



**Skript zum
Teilbereich Immunologie
im Rahmen des Seminars zum
Biochemischen Praktikum für
Studentinnen und Studenten
der Humanmedizin**

Vorbemerkung:

Dieses Skript ist im Laufe der Jahre, seit dem ich für diesen Teilbereich des Seminars verantwortlich bin, vor allem zu dem Zwecke entstanden, es mir als Seminarleiter zu erleichtern allen Beteiligten dieser ja mehrfach hintereinander durchgeführten Lehrveranstaltung den gleichen Wissensumfang zu präsentieren. Diesem Zweck soll es auch in Zukunft schwerpunktmäßig dienen. Verbunden damit ist jedoch eine vor allem in den Textpassagen eher kurze Darstellungsweise und eine im Vergleich zu guten Lehrbüchern höhere Fehlerrate.

Das bedeutet, dass dieses Skript keinesfalls das Studium von Lehrbüchern der Immunologie ersetzen kann und soll.

Was es allerdings leisten kann, ist eine Orientierungshilfe zu bieten, welche Teilbereiche der Immunologie im knappen zeitlichen Rahmen des Praktikums der Biochemie behandelt und natürlich auch geprüft werden. (Das gilt für Studenten der Human- wie der Zahnmedizin in gleichem Maße). Deshalb habe ich mich entschlossen, versuchsshalber die kommenden Seiten der Öffentlichkeit zugänglich zu machen. Für Hinweise auf Fehler jeglicher Art bin ich natürlich dankbar.

Helfried Mallow
Lehrstuhl Biochemie III
VKL 50.18
Universität Regensburg
E-Mail: Helfried.Mallow@vkl.uni-regensburg.de

Literaturhinweise:

Janeway C.A., Travers P.: Immunologie, Spektrum Verlag 1995 bzw. 1997 (2.Aufl.), 88 WF 9800 J33 I3

Sicherlich eines der besten Immunologie Lehrbücher derzeit, aber für den Einsteiger recht umfangreich. Die englische Ausgabe soll 2001 schon in der 5. Auflage erscheinen.

Abbas A.K. et al.: Immunologie, Verlag Hans Huber 1996, 88 WF 9800 A122 D4
Von vergleichbarer Qualität aber auch von ähnlichem Umfang wie Janeway et al. Schenkt dem Complementsystem etwas mehr Aufmerksamkeit als andere Autoren. Die schon für 2000 angekündigte deutsche Neuauflage ist derzeit (August 2001) noch nicht erschienen. Die englische Ausgabe ist bereits in der 4. Auflage erschienen.

Gegenstandskatalog für den schriftlichen Teil der ärztlichen Vorprüfung, zu erhalten unter <http://www.impp.de/ImppGk.html>

Seminar: Immunologie

I Grundlagen

Verschiedene Möglichkeiten der Strukturierung des Immunsystems

- zelluläre <-> humorale Immunabwehr (so gliedert sich grob das kommende Seminar)

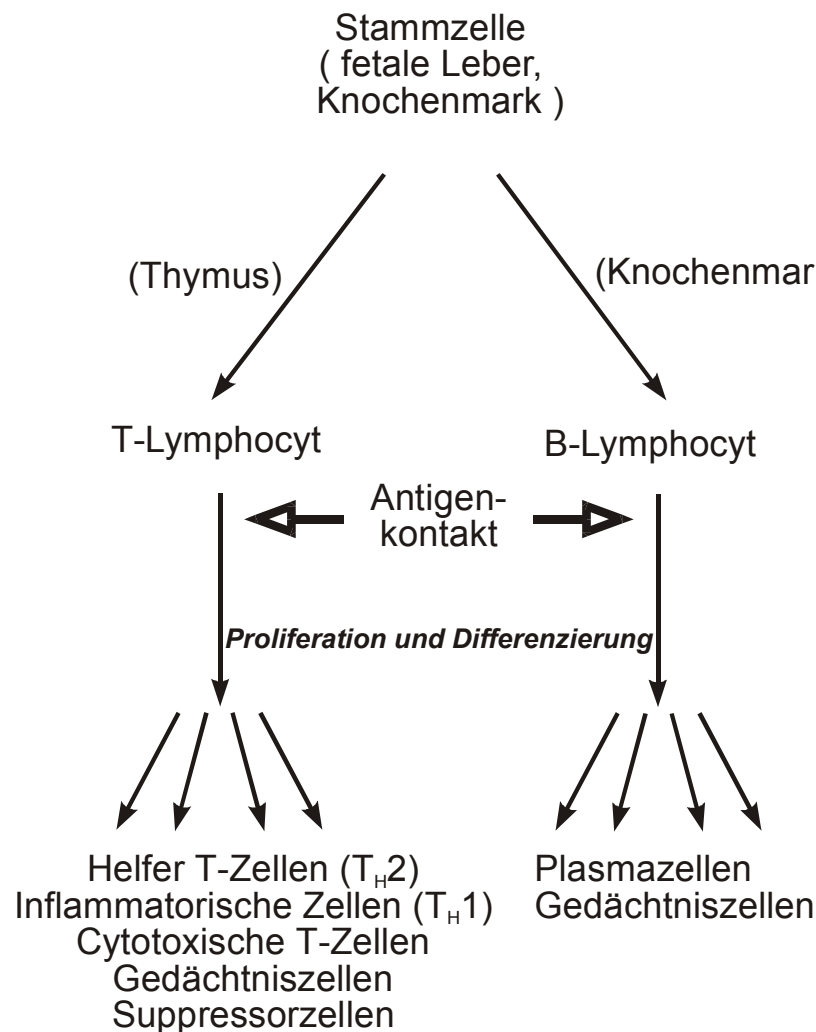
oder aber:

- unspezifische <-> spezifische Abwehr

	unspez. oder angeborene Abwehr (natural oder innate immunity)	spez. oder adaptive Abwehr (acquired immunity)
Barrieren	Haut, Schleimhäute	AK (IgE) in den Schleimhäuten
Zirkulierende Moleküle	Complementfaktoren (alternativer Weg)	Antikörper
Zellen	Phagozytierende Zellen aller Art (Makrophagen, Neutrophile, NK-Zellen etc.)	hauptsächlich Lymphocyten

Die angeborene Immunität wird im Folgenden aus Zeitgründen kaum besprochen, obwohl sie eine weitaus wichtigere Rolle spielt als man ursprünglich annahm.

Zudem ist zu beachten, dass es neben den beiden oben genannten Begriffspaaren natürlich noch andere Möglichkeiten zur Abgrenzung von Teilbereichen des Immunsystems gibt.

Lymphocytenentwicklung im groben Überblick

obige Unterteilung der Lymphocyten ist *funktionseller Natur*

Daneben existiert eine *immunologisch-biochemische Möglichkeit* zur Unterteilung, die auf Oberflächenmerkmalen beruht. Die verschiedenen Oberflächenmerkmale werden mittels Antikörpern identifiziert und mit den beiden Buchstaben CD plus einer Nummer bezeichnet. Meist, aber nicht immer können funktionelle und biochemische Nomenklatur zur Deckung gebracht werden.

Bsp.: CD4 : tritt auf allen Helferzellen auf
 CD8 : tritt auf den meisten cytotoxischen Zellen auf

Bei T_H1 und T_H2 handelt es sich um Subpopulationen der CD4-positiven Zellen, die sich vor allem durch ihre unterschiedliche Cytokinproduktion unterscheiden lassen. Dabei sind die T_H2-Zellen die klassischen Helferzellen, welche die AK-Produktion von B-Lymphocyten anregen (siehe unten) und hauptsächlich IL-3, IL-4, IL-5 und IL-10 produzieren. T_H1-Zellen aktivieren generell die Phagocytose-vermittelte Immunabwehr und spielen vor allem bei der Zerstörung von intrazellulären Erregern (z.B. Mycobacterium tuberculosis) in Makrophagen eine wichtige Rolle. Sie produzieren vor allem IFN γ und aktivieren so Makrophagen. Bei infizierten Makrophagen führt dies letztlich zu deren Zerstörung.

