

Lymphozytendifferenzierung

Klinische Bedeutung

Lymphozyten sind **die** Spezialisten unseres Immunsystems, bestens angepasst an die Erkennung körperfremder Partikel oder entarteter, körpereigener Zellen durch ihre hochspezifischen Oberflächenrezeptoren.

In den letzten Jahren wurden gewaltige Fortschritte gemacht in der phänotypischen und funktionellen Charakterisierung einzelner Lymphozytensubgruppen sowie in deren Reifungsprozessen. Durch die Möglichkeit der durchflusszytometrischen Analyse der einzelnen Subgruppen steht uns ein wertvolles Mittel zur Verfügung, angeborene oder erworbene Störungen und Defekte des adaptiven Immunsystems aufzudecken.

Über die bisher bekannte und bewährte Basisdiagnostik der Lymphozytendifferenzierung hinaus bieten wir seit kurzem auch eine erweiterte Differenzierung an, die sowohl bei der Analyse der Immunkompetenz bei chronisch-entzündlichen Krankheitsbildern und malignen Tumoren, Autoimmunerkrankungen und Allergien, bei angeborenen und erworbenen Defektimmunopathien als auch bei der Planung und Überwachung zytostatischer oder immunsuppressiven Therapien von Nutzen sind.

Indikation

Mittels der Durchflusszytometrie können angeborene und erworbene zelluläre Immundefizite im Blut genauer untersucht werden, z.B. bei

- gehäuft wiederkehrenden bzw. persistierenden opportunistischen Infektionen durch Viren und Bakterien
- Autoimmunerkrankungen und Allergien
- Abklärung einer unklaren Lymphozytose oder Lymphopenie
- Analyse der Immunkompetenz bei Tumoren und chronischen Entzündungen
- Patienten unter zytostatischer oder immunsuppressiver Therapie oder Bestrahlung
- Verlaufskontrollen von Erkrankungen zwecks Aufschluss über den Fortschritt der Erkrankung, z.B. Monitoring einer HIV-Infektion
- Neigung zu Pilzinfektionen
- Parasitosen
- unklaren Lungenveränderungen und unklaren Infiltraten (in der bronchoalveolären Lavage)

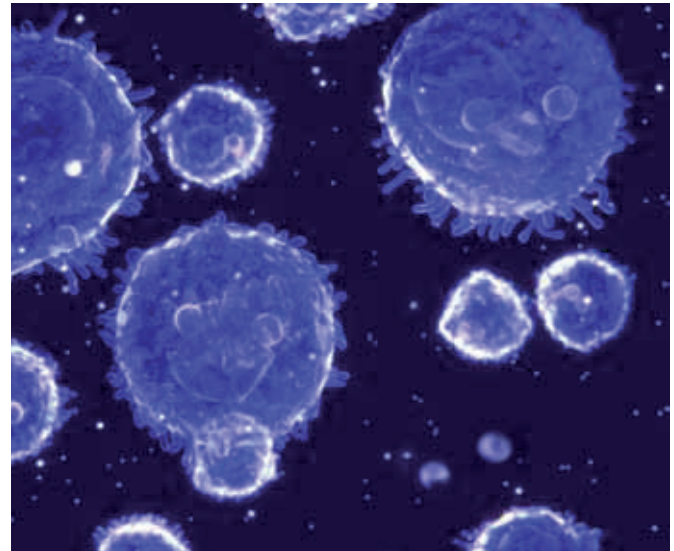


Abb 1.: Lymphozyten

Hintergrundinformationen zur Entwicklung und Funktion der Lymphozytensubpopulationen

