



IMMUNOLÓGIAI ÉS  
BIOTECHNOLÓGIAI  
INTÉZET



# 14. Praktikum: Autoantikörper Diagnostik

Grundlagen der Immunologie

Universität Pécs, klinisches Zentrum  
Institut für Immunologie und Biotechnologie  
Pécs, 2024.

# Autoimmunität

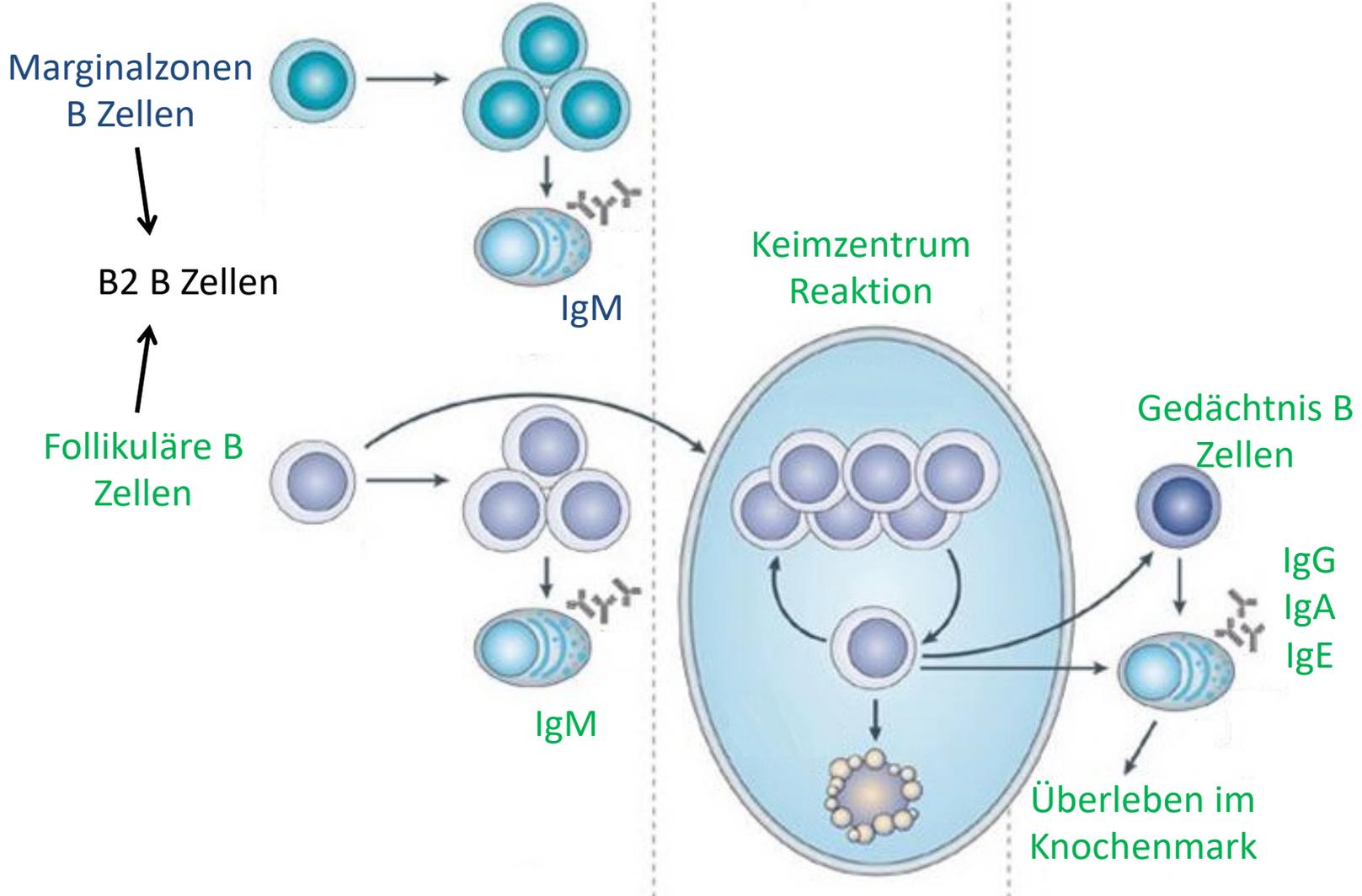
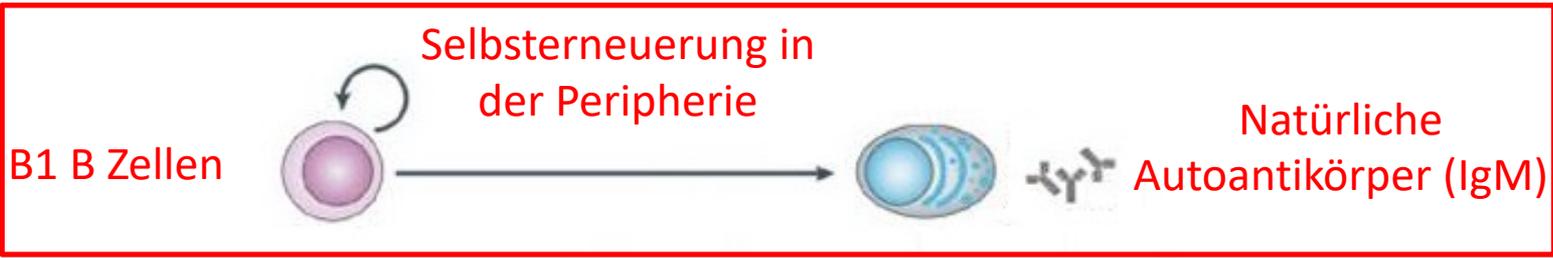
- Autoimmunität: Erkennung und Immunantwort gegen **Eigenantigene**.

## Natürliche Autoimmunität

- Immunregulatorische Funktion
- Antikörper Produktion ohne externe Stimuli
- **Natürliche Autoantikörper:**
  - **Niedrige Affinität**
  - **Polyspezifisch**
  - Vor allem **IgM**
  - niedrige Serumkonzentrationen
  - Von **B1 B Zellen** produziert

## Pathologische Autoimmunität

- Verursacht oder wird assoziiert mit Pathologischen Zuständen
- **Pathologische Autoantikörper:**
  - **Hohe Affinität**
  - **Monospezifisch**
  - Vor allem **IgG**
  - Hohe Serumkonzentrationen
  - Von **B2 B Zellen** produziert