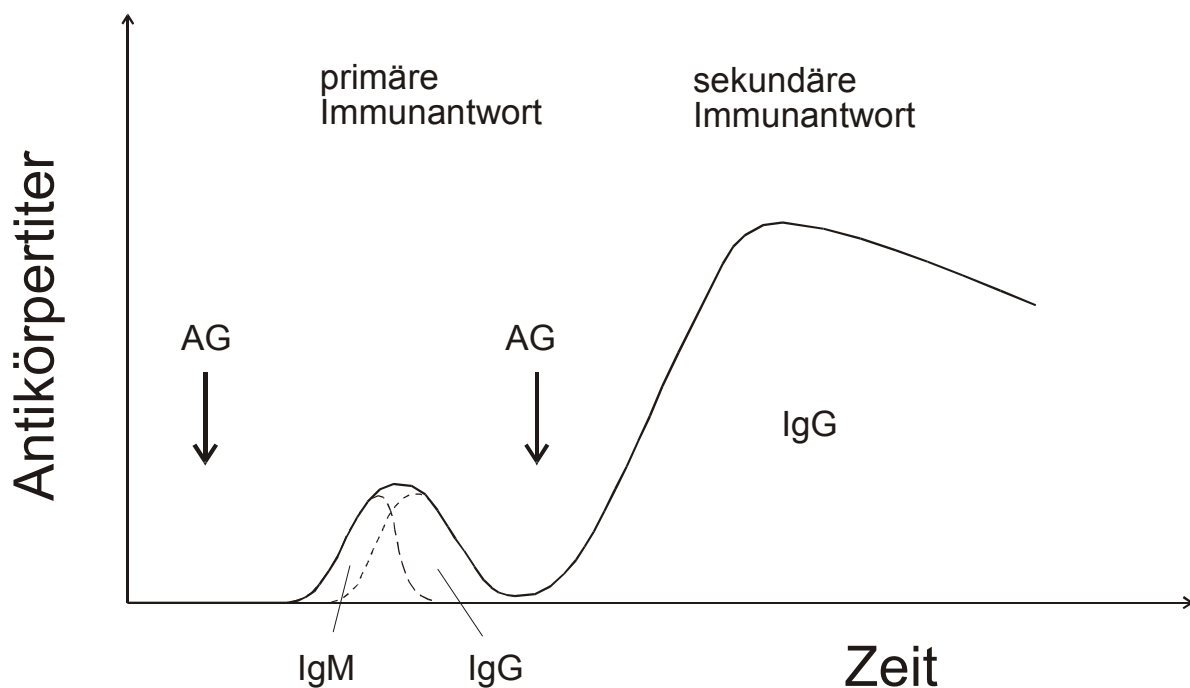
II Antikörperbildung

Antikörper sind Glykoproteine (d.h. Proteine mit Zuckerresten) verwandter Bauart.

Sie finden sich:

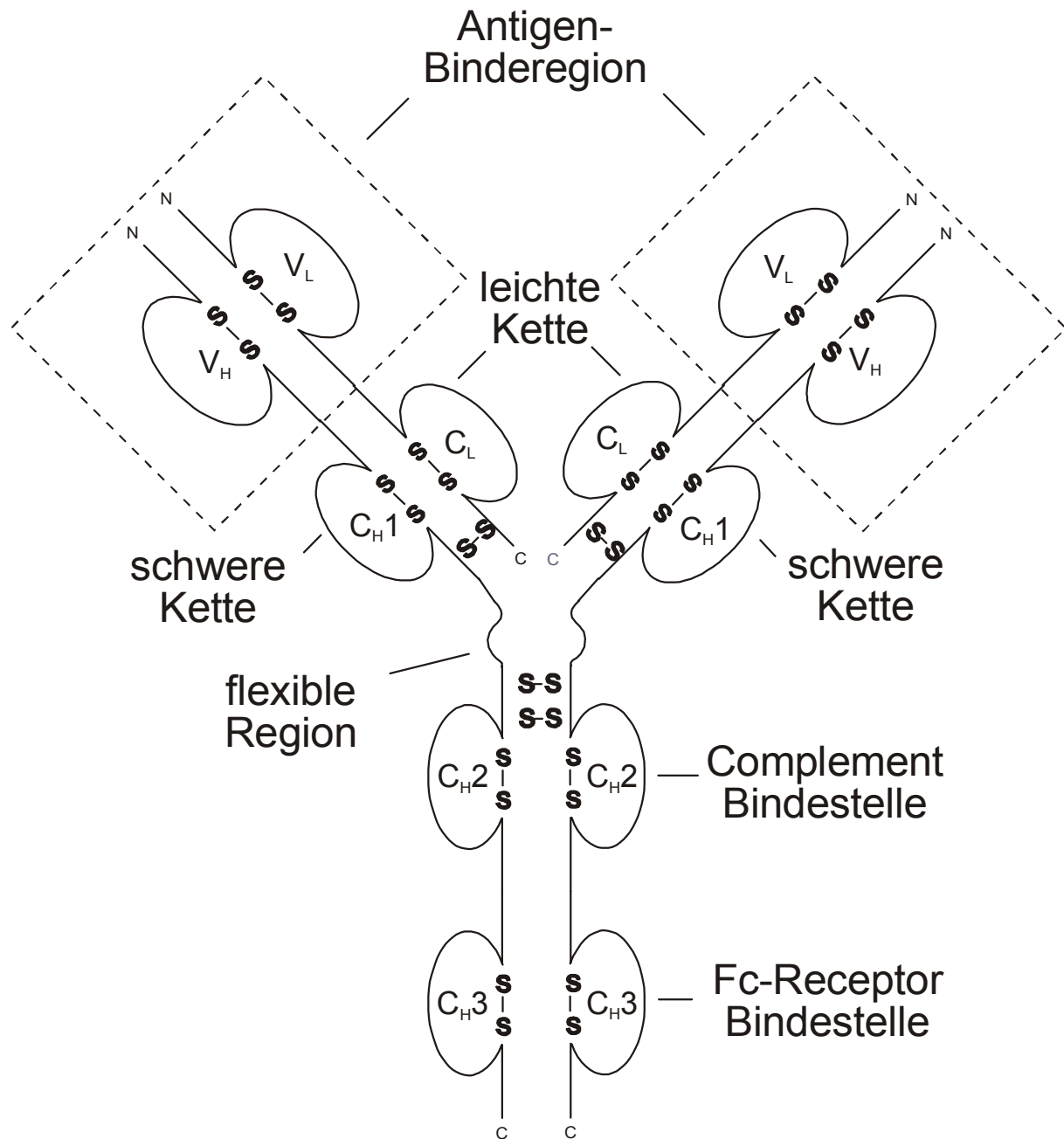
- im Blutplasma und in der interstitiellen Flüssigkeit
- auf der Zellmembran diverser Zellen vor allem der B-Lymphocyten
- in Sekretionsprodukten wie Schleim und Milch

Grundlegendes Experiment zur Antikörpererzeugung: Immunisierung eines Kaninchens



Zur primären Immunantwort gehört auch die vorgelagerte lag-Phase, in der die Komponenten des angeborenen Immunsystems eine wesentliche Rolle spielen. Ähnliche Abläufe bezüglich der Antikörperkonzentrationen im Serum sind auch bei vielen Impfungen zu beobachten.