Entwicklung der Lymphozyten

Die Lymphozyten entstehen aus im Knochenmark ansässigen Vorläuferzellen. B-Zellen (engl. bone marrow) und Natürliche Killerzellen (NK) wandern von dort aus direkt in die Peripherie. Die T-Zellen (engl. thymus) hingegen migrieren aus dem Knochenmark in den Thymus und durchlaufen dort eine positive und negative Selektion. Nach dieser Reifung exprimieren sie die Oberflächenrezeptoren CD4 oder CD8 und werden in die peripheren Blut- bzw. Lymphgefäße entsandt. Zeitnah aus dem Thymus migriert, exprimieren die T-Zellen noch CD31 und werden als Thymusreserve bzw. engl. recent thymic emigrants (RTE) bezeichnet. Sie entwickeln sich zu naiven T-Zellen, die noch keinen Antigenkontakt hatten und zwischen Blut und lymphatischem Gewebe patrouillieren. Entsprechend der Expression an Rezeptoren und ihrer damit verbundenen immunologischen Funktion werden die CD4+ T-Zellen als T-Helferzellen und die CD8+ T-Zellen als zytotoxische T-Zellen bezeichnet. Sie reifen nach Antigenkontakt aus und können u.a. zu regulatorischen T-Zellen oder zytotoxisch aktiven T-Zellen differenzieren.

Natürliche Killer-T-Zellen (NKT) sind eine weitere T-Zelllinie, die sich im Thymus entwickelt und neben dem T-Zellrezeptor einen weiteren Rezeptor besitzt, der Glycolipidantigene bakterieller Genese erkennt.



Abb. 2: Reifung und Differenzierung der Lymphozyten

Funktion der Lymphozyten

Die in Reifung und Funktion unterschiedlichen Lymphozytensubgruppen können mit Hilfe der spezifischen Expression an Oberflächenrezeptoren differenziert werden.

T-Zellen

T-Zellen (CD3+ Lymphozyten) erkennen mittels ihres T-Zell-Rezeptors und des Kofaktors CD3 Antigene und induzieren bzw. regulieren die zelluläre Immunabwehr. Vorläuferzellen wandern aus dem Knochenmark in den Thymus ein und durchlaufen dort eine Reifungs- und Prägungsphase.

Die T-Zellen sind erhöht bei viralen (z.B. Röteln) und bakteriellen (in der Überwindungsphase) Infektionen sowie Pilzinfektionen (z.B. Pneumocystis, Candida), Typhus, T-Zell-Leukämien und -Lymphomen und bei Rauchern.

Erniedrigte T-Zellen finden sich u. a. bei angeborenen (DiGeorge-Syndrom, SCID, Wiskott-Aldrich-Syndrom, Ataxia teleangiektasia/Louis-Bar-Syndrom) und erworbenen (malignen Erkrankungen, Infektionskrankheiten, z.B. AIDS, Tuberkulose) Immundefekten, nach Bestrahlung und Medikation mit Immunsuppressiva (z.B. Glukocortikoiden), Zytostatika oder Steroiden, bei chronischen Lebererkrankungen (z.B. Leberzirrhose, alkoholbedingte und nicht-alkoholbedingte Steatohepatitis, Hepatitis C), Verbrennungen, SLE und anderen Autoimmunerkrankungen, Cushing-Syndrom, Niereninsuffizienz und Eisenmangelanämie.

T-Helferzellen

T-Helferzellen (CD4+ Lymphozyten) sind eine heterogene Untergruppe der CD3+ Lymphozyten. Sie erkennen exogene Peptidantigene und aktivieren durch Ausschüttung von Zytokinen und direkten Zell-Zell-Kontakt weitere Zellen des Immunsystems. T-Helferzellen Typ 1 unterstützen die zellvermittelte Immunantwort durch Aktivierung von Makrophagen, zytotoxischen T-Zellen etc., T-Helferzellen Typ 2 induzieren die humorale Immunantwort durch die Interaktion mit B-Zellen.

Erhöhte T-Helferzelleraten findet man bei Allergien, Atopien und Autoimmunerkrankungen wie rheumatoider Arthritis, Multipler Sklerose und bakteriellen Infektionen sowie Pilzinfektionen.

Auch bei diversen T-Zell-Lymphomen z.B. dem Sezary-Syndrom (Kutanes T-Zell-Lymphom) sind die T-Helferzellen deutlich erhöht. Als

wichtiges diagnostisches Mittel einer Sarkoidose dient der Nachweis erhöhter T-Helferzelleraten in der bronchoalveolären Lavage.