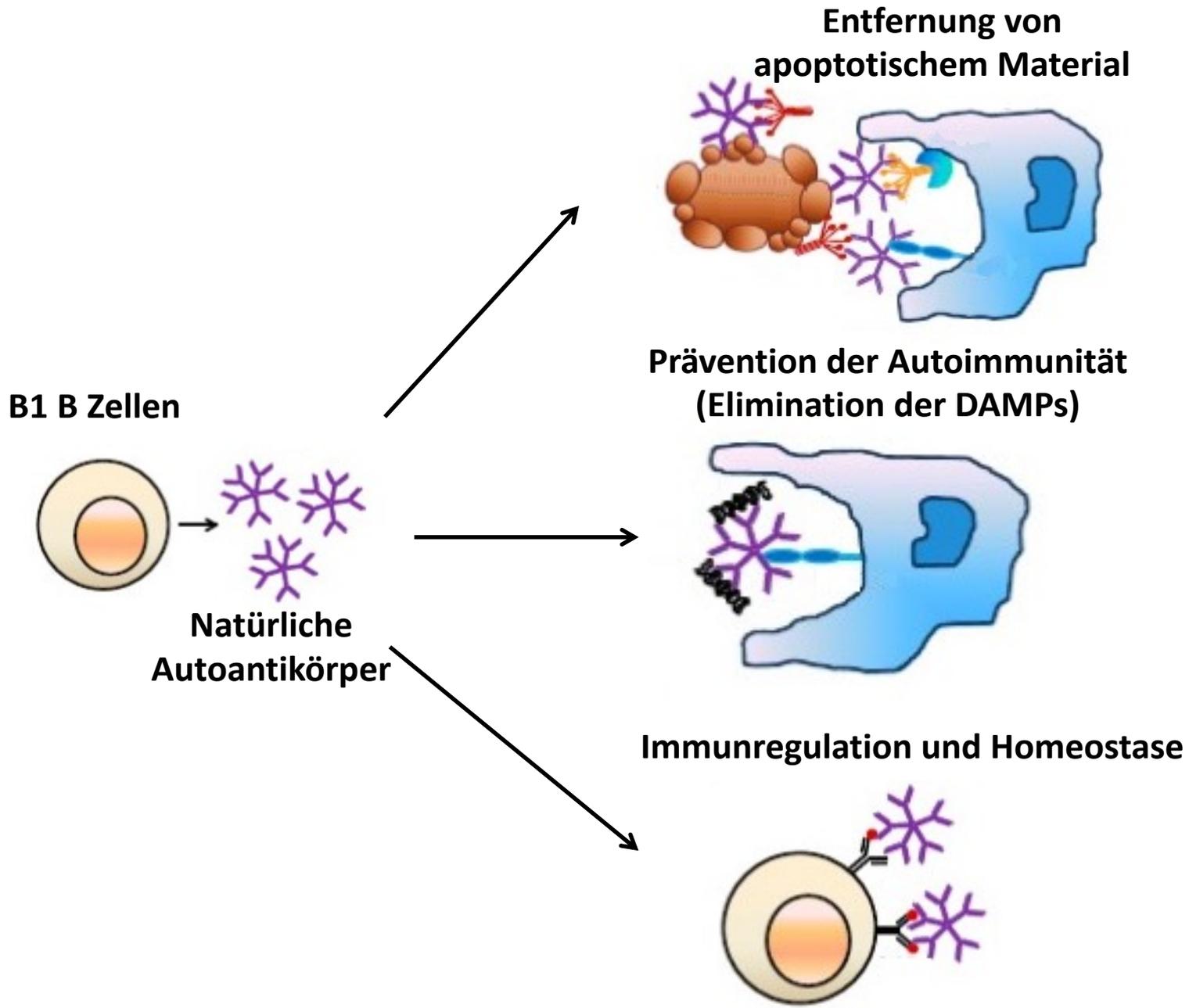


# Ziele natürlicher Autoantikörper

- **Evolutionär-konservierte** Strukturen die normalerweise in allen Zellen gefunden werden können, z.B.:
  - Hitzeschock-Proteine
  - Proteine des Zytoskeletts
  - Metabolische Enzyme
  - Nukleäre Strukturen
- Hypothetische Rolle: **Aufrechterhaltung der immunologischen Toleranz**, Entfernung von Eigenantigenen (z.B. DAMP: Damage-associated molecular pattern), Prävention der pathologischen autoimmunität
- Natürliche Autoantikörper sind ständig present und Ihre Repertoires sind konstant, unabhängig von Alter oder Geschlecht und **characteristisch für jedes Individuum**.

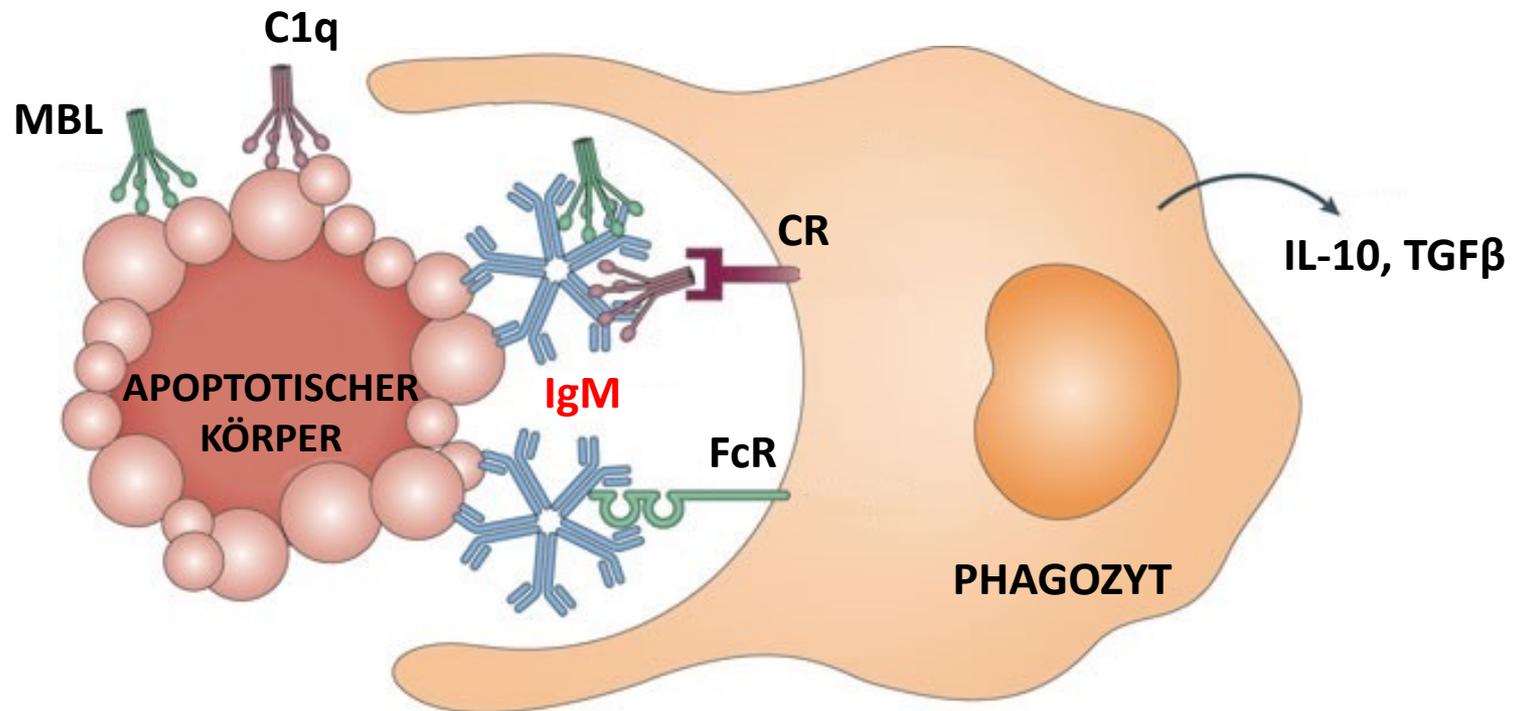


**Immunologischer Homunkulus oder Immunkulus**



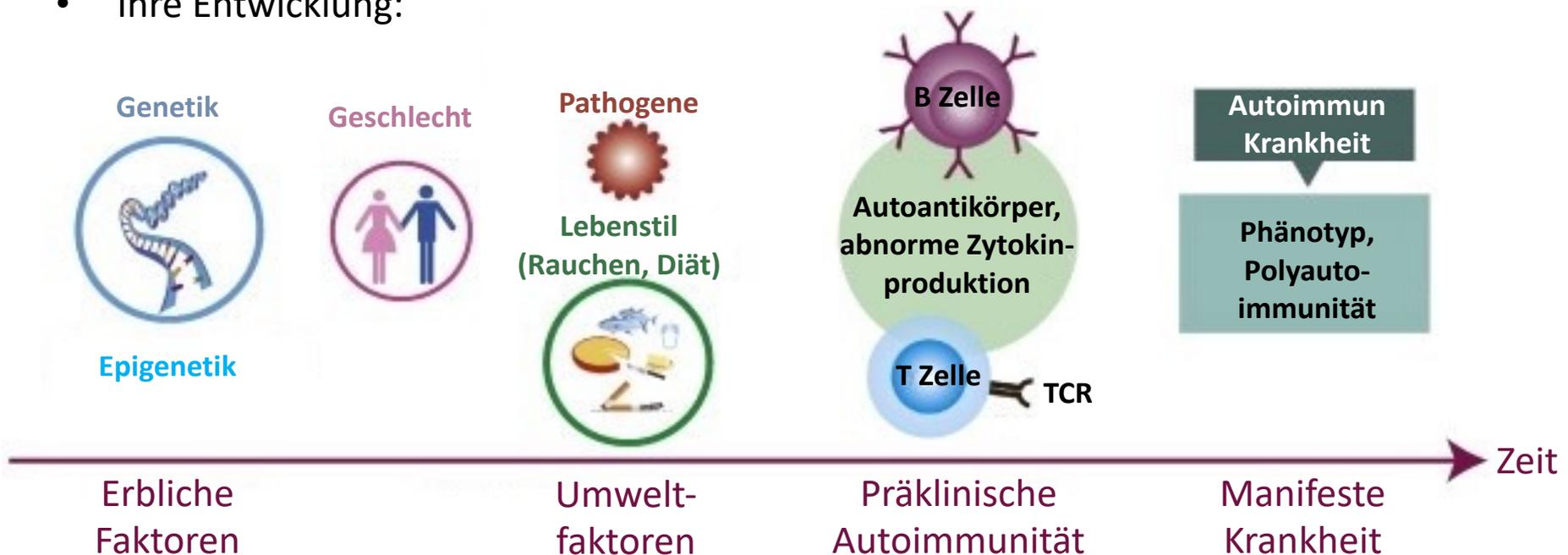
# Entfernung der Apoptotischen Körper

- Opsonisierung der apoptotischen Körper, Phagozytose via Fc und Komplementrezeptoren.