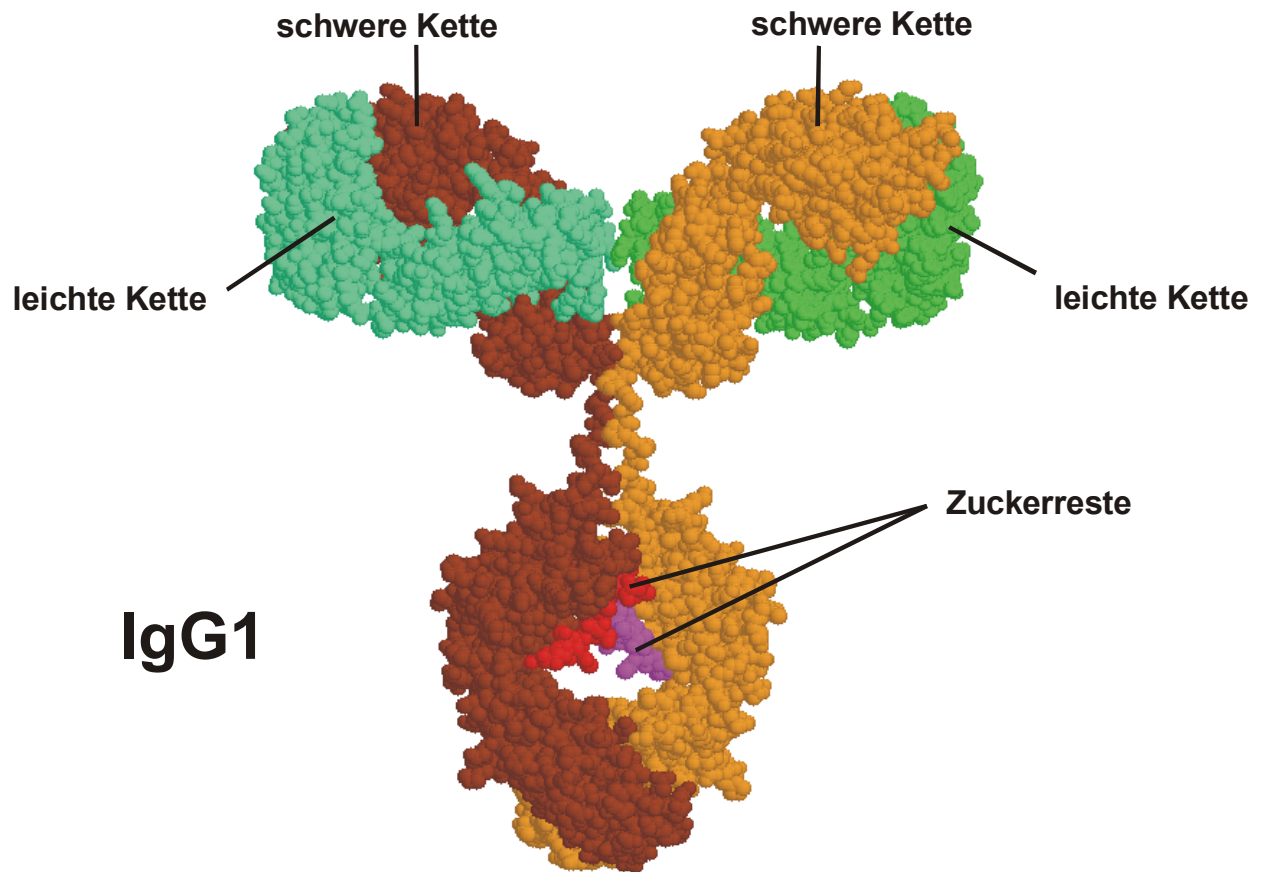
Antikörperstruktur am Beispiel des IgG (Seminarthema)



Dominierende Struktureinheiten sind die so genannten *Immunglobulindomänen*. Dies sind relative fixe Bereiche innerhalb des Proteins (ca. 110 Aminosäuren) die durch eine sehr ähnliche (homologe) Aminosäure-Sequenz und eine ähnliche räumliche Struktur ausgezeichnet sind. Sie treten auch in anderen Molekülen, so z.B. dem T-Zellreceptor und, den MHC-Komplexen und einer Reihe von anderen Zelloberflächenmolekülen auf. Die Namensgebung sollte daher nicht dazu verleiten, diese Moleküle mit ganz unterschiedlichen Funktion zu verwechseln.

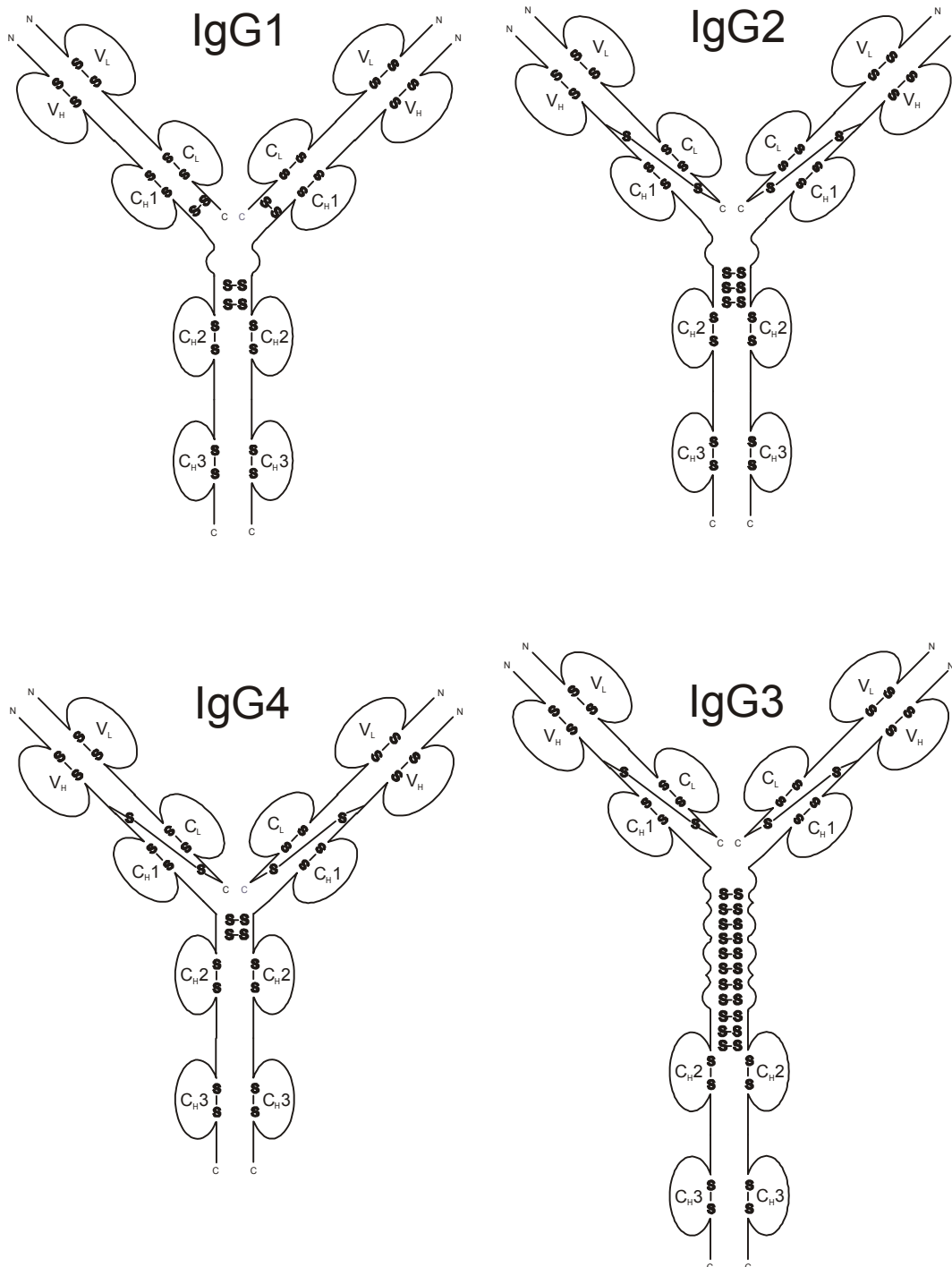
An der C_{H2}-Domäne ist der Hauptzuckerrest lokalisiert. Seine Veränderung kann die Complementaktivierung verhindern. Es handelt sich aber **nicht** um die Complementfaktor C1q-Bindestelle, wie gentechnische Experimente gezeigt haben. Die C1q-Bindestelle wird durch eine Abfolge aus Aminosäuren ebenfalls in der C_{H2}-Domäne gebildet.

IgG1 im Kalottenmodell



MDL

Die *hinge* oder *flexible Region* ist ein Bereich ohne definierte 3D-Struktur. Über sie erhalten Antikörpermoleküle die Möglichkeit die Bindung zu verschiedenen weit auseinander liegenden antigenen Determinanten herzustellen. Die verschiedenen IgG-Subklassen unterscheiden sich vor allem in der hinge Region und in der C_H2-Domäne. Dies korreliert mit funktionellen Unterschieden: IgG1 und IgG3 können besser an bestimmte Fc-Rezeptoren binden, IgG4 löst kein Complementsystem aus.



