



IMMUNOLÓGIAI ÉS  
BIOTECHNOLÓGIAI  
INTÉZET



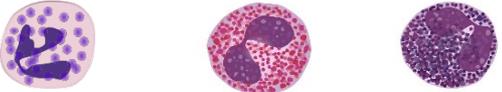
# 3. Praktikum: Zellen des Immunsystems, CD Marker

Grundlagen der Immunologie

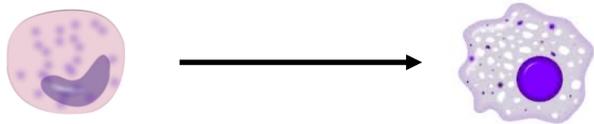
Universität Pécs, Klinisches Zentrum  
Institut für Immunologie und Biotechnologie  
Pécs, 2023.

# Zellen des angeborenen- und erworbenen Immunsystems

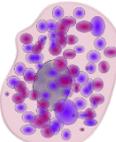
## Angeboren:

1. Granulozyten:   
Neutrophile, Eosinophile, Basophile

2. Monozyten (Blut), Makrophagen (Gewebe)

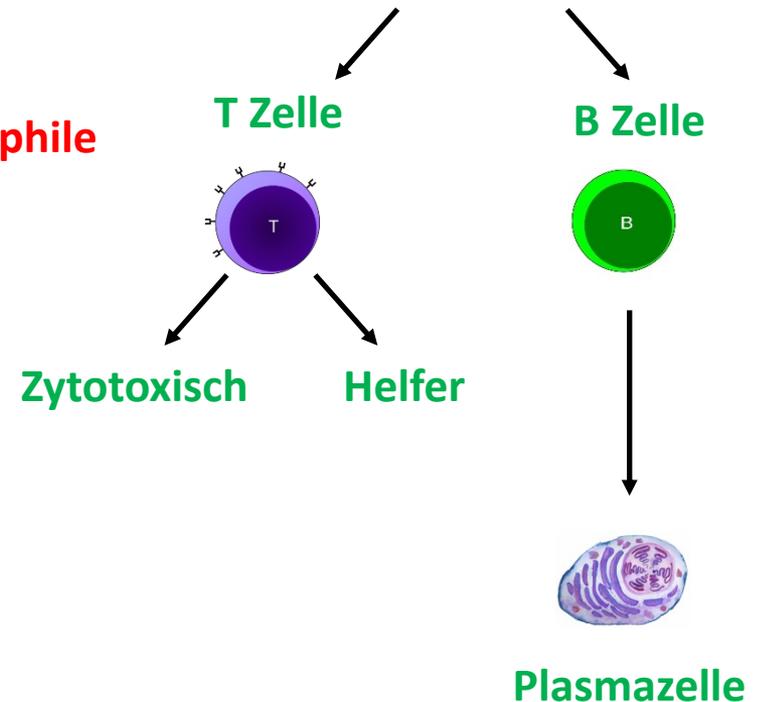


3. Dendritische Zelle (DC),  
Follikuläre Dendritische Zelle (FDC) 

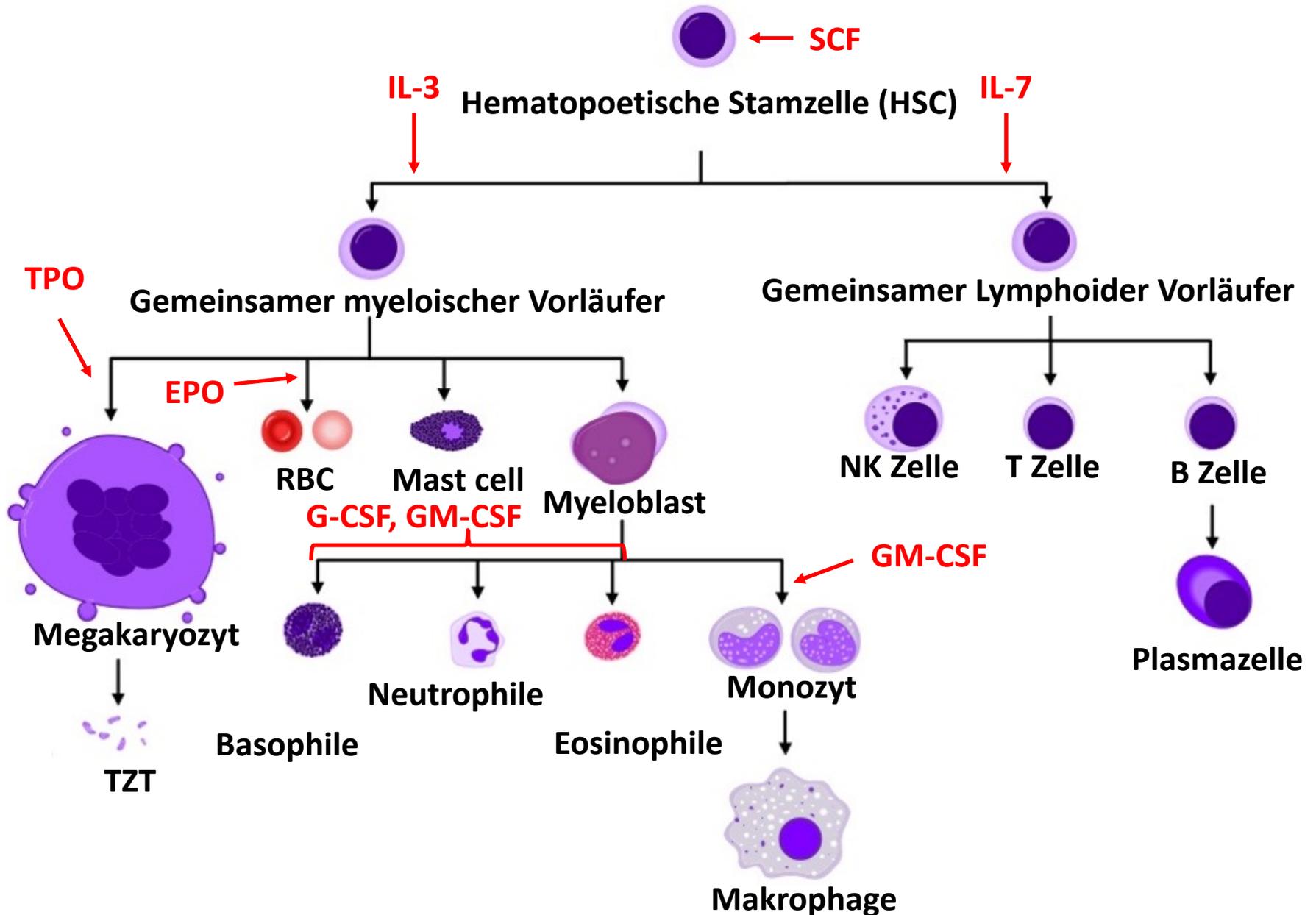
4. Mastzelle 

5. NK Zelle (natural killer) 

## Adaptiv:



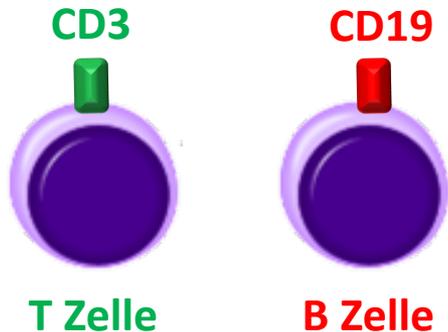
# Hämatopoese



# CD Marker



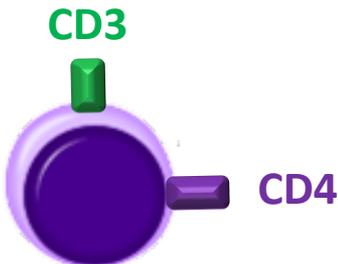
Bestimmte Zellen (z.B. Lymphozyten) können nicht immer aufgrund ihrer Morphologie unterschieden werden.



Verschiedene Zellen können mit Hilfe von Molekülen die sie auf der Zelloberfläche oder im Zytoplasma exprimieren identifiziert und unterschieden werden.

**IMMUNPHÄNOTYP:** Das charakteristische molekulare Muster eines Zelltyps wird durch die Benutzung von Antikörpern bestimmt.

Solche Oberflächenmoleküle erhielten eine standardisierte Nomenklatur:



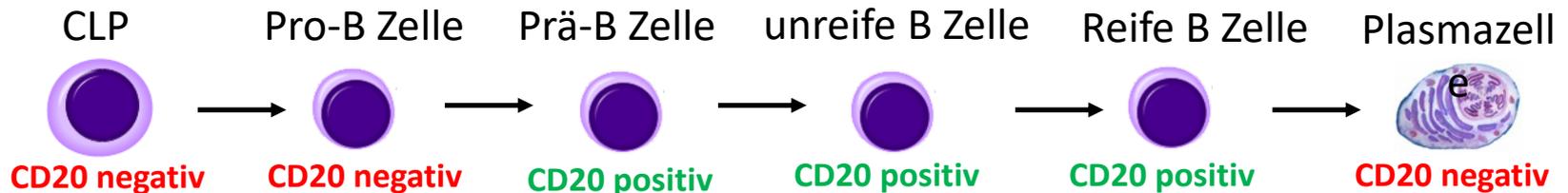
CD = **Cluster of differentiation**, Benutzung: CD + Nummer, e.g.: CD1, CD2, CD3, CD4, etc...

Die Struktur und Funktion der CD Marker variiert.

Beispiel für Immunphänotyp:  
CD3+/CD4+/CD8- → Helfer T Zelle

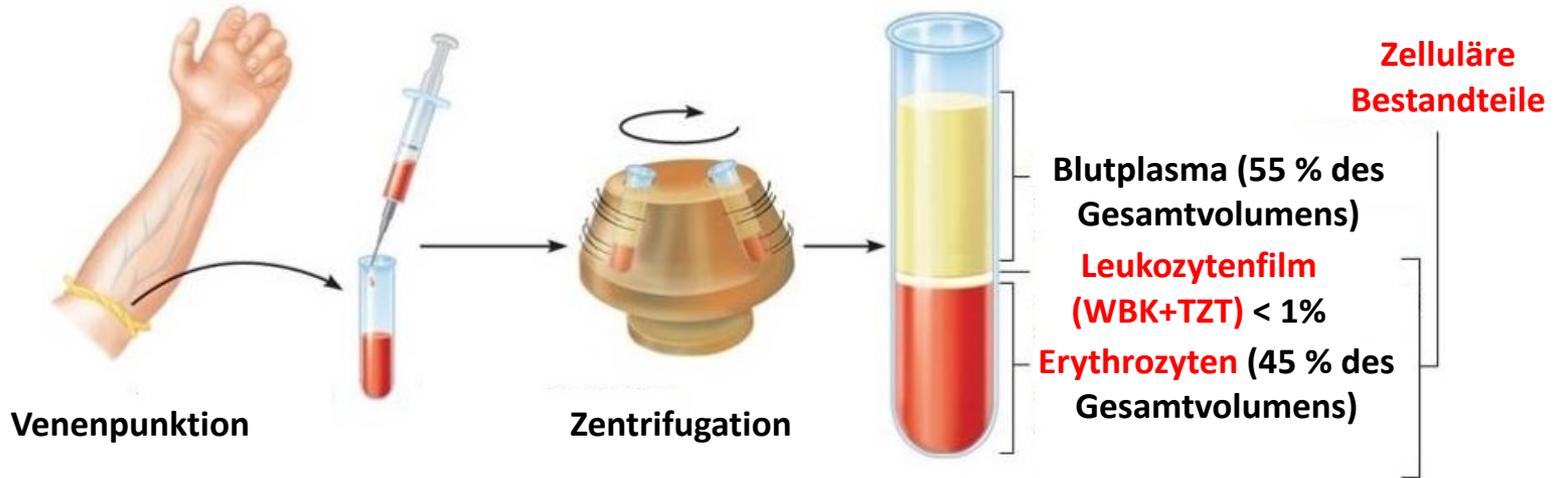
# Arten von CD Markern

- **Abstammungsmarker (lineage):** Moleküle die exklusiv auf Zellen einer bestimmten Abstammung exprimiert werden
  - Z.B.: CD3 → auf allen T Zellen                      CD19 → auf allen B Zellen
- **Reifungsmarker:** Der Immunphänotyp kann in verschiedenen Reifungsstadien unterschiedlich sein. Bestimmte Moleküle werden, unter anderem, nur auf unreifen Zellen, andere auf reifen Zellen und wieder andere nur bei voll Funktionsfähigen Zellen exprimiert.
  - Z.B.: CD20 (Ist gleichzeitig ein Abstammungsmarker der B Zellen da es auf keinen anderen Zellen gefunden werden kann)