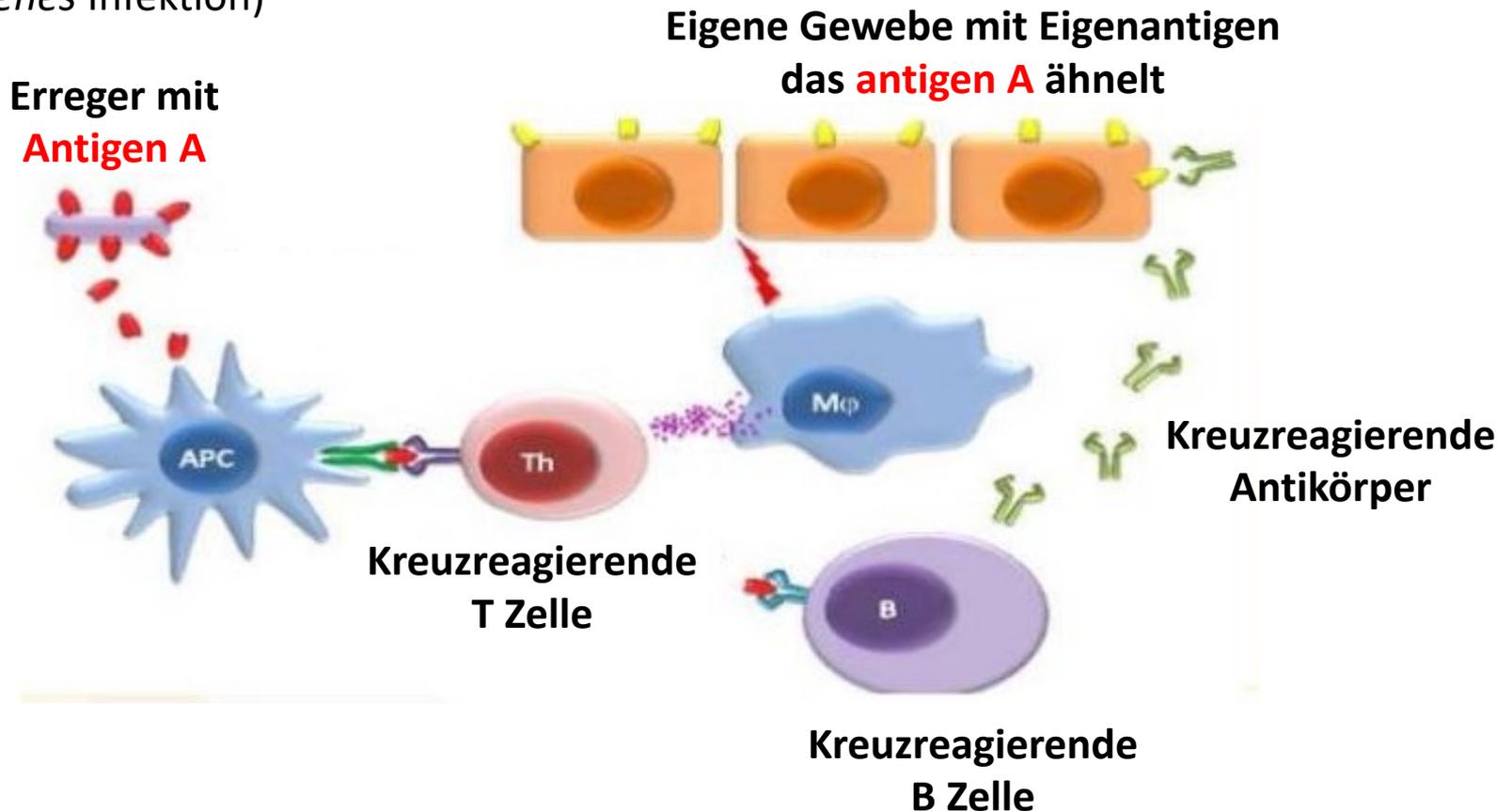
# Autoimmune Störungen

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

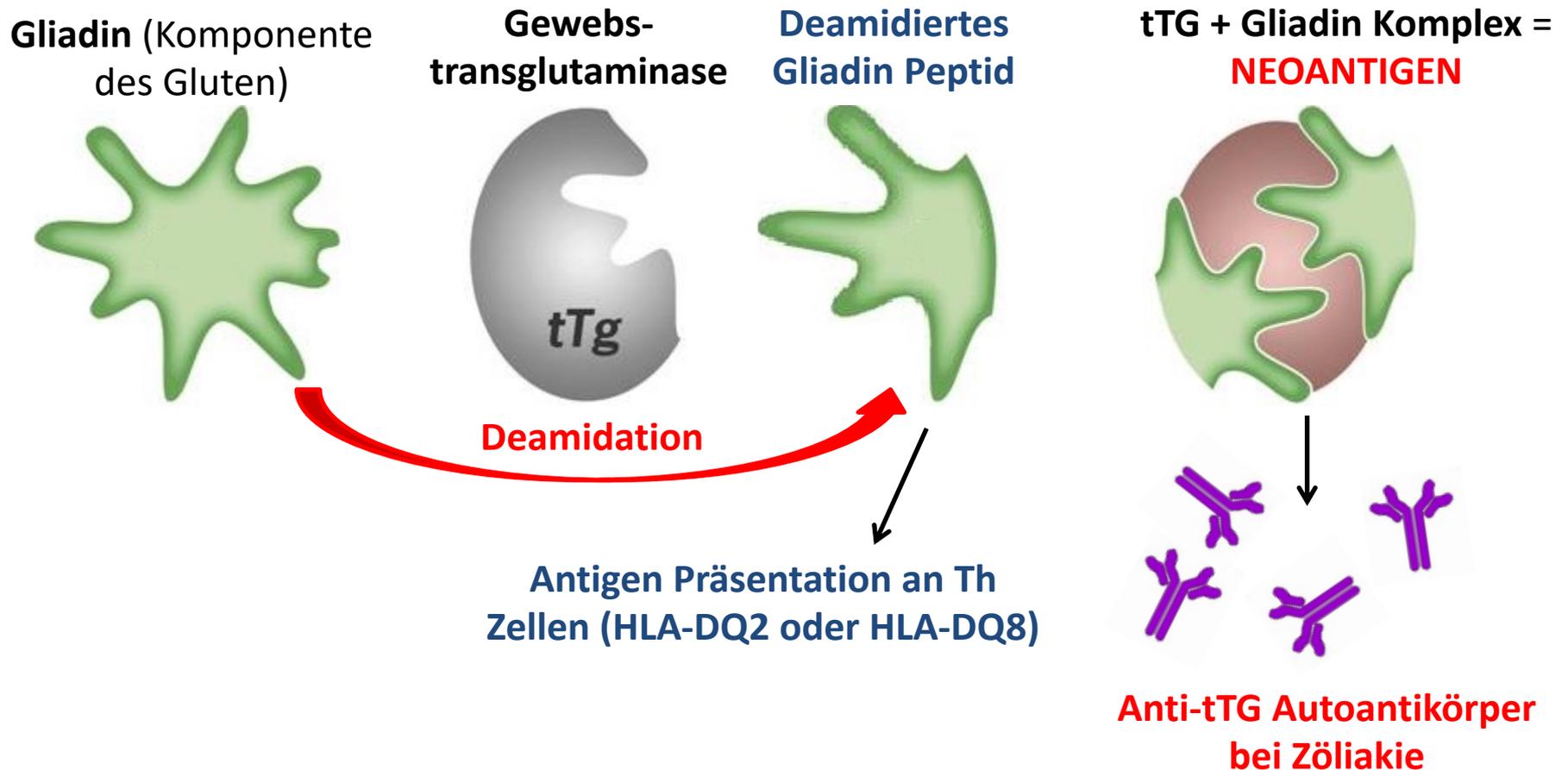


# Molekulare Mimikry

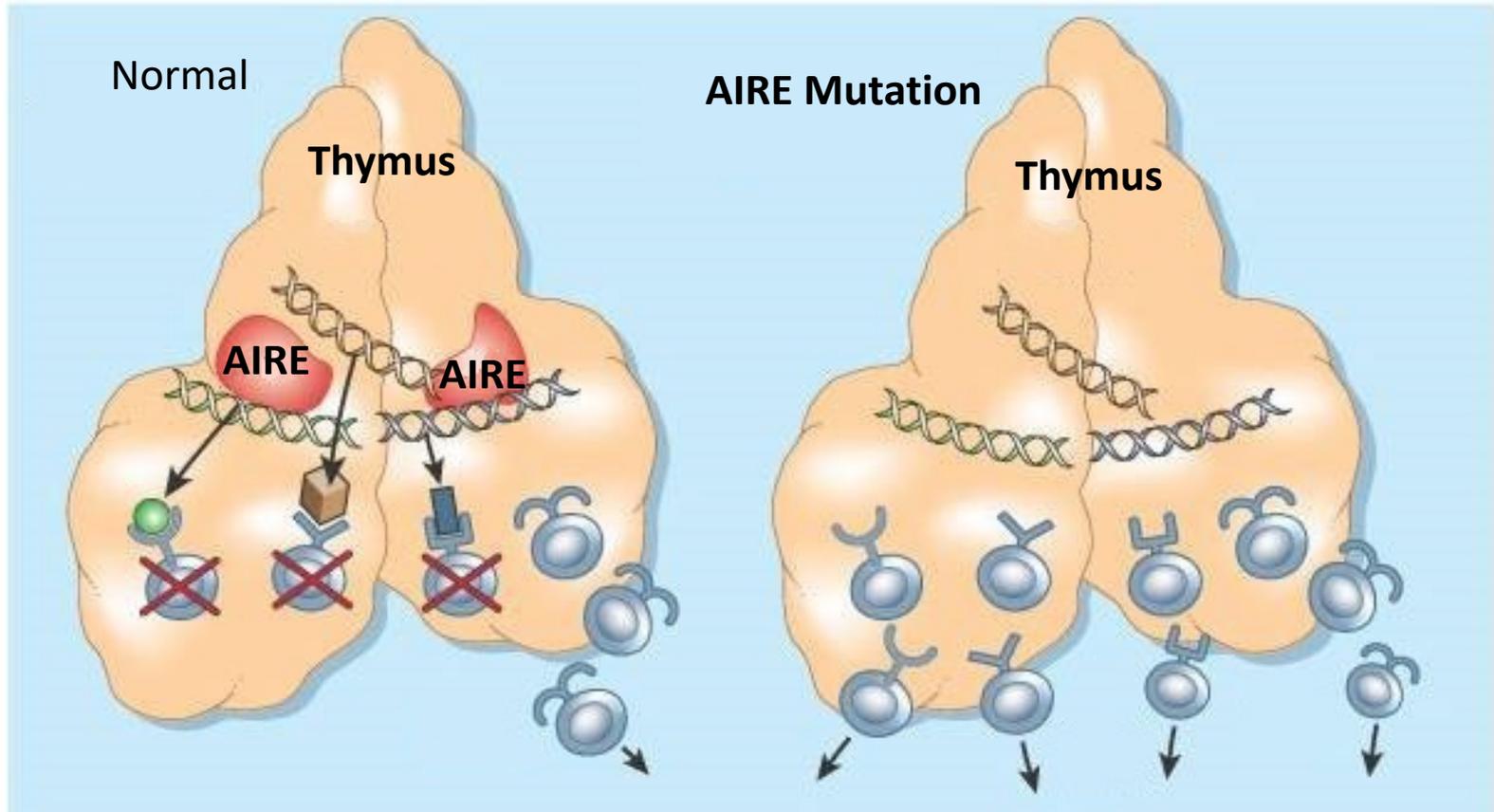
Das Antigen des Erregers teilt eine hochgradige **struktureller Ähnlichkeit** mit Eigenantigenen. → Kann zu **Kreuzreaktionen und Autoimmunität** in genetisch anfälligen Personen führen. (z.B. Rheumatisches Fieber nach *Streptococcus pyogenes* Infektion)



# Bildung von Neoantigenen



# Verlust der zentralen Toleranz



**Negative Auswahl**

Autoreaktive T Zellen in die Peripherie ausgeschieden

↙  
**APECED** (Autoimmune Polyendokrinopathie-Candidiasis - ektodermal Dystrophie)

# Klassifikation der Autoimmunkrankheiten

**Autoimmune Störungen**  
(siehe klinischer Teil)

**Systemische Krankheiten**  
(betreffen den ganzen Körper)

**Organspezifische Krankheiten**  
(betreffen ein bestimmtes Organ)



Rheumatoide Arthritis



Morbus Addison



Myasthenia gravis



Sklerodermie  
(Systemische Sklerose)



SLE (Systemischer Lupus  
Erythematosus)