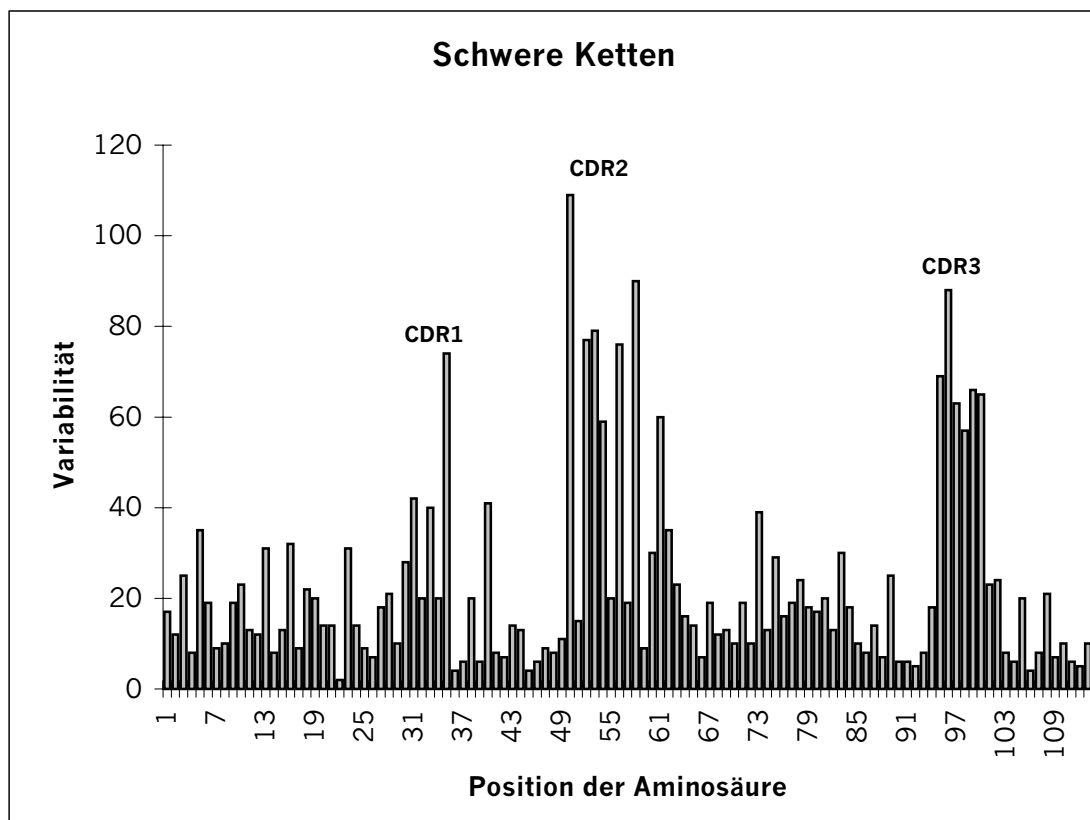
Die schweren Ketten werden mit griechischen Buchstaben gekennzeichnet und bestimmen die Antikörperklasse. Bei mehreren Klassen gibt es Untertypen. Hier die Verhältnisse beim Menschen:

α_1	α_2	δ	ϵ	γ_1	γ_2	γ_3	γ_4	μ
IgA1	IgA2	IgD	IgE	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4	IgM

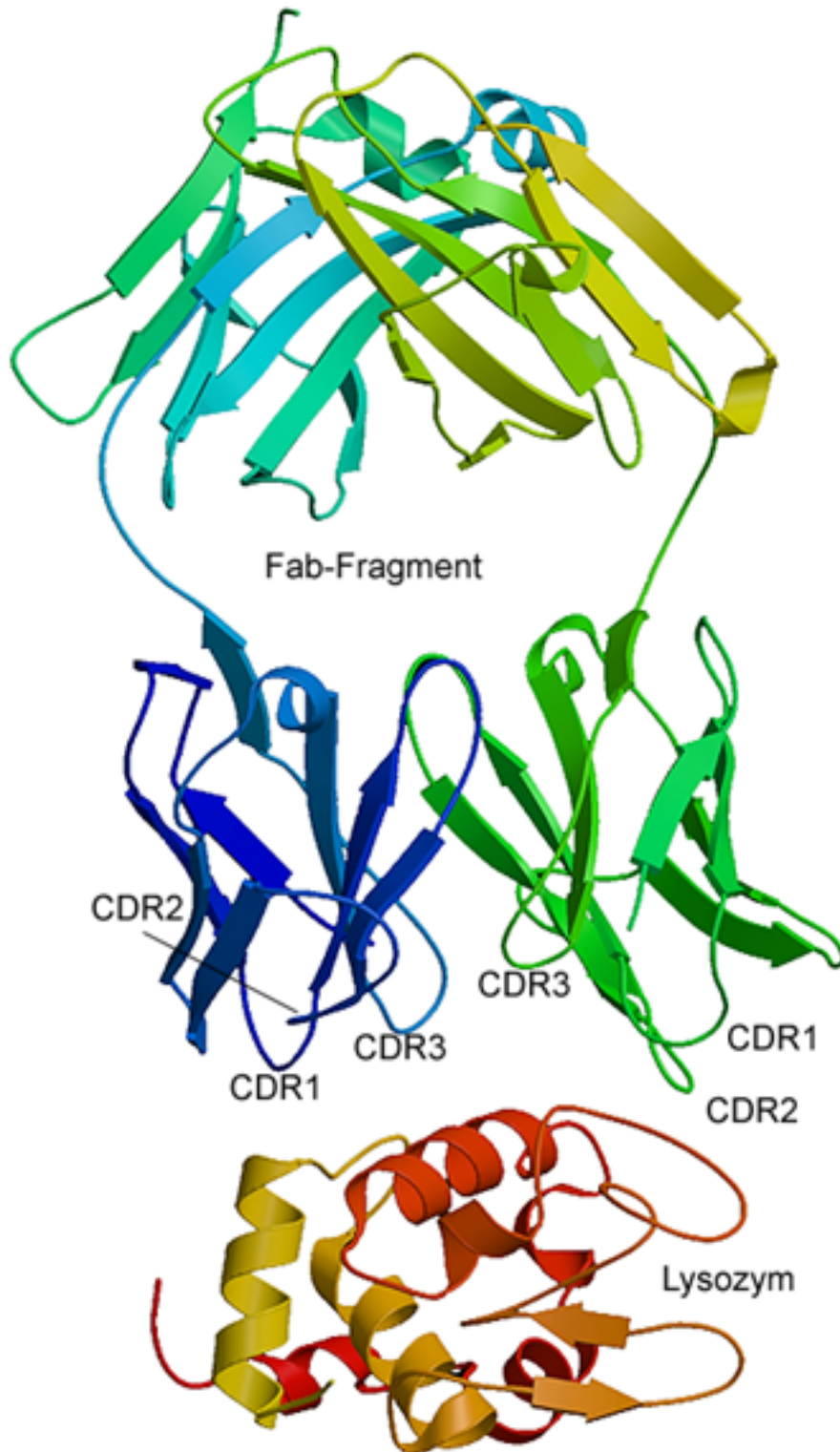
Die leichten Ketten können vom κ oder λ Typus sein. Es sind jeweils in einem Antikörper-Molekül zwei gleiche leichte Ketten vorhanden, ebenso in allen Antikörpern eines Klon. Bei verschiedenen Antikörpern ist keine Voraussage über den Typus der leichten Kette nicht möglich, es treten auch deutliche Speziesunterschiede auf (Mensch 1:1, Maus 10:1 für κ zu λ).

Die Verbindung der leichten und schweren Ketten erfolgt über Disulfidbrücken und nicht kovalente Wechselwirkungen.