- **Aktivierungsmarker:** Moleküle die von aktivierten Zellen exprimiert werden, während sie bei ruhenden Zellen entweder vollständig fehlen oder in geringerem Maße exprimiert werden, z.B.:
  - CD25 (Die alpha Kette des Interleukin-2 Rezeptors, IL-2R $\alpha$ , mehr dazu später)
  - CD80 und CD86 (B7-1 und B7-2, sogenannte kostimulator-Moleküle die von Antigen-präsentierenden Zellen exprimiert werden, mehr dazu später)

# Komponenten des peripheren Blutes

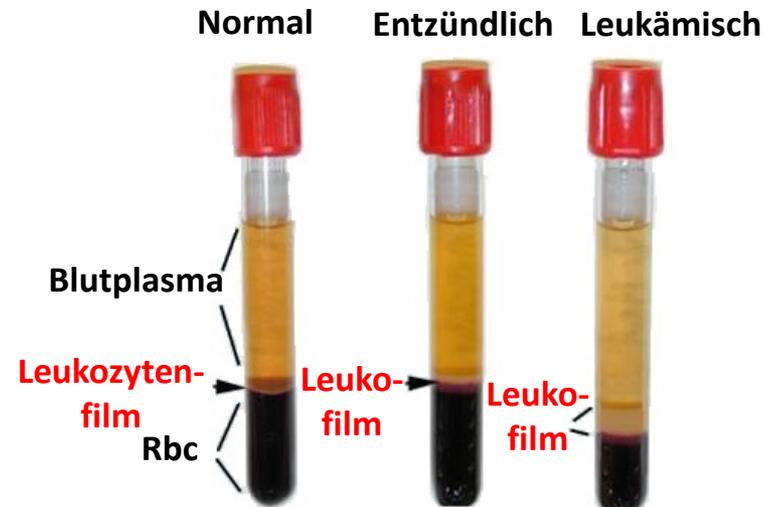


**Blutplasma:** Überstand des antikoagulierten Blutes

**Blutserum:** Überstand des koagulierten Blutes



Sie sind für verschiedene Labortests von nutzen, z.B. Koagulationstests können nicht mit Serum durchgeführt werden

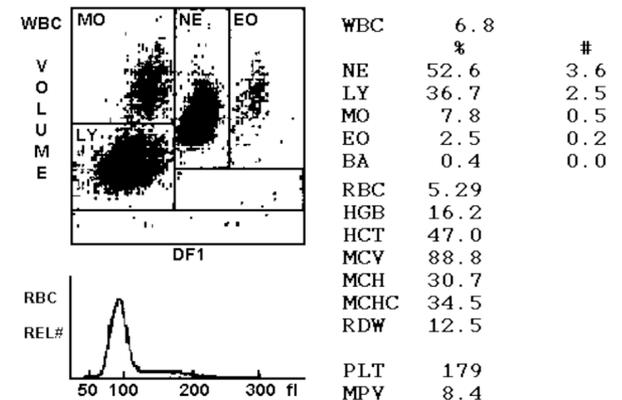


# Zelluläre Bestandteile des Blutes

Die Labor Blutzellzählungen werden automatisch von Hämatologischen Analysegeräten auf Basis der **Durchflusszytometrie** durchgeführt. (siehe später)

## Qualitative blood count

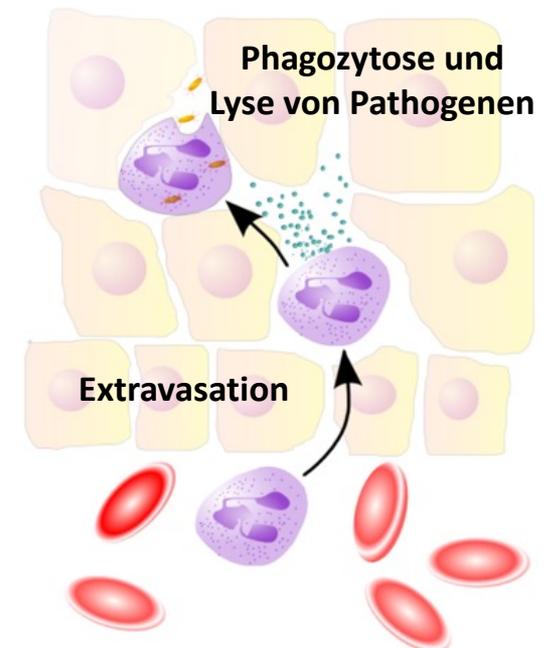
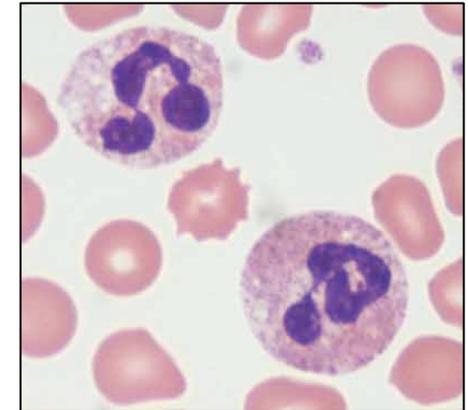
Cell type	Absolute number (cells/ $\mu$ l)	Ratio (%)
Leukozyten	4500-10.000	
Neutrophile	2200-6300	55-70
Stabkernige	120-450	3-5
Segmentierte	2000-6300	50-70
Eosinophile	80-360	2-4
Basophile	< 90	0-1
Monozyten	80-540	2-6
Lymphozyten	1000-3600	25-40



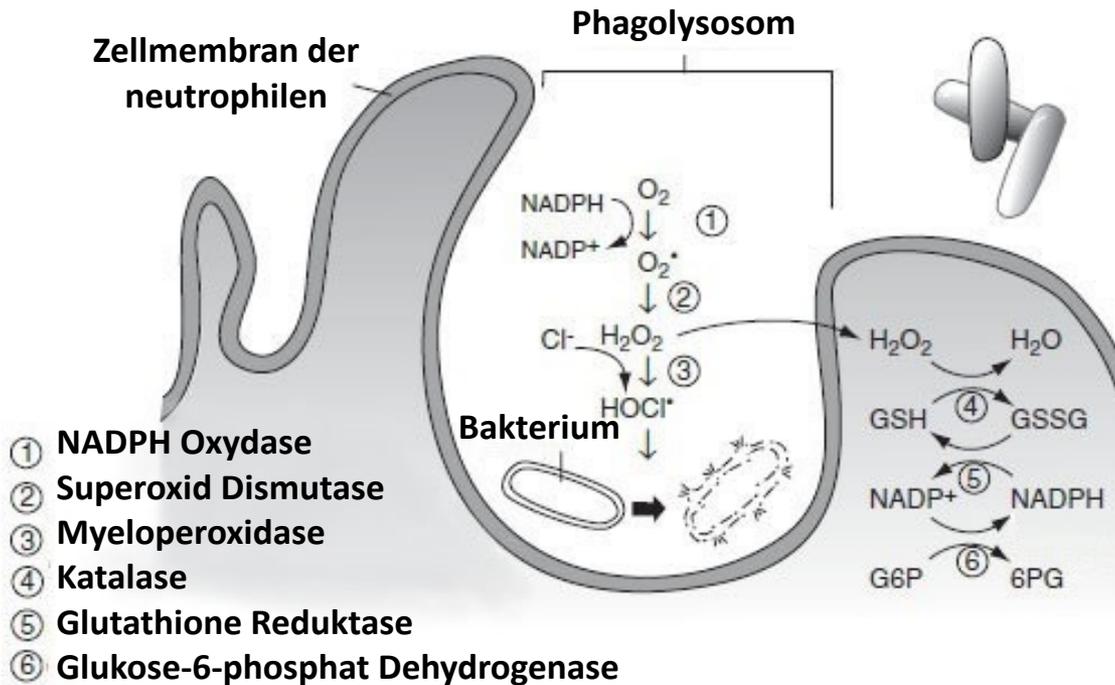
# Neutrophile Granulozyten

Leukozyten %	55-70
Hauptfunktion:	Elimination von Pathogens, Entfernung von Gewebetrümmern
Erkennung durch:	PRR (Mustererkennung), <b>Fc Rezeptor</b> , Komplementrezeptor
Inhalt der Granulen:	Verdauungsenzyme
Elimination des Pathogenes:	Phagozytose, oxidativer Burst, Degranulation
Produzierte Mediatoren:	Inflammatorische Zytokine
Fc Rezeptor:	FcγR ( <b>bindet IgG</b> )
Rolle bei Krankheiten:	Entzündungsreaktion

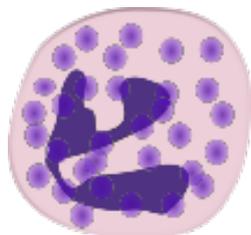
**Rot:** Nur möglich nach aktivierung der adaptiven Immunität



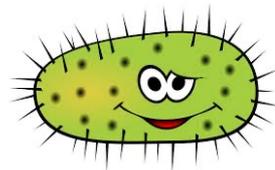
# Oxidativer Burst



1. Phagozytose (Phagosom)
  - ↓
2. Phagosom + Lysosom enthält Enzyme und reaktive Sauerstoffspezies (ROS) → **Phagolysosom**
  - ↓
3. Die Enzyme und die ROS töten den Erreger