Erniedrigte T-Helferzellen treten bei zellulären Immundefekten (angeboren oder erworben, z. B. idiopathische CD4 Lymphopenie, AIDS), passager bei Virusinfektionen, bei Rauchern, Einnahme bestimmter Medikamente, bei Sportlern nach exzessivem Training, Eisenmangelanämie und bei Patienten mit Tuberkulose auf.

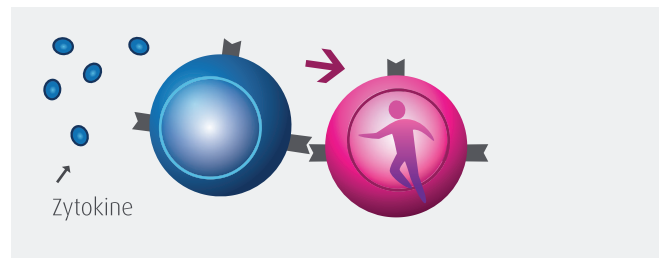


Abb. 3: T-Helferzellen aktivieren über Rezeptorbindung und Zytokinfreisetzung andere Immunzellen

Naive T-Zellen und Thymusreserve

Naive T-Zellen (CD3+CD4+CD45RA+) sind noch ruhende, nicht aktivierte T-Zellen mit einem breiten Antigenrezeptor-Repertoire, die noch keinen Antigenkontakt hatten. Sie sind in der Lage, dem Immunsystem noch unbekannte Antigene zu präsentieren und eine adaptive Immunantwort einzuleiten.

Erhöhte Spiegel an naiven T-Zellen kommen bei jungen Menschen vor und nehmen stetig mit zunehmendem Alter ab, da im Laufe des Lebens durch den ständigen Antigenkontakt die Zellen nach und nach aktiviert werden und reifen. Bei gesteigerter Lymphozytopoese (reaktiv, z.B. bei Virus-Infektion) nimmt der relative Anteil an naiven T-Zellen zu.

Erniedrigte Spiegel an naive T-Zellen sind bei chronischer Immunschwächung, z.B. chronischen Infektionen mit Hepatitis B und C, Tuberkulose, gestörter Lymphozytopoese, direkt nach Tumorthherapie und nach bestimmten Medikationen (z.B. Fingolimod bei MS-Therapie) zu finden.

Thymusreserve: Die Bestimmung von zeitnah aus dem Thymus migrierten T-Zellen (CD3+CD4+CD45RA+CD31+), auch „recent thymic emigrants“ (RTE) genannt, dient zur Abschätzung der Fähigkeit des Thymus, neue, naive T-Zellen in die Peripherie zu entsenden. Im Laufe des Lebens nimmt die Thymusaktivität stetig ab. Die Bestimmung der Thymusreserve kann als prognostischer Marker für die Einschätzung der T-Zellregenerationsfähigkeit nach einer Transplantation mit anschließender Immunsuppression oder Chemo- oder Strahlentherapie fungieren.

Erhöhte Werte an CD31+ T-Zellen sind messbar unter Therapie mit Thymuspeptiden, durch Hemmung proinflammatorischer Mediatoren (z.B. TNF) und nach Stammzelltransplantation.

Eine erniedrigte Thymusreserve tritt bei viralen Infektionen (HIV, HCV), Autoimmunerkrankungen wie MS, RA, Strahlen- oder Chemotherapie, Therapie mit proinflammatorischen Faktoren (IFN α) und Patienten mit T-Zellanomalien wie dem Allgemeinen variablen Immundefekt (CVID) auf.