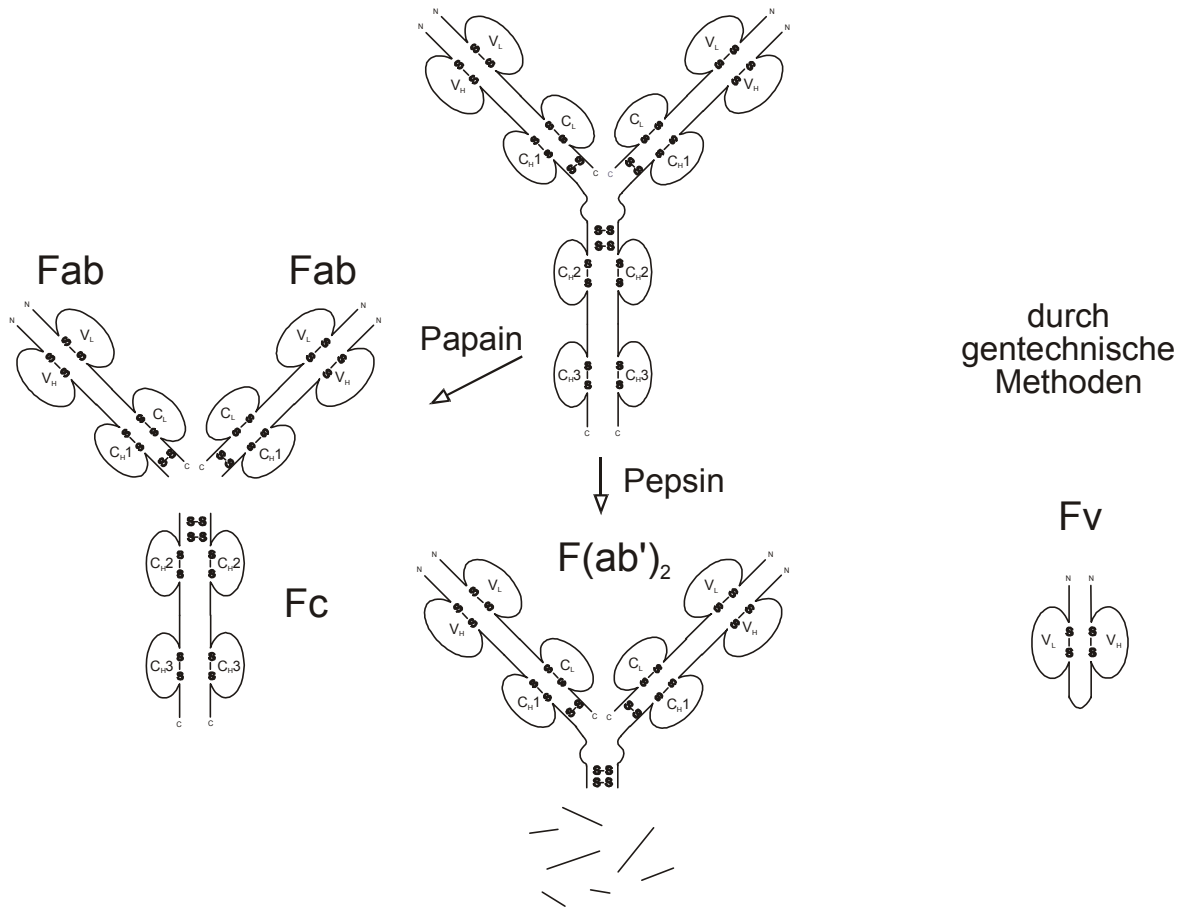
Die Spezifität der Antikörper wird durch die jeweiligen variablen Regionen der leichten *und* der schweren Kette bestimmt und hierbei besonders durch die sogenannten *hypervariablen Regionen*. Dies sind die Bereiche, in denen die Aminosäuren von Antikörpern verschiedener Spezifität besonders variieren. Im englischen Sprachgebrauch heißen diese Bereiche auch *CDRs* von *complementarity-determining region*. Bei korrekter Faltung des Antikörpers bilden diese Aminosäuren auch den direkten Kontakt zum Antigen aus.



Die folgende Graphik zeigt ein Fab-Fragment eines Antikörpers (Begriffserklärung siehe unten) gebunden an sein Antigen. Dabei ist deutlich zu erkennen, dass die hypervariablen Regionen genau in den Bereichen liegen, die für die Bindung des Antigens verantwortlich sind.



Proteolytischer Abbau des IgG



Die Kenntnis der Nomenklatur der entstehenden Fragmente ist u.a. wichtig, weil bei vielen Nachweisverfahren in Forschung und Diagnostik derartige Konstrukte zur Anwendung kommen. So werden z.B. in der Histologie sehr oft markierte Fab Fragmente statt markierter ganzer Antikörper eingesetzt um falsch positive Reaktionen zu minimieren.

Andere Antikörperklassen

IgM:

Pentamer (=> 10 Bindungsstellen), durch Joining-Peptid und Disulfidbrücken zusammengehalten. Besitzt eine zusätzliche Immunglobulindomäne. Wichtigster Antikörper der primären Immunantwort.

IgA:

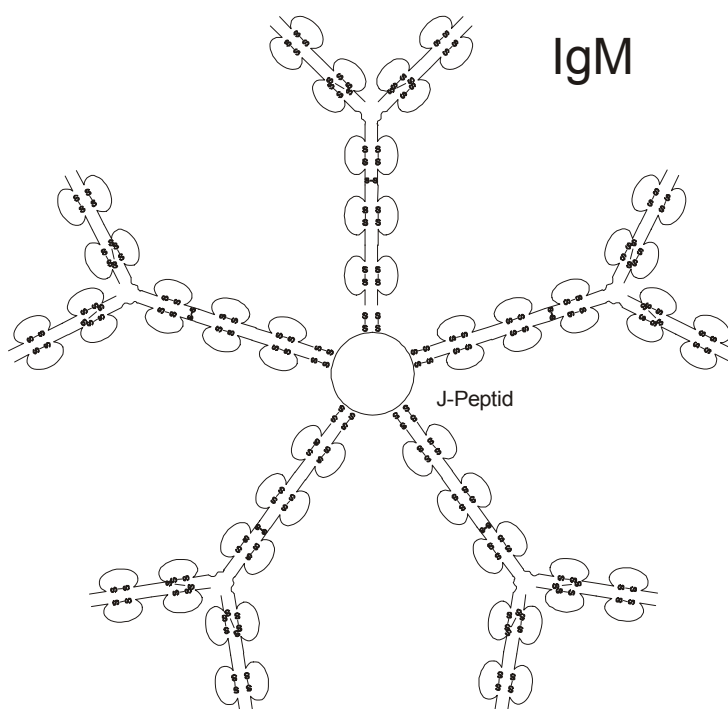
Dimer (manchmal auch Monomer z.B. im menschlichen Serum, Trimer oder höhere Polymere), ebenfalls mit J-Peptid zusammengehalten. In der sekretierten Form ist es mit einem zusätzlichen Protein, der sekretorischen Komponente assoziiert. Wichtigster AK der Immunabwehr an Schleimhäuten z.B. in Lunge und Darm. Nach neueren Schätzungen ist IgA, bezieht man sich nicht nur auf den Serumgehalt, sondern auf die gesamte Produktion an Antikörpern, der mengenmäßig wichtigste Antikörper. Circa zwei der drei Gramm Antikörper, die ein durchschnittlicher Erwachsener täglich produziert, sind vom Typ IgA.

IgE:

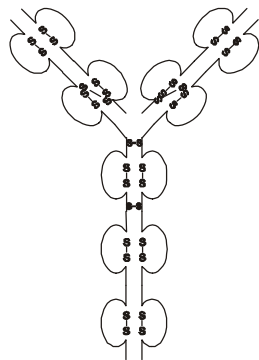
Besitzt ebenfalls eine zusätzliche Immunglobulindomäne, aber keine hinge Region. Wichtige Rolle bei der Parasitenabwehr (z.B. gegen Helminthen) und in der Entwicklung von Allergien. Wird von B-Lymphocyten gebildet, diffundiert dann zu Mastzellen bzw. Eosinophilen und wird von diesen über einen Receptor für den F_c -Teil auf der Membran fest gehalten (\neq membranständiger AK!). Bei Kontakt mit Antigen erfolgt z.B. Histaminausschüttung bei den Mastzellen bzw. die Aktivierung der zellvermittelten cytotoxischen Abwehr bei Eosinophilen.

