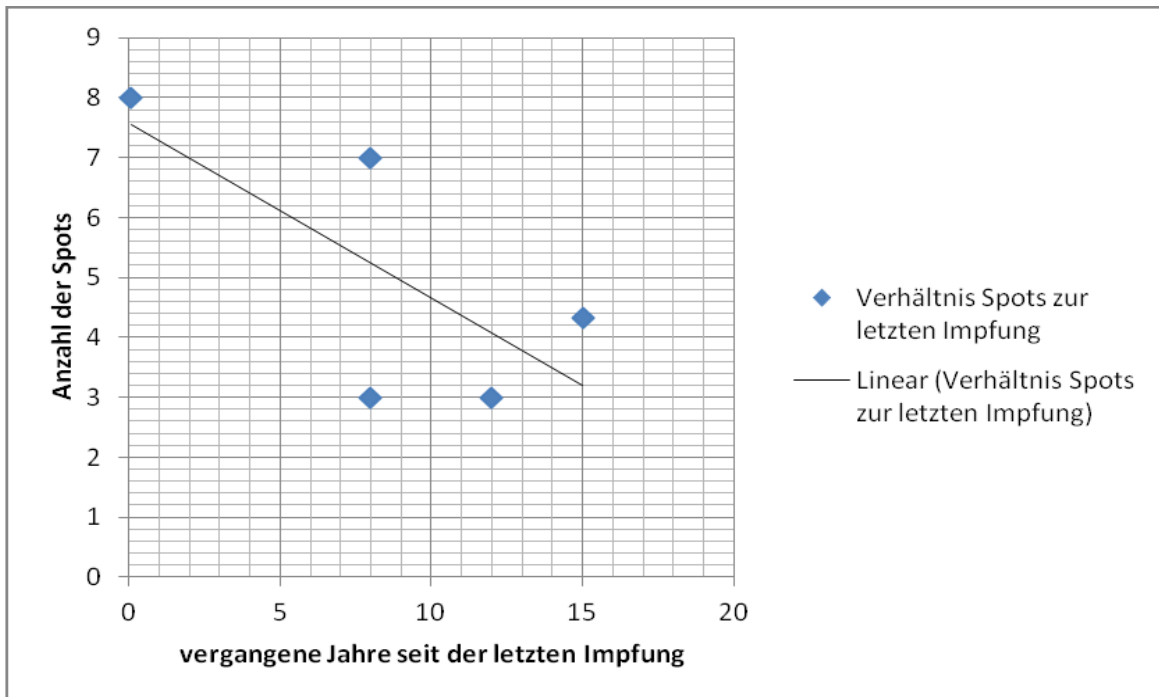
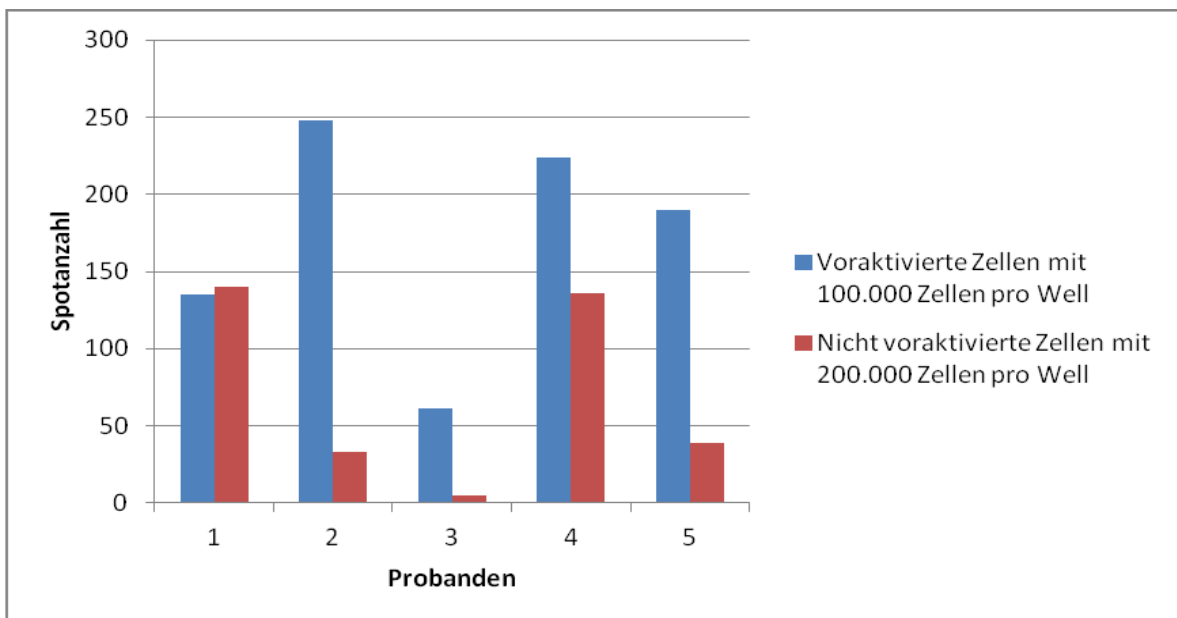