Neutrophil

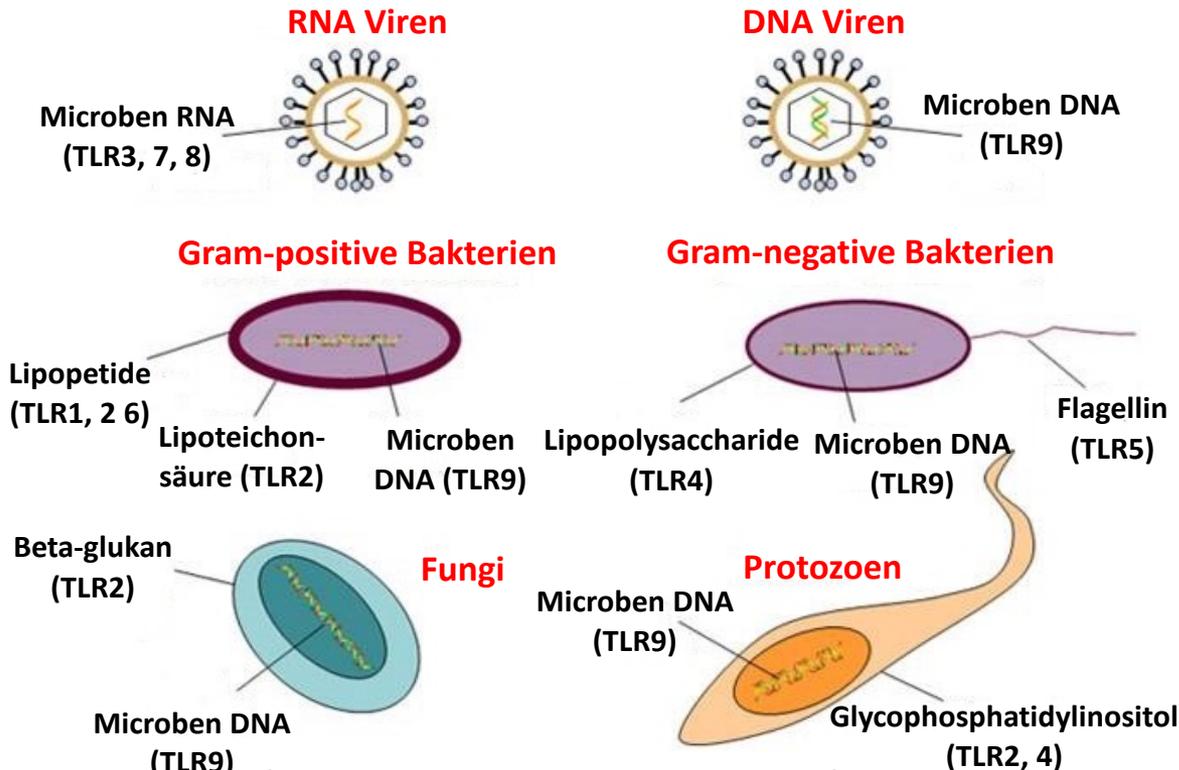


Pathogenes  
Bakterium



# Mustererkennung

- **PAMP** (Pathogen-assoziiertes molekulares Muster (Pattern)): Moleküle die häufig auf Erregern gefunden werden und vom angeborenen Immunsystem erkannt werden können.



Beispiele für PAMPs:

- **LPS (lipopolysaccharide)**
- Beta-glukan
- dsRNA (doppelsträngige RNA)
- CpG-DNA (mikrobielle DNA)
- Flagellin

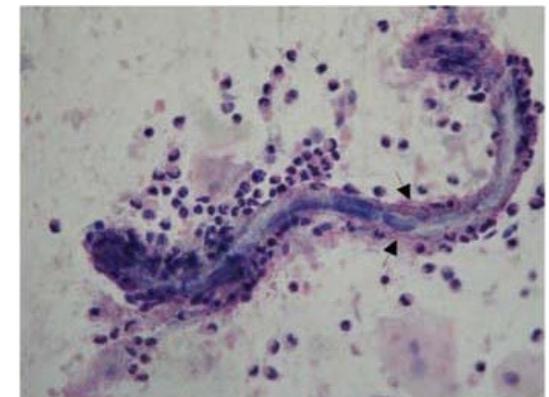
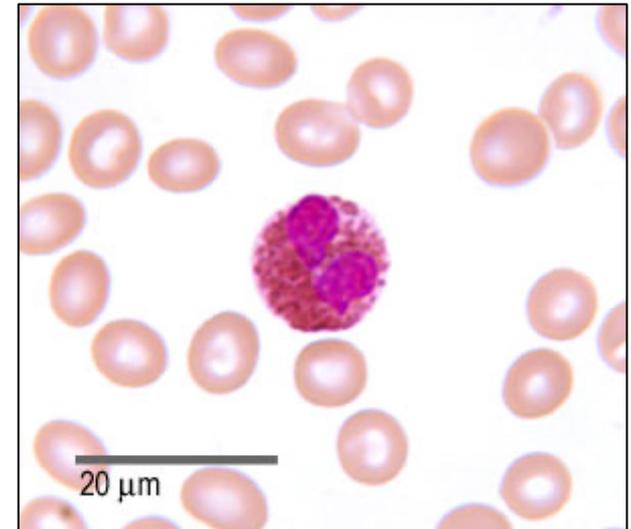
Beispiele für PRRs:

- **LPS-Rezeptor (CD14)**
  - **Mannose-Rezeptor**
  - **Glukan-Rezeptor**
  - **Toll-like Rezeptors (TLR)**
  - **Scavenger Rezeptors**
- } C-lectin-R

- **PRR** (Pattern-recognition Rezeptor): Die Gene rearrangieren sich nicht; all unsere angeborenen Immunzellen exprimieren genau die gleichen PRRs während des ganzen Lebens.
- Einige Rezeptoren können auf der **Zelloberfläche** gefunden werden, andere **intrazellulär**.

# Eosinophile Granulozyten

Leukozyten %	2-4
Hauptfunktion:	Schutz vor multizellularen Parasiten
Erkennung:	PRR, <b>Fc Rezeptor</b>
Inhalt der Granulen	Toxische Proteine, Enzyme
Elimination des Erregers:	Degranulation
Produzierte Mediatoren:	Prostaglandine, Leukotriene, Inflammatorische Zytokine
Fc Rezeptor:	FcεR ( <b>bindet IgE</b> )
Rolle in Krankheiten:	Allergische Reaktionen

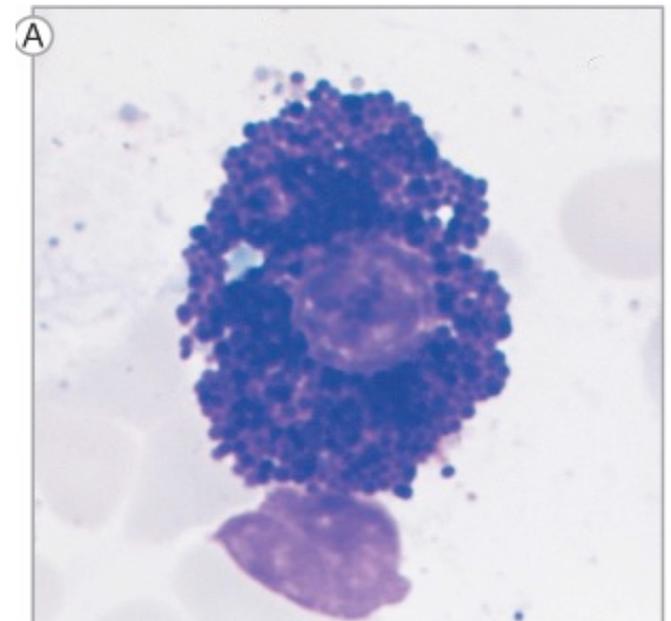
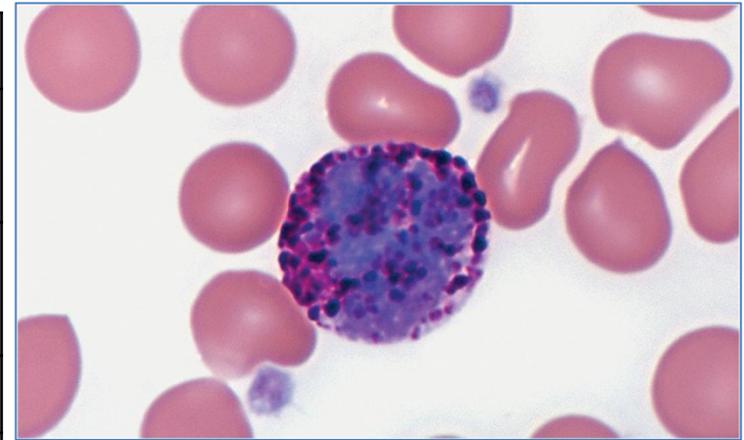


**Rot: Nur nach der Aktivierung des adaptiven Immunsystems möglich**

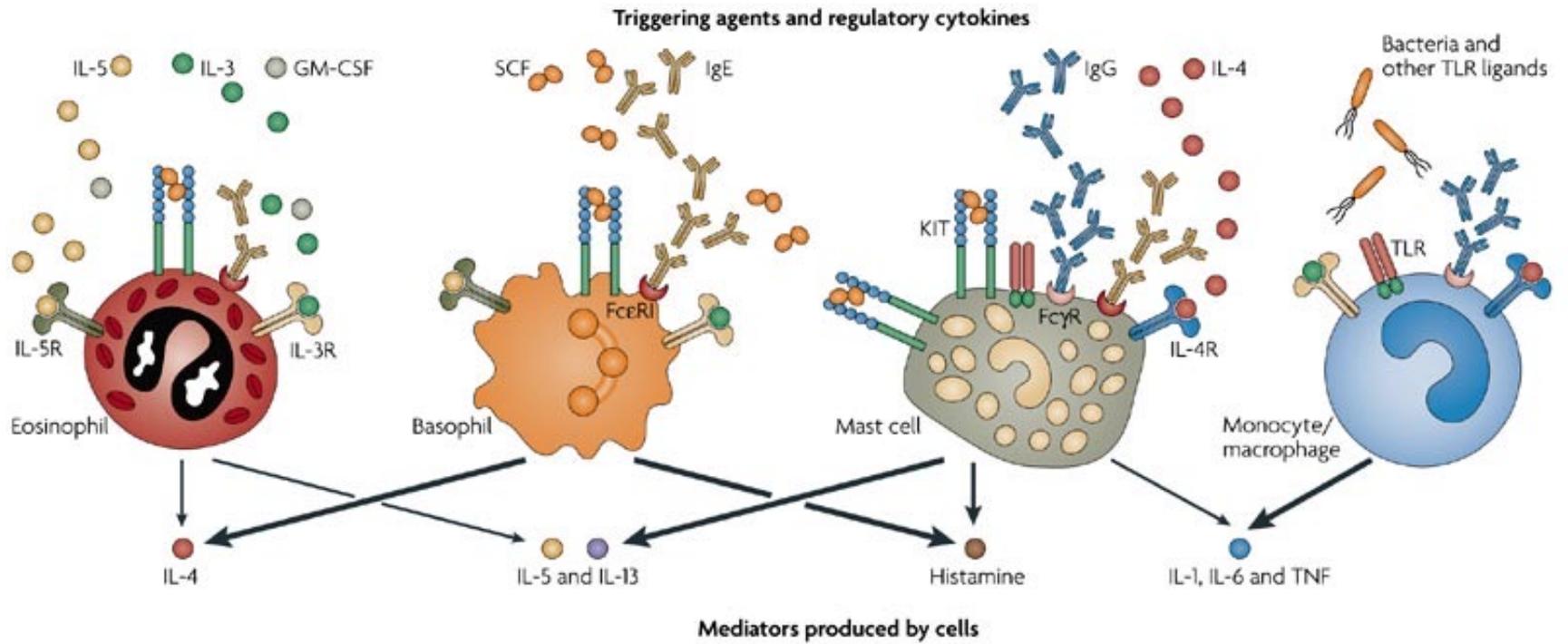
Eosinophile umzingeln eine *Strongyloides stercoralis* Larve. (Sputum eines Falles von parasitischer Pneumonie)