IgD:

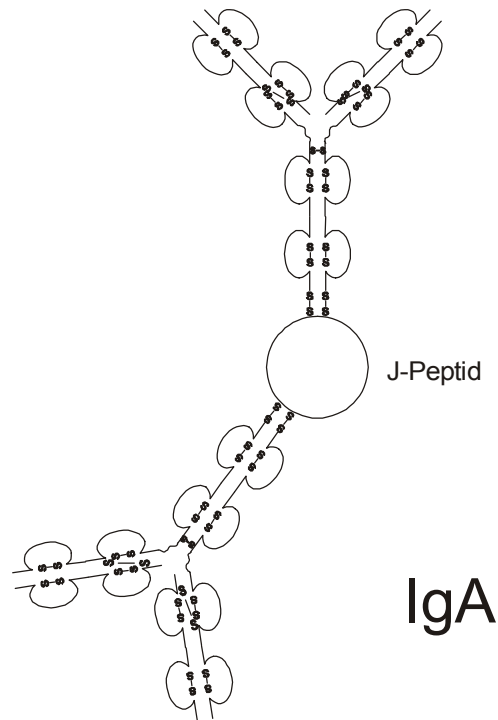
einzige bekannte Funktion bei der B-Lymphocytenreifung (s.u.)



Die Lage der Disulfidbrücken wurde A.K. Abbas et al.: Cellular and molecular immunology entnommen. Sie entspricht nur annähernd den tatsächlichen Verhältnissen.



IgE



J-Peptid

IgA

ohne sekretorische
Komponente

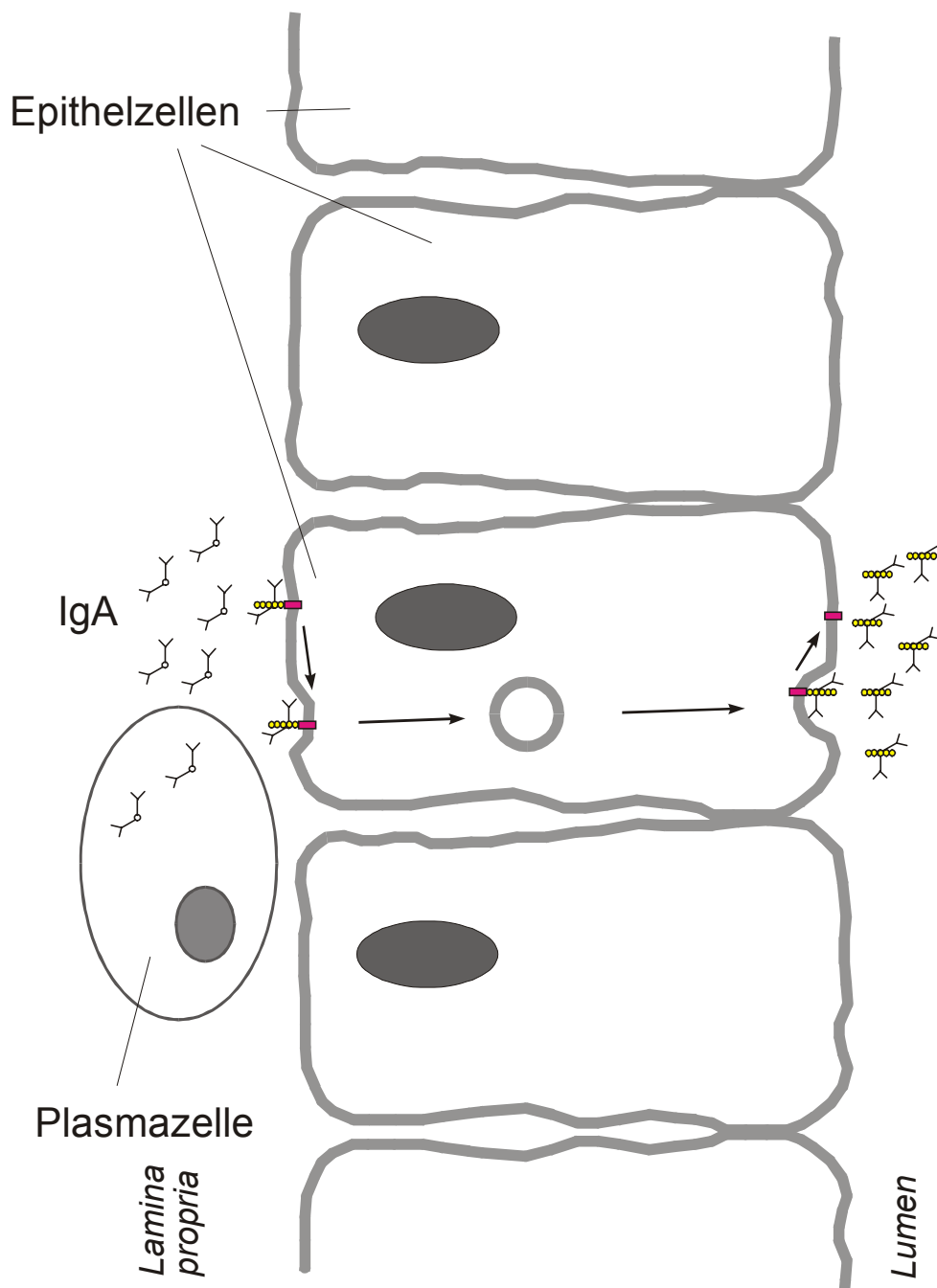
Die Darstellung der Disulfidbrücken ist in allen Fällen vereinfacht. So haben z.B. einige der IgG Isoformen besonders in der hinge Region gleich mehrere Cysteinreste, die eine Disulfidbrücke ausbilden ($\gamma 3$ eventuell 15 Stück). Teilweise ist jedoch der exakte Bindungspartner umstritten. Die schräg eingezeichneten S-S Brücken gehen meist von der carboxyterminalen AS der leichten Kette (präziser: letzte AS bei κ -Ketten bzw. vorletzte AS bei λ -Ketten) aus.