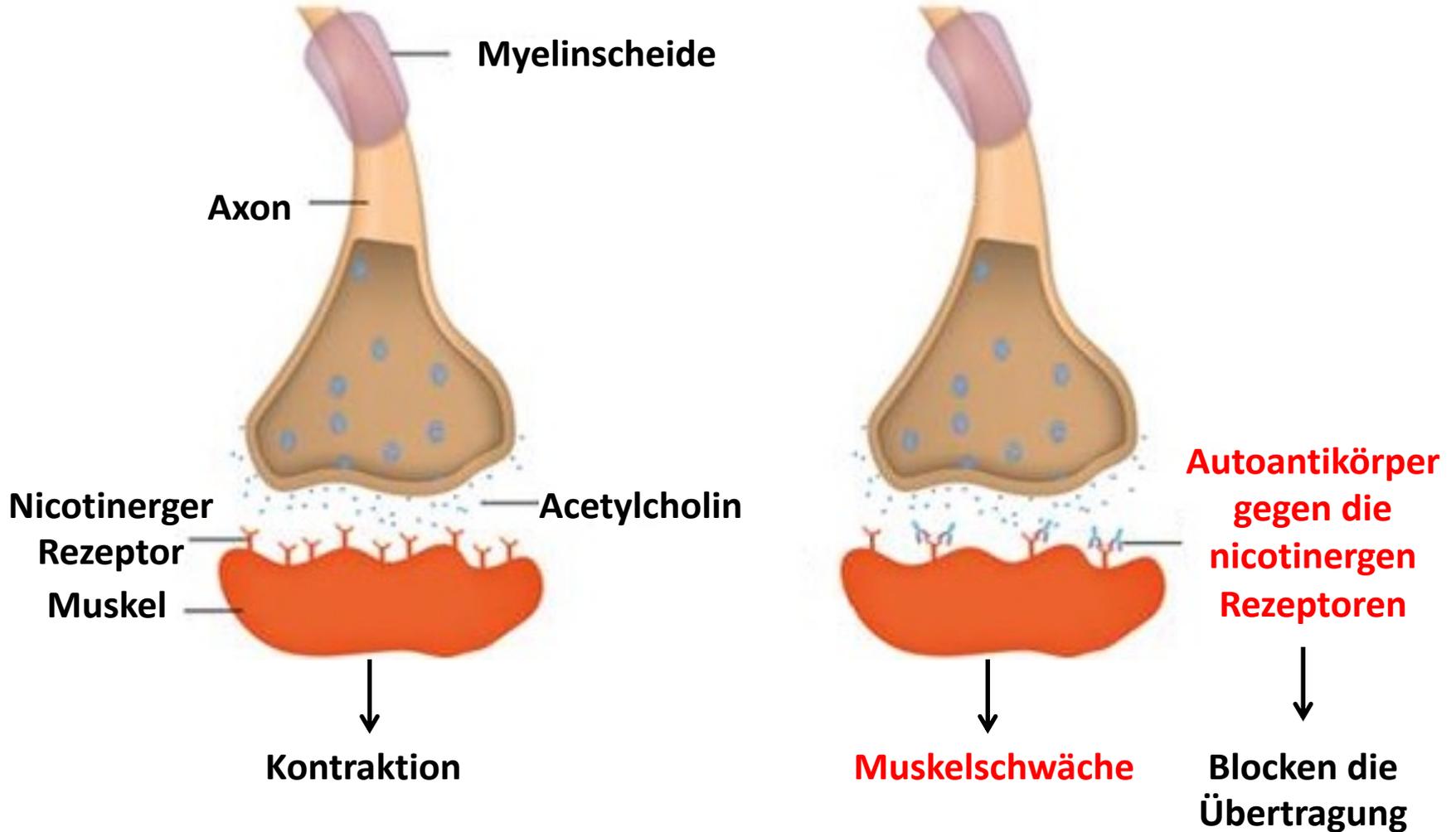
Morbus Graves-Basedow



# Organspezifische Autoantikörper

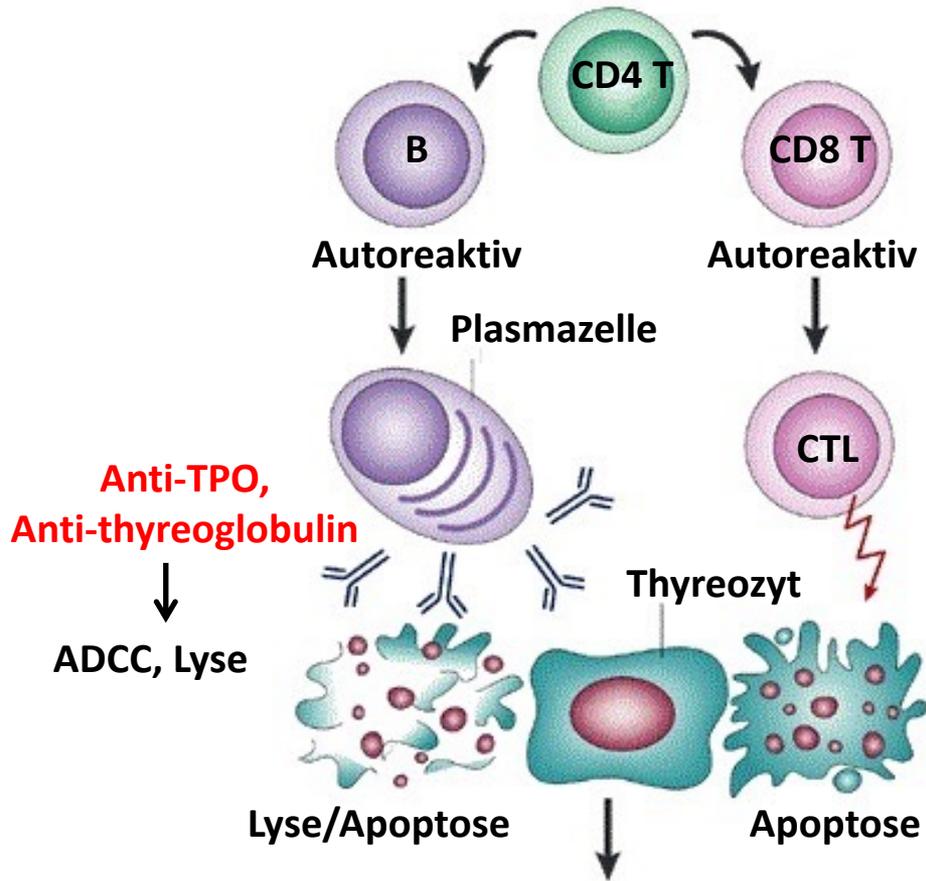
- Tauchen in organspezifischen autoimmunen Krankheiten auf.
- Einige Beispielziele von organspezifischen Autoantikörpern:
  - Typ I Diabetes Mellitus (T1D): Glutamat Decarboxylase (GAD), Tyrosin Phosphatase-like Protein (IA-2)
  - **Autoimmune Schilddrüsen Erkrankungen: Thyroperoxidase (TPO), Thyroglobulin**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

# Myasthenia gravis



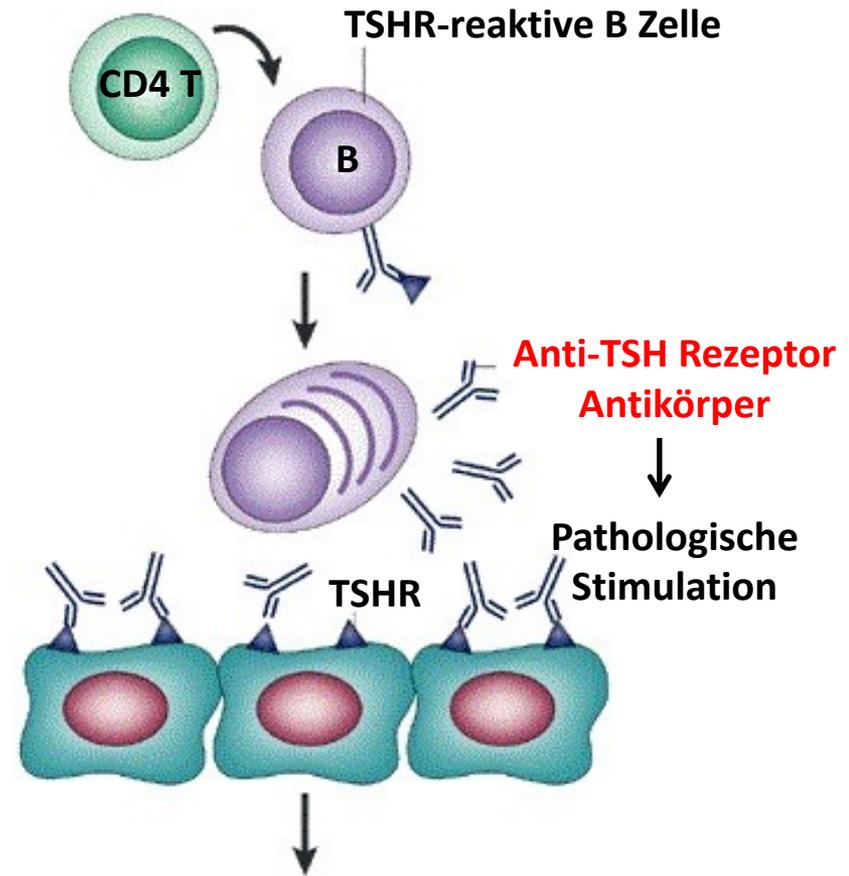
# Autoimmune Schilddrüsenerkrankungen

Hashimoto Thyroiditis:



**Hypothyroidismus**  
(T3/T4↓, TSH↑)

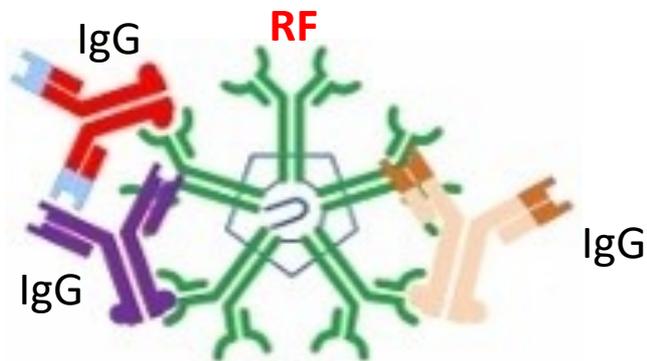
Morbus Graves-Basedow :



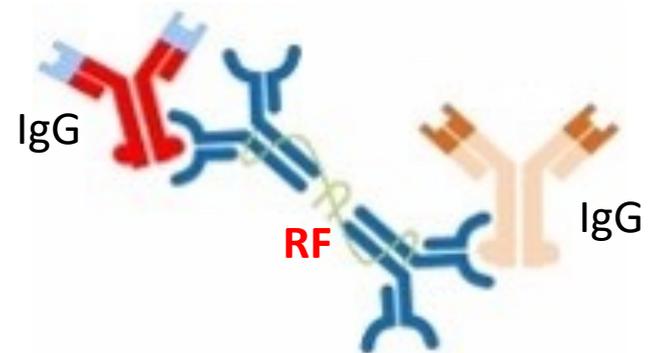
**Hyperthyroidismus**  
(T3/T4↑, TSH↓)