Abbildung 16: Korrelation der Spotzahl in Abhängigkeit der letzten Auffrischungsimpfung



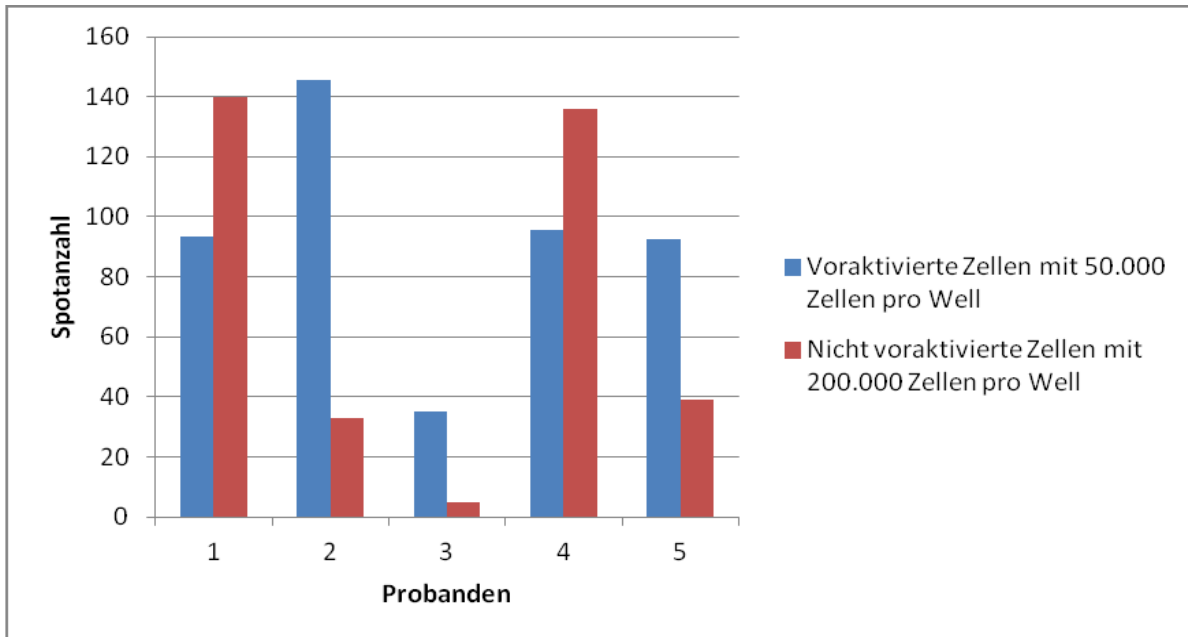
*Trendlinie: $y = -0,2911x + 7,5751$, $R^2 = 0,5034$

Abbildung 17: Vergleich von 100.000 voraktivierten Zellen pro Well mit 200.000 nicht voraktivierten Zellen pro Well auf gesamt IgG



*Bei Proband 2 bis 5 erkennt man bei 100.000 Zellen den Vorteil einer Voraktivierung gegenüber den 200.000 nichtaktivierten Zellen. Mit Ausnahme von Proband 1.