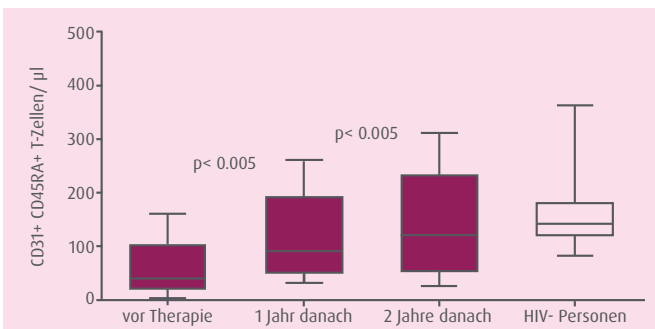
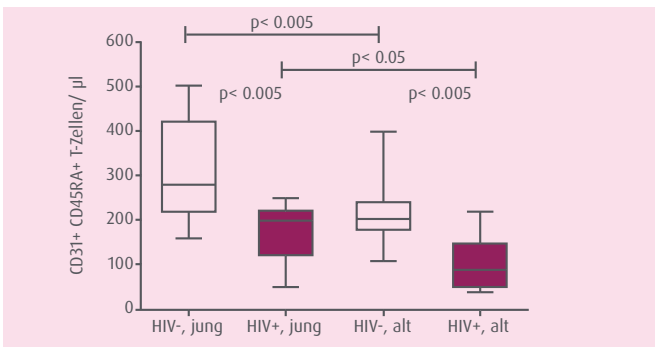


Abb. 4: adaptiert aus Rickabaugh et al. 2011: CD45RA+CD31+ T-Zellen sind bei HIV-positiven Patienten erniedrigt im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen (HIV-) in Altersabhängigkeit (jung: 19-32 Jahre, alt: 39-60 Jahre). Nach HIV-Therapie steigen die Werte wieder auf Normalniveau an.

Regulatorische T-Zellen

Regulatorische T-Zellen (Treg, CD4+CD25+CD127-) sind eine Untergruppe der T-Helferzellen. Sie wirken regulatorisch/supprimierend auf die Zellen des aktivierten Immunsystems und spielen eine wichtige Rolle bei der Ausbildung der Selbsttoleranz und Beendigung der Immunantwort in der Spätphase einer Infektion. Sie steuern zudem den Verlauf von Allergien, Autoimmunerkrankungen, Tumorwachstum und Transplantationen.

Regulatorische T-Zellen sind erhöht in der Spätphase von Infektionen, bei Tumoren, bei Parasitosen und in der Schwangerschaft. Einen protektiven Effekt haben sie bei Infektionen mit Viren wie HIV, bei Parasiten wie Toxoplasmen oder Plasmodien und bei Candida-Pilzinfektionen. Nachteilig wirken sie sich aus bei bakteriellen Infekten mit z.B. Salmonellen sowie Mykobakterien.

Regulatorische T-Zellen sind erniedrigt bei Allergien und Autoimmunerkrankungen sowie bei Abstoßungsreaktionen nach Transplantationen.

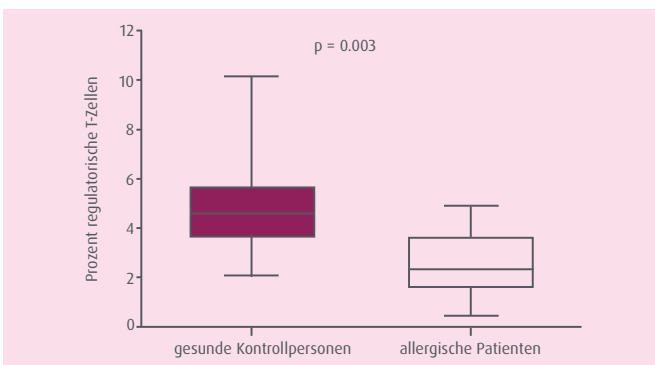


Abb. 5: adaptiert aus Stelmaszyk-Emmel et al. 2012: Regulatorische T-Zellen sind reduziert bei Kindern mit atopischer Allergie.

Zytotoxische T-Zellen

Zytotoxische T-Zellen (CD8+ Lymphozyten) sind eine weitere Untergruppe der CD3+ Lymphozyten. Sie erkennen endogene Peptidantigene und werden unter Vermittlung der T-Helferzellen aktiviert. Sie können direkt an Zielzellen binden und deren Apoptose (Zelltod) auslösen.

Zytotoxische T-Zellen sind erniedrigt u. a. bei zellulären Immundefekten, bei Multipler Sklerose, außerdem bei Einnahme bestimmter Medikamente sowie passager bei körperlicher Belastung.