# Autoantikörper in Systemischen Krankheiten

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



Rheumafaktor des IgM Isotyps

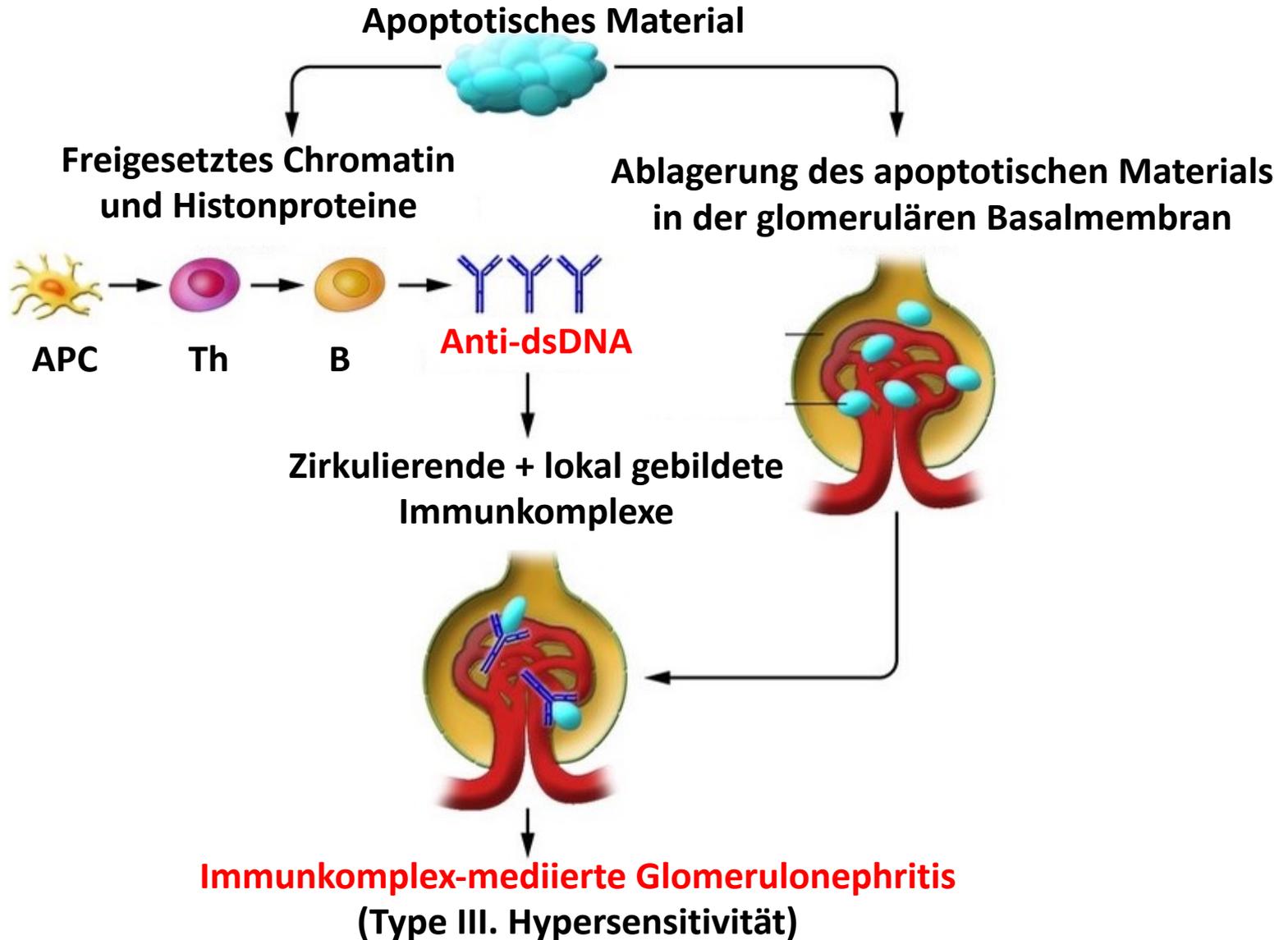


Rheumafaktor des IgA Isotyps

# Antinukleäre Antikörper (ANA)

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

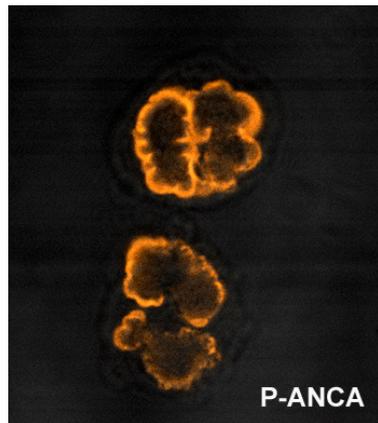
# Lupus Nephritis



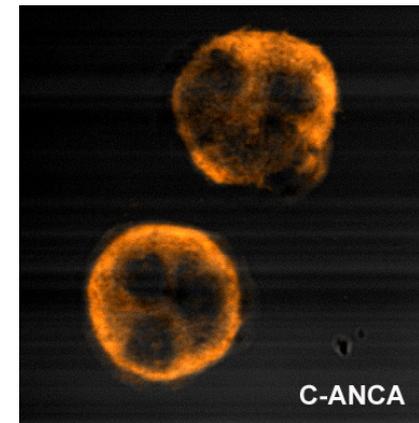
# Anti-Neutrophil Zytoplasmatische Antikörper (ANCA)

Zwei Haupttypen:

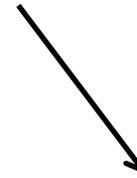
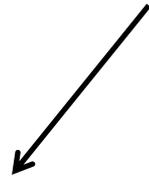
Perinukleäres Muster (p-ANCA)



Zytoplasmatisches Muster (c-ANCA)



Indirekte Immunfluoreszenz  
Mikroskopie



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

- Beispiele:

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

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

- Beispiele:

- Wegener Granulomatose (GPA: Granulomatose mit Polyangitis)

# Nachweis von Autoantikörpern

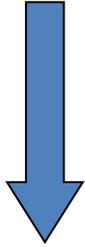
- **Screening:**
  - **Direkte Immunfluoreszenz:** Bei Gewebeproben des Patienten genutzt. (z.B. Dermatologische oder nephrologische Krankheiten, siehe klinische Phase)
  - **Indirekte Immunfluoreszenz:** Das Patientenserum wird in verschiedenen Zellkulturen oder Gewebstypen auf Autoantikörper getestet.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

} 6.-8.  
Praktiku  
m

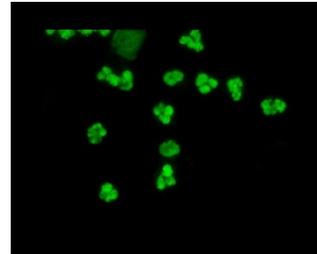


# Eigenschaften der Tests

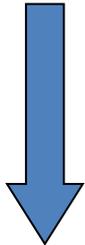
**Immunfluoreszenz:** nicht spezifisch, zeigt Muster, multiplex Bild, manuell, viele Autoantikörper können nicht nachgewiesen werden



Was ist das?



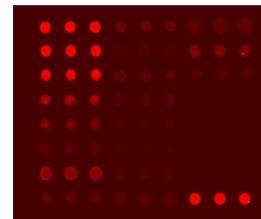
**ELISA:** antigenspezifisch, kann individuelle Autoantikörper messen, Kann automatisiert werden , kann neue Autoantigene identifizieren



Zeit?

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

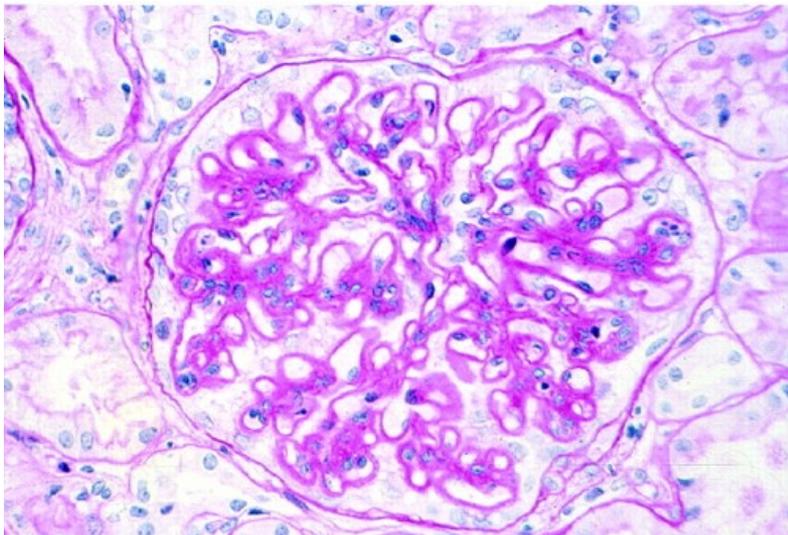
Schnell und spezifisch



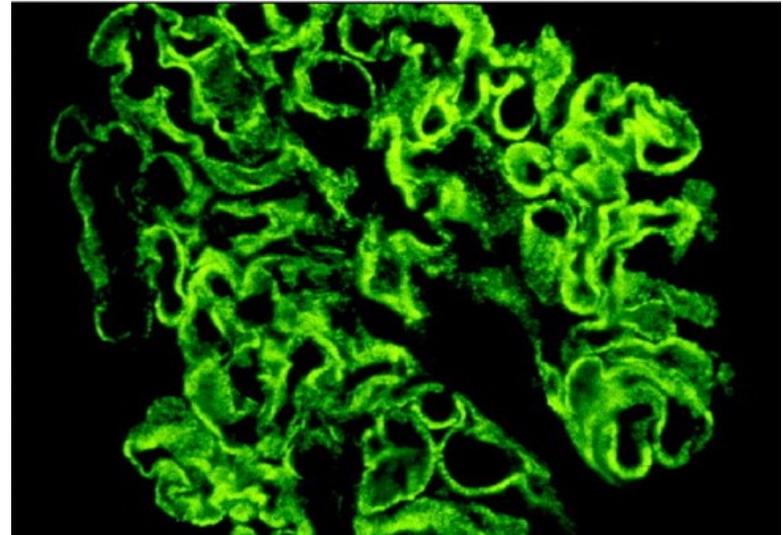
# Immunfluoreszenz I.