Abbildung 18: Vergleich von 50.000 voraktivierten Zellen pro Well mit 200.000 nicht voraktivierten Zellen pro Well auf gesamt IgG



*Bei Proband 2, 3 und 5 erkennt man auch bei 50.000 Zellen einen deutlichen Unterschied zu den nichtvoraktivierten Zellen mit 200.000 Zellen.

5 Diskussion

Das Hauptziel dieser Arbeit war der Versuch, das B-Zell ELISpot Verfahren für das Standardlabor zu etablieren. Die ELISpot Technik ist nicht nur für die Messung der antigenspezifischen T-Zellen einer der sensitivsten Assays [29], [43]. Sie ist auch die sensitivste Methode zur quantitativen Bestimmung der B-Zellen. Jedoch ist das Verfahren noch nicht endgültig ausgefeilt. Schuld daran ist einerseits die noch immer anhaltende Unsicherheit gegenüber den optimalen Ergebnissen. Andererseits könnten aber auch die technisch, schlechteren Qualitäten der Resultate der Grund dafür sein [29].

Deshalb wurde versucht mit einem kommerziell erwerbbaaren Kit (ELISpot^{Plus} for human IgGTM Kit von der Firma Mabtech) die idealen Schritte, Zellkonzentrationen und Antigenkonzentrationen für eine Etablierung herauszufinden. Großteils hielt man sich an die beigefügte Anleitung des Kits, um auch die mitgelieferten Reagenzien in der richtigen Dosierung verwenden zu können. Jedoch waren auch hier noch ein paar unbekannte Variablen vorhanden, um den idealen Vorgang zu finden. Deshalb musste öfter mit der Firma selbst telefoniert werden, um diese Ungereimtheiten und Erklärungsfehler zu beseitigen. Die Antigenkonzentration hat, laut Anleitung der Firma [1], eine große Spannweite von 1µg bis 50µg/ml. Ich entschied mich für eine Konzentration von 5µg/ml. Bei einer anderen ähnlichen Arbeit wurde auch eine Menge zwischen 1µg und 50µg angegeben [36]. Für den nächsten Versuch sollte jedoch die Konzentration von TT dementsprechend angehoben werden, um aussagekräftigere Spotzahlen zu bekommen, da die erste Versuchsreihe in zwei von 6 Fällen zwar positiv ausfiel, jedoch mit maximal 10 Spots insgesamt eher schwach ausfiel. Die Grenze eines positiven Testergebnisses errechnete sich aus dem Durchschnitt der Spotanzahlen der Negativkontrollen addiert mit der dreifachen Standardabweichung. Insgesamt hatte der ELISpot mit den ersten 5 Probanden funktioniert, da bei allen die Negativkontrollen negativ waren und auch die Positivkontrollen hoch positiv ausgefallen sind. Proband 6 war zugleich Proband 1, jedoch mit dem Unterschied, dass das Blut bei Proband 6 nicht kryokonserviert, sondern frisch abgenommen wurde. Bei der Probe 6 mit dem frisch abgenommen Blut, muss ein Fehler unterlaufen sein. Die Positivkontrolle war zwar schwach positiv, jedoch fiel auf, dass bei allen Verdünnungsreihen bei spezifischen und auch bei dem Gesamt-IgG ELISpot, insgesamt viel weniger Reaktionen stattfanden. Obwohl das Blut

frisch abgenommen war und der Proband sich 4 Wochen vor der zweiten Blutabnahme für diesen Versuch eine Auffrischungsimpfung geben ließ, waren insgesamt weniger bis gar keine Spots vorhanden. Es besteht die Möglichkeit, dass die gewaschenen PBMCs von Proband 6 in ein falsches Medium (RPMI 1640) für die Voraktivierung mit R848 und IL-2 gegeben wurden. Möglicherweise hätte bei diesem Medium 10% FCS (fetales Kälberserum) beigemischt werden sollen, damit die Zellen genügend Nährstoffe gehabt hätten. FCS enthält eine Vielzahl an Proteinen, unter anderem Wachstumsfaktoren, die wichtig für die Zellkultivierung sind [44]. Bei der Kryokonservierung der anderen 5 Probanden mit C.T.L-Cryo™ ABC Media Kit wurde sowieso ein Medium, das Insulin, Transferrin, humanes Albumin und andere bestimmte Proteine enthält, zugesetzt, um die Zellen vor Frostschäden zu bewahren [45].