Sekretion von IgA

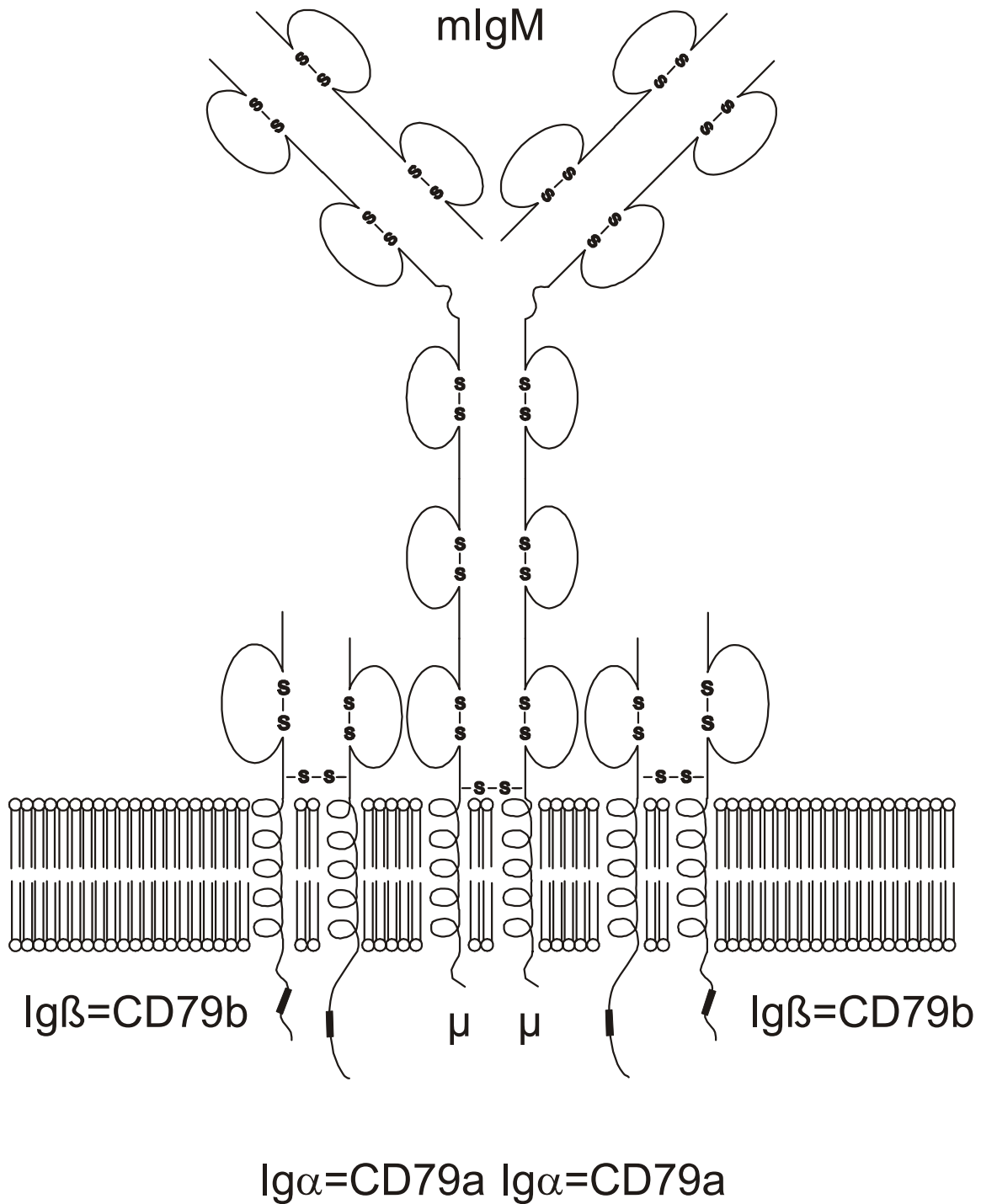
IgA als sekretierter Antikörper muss mittels eines Transcytoseprozesses durch das Mucosaepithel (des Darmes, der Lunge, etc.) geschleust werden. Dabei verbindet es sich auf der basalen Seite der Epithelzellen mit einem speziellen Ig-Rezeptor. Dieser wird auf die übliche Weise über Vesikelbildung internalisiert. Die Vesikel wandern dann zur luminalen Membran und verschmelzen mit dieser. Die Freisetzung des IgA in das Lumen erfolgt durch proteolytische Spaltung des Receptors. Das dabei am IgA verbleibende Receptorbruchstück ist identisch mit der so genannten sekretorischen Komponente.

Nach neueren Befunden kann IgA durch diesen Transcytosevorgang auch zur Abwehr von Viren, welche die Epithelzellen befallen, dienen. [Trends in Immunology 22, S.205ff, 2001]

Transcytose von IgA



Struktur membranständiger Antikörper (B-Zellreceptor-Komplex)



Der cytoplasmatische Teil ist unterschiedlich lang, bei IgM z.B. nur 3 Aminosäuren (K,V,K), bei anderen länger. Die Signaltransduktion von der Zellaußenseite in das Cytosol benötigt die akzessorischen Proteine Igα und Igβ und beginnt mit der Tyrosinphosphorylierung in speziellen Regionen (schwarze Boxen) dieser Proteine.

Man beachte, dass alle Immunglobulinklassen in einer membranständigen Form vorkommen können.

Begriffsdefinitionen

Immunogen: Eine Substanz, die eine Immunantwort auslöst (historische rein funktionelle Definition, die früher auch auf den Begriff Antigen angewendet wurde);

Antigen: Alle Stoffe, die vom adaptiven Immunsystem erkannt werden.

Hapten: Eine (oft kleinmolekulare) Substanz, die selbst keine Immunreaktion auslöst, aber sehr wohl, wenn sie an einen großmolekularen Träger gekoppelt wurde. Unter den so erzeugten Antikörpern finden sich auch solche, die das Hapten alleine binden können.

antigene

Determinante

oder Epitop: Der Teil eines Antigens, der tatsächlich mit dem Antikörper in Kontakt tritt.

Lineare oder

kontinuierliche

Determinante: Die Aminosäuren der Determinante liegen direkt nebeneinander.

Konforma-

tionsdetermi-

nante oder dis-

kontinuierliche

Determinante: Hier wird die Kontaktstelle zum Antikörper von AS gebildet, die im Protein nicht unmittelbar nebeneinander liegen.

Affinität: Bindungsstärke zwischen einem *monovalenten* Antigen und einem Antikörper (präziser sogar nur einer Antigenbindungsstelle).

Avidität: Gesamtstärke der Bindungen zwischen einem *polyvalenten* Antigen und einem Antikörper

Es sei nicht verschwiegen, dass besonders die letzten beiden Begriffe in der Literatur unablässig durcheinander gebracht werden.

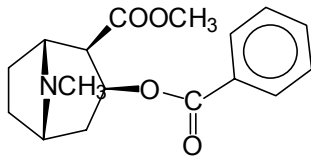
Beispiele für Haptene:

a) Penicillin

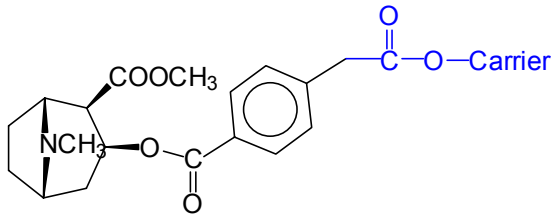
Penicillin hat einen aktiven β -Lactamring, der mit z.B. Serinresten (vor allem der bakteriellen Transpeptidase) reagiert. Die entstehenden Hapten-Carrier-Komplexe können Allergien auslösen.

b) Cocain

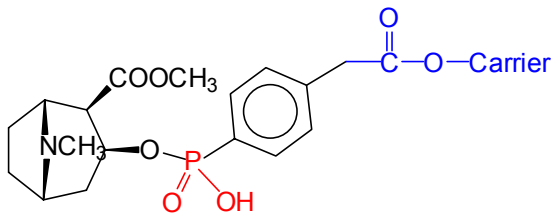
In jüngster Zeit wird versucht mit Hilfe von Antikörpern gegen Cocain vorzugehen. Der Grundgedanke ist dabei, das Cocain vor Erreichen des Zentralnervensystems abzufangen. Eine Weiterentwicklung dieser Methode besteht darin, Antikörper zu synthetisieren, die eine Zwischenstufe der Cocainhydrolyse stabilisieren und damit den Abbau beschleunigen. (Cocain blockiert den Rücktransport von Dopamin aus dem synaptischen Spalt in die präsynaptischen Endigungen, wodurch die Dopamin-Wirkung länger anhält.)



Cocain



Cocainderivat an Carrier gekoppelt
dient zur Produktion neutralisierender AK



Phosphoresterderivat des Cocains
(ähnelt dem Übergangszustand bei der
Cocainhydrolyse)
dient zur Produktion katalytisch wirksamer AI

wesentliche Funktionen der Antikörper

Membranständige Antikörper dienen als Antigen-Rezeptoren auf unreifen B-Lymphocyten und Gedächtniszellen. Kontakt mit dem Antigen führt z.B. zur Proliferation und Reifung der Lymphocyten.