Zytotoxische T-Zellen sind typischerweise erhöht bei einer lymphotropen Virusinfektion und akuten Hepatitis B.

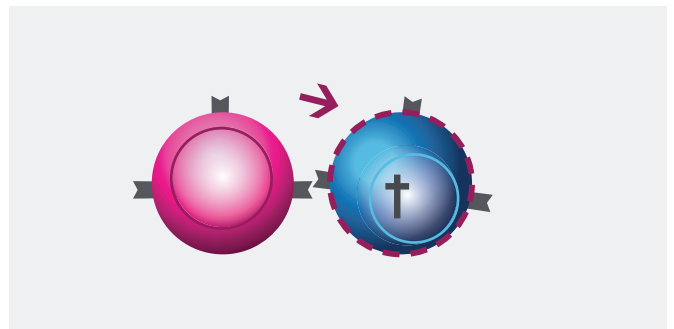


Abb. 6: Zytotoxisch aktive T-Zellen induzieren den Zelltod von Zielzellen.

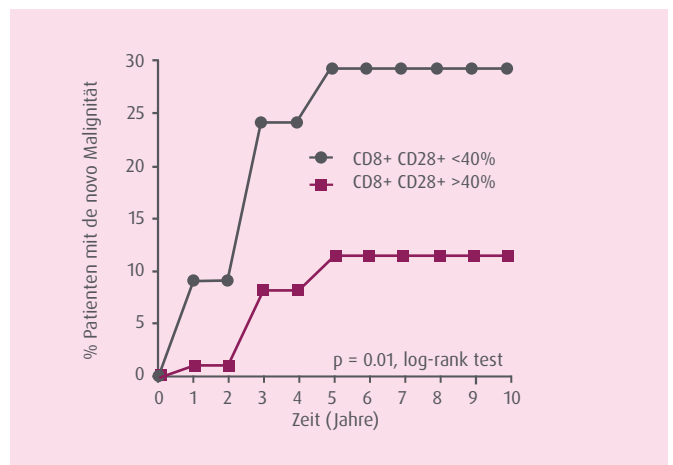
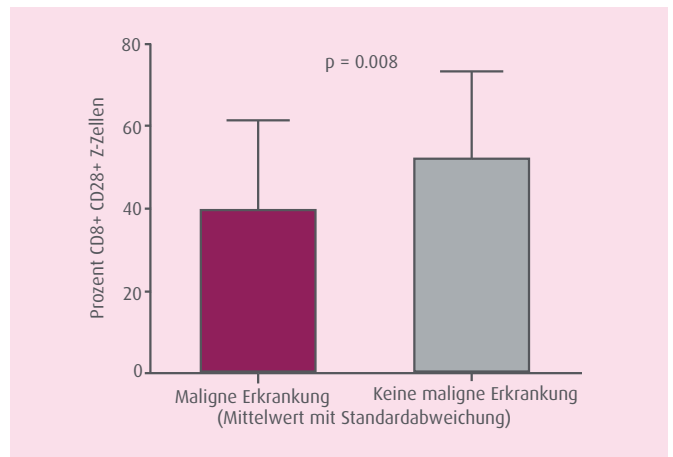


Abb. 7: adaptiert aus Boleslawski et al. 2011: Patienten mit malignen Erkrankungen weisen weniger zytotoxisch aktive T-Zellen auf. Patienten mit niedrigerem Anteil an zytotoxisch aktiven T-Zellen (<40%) entwickeln häufiger erneut eine Krebserkrankung.