Bei dem spezifischen B-Zell ELISpot, aber auch bei dem Gesamt-IgG ELISpot stellte sich heraus, dass es besser war, eine höhere Zellkonzentration zu wählen. Auch hier gab die Anleitung des Kits [1] einen Spielraum von 100.000 bis 500.000 für den spezifischen und 25.000 bis 50.000 für den Gesamt-IgG ELISpot an. In einer schwedischen Studie von Jahnmatz M. et al. aus dem Jahre 2013 wurden auch unterschiedliche Verdünnungsreihen, abhängig von der letzten Zeitspanne der letzten Auffrischungsimpfung, von 100.000 bis 400.000 PBMC pro Well verwendet [37]. Interessant ist auch, dass bei dem spezifischen TT ELISpot ohne eine Voraktivierung der Zellen, keine Spots ausgebildet wurden. Bei dem Gesamt-IgG entstanden jedoch, trotz dem Weglassen der Voraktivierung, ausreichend Spots. Jedoch waren dies im Durchschnitt 40 bis 92 Prozent weniger Spots als bei den voraktivierten Zellen. Nur bei Proband 1 bildeten die nicht voraktivierten Zellen 4 Prozent mehr Spots als bei den aktivierten Zellen aus. Insgesamt wurde bei den voraktivierten Zellen auf Gesamt-IgG eine Zellzahl von 50.000 und 100.000 Zellen pro Well gewählt. Bei den nichtaktivierten Zellen wurden gleichermaßen bei dem TT spezifischen, aber auch bei dem Gesamt-IgG eine Zellzahl von 200.000 gewählt. Selbst bei dem Vergleich von 50.000 aktivierten Zellen mit 200.000 nicht aktivierten Zellen ergab sich bei Proband 2, 3 und 5 ein Vorteil von 58 bis 86 Prozent. Warum bei Proband 1 die Nichtaktivierung fast gleich viele Spots ausgebildet hat wie bei einer Aktivierung der Zellen ist unklar. Es besteht die Möglichkeit, dass es zum Zeitpunkt der Blutabnahme, vor der Kryokonservierung, zu einer allgemeinen in-vivo Aktivierung der B-Zellen aufgrund eines okkulten

Infektes, gekommen ist. Wenn die B-Zellen schon in-vivo aktiviert sind, dann kann die in-vitro Aktivierung mit R848 und IL-2 höchstwahrscheinlich keinen zusätzlichen Aktivierungseffekt mehr auslösen.

Bei dieser Arbeit stellte sich eine prozentuell kontinuierliche Anzahl von im Blut frei zirkulierenden IgG-Antikörpern spezifisch sezernierenden B-Zellen von 0,89% aus dem gesamt-IgG heraus. Berechnet wurde dieser Wert durch eine rechnerische Gleichsetzung der Zellzahl von 400.000 auf 100.000 Zellen. Interessanterweise lag dieser Anteil bei den Probanden mit dem höheren total-IgG über diesem Durchschnitt und bei Probanden mit dem niedrigeren total-IgG etwas unter diesem Durchschnitt. Deshalb erkannte man bei Proband 5, der seit 15 Jahren keine Auffrischungsimpfung bekommen hatte, eine eher schwache Reaktion bei dem gesamt-IgG aber zugleich auch eine schwache Reaktion bei dem TT-spezifischen-IgG. Bei Proband 2, bei dem die letzte Impfung 4 Wochen zurücklag, erkannte man die höchste gesamt- aber auch die höchste TT-spezifische Reaktion. Bei der Arbeit von Jahnmatz M et. al [37] erkannte man einen kontinuierlichen prozentuellen Anteil von 20%. In dieser Arbeit wurde jedoch nicht aufgezeigt, wie dieser Wert berechnet wurde. Außerdem ein biotinyliertes Antigen für den B-Zell ELISpot verwendet [37]. Dies könnte für diese sensitiveren Ergebnisse verantwortlich sein.

