Der falsche Schlüssel

Unser Abwehrsystem befindet sich ständig im Kriegszustand: Immunzellen fungieren als „Soldaten“, die mit einem Arsenal chemischer Waffen aus Antikörpern und anderen aggressiven Molekülen gegen Eindringlinge kämpfen. Damit sind wir, um im Bild zu bleiben, gut gerüstet.

Manche Gegner sind leicht an ihrer Uniform zu erkennen (Bakterien zum Beispiel an typischen Zellwandstrukturen). Wie aber unterscheidet das Immunsystem gut getarnte Angreifer von körpereigenen Zellen? Dafür gibt es das *Human Leukocyte Antigen*: Als *HLA-Klasse 1* findet es sich auf jeder menschlichen Zelle und funktioniert wie ein Sicherheitsschloss. Das Pendant, die *Klasse 2*, entspricht dem dazugehörigen Schlüssel, über den nur die Abwehrzellen verfügen. Passen beide zusammen, dann wird die Zelle nicht angegriffen. Diesen Mechanismus müssen kindliche Immunzellen in der Thymusdrüse regelrecht trainieren: Sogenannte *T-Zellen*, von denen jede über einen bestimmten HLA-Schlüssel verfügt, probieren – vereinfacht ausgedrückt – jedes Schlüsselloch (*Antigen*) aus, und nur diejenigen unter ihnen überleben, die gelernt haben, Freund und Feind korrekt auseinanderzuhalten.

Bei Autoimmunkrankheiten wie der rheumatoiden Arthritis sind einige T-Zellen sozusagen mit dem falschen Schlüssel ausgestattet und zerstören systematisch eigene Körperzellen. Man weiß heute, dass angeborene und erworbene Auslöser zusammenkommen müssen: Manche HLA-Muster sind besonders fehleranfällig, manche Fremdantigene imitieren menschliche Molekülstrukturen usw.

Labortests geben zwar wertvolle Hinweise auf Ursachen und Auswirkungen solchen Fehlverhaltens. Vorhersagen oder gar verhindern können sie Autoimmunkrankheiten bislang aber nicht.

gh

Autoantikörperbestimmungen

Harmonisierung ist das Ziel

Die Autoimmundiagnostik ist aufgrund ihrer Komplexität von einer Standardisierung noch weit entfernt. Erste Schritte in Richtung Harmonisierung erscheinen jedoch Erfolg versprechend.

Zirka fünf Prozent der Bevölkerung leiden an bis zu hundert verschiedenen Formen von Autoimmunerkrankungen. Zu ihrer Erkennung und Differenzierung leistet die Labordiagnostik einen entscheidenden Beitrag durch den Nachweis unterschiedlichster Autoantikörper (AAK), zum Beispiel dsDNA-Antikörper beim Lupus erythematodes, CCP-Antikörper bei rheumatoider Arthritis, Phospholipid-Antikörper beim Anti-Phospholipid-Syndrom oder antineutrophile cytoplasmatische Antikörper (ANCA) bei einigen systemischen Vaskulitiden .

Die Bestimmung erfolgt zum einen mit der indirekten Immunfluoreszenz an Zellpräparationen, Gewebeschnitten oder artifiziellen Antigenträgern, zum anderen mit immunchemischen Assays, bei denen die AAK mit definierten Antigenen oder Antigengemischen reagieren. Diese wiederum können aus natürlichen Quellen gereinigt oder rekombinant hergestellt werden.

Autoantikörper bei Kollagenosen

Ein Charakteristikum von den sich an mehrenen Organen manifestierenden Kollagenosen wie dem systemischen Lupus erythematodes sind relativ krankheitsspezifische, jedoch nicht organspezifische AAK[1]. Sie erkennen Autoantigene, die in nahezu allen Zellen vorkommen, zum Beispiel Doppelstrang-DNA in den Zellkernen oder tRNA-Synthetasen im Zytoplasma. Weitere Erkrankungen dieses Formenkreises sind systemische Sklerose, autoimmune Myositiden, Sjögren-Syndrom sowie undifferenzierte und Mischkollagenosen.

Screening mit HEp-2-Zellen

Die nicht organspezifischen AAK können heute kostengünstig mittels indirekter Immunfluoreszenz (IIF) an humanen Tumorzell-Monolayern (Beispiel IIF-Muster von PCNA-Antikörpern an HEp-2-Zellen in obiger Abb.) gescreent und teilweise sogar spezifisch bestimmt werden. Die einheitliche Nutzung der HEp-2-Zelllinie als Target ist ein wichtiger Schritt in Richtung Standardisierung, doch bisher sind nicht nur die einzelnen Arbeitsschritte der IIF, sondern auch unterschiedlich fixierte Zellen, die Kombination mit anderen Substraten, die Auswertung am Mikroskop und die individuelle Interpretation und Befundung so variabel, dass sich die Ergebnisse von Labor zu Labor oft erheblich unterscheiden.

Um dem Ziel einheitlicher Leitlinien näher zu kommen, wurde folgendes Vorgehen im Konsens zwischen den Fachgesellschaf-

ten DGfI, DGKL, GFID und DGRh (siehe unten) vorgeschlagen[2]: „Initiales Screening mittels indirekter Immunfluoreszenz an sorgfältig ausgewählten HEp-2-Zellen, beginnend mit einer Serumverdünnung von 1:80 und Auswertung in einem lichtstarken Mikroskop, positive Befundung ab einem Titer von 1:160, laborinterne Qualitätssicherung und vereinheitlichte Befundung."