# Basophile Granulozyten

Leukozyten %	0-1
Hauptfunktion:	Schutz vor Multizellularen Parasiten
Erkennung:	PRR, <b>Fc Rezeptor</b>
Inhalt der Granulen:	Histamin, Heparin
Elimination des Erregers:	Degranulation
Produzierte Mediatoren:	Zytokine (z.B. IL-4), Leukotrienes
Fc Rezeptor:	FcεR ( <b>bindet IgE</b> )
Rolle in Krankheiten:	Allergische Reaktionen



**Rot: Nur nach der Aktivierung des adaptiven Immunsystems möglich**

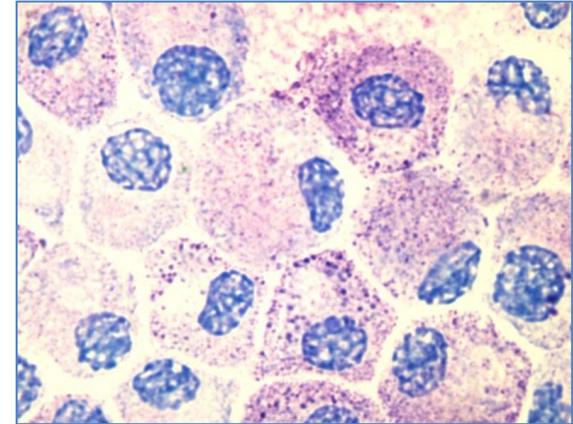


Nature Reviews | Immunology

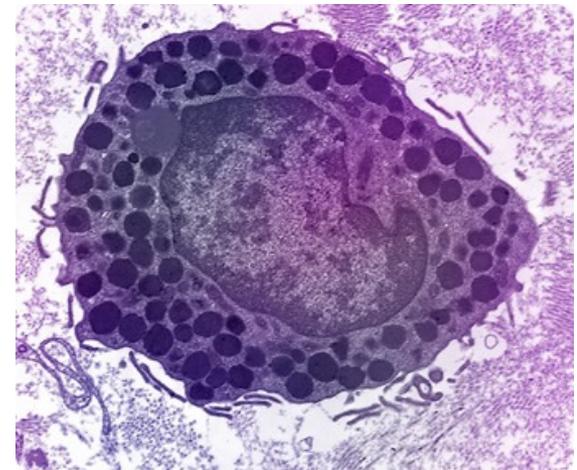
Bischoff *Nature Reviews Immunology* 7, 93–104 (February 2007) | doi:10.1038/nri2018

# Mastzellen (mastozyten)

<b>Auffindbar im:</b>	<b>Gewebe</b>
<b>Hauptfunktion:</b>	<b>Schutz vor multizellularen Parasiten</b>
<b>Erkennung:</b>	<b>PRR, <b>Fc receptor</b></b>
<b>Inhalt der Granulen:</b>	<b>Histamin, Heparin, Enzyme</b>
<b>Elimination des Erregers:</b>	<b>Degranulation</b>
<b>Produzierte Mediatoren:</b>	<b>Zytokine, Leukotriene</b>
<b>Fc Rezeptor:</b>	<b>FcεR (<b>bindet IgE</b>)</b>
<b>Rolle in Krankheiten:</b>	<b>Allergische Reaktionen</b>



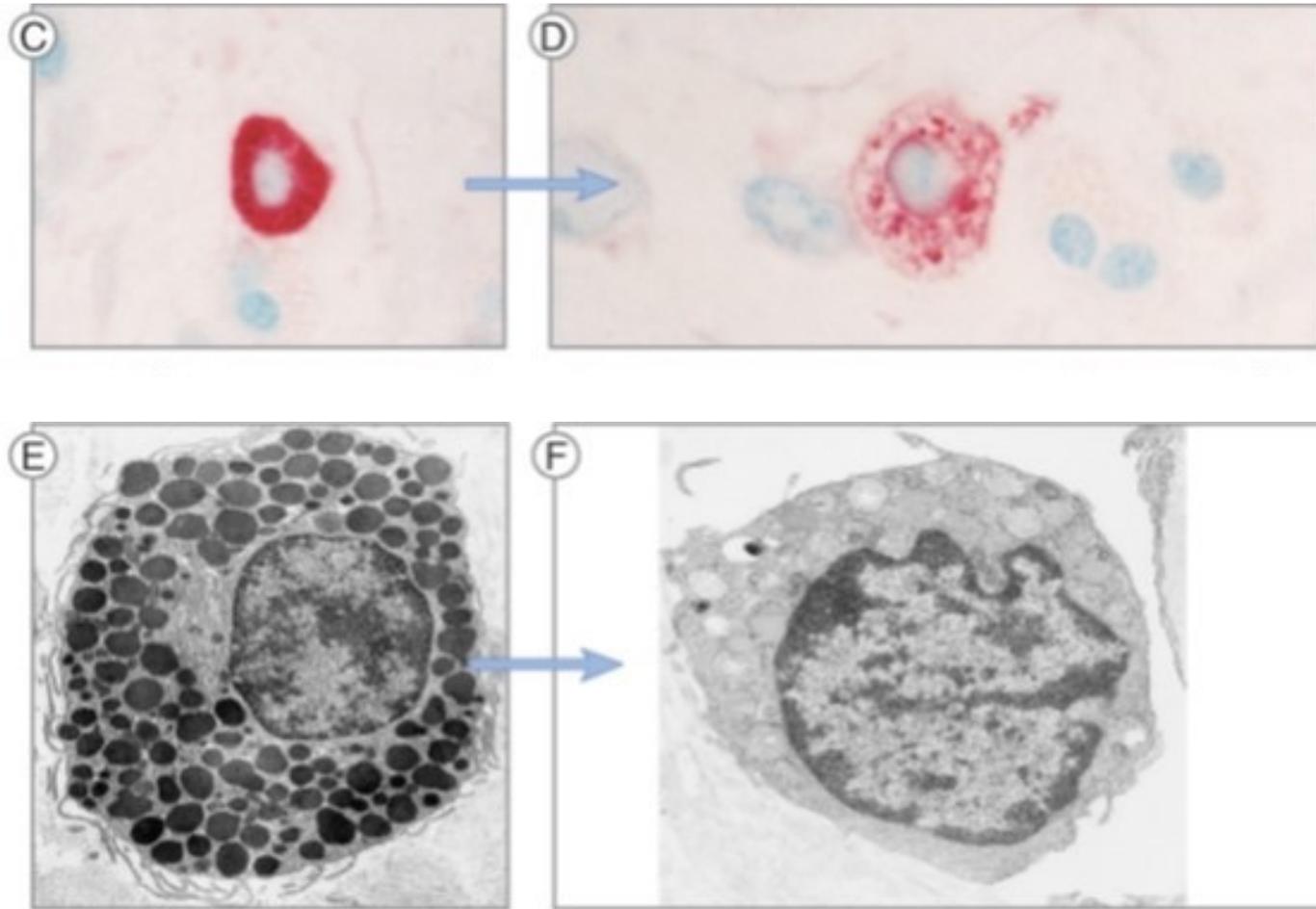
Mastzellkultur  
(Toluidinblau Färbung)



Mastzelle (Elektronenmikroskopie)

**Rot: Nur nach der Aktivierung des adaptiven Immunsystems möglich**

# Schnelle degranulation einer Mastzelle

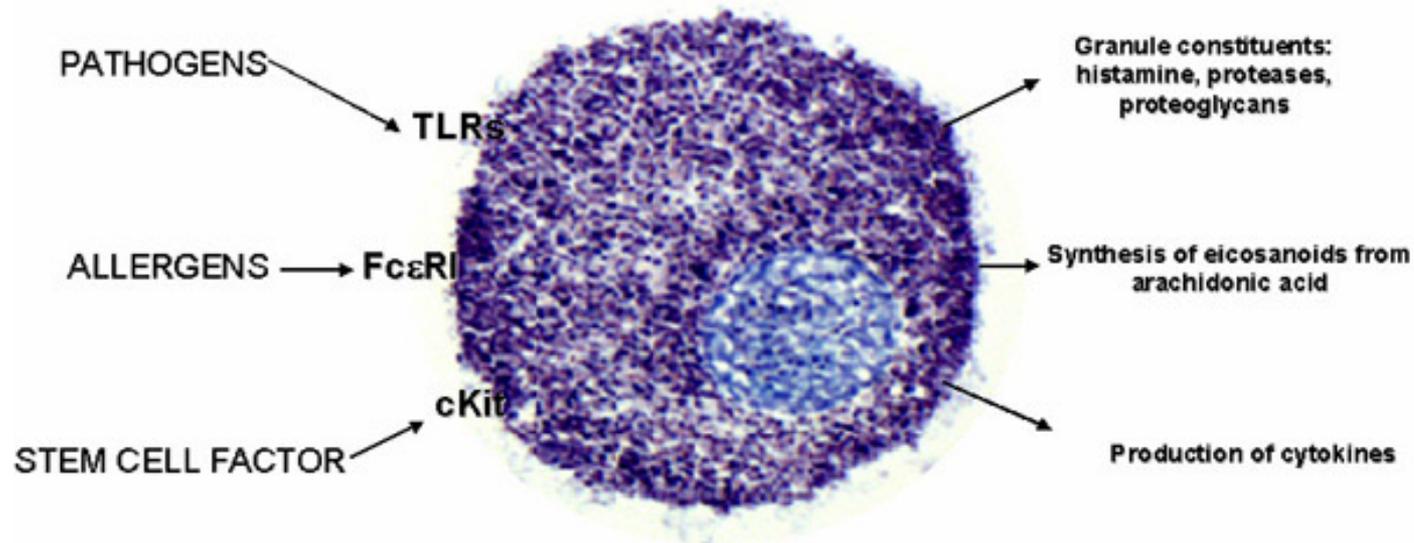


# Hízósejtek aktivációs mechanizmusa

**TLR4** – LPS → IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 and IL-13, without mast cell degranulation

**TLR2** – peptidoglycan → mast cell degranulation and production of IL-4 and IL-5, IL-6, IL-13

**TLR3,7,9** – Poly (I:C), CpG oligonucleotid → release of pro-inflammatory cytokines and chemokines

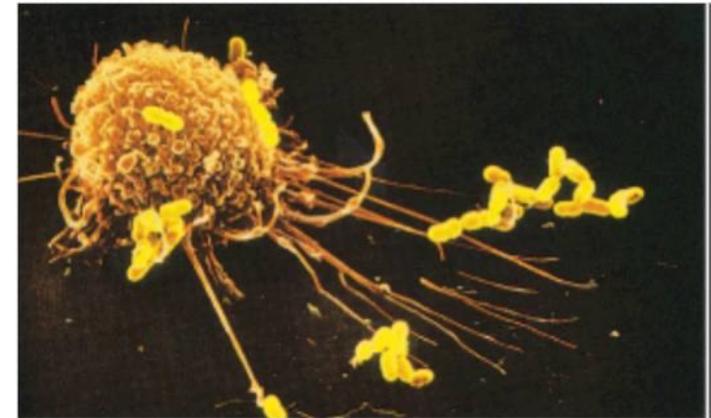


they express several hundred thousand high affinity receptors for IgE (Fc $\epsilon$ R1) and thus respond to IgE-directed antigens