Obwohl bei diesem B-Zell ELISpot sorgfältig und genauestens gearbeitet wurde, können trotzdem Fehler bei den Umrechnungen der Einheiten und Verdünnungsreihen, beim Titrieren oder Verunreinigungen der Platten nicht vollkommen ausgeschlossen werden. Auch die Zeitspanne der Kryokonservierung könnte verkürzt werden, um vielleicht dadurch noch bessere Ergebnisse erzielen zu können. Am wichtigsten wäre jedoch die Zellzahl und die TT Menge möglichst hoch zu wählen, um mehrere gut abgrenzbare Spots zu erhalten. Prinzipiell hat diese Arbeit gezeigt, dass der B-Zell ELISpot mit einem kommerziell erwerbbaaren Kit überzeugende repräsentative Ergebnisse bringen kann. Deshalb sollte diese als zukünftige Vorlage für die Weiterentwicklung des B-Zell ELISpot Verfahrens als Standardmethode dienen. Jedoch sollte dabei die Anzahl der Probanden, die Zellkonzentration und die Antigenkonzentration erhöht werden, um noch schlüssigere und besser abgrenzbare Ergebnisse zu erhalten.

Literaturverzeichnis

1. Mabtech AB. Packungsbeilage ELISpot^{Plus} for Human IgG Kit. Kit Anleitung. Product Code 3850-2AW-Plus.
2. Murphy K, Travers P, Walport M. Janeway Immunologie. 7. Auflage. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag; 2009.
3. Hou R, Baldwin DS. A neuroimmunological perspective on anxiety disorders. Hum Psychopharmacol. 2012 Jan;27(1):6-14.
4. Schütt C, Bröker B. Grundwissen Immunologie. 3. Auflage. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag; 2011.
5. Böcker W, Denk H, Heitz U, Moch H, Herausgeber. Pathologie. 4., vollständig überarbeitete Auflage. München: Elsevier Urban&Fischer Verlag; 2008.
6. Schmidt R, Lang F, Herausgeber. Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie. 30., neu bearbeitete und aktualisierte Auflage. Heidelberg: Springer Medizin Verlag; 2007.
7. Bekeredjian-Ding IB, Wagner M, Hornung V, Giese T, Schnurr M, Endres S, Et al. Plasmacytoid dendritic cells control TLR7 sensitivity of naive B cells via type I IFN. J Immunol. 2005 Apr 1;174(7):4043-50.
8. Brown WC, Estes DM, Chantler SE, Kegerreis KA, Suarez CE. DNA and a CpG oligonucleotide derived from Babesia bovis are mitogenic for bovine B cells. Infect Immun. 1998 Nov;66(11):5423-32.
9. Oen K, Schroeder ML, Krzekotowska D. Pokeweed mitogen and Staphylococcus aureus Cowan I induced immunoglobulin A synthesis by lymphocytes of IgA deficient blood donors. Clin Exp Immunol. 1985 Nov;62(2):387-96.
10. Aktories K, Förstermann U, Hofmann F, Starke K, Herausgeber. Repetitorium Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. 2. Überarbeitete Auflage. München: Elsevier Urban&Fischer Verlag; 2009.
11. ArthritisToday. DMARDs List [online]. ArthritisToday; 2013 [cited 2013 Apr 1]. Available from:
http://www.arthritistoday.org/DrugGuide/drug-chart.php?drug_type=dmards
12. Rheumazentrale. Wirkungsweise von Biologika [online]. Rheumazentrale; 2013 [Cited 2013 Apr 1]. Available from:
<http://www.rheumazentrale.de/beitraege/aktuell/rheuma-medizin-167.html>