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

1. Biopsie aus der Patientenniere

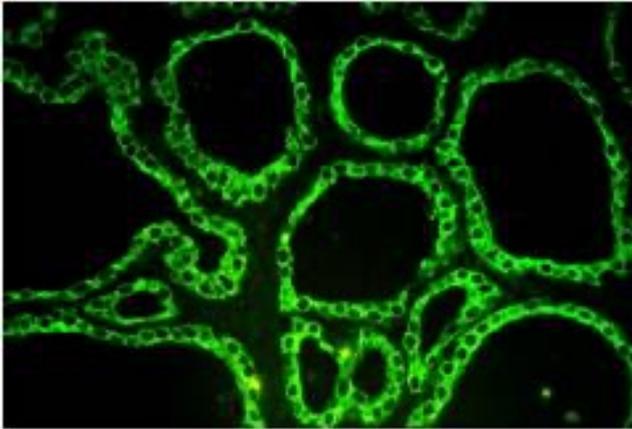


2. Glomerulus mit PAS Reaktion:  
dickere Basalmembran

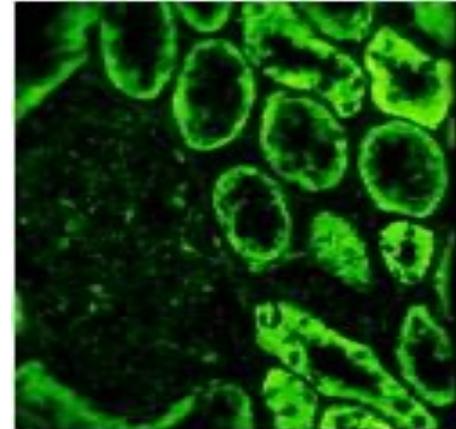


3. **Direkte IF** mikroskopisches Bild des Glomerulus:  
Ablagerung von **IgG Immunkomplexe** bei GBM  
(Type III. Hypersensitivität)

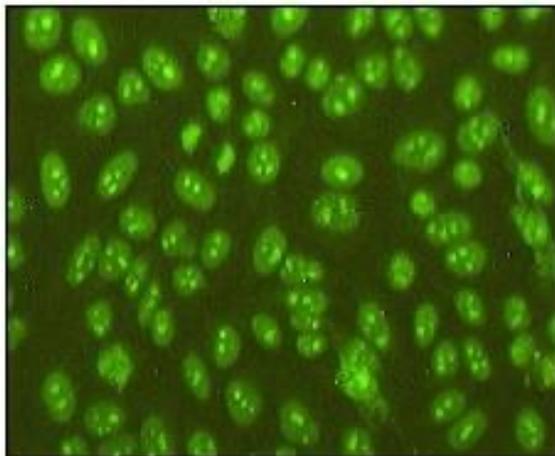
# Immunfluoreszenz II.



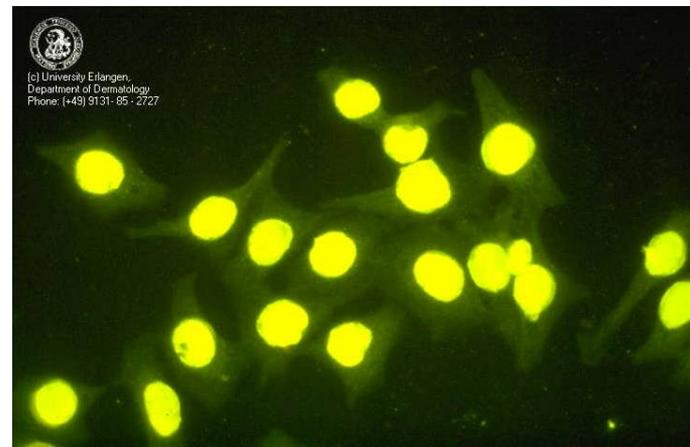
Anti-TPO Autoantikörper in einem  
Schilddrüsen Gewebsschnitt



Mitochondriales Färbungsmuster  
in Nierengewebe



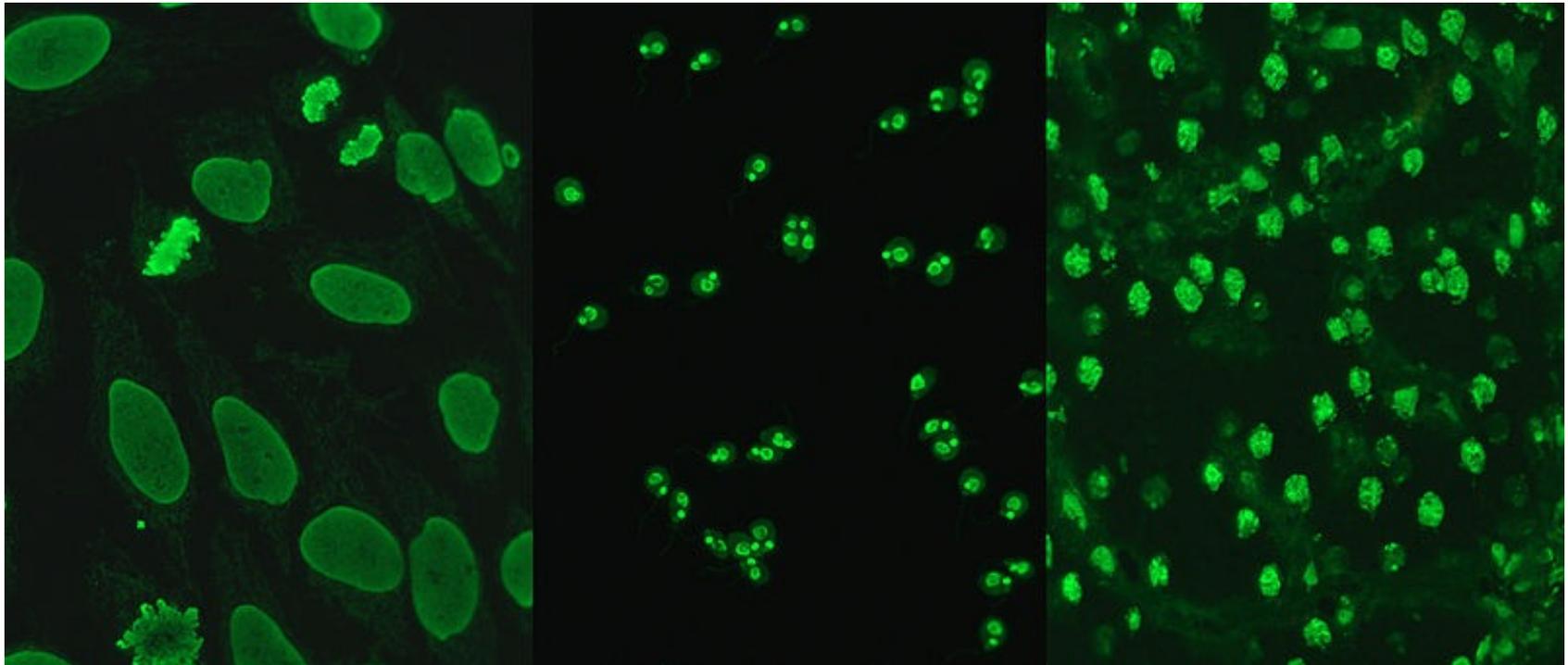
Nukleoläres Muster in  
Hep2 Zellen (anti-SSA)



Homogene nukleäre Färbung  
in Hep2 Zellen (anti-dsDNA)

# Immunfluoreszenz III.

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



HEp-20-10 Zellkultur  
(humaner epithelialer Tumor)

*Crithidia luciliae* Zellen  
(protist Parasit)