Zelltyp	Spezifische Marker	Funktion
T-Zellen	CD3+	Induktion und Regulation der zellulären Immunabwehr
T-Helferzellen	CD3+CD4+	Induktion der zellvermittelten und humoralen Immunantwort, Antigenpräsentation
Naive T-Zellen	CD4+CD45RA+	T-Zellen ohne Antigenkontakt
Thymusreserve	CD4+CD45RA+CD31+	Zeitnah aus dem Thymus migrierte Zellen als Maß für die Thymusaktivität
Regulatorische T-Zellen	CD4+CD25+CD127-	Regulation des aktivierten Immunsystems
Zytotoxische T-Zellen	CD3+CD8+	Zerstörung von Zielzellen, aber auch suppressorische Eigenschaften
Zytotoxisch aktive T-Zellen	CD8+CD28+	Zerstörung von Zielzellen
Aktivierte T-Zellen	CD3+HLA-DR+	Antigen-Präsentation
Natürliche Killer-T-Zellen	CD3+CD16+/CD56+	Abwehr von Virusinfekten, lysieren entartete Zellen antigenspezifisch
B-Zellen	CD19+	Humorale Immunantwort, Expression und Freisetzung von Immunglobulinen
Natürliche Killerzellen	CD16+/CD56+	Angeborene Immunabwehr, lysieren infizierte Zellen und Tumorzellen antigenunspezifisch

Tabelle 1: Subgruppen der Lymphozyten und deren Marker und wichtigste Funktion.

Zytotoxisch aktive T-Zellen

Zytotoxisch aktive T-Zellen (CD3+CD8+CD28+) agieren gegen viren-befallene oder entartete körpereigene Zellen.

Erhöhte zytotoxisch aktive T-Zellen treten in der frühen Phase von viralen Infektionen auf.

Erniedrigte zytotoxisch aktive T-Zellen findet man bei Tumorpatienten, Autoimmunerkrankungen, latent virusinfizierten Patienten (HIV, Hepatitis), Multipler Sklerose und im hohen Alter.

CD4/CD8-Ratio

Die CD4/CD8-Ratio beschreibt das Verhältnis der T-Helfer-Zellen zu den zytotoxischen T-Zellen.

Die CD4/CD8-Ratio ist erhöht bei rheumatoider Arthritis, insulin-abhängigem Diabetes mellitus, Systemischem Lupus Erythematoses ohne Nierenschaden, primär biliärer Zirrhose, atopischer Dermatitis, Sezary-Syndrom, Psoriasis, Autoimmunhepatitis und Multipler Sklerose im akuten Schub. Eine deutliche Erhöhung tritt bei chronischen CD4+ T-Zellleukämien auf.

Eine erhöhte CD4/CD8-Ratio in der bronchoalveolären Lavage weist auf eine Sarkoidose oder Pneumokoniose (Berylliose, Asbestose) hin.

Die CD4/CD8-Ratio ist erniedrigt bei akuten Virusinfekten (EBV, CMV, Herpes, Masern), Systemischem Lupus Erythematoses mit Nierenschaden, Verbrennungen, Transplantatabstoßungen, sportlicher Belastung, Myelodysplasien, T-Zellleukämien mit CD8+ Leukämiezellen und Tumoren sowie bei Bestrahlungs-, Chemo- oder Cortisontherapien. Ist die CD4/CD8-Ratio in der BAL erniedrigt, kann es sich um eine exogen-allergische Alveolitis oder auch um eine medikamentös induzierte Alveolitis, eine kryptogene organisierende Pneumonie (COP), Eosinophile Pneumonie oder um ein Churg-Strauss-Syndrom handeln.

Aktivierte T-Lymphozyten

Aktivierte T-Zellen sind CD3+ Lymphozyten, die HLA-DR auf der Zelloberfläche exprimieren (CD3+HLA-DR+). HLA-DR ist ein MHC Klasse II-Rezeptor, der Antigene aufnehmen und anderen Immunzellen präsentieren kann.

Ein erhöhter Anteil aktivierten T-Lymphozyten wird bei systemischen Virusinfektionen, Autoimmunerkrankungen, Allergien, Verbrennungen, Kokainabusus, bestimmten Karzinomen, medikamentöser Immunstimulation und in der Schwangerschaft gemessen.