13. Charité Universitätsmedizin Berlin. Immunsuppression [online]. Charité Berlin, 2013 [cited 2013 Apr 2]. Available from: <http://transplantation-cbf.charite.de/patienten/transplantation/immunsuppression/>
14. Deutsche Gesellschaft für Rheumatologie. Empfehlungen zum Einsatz von Belimumab beim systemischen Lupus erythematodes [online]. DGRh; 2012 [updated 2012 Jul 21; cited 2013 Apr 3]. Available from: <http://dgrh.de/tebelimumab.html>
15. National Rheumatoid Arthritis Society. Getting Established on DMARD Therapy [online]. NRAS, 2006 [updated 2012 Nov 23; cited 2013 Apr 1]. Available from: http://www.nras.org.uk/about_rheumatoid_arthritis/established_disease/managing_well/getting_established_on_dmard_therapy.aspx
16. Bingham C. Rheumatoid Arthritis Treatment [online]. Bingham and the John Hopkins Arthritis Center; 2012 [updated 2012 Oct 10; cited 2013 Apr 1]. Available from: <http://www.hopkinsarthritis.org/arthritis-info/rheumatoid-arthritis/ra-treatment/#cytotoxic>
17. ImmunDefektCentrum der Charité. Informationen für Eltern und Patienten [online]. ImmunDefektCentrum der Charité; 2013 [cited 2013 Mar 31]. Available from: <http://www.immundefekt.de/linfo.shtml>
18. Gerritzen A. Immunstatus [online]. Gerritzen vom medizinischen Labor Bremen; 2007 [updated 2007 Sep 11; cited 2013 Apr 1]. Available from: http://www.mlhb.de/fileadmin/user_upload/Fachinfo/Laborinfo/Immunstatus_110907.pdf
19. Emmerich F. Vorlesung 7, Immundefekte und Überreaktionen [online]. Emmerich auf dem Uniklinikum Leipzig; 2007 [cited 2013 Apr 1]. Available from: http://ikit.uniklinikum-leipzig.de/immunologie.site.postext.humanmedizin,a_id,278.html?PHPSESSID=1s6ol3u06ggkhrn0j1rice5sh5
20. Brommer B, Kopp M, Laginha I, Schwab J. Sekundäre Immundefizienz (Immunparalyse) nach Rückenmarkverletzung. NeuroForum 03/10 [online]. 2010 Sep [cited 2013 Apr 1]; S. 208-217. Available from: <http://nwq.glia.mdc-berlin.de/media/pdf/neuroforum/2010-3.pdf>
21. Bundesministerium für Gesundheit. Allgemeine Informationen über Impfungen [online]. BMG; 2013 [cited 2013 Mar 31]. Available from:

<http://bmg.gv.at/cms/home/faq.html?channel=CH1158&doc=CMS1286199354806>

22. MedizInfo. Aktive und passive Immunisierung [online]. MedizInfo®; 2013 [cited 2013 Mar 31]. Available from:
<http://www.medizinfo.de/impfen/allgemein/impfarten.shtml>
23. Robert Koch Institut. Inanspruchnahme der Tetanusimpfung in den letzten 10 Jahren [online]. Robert Koch Institut; 2012 [updated 2012 Nov 23; cited 2013 Mar 29]. Available from:
http://www.rki.de/DE/Content/Gesundheitsmonitoring/Gesundheitsberichterstattung/GBEDownloadsB/Geda09/Tetanusimpfung.pdf?__blob=publicationFile
24. Robert Koch Institut. Tetanus Ratgeber für Ärzte [online]. Robert Koch Institut; 2010 [updated 2010 Mar 16; cited 2013 Mar 29]. Available from:
http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_Tetanus.html#doc2398266bodyText7
25. Todar K. The Microbial World [online]. Todar at University of Wisconsin-Madison Department of Bacteriology; 2007 [updated 2009 Oct 16; cited 2013 Mar 30]. Available from:
<http://textbookofbacteriology.net/themicrobialworld/Tetanus.html>
26. Bundesamt für Sicherheit und Gesundheitswesen (BASG). Impfstoffliste [online]. BASG; 2012 [updated 2012 Nov 8; cited 2013 Mar 29]. Available from: http://www.basg.gv.at/uploads/tx_basginfo/121108_Impfstoffliste.pdf
27. Novartis Pharma Wien. Beipackzettel Tetanol® pur [online]. Novartis Pharma Wien; 2012 [updated 2012 Dec 14; cited 2013 Mar 31]. Available from:
<http://www.pharmazie.com/graphic/A/79/2-00079.pdf>
28. Robert Koch Institut. Epidemiologisches Bulletin, Mitteilung der Ständigen Impfkommision (STIKO) am Robert Koch-Institut: Hinweise zu Impfung für Patienten mit Immundefizienz [online]. Robert Koch Institut; 2005 [updated 2005 Nov 10; cited 2013 Mar 29]. Available from:
http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2005/Sonderausgaben/Sonderdruck_STIKO-Hinweise_Nov-2005.pdf?__blob=publicationFile
29. Mabtech AB. B-cell ELISpot/FluoroSpot Brochure [online].; 2011 [updated 2011 Jun 29; cited 2012 Dec 12]. Available from:
<http://www.mabtech.com/Documents/Upload/BCell170x245webb.pdf>