Die unübertroffene Empfindlichkeit der IIF an HEp-2-Zellen macht diese Methode zum idealen Werkzeug für die Screeningphase, gefolgt von Bestätigungstests mit unterschiedlichen immunologischen Assaytechnologien.

Stufendiagnostik

In Abhängigkeit vom Immunfluoreszenzmuster sowie der diagnostischen Fragestellung muss – von wenigen Ausnahmen abgesehen – dem IIF-Screening die Bestimmung der AAK-Spezifität folgen. Hierfür steht eine ständig wachsende Anzahl von unterschiedlichen Testsystemen wie Ouchterlony-Assay, CLIFT, ELISA, Dot- bzw. Line-Immunoassays (LIA), Mikroarray- und Mikrobead-Assays (MBA) zur Verfügung.

Festphasen-Immunoassays (ELISA, LIA, MBA) lassen sich einfacher automatisieren und sind damit auch Routinelaboren leichter zugänglich. Dies ist insbesondere im Hinblick auf steigende Anforderungszahlen und die zunehmende Häufigkeit diagnostizierter Autoimmunerkrankungen von erheblicher Bedeutung. Allerdings werden hierbei deutlich mehr falsch-negative Ergebnisse als bei der IIF erhoben; auch können technisch bedingt falsch positive Befunde bei alleinigem Einsatz von Festphasen-Immunoassays nicht ausgeschlossen werden, weil Antikörper zum Beispiel mit Assay-Komponenten unspezifisch reagieren können.

Daher bestätigte die *American College of Rheumatology* (ACR) Task Force 2010 erneut die IIF an HEp-2-Zellen als Goldstandard für das Screening auf nicht organspezifische AAK. Sie ist trotz aller Fortschritte bei der Etablierung spezifischer AAK-Assays für eine qualitätsgerechte Autoimmundiagnostik von Kollagenosen weiterhin unabdingbar. Nur die IIF an HEp-2-Zellen ermöglicht ein hochsensitives Screening auf mehr als 30 klinisch relevante AAK-Spezifitäten, wobei die unter dem Mikroskop erkennbaren Bindungsmuster (zum Beispiel Anti-Centromer-Antikörper) eine wichtige Rolle spielen. Dies gilt auch für den kosteneffektiven Einsatz nachfolgender Untersuchungen je nach Immunfluoreszenzmuster und diagnostischer Fragestellung.

Mit der IIF gelingt ferner der Nachweis seltener, diagnostisch bedeutsamer AAK, für die entweder keine kommerziellen Assays zur Verfügung stehen oder deren Feinspezifität unbekannt – und klinisch trotzdem relevant – ist.

Wichtige Qualitätsaspekte sind schließlich die Verbesserung der diagnostischen Sicherheit im Rahmen der Stufendiagnostik: Die IIF hilft, falsch positive Befunde bei den Immunoassays zu vermeiden und erhöht die diagnostische Spezifität durch Kombination von verschiedenen Befunden[3]. Dem stehen als Nachteile der hohe Aufwand an manuellen Arbeitsschritten und die subjektive visuelle Auswertung gegenüber.

Automatisierte Lösungen

Aus dem Gesagten wird deutlich, welche Bedeutung der Automatisierung möglichst vieler Prozesse – als Grundlage künftiger Harmonisierung beim IIF-Screening – zukommt. Erste kommerziell verfügbare Systeme basieren in der Regel auf digitaler Erfassung und Analyse von IIF-Bildern sowie Algorithmen zur Mustererkennung. Einige unterscheiden nur zwischen positiven und negativen Ergebnissen des Screenings, während andere auch in der Lage sind, die zugrundeliegenden Färbungsmuster auszugeben.

Der mittelfristige Trend geht hin zu Komplettsystemen, die die Fluoreszenzmikroskopie automatisieren und Interpretationsunterstützung bieten. Auch bei den Immunoassays sehen wir Fortschritte, insbesondere bei multiplex adressierbaren Microbeads auf Festphasenträgern.

Fazit

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass wir auf Grund vielfältiger Besonderheiten bei der Autoantikörper-Diagnostik noch weit von einer Standardisierung der Autoimmundiagnostik entfernt sind. Erste Schritte in Richtung Harmonisierung sind getan, doch ist hier noch viel Arbeit zu leisten.

DGfI = Deutsche Gesellschaft für Immunologie
DGKL = Deutsche Gesellschaft für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin
DGRh = Deutsche Gesellschaft für Rheumatologie
GFID = Gesellschaft zur Förderung der Immundiagnostik

Literatur

1) Conrad K, Roggenbuck D, Reinhold D & Sack U 2012: Autoantibody diagnostics in clinical practice. Autoimmun.Rev. 11:207-211.

2) Sack U, Conrad K, Csernok E, Frank I, Hiepe F, Krieger T, Kromminga A, von Landenberg P, Messer G, Witte T & Mierau R 2009: Autoantibody detection using indirect immunofluorescence on HEp-2 cells 1. Ann.N.Y.Acad.Sci. 1173 166-173.

3) Hiemann R, Roggenbuck D, Sack U, Anderer U, Conrad K 2011: Die HEp-2-Zelle als Target für multiparametrische Autoantikörperanalytik – Automatisierung und Standardisierung. J Lab Med 35:351–361.

Prof. Dr. Ulrich Sack
Translationszentrum für Regenerative Medizin
sack@uni-leipzig.de
Priv.-Doz. Dr. med. Karsten Conrad
Institut für Immunologie
karsten.conrad@tu-dresden.de