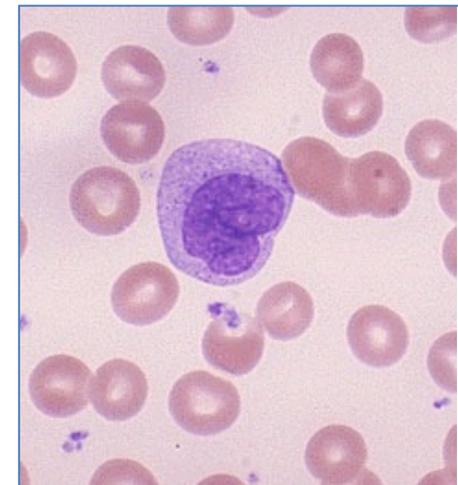
express the pathogen-recognizing Toll-like receptors (TLRs) which probably account for the ability of mast cells to mount an effective innate immune response

# Monozyten, Makrophagen

Leukozyten %:	2-8
Hauptfunktionen:	Phagozytose, Antigen Präsentation, Zytokinproduktion,
Ort der Antigenpräsentation:	Lokal, im Gewebe
Erkennung:	PRR, <b>Fc Rezeptor</b> , Komplementrezeptor
Elimination des Erregers:	Phagozytose, oxidativer Burst
Produzierte Mediatoren:	Zytokine
Fc Rezeptor:	FcγR ( <b>bindet IgG</b> )
Rolle in Krankheiten:	Typ IV. Hypersensibilität



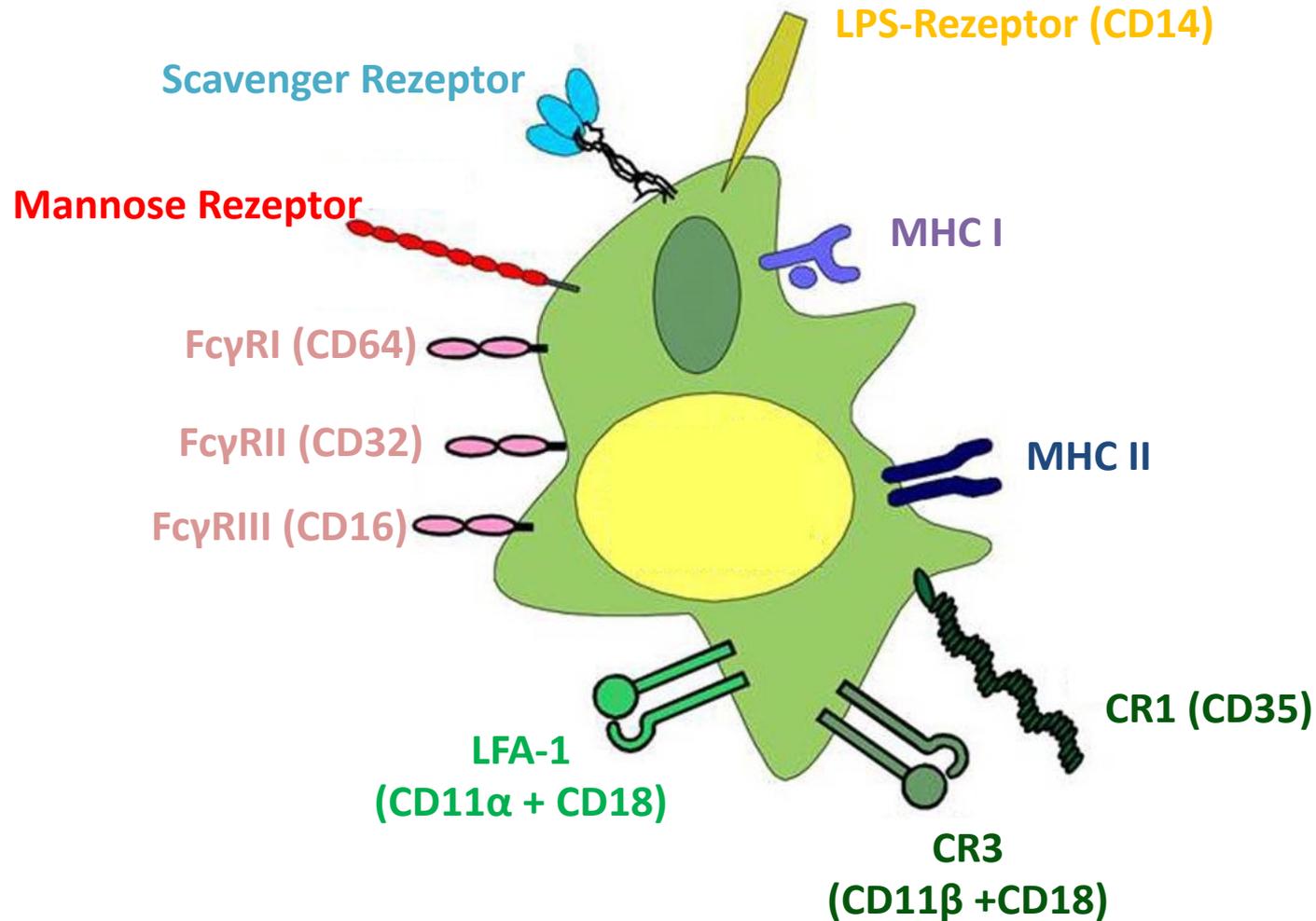
Eine Makrophage phagozytiert ein Bakterium (SEM Bild)



Monozyt im Blutausstrich

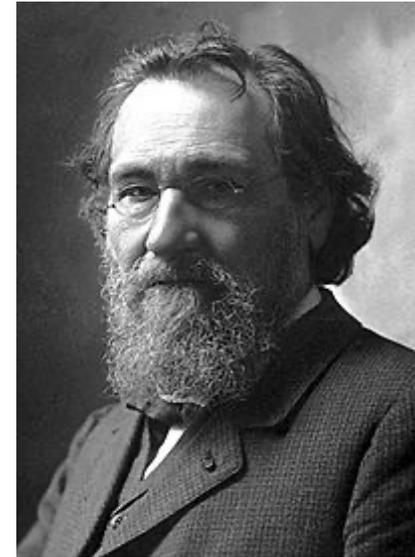
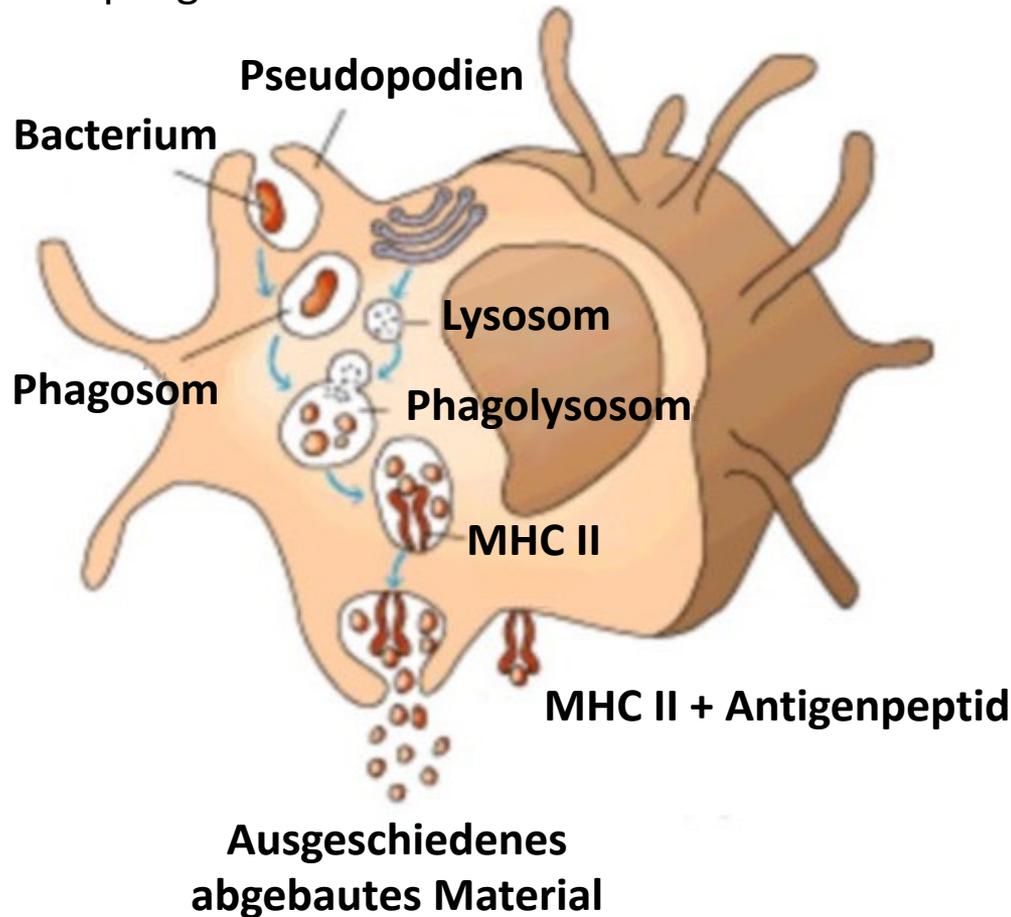
**Rot: Nur nach der Aktivierung des adaptiven Immunsystems möglich**

# Oberflächenmoleküle von Makrophagen



# Phagozytose

Phagozytose und Antigenpräsentation durch Makrophagen



Ilya Ilyich Mechnikov der Makrophagen und das Phänomen der Phagozytose entdeckte.

Erhielt 1908 den Nobelpreis für Physiologie und Medizin zusammen mit Paul Ehrlich als "Anerkennung ihrer Arbeit über Immunität".



# Funktionelle Tests der Phagozyten

- **Isolation:** Zellen adhäreren normalerweise an Glas oder Plastikoberflächen.
- **Migration:** Testen der spontanen oder gesteuerten (Chemotaxis) Zellmigration in vitro oder in vivo. (z.B. Skin Window Test - Hautfenstertest)
- **Phagozytose :**
  - Nicht-opsonisiert
  - Opsonisiert (z.B. mediiert durch Fc Rezeptoren oder Komplementrezeptoren)
- **Oxidativer burst und phagozytotische Enzyme:**
  - Nitroblau Tetrazolium (NBT) Test, Myeloperoxidase (MPO) Test, alkalische Phosphatase Test, Lysozym Test, usw.
- **Testen der Zytokin Produktion** (diese Tests sehen Sie später):
  - ELISA, ELISPOT
  - CBA (Cytometric Bead Array): Eine Multiplex durchflusszytometrische Methode die auf die Nutzung von Mikroperlen basiert

# Skin window test<sup>[12.]</sup>



1. Die **oberste Schicht der Haut wird auf** der volaren Oberfläche des Arms **entfernt**. (Ziel: Kapillaren ohne Blutung visualisieren)



Hautfenster am Arm

2. Ein **Filterpapier** wird auf die Läsion gelegt. Abhängig vom Experiment kann es **Chemokine** enthalten (z.B. IL-8)
3. Die Zellen die zur Läsion migrieren **verlassen die Zirkulation** und gehen in das Filterpapier.
4. Schlussendlich wird das Filterpapier entfernt und die **Zelluläre Zusammensetzung** untersucht.