30. Czerkinsky CC, Nilsson LA, Nygren H, Ouchterlony O, Tarkowski A. A solid-phase enzyme-linked immunospot (ELISPOT) assay for enumeration of specific antibody-secreting cells. *J Immunol Methods*. 1983 Dec 16;65(1-2):109-21.
31. Mabtech AB. B-cell ELISpot. B-cell principle [image on the Internet]. 2008 [cited 2013 Feb 10], Available from: <http://www.mabtech.com/Graphics/Upload/bcellprincip2.gif>
32. Mayer S, Laumer M, Mackensen A, Andreesen R, Krause SW. Analysis of the immune response against tetanus toxoid: enumeration of specific T helper cells by the Elispot assay. *Immunobiology*. 2002 Jul;205(3):282-9.
33. Newman J, Rice JS, Wang C, Harris SL, Diamond B. Identification of an antigen-specific B cell population. *J Immunol Methods*. 2003 Jan 15;272(1-2):177-87.
34. Chovancova Z, Vlkova M, Litzman J, Lokaj J, Thon V. Antibody forming cells and plasmablasts in peripheral blood in COVID patients after vaccination. *Vaccine*. 2011 May 31;29(24):4142-50.
35. Blanchard-Rohner G, Galli G, Clutterbuck EA, Pollard AJ. Comparison of a limiting dilution assay and ELISpot for detection of memory B-cells before and after immunisation with a protein-polysaccharide conjugate vaccine in children. *J Immunol Methods*. 2010 Jun 30;358(1-2):46-55.
36. Heinrich D. Untersuchungen über die antigenspezifische Immunität nach Diphtherie- und Tetanusschutzimpfung mit dem B-Zell-ELISpot-Test. Universität Würzburg Bibliothek [Online]. 2002 Feb [cited 2013 Jan 25]., Available from Uni-Würzburg: <http://opus.bibliothek.uni-wuerzburg.de/volltexte/2002/390/pdf/promotionuni.pdf>
37. Jahnmatz M, Kesa G, Netterlid E, Buisman AM, Thorstensson R, Ahlborg N. Optimization of a human IgG B-cell ELISpot assay for the analysis of vaccine-induced B-cell responses. *J Immunol Methods*. 2013 May 31;391(1-2):50-9.
38. Oxford Immunotec Limited. Packungsbeilage T-SPOT.TB 8 (CD-ROM). 2009. Bluttest zur Diagnostik einer Tuberkuloseinfektion.
39. C.T.L. Cellular Technology Limited. Protocols and guidelines for working with human PBMC in ELISpot assays. 2012. Immunospot The exact science of ELISpot.

40. BD Biosciences. BD Pharmingen Technical Data Sheet Annexin V- FITC Apoptosis Detection Kit I. 2006. Katalognummer 556547
41. Merck Millipore. Tetanus Toxoid, Clostridium tetani; Calbiochem®. 2013. Bestellnummer 582231-25UG
42. Fisher Scientific. EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin. 2013. Artikelnummer 10538723
43. HelmholtzZentrum München. ELISpot Assay [online]. München: HelmholtzZentrum München Deutsches Forschungszentrum für Gesundheit und Umwelt; 2011 [cited 2013 Mar 28]. Available from: <http://www.helmholtz-muenchen.de/immunmonitoring/methoden/index.html>
44. Schrödel A. Die Rolle des fetalen Kälberserums in Zellkulturmedien. Biologie in unserer Zeit [Online]. 2007 May [cited 2013 Mar 28]; 37(5):289., Available from Wiley VCH Verlag online library: http://www.wiley-vch.de/vch/journals/2008/pdf/2007_5/289_a.pdf
45. C.T.L. Cellular Technology Limited [online]. Shaker Heights: C.T.L. Cellular Technology Limited. CTL-Cryo™ ABC Media Kit; 2013 [cited 2013 Mar 28]. Available from: <http://www.immunospot.com/index.php?id=432>