Rattenlebergewebe

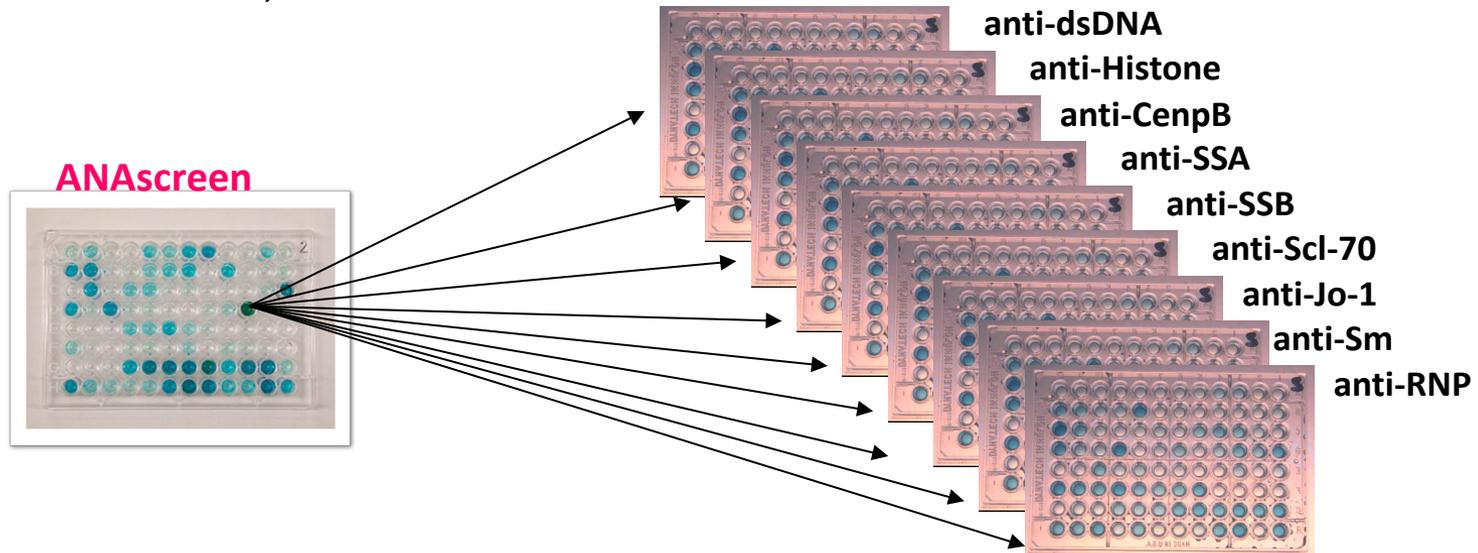
# ANAscreen - Mikroplatten ELISA

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

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



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



# Quellen (keine Reiehnfolge)

- Poletaev AB<sup>1</sup>, et al.: **Immunophysiology versus immunopathology: Natural autoimmunity in human health and disease.** *Pathophysiology*. 2012 Jun;19(3):221-31. doi: 10.1016/j.pathophys.2012.07.003. Epub 2012 Aug 9.
- Nguyen TT<sup>1</sup>, Elsner RA<sup>2</sup>, Baumgarth N<sup>3</sup>: **Natural IgM prevents autoimmunity by enforcing B cell central tolerance induction.** *J Immunol*. 2015 Feb 15;194(4):1489-502. doi: 10.4049/jimmunol.1401880. Epub 2015 Jan 16.
- Binder CJ<sup>1</sup>: **Naturally occurring IgM antibodies to oxidation-specific epitopes.** *Adv Exp Med Biol*. 2012;750:2-13. doi: 10.1007/978-1-4614-3461-0\_1.
- Lutz HU<sup>1</sup>: **Homeostatic roles of naturally occurring antibodies: an overview.** *J Autoimmun*. 2007 Dec;29(4):287-94. Epub 2007 Sep 12.
- Lutz HU<sup>1</sup>, Binder CJ, Kaveri S: **Naturally occurring auto-antibodies in homeostasis and disease.** *Trends Immunol*. 2009 Jan;30(1):43-51. doi: 10.1016/j.it.2008.10.002. Epub 2008 Dec 4.
- Aziz M<sup>1</sup>, et al.: **The role of B-1 cells in inflammation.** *Immunol Res*. 2015 Dec;63(1-3):153-66. doi: 10.1007/s12026-015-8708-3.
- Savage HP<sup>1,2</sup>, Baumgarth N<sup>1,2,3</sup>: **Characteristics of natural antibody-secreting cells.** *Ann N Y Acad Sci*. 2015 Jun 23. doi: 10.1111/nyas.12799.
- Grönwall C<sup>1</sup>, Vas J, Silverman GJ: **Protective Roles of Natural IgM Antibodies.** *Front Immunol*. 2012 Apr 4;3:66. doi: 10.3389/fimmu.2012.00066. eCollection 2012.
- Elkon K<sup>1</sup>, Casali P: **Nature and functions of autoantibodies.** *Nat Clin Pract Rheumatol*. 2008 Sep;4(9):491-8. doi: 10.1038/ncprheum0895.
- Grönwall C<sup>1</sup>, Silverman GJ: **Natural IgM: beneficial autoantibodies for the control of inflammatory and autoimmune disease.** *J Clin Immunol*. 2014 Jul;34 Suppl 1:S12-21. doi: 10.1007/s10875-014-0025-4. Epub 2014 Apr 2.
- Cohen IR<sup>1</sup>: **Biomarkers, self-antigens and the immunological homunculus.** *J Autoimmun*. 2007 Dec;29(4):246-9. Epub 2007 Sep 20.

# Quellen

- Vas J<sup>1</sup>, Grönwall C, Silverman GJ: **Fundamental roles of the innate-like repertoire of natural antibodies in immune homeostasis.** *Front Immunol.* 2013 Feb 5;4:4. doi: 10.3389/fimmu.2013.00004. eCollection 2013.
- Xu X<sup>1</sup>, et al.: **Human-derived natural antibodies: biomarkers and potential therapeutics.** *Future Neurol.* 2015;10(1):25-39.
- Casali P<sup>1</sup>, Schettino EW: **Structure and function of natural antibodies.** *Curr Top Microbiol Immunol.* 1996;210:167-79.
- Panda S<sup>1</sup>, Ding JL<sup>2</sup>: **Natural antibodies bridge innate and adaptive immunity.** *J Immunol.* 2015 Jan 1;194(1):13-20. doi: 10.4049/jimmunol.1400844.
- Mannoor K<sup>1</sup>, Xu Y, Chen C: **Natural autoantibodies and associated B cells in immunity and autoimmunity.** *Autoimmunity.* 2013 Mar;46(2):138-47. doi: 10.3109/08916934.2012.748753. Epub 2013 Jan 10.
- Madi A<sup>1</sup>, et al.: **The natural autoantibody repertoire in newborns and adults: a current overview.** *Adv Exp Med Biol.* 2012;750:198-212. doi: 10.1007/978-1-4614-3461-0\_15.
- Kaveri SV<sup>1</sup>: **Intravenous immunoglobulin: exploiting the potential of natural antibodies.** *Autoimmun Rev.* 2012 Sep;11(11):792-4. doi: 10.1016/j.autrev.2012.02.006. Epub 2012 Feb 12.
- Choi YS<sup>1</sup>, et al.: **B-1 cells in the bone marrow are a significant source of natural IgM.** *Eur J Immunol.* 2012 Jan;42(1):120-9. doi: 10.1002/eji.201141890. Epub 2011 Nov 28.
- Rahyab AS<sup>1</sup>, et al.: **Natural antibody - Biochemistry and functions.** *Glob J Biochem.* 2011;2(4):283-288.
- Baumgarth N<sup>1</sup>: **The double life of a B-1 cell: self-reactivity selects for protective effector functions.** *Nat Rev Immunol.* 2011 Jan;11(1):34-46. doi: 10.1038/nri2901. Epub 2010 Dec 10.
- Chan AY<sup>1,2</sup>, Anderson MS<sup>1</sup>: **Central tolerance to self revealed by the autoimmune regulator.** *Ann N Y Acad Sci.* 2015 Nov;1356:80-9. doi: 10.1111/nyas.12960.

# Quellen

- Anaya JM<sup>1</sup>: **The diagnosis and clinical significance of polyautoimmunity.** *Autoimmun Rev.* 2014 Apr-May;13(4-5):423-6. doi: 10.1016/j.autrev.2014.01.049. Epub 2014 Jan 11.
- Pisetsky DS<sup>1</sup>: **Anti-DNA antibodies - quintessential biomarkers of SLE.** *Nat Rev Rheumatol.* 2015 Nov 19. doi: 10.1038/nrrheum.2015.151.
- Czömpöly T<sup>1</sup>, et al.: **Anti-topoisomerase I autoantibodies in systemic sclerosis.** *Autoimmun Rev.* 2009 Jul;8(8):692-6. doi: 10.1016/j.autrev.2009.02.018. Epub 2009 Feb 13.
- Nihtyanova SI<sup>1</sup>, Denton CP: **Autoantibodies as predictive tools in systemic sclerosis.** *Nat Rev Rheumatol.* 2010 Feb;6(2):112-6. doi: 10.1038/nrrheum.2009.238.
- Liberal R<sup>1</sup>, et al.: **Diagnostic and clinical significance of anti-centromere antibodies in primary biliary cirrhosis.** *Clin Res Hepatol Gastroenterol.* 2013 Dec;37(6):572-85. doi: 10.1016/j.clinre.2013.04.005. Epub 2013 Jul 19.
- Zampieri S<sup>1</sup>, et al.: **Anti-Jo-1 antibodies.** *Autoimmunity.* 2005 Feb;38(1):73-8.
- Aggarwal A<sup>1</sup>: **Role of autoantibody testing.** *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2014 Dec;28(6):907-20. doi: 10.1016/j.berh.2015.04.010. Epub 2015 May 23.
- Csernok E<sup>1</sup>, Moosig F<sup>1</sup>: **Current and emerging techniques for ANCA detection in vasculitis.** *Nat Rev Rheumatol.* 2014 Aug;10(8):494-501. doi: 10.1038/nrrheum.2014.78. Epub 2014 Jun 3.
- Poletaev AB<sup>1</sup>, Stepanyuk VL, Gershwin ME: **Integrating immunity: the immunculus and self-reactivity.** *J Autoimmun.* 2008 Feb-Mar;30(1-2):68-73. doi: 10.1016/j.jaut.2007.11.012.
- Poletaev AB<sup>1</sup>: **The immunological homunculus (immunculus) in normal state and pathology.** *Biochemistry (Mosc).* 2002 May;67(5):600-8.