Anwendung: **In vivo Untersuchung der Zellmigration**, z.B. Vergleich der Zellmigration in gesunden Freiwilligen und Patienten mit autoimmunen Störungen, usw.

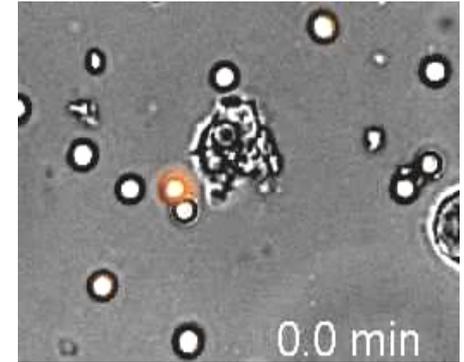


Die Läsion heilt innerhalb einiger Tage ohne Narbenbildung.

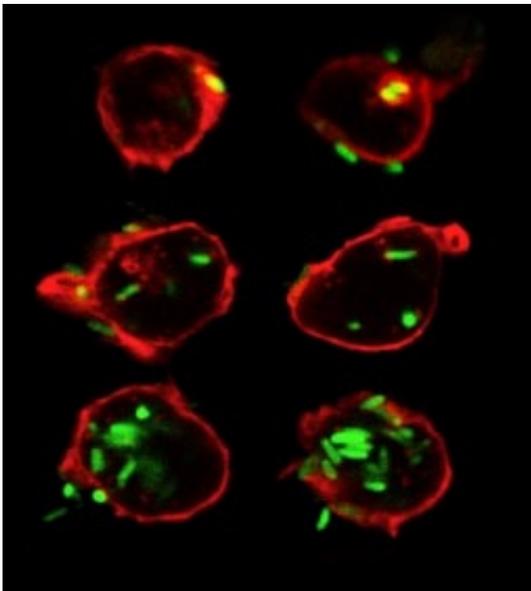
# Phagozytose Test

Methode:

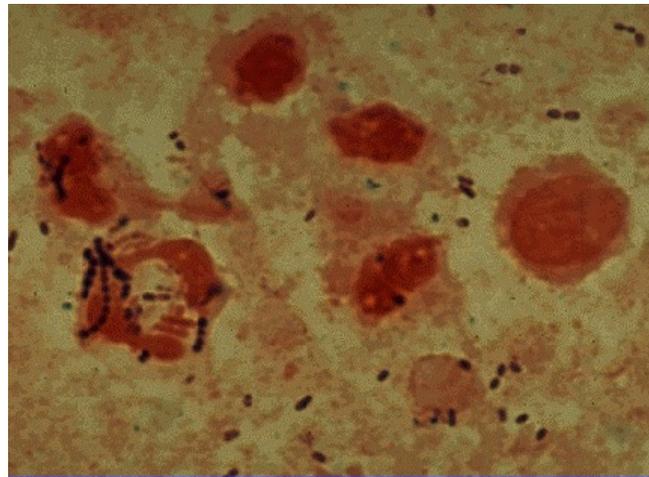
- **Markierte Partikel** (z.B. Bakterien) werden mit Phagozyten inkubiert.
- Phagozytose wird dann unter einem Mikroskop oder mit Durchflusszytometrie untersucht (letzteres → 5. Praktikum)



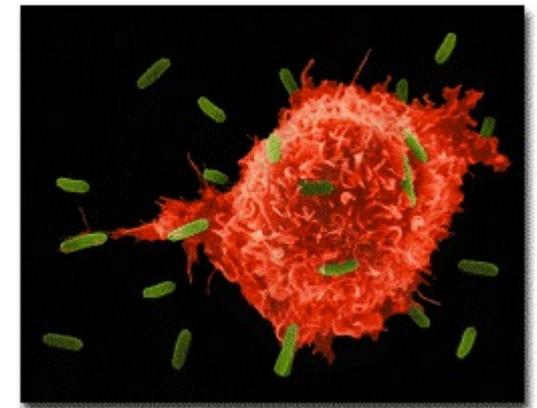
Video: Ein neutrophiler Granulozyt nimmt mehrere Konidien auf.



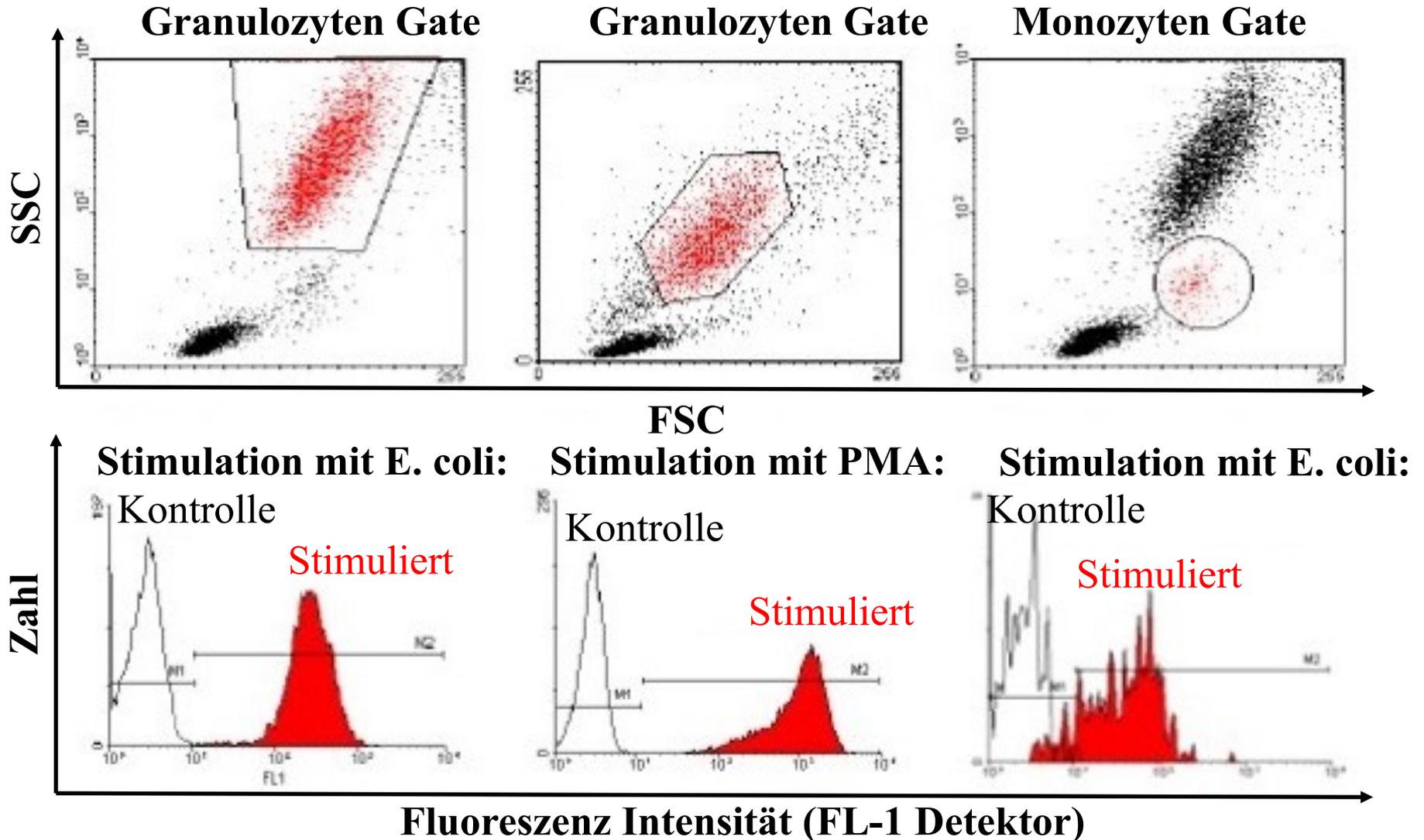
Phagozytose mit  
Fluoreszenzmikroskopie



Phagozytose mit  
Immunhistochemie

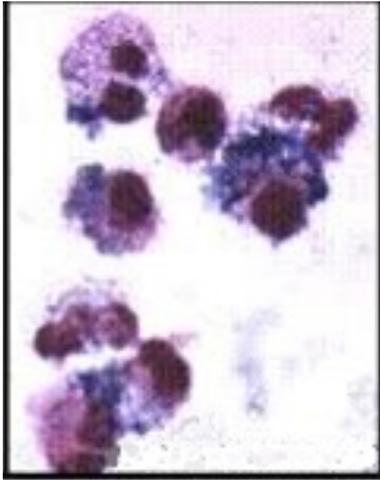


# „Phagoburst“ Test – messen des oxidativen burst der Leukozyten

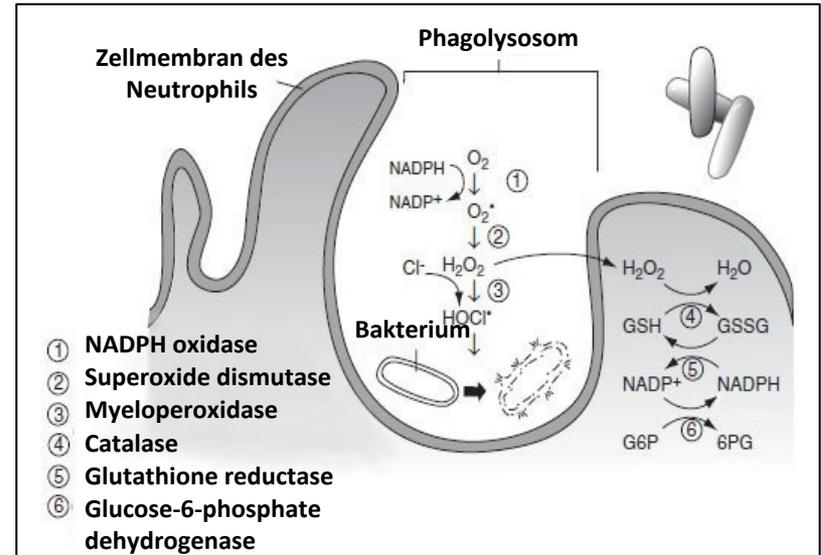


Dihydrorhodamine 123 ist das Fluorochrom (Emittiert Licht nach oxidation)