Indikation/Zelltyp	T-Zellen	T-Helferzellen	Naive T-Zellen	Thymusreserve	Regulatorische T-Zellen	Zytotoxische T-Zellen	Zytotoxisch aktive T-Zellen	Natürliche Killer-T-Zellen	B-Zellen	Natürliche Killer-Zellen
Allergien/ Autoimmunerkrankungen	■	■	■	■	■	■	■	■	■	
Maligne Erkrankungen	■	■	(■) vor Therapie	(■) vor Therapie	■	■	■	■	(■) B-Zell-Lymphom/Leukämie	■
Bestrahlung/ Medikation	■	■	■	■					(■) Anti-CD20-Therapie	
Chronische Infektionen, Infektanfälligkeit	■	■	■	■	■	■		■	■	
Angeborene/ erworbene Immundefekte	■	■				■			■	■
Virusinfektion	■	(■) HIV				■	■			■
Parasitosen					■					
Transplantationen	■	■			■	■	■			

Tabelle 2: Indikationen für Lymphozytendifferenzierung

Natürliche Killer-T-Zellen

Natürliche Killer-T-Zellen (NK-T-Zellen, CD3+CD16+/CD56+) sind eine Untergruppe der Lymphozyten, die Gemeinsamkeiten mit NK-Zellen haben. Sie erkennen Lipid- und Glykolipidantigene, die auf CD1d-Rezeptoren präsentiert werden, und zeichnen sich durch eine schnelle Zytokinantwort aus.

NK-T-Zellen sind bei der Abwehr von Erregern, insbesondere Mykobakterien, sowie bei der Regulation der Immunabwehr beteiligt. Ein Mangel oder eine Dysfunktion der NK-T-Zellen wird bei Autoimmunerkrankungen und Krebserkrankungen beobachtet.

B-Zellen

B-Zellen (CD19+ Lymphozyten) sind Effektorzellen der humoralen Immunabwehr und können nach Antigenkontakt zu Plasmazellen (Sekretion von Antikörpern) und B-Gedächtniszellen differenzieren. Im Gegensatz zu den T-Zellen findet die Reifung direkt am Bildungs-ort, dem Knochenmark (engl. bone marrow), statt.

Deutlich erhöhte B-Zellen (> 5.000 B-Zellen/ μ l) sprechen für eine B-Zellen-Leukämie. Erhöhte B-Zell-Spiegel treten auch im Rahmen einer monoklonalen B-Zell-Lymphozytose auf.

Erniedrigte B-Zellen finden sich bei angeborenen und erworbenen Immundefekten (z.B. SCID) und bei Therapie mit Anti-CD20-Antikörpern (z.B. Rituximab).

Natürliche Killerzellen

Natürliche Killerzellen (NK-Zellen, CD3-CD16+/CD56+) sind Effektorzellen des angeborenen Immunsystems. Sie töten Tumorzellen und virusbefallene Körperzellen ab, indem sie deren Apoptose auslösen.

Erhöhte NK-Zellen sind meßbar bei Virusinfektionen, Mykoplasmen-Infektion oder nach medikamentöser Immunstimulation sowie bei NK-Zell-Leukämie (selten).

Erniedrigte NK-Zellen werden bei progredientem Tumorwachstum, bei Rauchern, passager bei körperlicher Belastung und während einer kalorienarmen Diät gemessen.

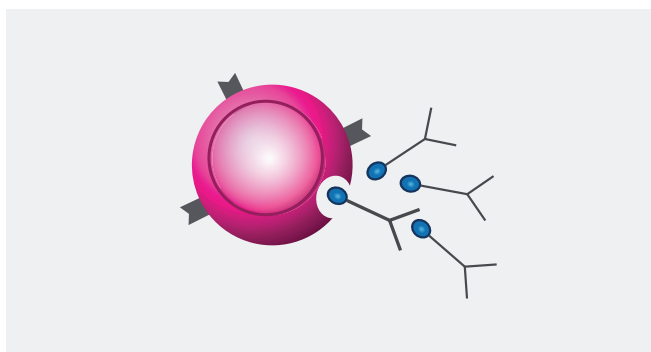


Abb. 8: B-Zellen differenzieren nach Antigenkontakt zu Plasmazellen und schütten Immunglobuline aus.