# NBT Test



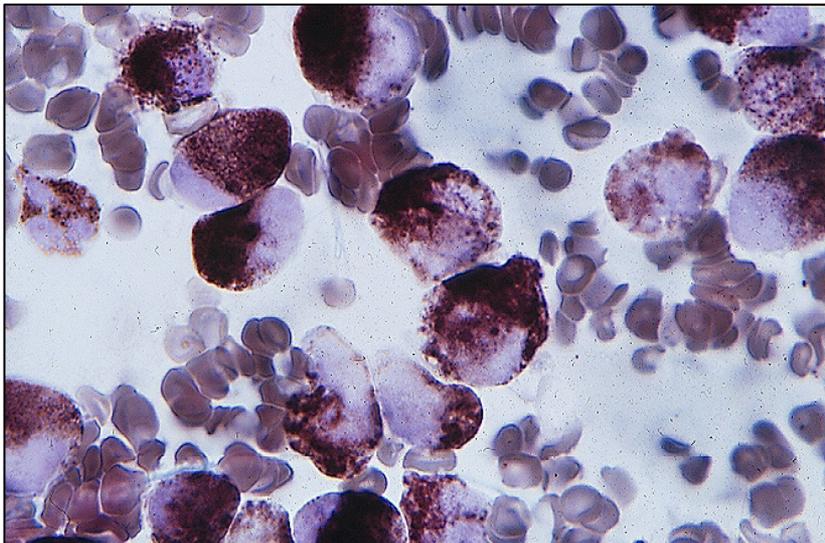
Makrophagen



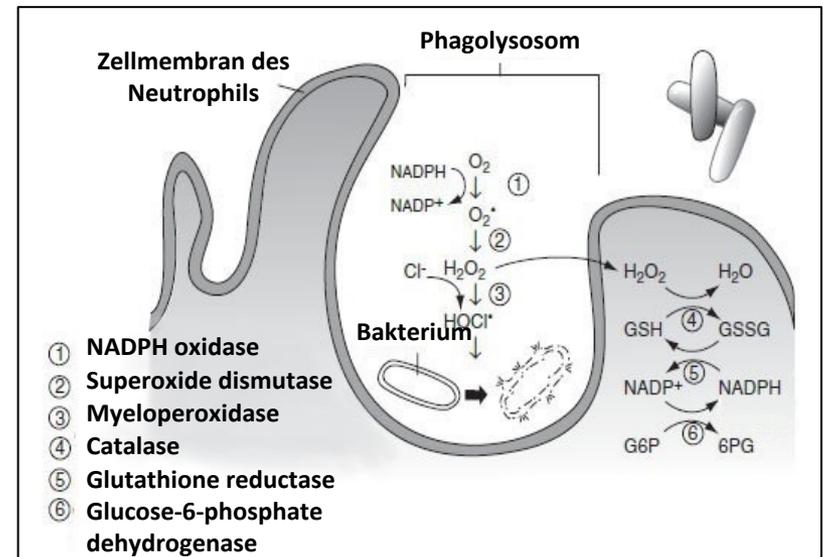
Prinzip: Reaktive Sauerstoff Spezies (ROS) reduzieren das Färbemittel das **blau wird**.<sup>[13.]</sup>

# Myeloperoxidase Färbung

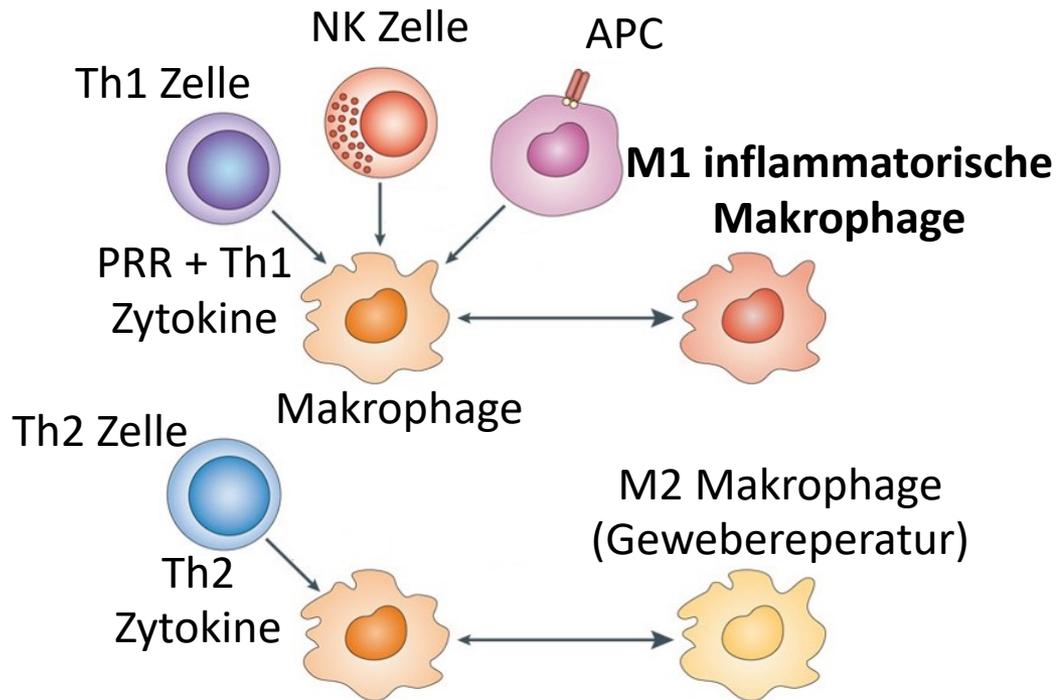
- Myeloperoxidase, ein charakteristisches Enzym der myeloischen Zellen (vor allem Neutrophile), nimmt an der Bildung der ROS teil.
- Detektion intrazellulärer Myeloperoxidase ist zur Bestätigung des **myeloischen Ursprungs bestimmter Leukämien** wichtig.<sup>[15, 16.]</sup>



Detektion der Myeloperoxidase in akuter promyelozytischer Leukämie (AML-M3 oder APL)



# Aktivierung von Makrophagen

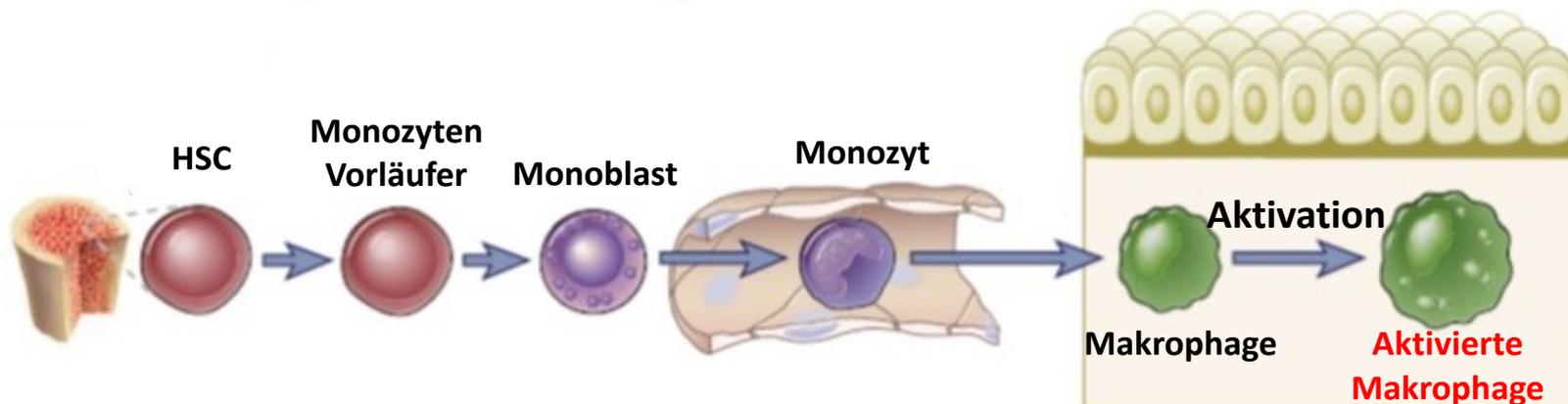


EFFEKTE DER KLASSISCHEN AKTIVATION<sup>[10.]</sup>:

- **Erhöhte Phagozytose**
- Produktion **inflammatorischer Zytokine** (siehe später)
- Produktion von **Chemokinen**
- **Erhöhte Expression von MHC II**
- **Sie exprimieren Kostimulatorische Moleküle** auf ihrer Oberfläche (e.g. CD40, CD80, CD86)

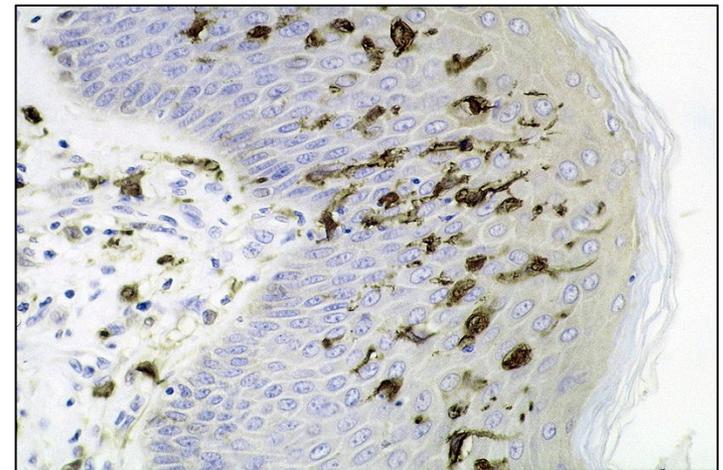
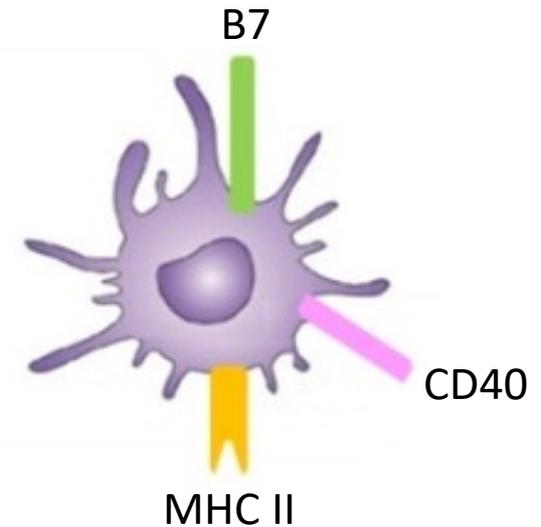
HYPERAKTIVIERTE M1 MAKROPHAGE:

- **Anti-Tumor Aktivität**



# Dendritische Zelle (DC)

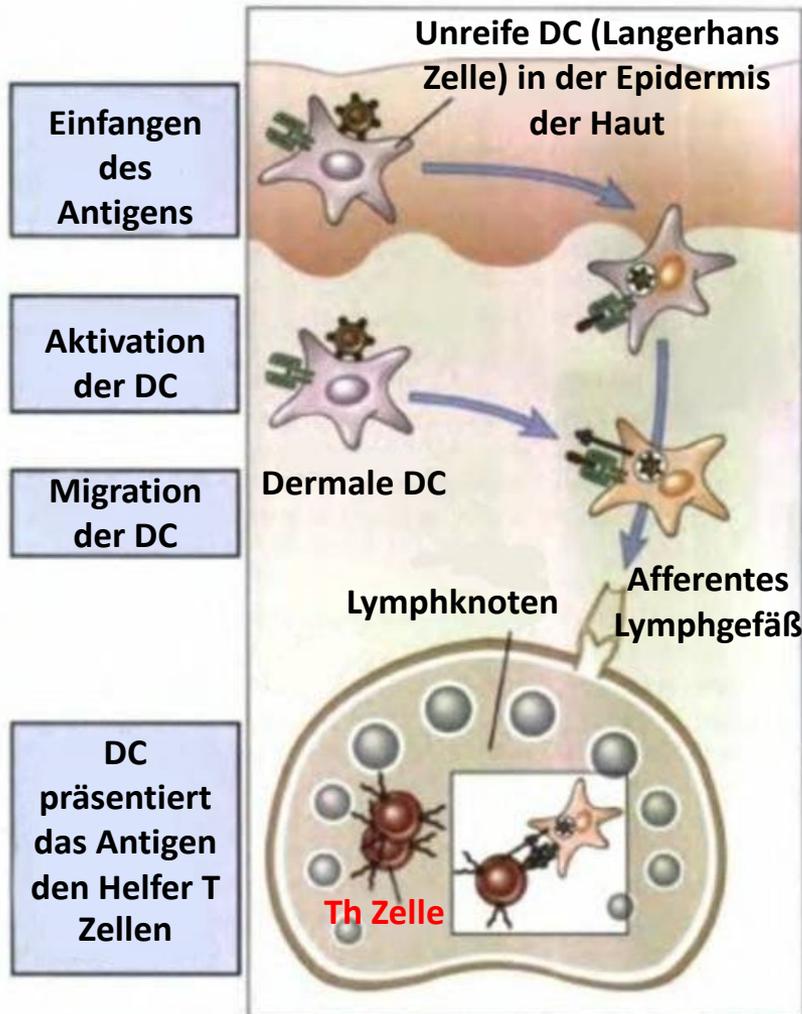
<b>Auffindbar im:</b>	<b>Gewebe</b>
<b>Hauptfunktion:</b>	<b>Antigenpräsentation</b>
<b>Ort der Antigenpräsentation:</b>	<b>In den sekundären Lymphorganen</b>
<b>Erkennung:</b>	<b>PRR, Fc Rezeptor</b>
<b>Produzierte Mediatoren:</b>	<b>Zytokine</b>
<b>Fc Rezeptor:</b>	<b>FcγR (<b>bindet IgG</b>)</b>
<b>Rolle in Krankheiten:</b>	<b>Autoimmunität, HIV Infektionen</b>



**Rot: Nur nach der Aktivierung des adaptiven Immunsystems möglich**

Dendritische Zellen (Langerhans Zellen) in der Haut eines mit *Mycobacterium ulcerans* infizierten Patienten. (Immunhistochemie)

# Funktion der Dendritischen Zellen



1. Sie fangen Antigene im Gewebe mit **PRRs ein**.
2. Sie transportieren diese Antigene zu den abfließenden Lymphknoten.
3. Sie präsentieren das Antigen mit **MHC II Molekülen** den **Helfer T Zellen**.



„Wir werden sie für eine Zeugen-gegenüberstellung mitnehmen“

Antigenpräsentation von ruhenden, „unreifen“ DCs:

$MHC II^{low} / CD80^{low} / CD86^{low}$  (keine Kostimulation)

↓  
**TOLERANCE**

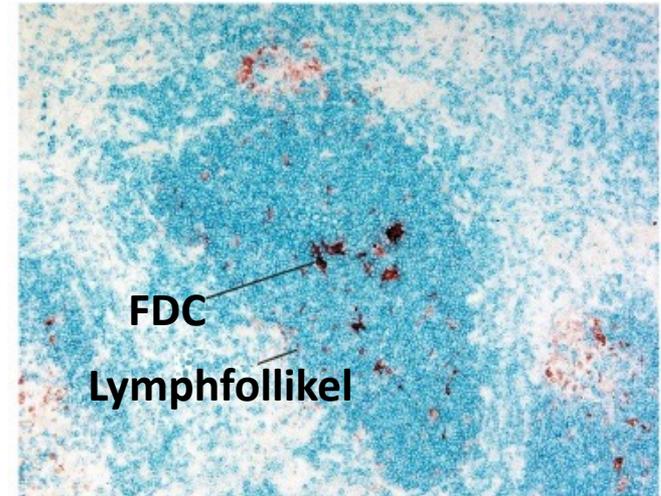
Antigenpräsentation von DCs die durch PRRs aktiviert wurden:

$MHC II^{high} / CD80^{high} / CD86^{high} / CD40+$

↓  
**IMMUNE RESPONSE**

# Folikuläre Dendritische Zelle (FDC)

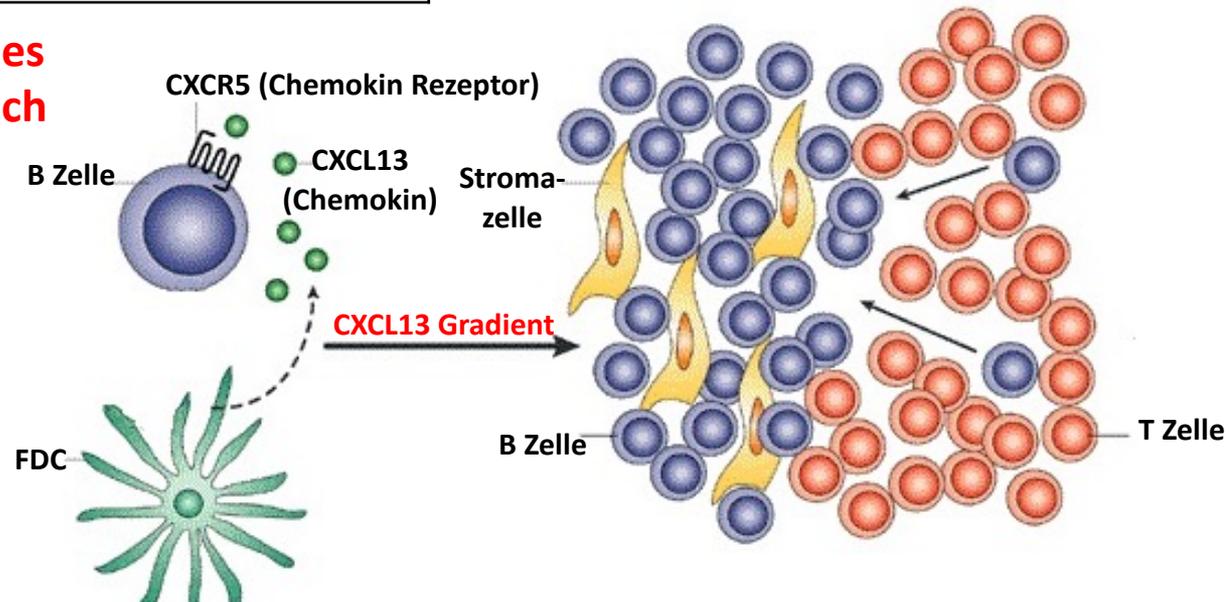
Auffindbar in:	Lymphfollikel
Hauptfunktion:	Bildung von Follikeln, Antigen im Follikel für B Zellen behalten
Erkennung:	<b>Fc Rezeptor,</b> Komplement Rezeptor
Produzierte Mediatoren:	Zytokine
Fc Rezeptor:	FcγR ( <b>bindet IgG</b> )



**Rot: Nur nach der Aktivierung des adaptiven Immunsystems möglich**

## Iccosome:

- Antigen
- Antikörper + Fc Rezeptor
- Komplement + Komplement Rezeptor



# Quellen 1.

- Mayo Clinic: **CD20 on B Cells** (<http://www.mayomedicallaboratories.com/test-catalog/Clinical+and+Interpretive/89584>)
- Nauseef WM, et al: **Neutrophils at work**. *Nat Immunol*. 2014 Jul;15(7):602-11. doi: 10.1038/ni.2921.
- Stone KD, et al: **IgE, mast cells, basophils, and eosinophils**. *J Allergy Clin Immunol*. 2010 Feb;125(2 Suppl 2):S73-80. doi: 10.1016/j.jaci.2009.11.017.
- Denzel A, et al: **Basophils enhance immunological memory responses**. *Nat Immunol*. 2008 Jul;9(7):733-42. doi: 10.1038/ni.1621. Epub 2008 May 30.
- Karasuyama et al: **Newly discovered roles for basophils: a neglected minority gains new respect**. *Nat Rev Immunol*. 2009 Jan;9(1):9-13. doi: 10.1038/nri2458.
- Auffray C, et al: **Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells**. *Annu Rev Immunol*. 2009;27:669-92. doi: 10.1146/annurev.immunol.021908.132557.
- Johnathan CPeiser L, et al: **Scavenger receptors in innate immunity**. *Curr Opin Immunol*. 2002 Feb;14(1):123-8.
- Canton J, et al: **Scavenger receptors in homeostasis and immunity**. *Nat Rev Immunol*. 13, 621–634 (2013) doi:10.1038/nri3515
- Nobelprize.org: **Ilya Mechnikov – Biographical** ([http://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/medicine/laureates/1908/mechnikov-bio.html](http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1908/mechnikov-bio.html))
- Mosser DM, et al: **Exploring the full spectrum of macrophage activation**. *Nat Rev Immunol*. 2008 Dec;8(12):958-69. doi: 10.1038/nri2448.

# Quellen 2.

- Wu L, et al: **Development of dendritic-cell lineages.** *Immunity.* 2007 Jun;26(6):741-50.
- Liu K, et al: **Origin and development of dendritic cells.** *Immunol Rev.* 2010 Mar;234(1):45-54. doi: 10.1111/j.0105-2896.2009.00879.x.
- Heesters BA, et al: **Follicular dendritic cells: dynamic antigen libraries.** *Nat Rev Immunol.* 2014 Jul;14(7):495-504. doi: 10.1038/nri3689. Epub 2014 Jun 20.
- Juelke K, et al: **Differentiation of human innate lymphoid cells (ILCs).** *Curr Opin Immunol.* 2016 Feb;38:75-85. doi: 10.1016/j.coi.2015.11.005. Epub 2015 Dec 17.
- Vivier E, et al: **Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells.** *Science.* 2011 Jan 7;331(6013):44-9. doi: 10.1126/science.1198687.
- Molecular Biology of the Cell. 4th edition: **Lymphocytes and the Cellular Basis of Adaptive Immunity** (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26921/>)
- Bonneville M, et al: **Gammadelta T cell effector functions: a blend of innate programming and acquired plasticity.** *Nat Rev Immunol.* 2010 Jul;10(7):467-78. doi: 10.1038/nri2781. Epub 2010 Jun 11.
- Rothstein TL, et al: **Human B-1 cells take the stage.** *Ann N Y Acad Sci.* 2013 May;1285:97-114. doi: 10.1111/nyas.12137.
- Covens K, et al: **Characterization of proposed human B-1 cells reveals pre-plasmablast phenotype.** *Blood.* 2013 Jun 27;121(26):5176-83. doi: 10.1182/blood-2012-12-471953. Epub 2013 Apr 23.
- Rothstein TL, et al: **The human counterpart of mouse B-1 cells.** *Ann N Y Acad Sci.* 2015 May 18. doi: 10.1111/nyas.12790.