Labordiagnostik

Die Zelloberflächenmoleküle werden mit Hilfe monoklonaler, fluorchrommarkierter Antikörper identifiziert. Die Blutzellen werden mit einem Antikörpermix gegen die gesuchte Zellpopulation inkubiert. Im Durchflusszytometer werden die Zellen vereinzelt und die Fluoreszenzfarbstoffe der gebundenen Antikörper während der Passage durch einen Laserstrahl angeregt.

Detektoren zeichnen die unterschiedlichen Farbsignale pro Zelle auf. Für jede Zelle kann nun bestimmt werden, welche Oberflächenmoleküle sie exprimiert und somit um welche Zelle es sich handelt.

Hinweise zu Präanalytik und Abrechnung

Probenmaterial			1 ml EDTA-Blut		
Probentransport			Standardtransport, ungekühlt, innerhalb 8 Stunden ins Labor senden		
Methode			Durchflusszytometrie		
	EBM		GOÄ	1-fach	1,15-fach
Basisprofil: T-Zellen, T-Helferzellen, zytotoxische T-Zellen, B-Zellen, NK-Zellen	32521 32522 32523 32520 32524	€ 43,00	3x 3696 2x 3697	€ 128,80	€ 148,12
Erweitertes Profil: Basisprofil + regulatorische T-Zellen, zytotoxisch aktive T-Zellen, naive T-Zellen/Thymus- reserve	siehe Basisprofil +23527 32526 32527	€ 74,90	3x 3696 5x 3697	€ 172,51	€ 198,39
T-Zellen	32521	€ 7,40	3696	€ 33,22	€ 38,21
T-Helferzellen	32522	€ 8,90	3696	€ 33,22	€ 38,21
Naive T-Zellen/Thymus- reserve	32527	€ 11,50	3696	€ 33,22	€ 38,21
Regulatorische T-Zellen	32527	€ 11,50	3696	€ 33,22	€ 38,21
Zytotoxische T-Zellen	32523	€ 8,90	3696	€ 33,22	€ 38,21
Zytotoxisch aktive T-Zellen	32526	€ 8,90	3696	€ 33,22	€ 38,21
Aktivierete T-Zellen (HLA-DR+)	32525	€ 8,90	3696	€ 33,22	€ 38,21
Natürliche Killer-T-Zellen	32524	€ 8,90	3696	€ 33,22	€ 38,21
B-Zellen	32520	€ 8,90	3696	€ 33,22	€ 38,21
Natürliche Killerzellen	32524	€ 8,90	3696	€ 33,22	€ 38,21

Autor:

Dr. rer. nat. Susanne Deininger, Limbach Gruppe

Literatur:

1. T.M. Rickabaugh, R.D. Kilpatrick, L.E. Hultin et al.: The dual Impact of HIV-1 infection and aging on naive CD4+ T-cells: additive and distinct patterns of impairment. PLoS One, 2011, 6(1) e16459.
2. S. Kohler, A. Thiel: Life after the thymus: CD31+ and CD31- human naive T cell subsets. Blood, 2009, 113(4): 769-74.
3. A. Stelmaszczyk-Emmel, A. Zawadzka-Krajewska, A-Szypowska et al.: Frequency and Activation of CD4+CD25highFoxP3+ regulatory T cells in peripheral blood from children with atopic allergy. Int Arch Allergy Immunol, 2013, 162(1): 16-24.
4. A. Boleslawski, S.B. Othman, L. Aoudjehane et al.: CD28 expression by peripheral blood lymphocytes as a potential predictor of the development of de novo malignancies in long-term survivors after liver transplantation. Liver Transpl, 2011, 17(3): 299-305.
5. V. Appay, R.A. van Lier, F. Sallusto et al.: Phenotype and function of human T lymphocyte subsets: consensus and issues. Cytometry A, 2008, 73(11): 975-83.

MVZ Labor Ravensburg GbR
Elisabethenstr. 11 | 88212 Ravensburg

Tel.: +49 751 502-0
Fax: +49 751 502-355

info@labor-gaertner.com
www.labor-gaertner.com

Ihre Ansprechpartner:
Abteilung Hämatologie
Telefon +49 751-502 216