Sezernierte Antikörper führen zur:

- 1) Neutralisation von Antigenen (an einem beliebigen Toxin oder am Cocain erläutern)
- 2) Aktivierung des Complementsystems (IgM,IgG)
- 3) Opsonierung von AG mit nachfolgender Stimulierung der Tätigkeit von Fresszellen (hauptsächlich IgG, teilweise IgM)

B-Zellentwicklung im Detail

Differenzierungsstadium	Biochemischer Marker	Funktionelle Charakteristiken
Stammzelle	CD34, Sca-1(stem cell antigen-1)	
frühe Pro-B-Zelle	D-J Umordnung	
späte Pro-B-Zelle	V-DJ Umordnung	
Prä-B-Zelle	cytoplasmatische μ -Kette, membranständige Form mit Hilfsproteinen an Stelle der L-Kette	Überprüfung auf erfolgreiche Rekombination der schweren Kette
Unreife B-Zelle	membranständiges IgM	Toleranzinduktion im Knochenmark
Reife B-Zelle B-Lymphocyt	membranständiges IgM/IgD	Erkennung von Antigenen und mögliche Aktivierung der Zelle =>
ANTIGENKONTAKT führt zur Proliferation der aktivierten Lymphocyten		
Aktivierter B-Lymphocyt	sehr geringe AK-Sekretion ev. Wechsel der AK-Klasse	frühes Stadium der Immunantwort
Plasmazelle	hohe AK-Sekretion	Stadium der vollen Immunantwort

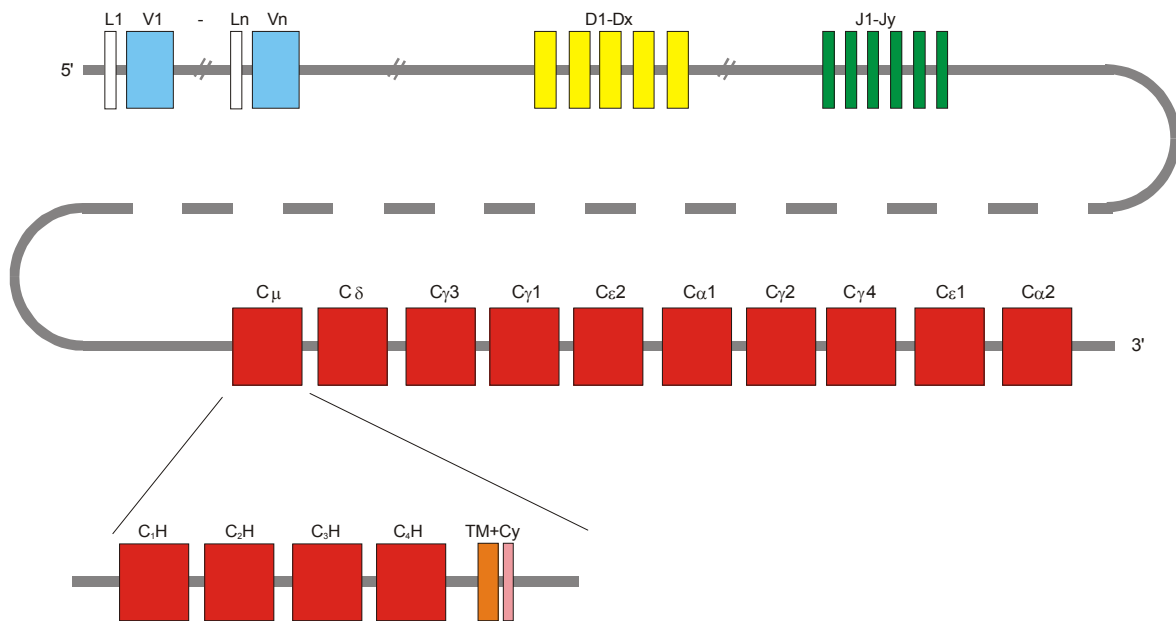
Nochmals klarstellen:

Jeder reife B-Lymphocyt produziert eine andere AG-Bindestelle, und zwar schon bevor er jemals ein Antigen gesehen hat. Wenn er sich nach AG-Kontakt teilt, produzieren alle Nachkommen (der *Klon*) den gleichen Antikörper. Ausnahmen siehe unten.

(Die frühere Annahme, dass IgD essentielle Voraussetzung für die Lymphocytenaktivierung sei, ist durch so genannte IgD-knockout Mäuse, also Mäuse, bei denen das IgD-Gen gentechnisch ausgeschaltet wurde, mit anscheinend normalen Immunsystem relativiert worden).

Entstehung der Antikörperdiversität 1) Genstruktur

Ausgangspunkt:



Die gezeigte Grafik spiegelt die Verhältnisse auf dem menschlichen Chromosom 14 in embryonalen Zellen wieder, das für die schweren Ketten codiert.

Bei den leichten Ketten fehlen die D-Segmente. Bei der λ-Kette sind die verschiedenen Isoformen (4) des konstanten Bereichs jeweils als Tandem mit einem J-Segment angeordnet. Auf die Existenz der J-Gensegmente bzw. der D-Gensegmente war man durch die Tatsache gestoßen, dass die Information der V-Gensegmente zu kurz ist um für die gesamte V-Domäne im Antikörper zu codieren.

Die genaue Anzahl der verschiedenen Gensegmente ist noch nicht abschließend geklärt. Vor allem die Aussonderung von Pseudogenen ist schwierig, zudem gibt es individuelle Unterschiede. Folgende Angaben stammen aus Janeway/Travers:

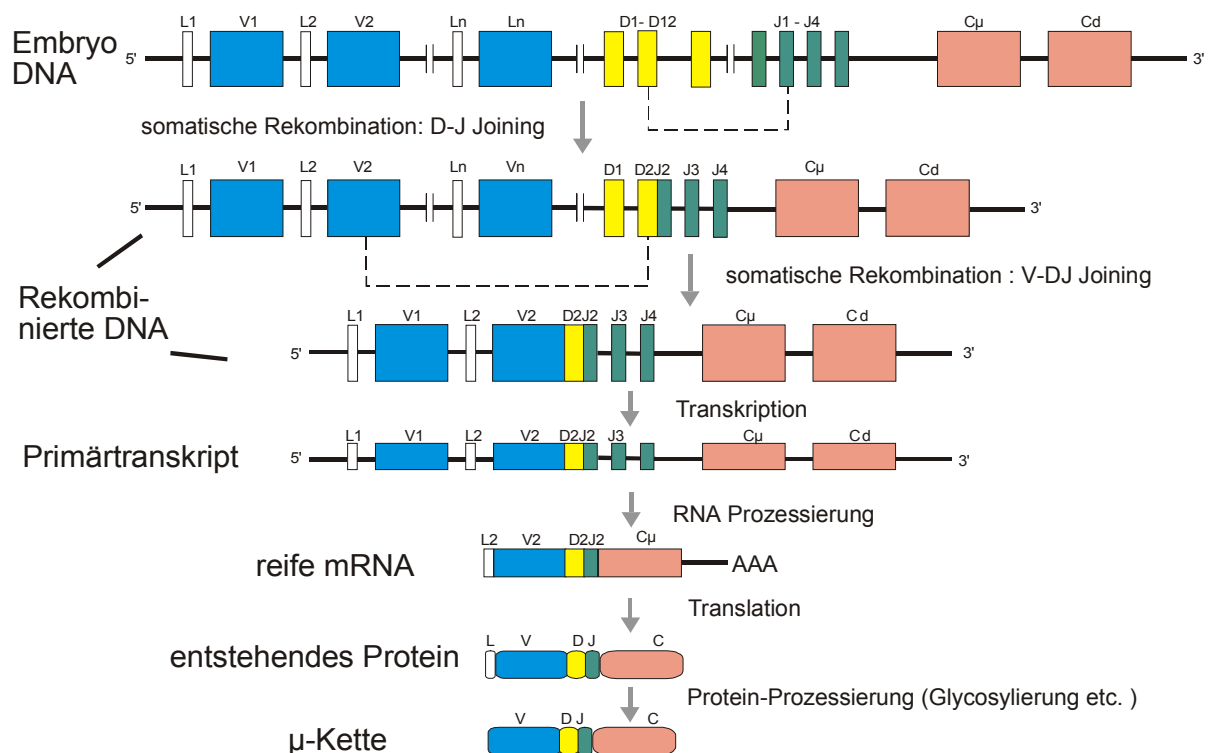
Segment	leichte Ketten Chromosom 2	leichte Ketten Chromosom 22	schwere Ketten Chromosom 14
	κ	λ	H
V-Segment	40	29	51
D-Segment	-	-	27
J-Segment	5	4	6

Von allen Gensegmenten wird jeweils *nur eines* letztendlich verwendet, um für den variablen Bereich des Antikörpers zu codieren.

Entstehung der Antikörperdiversität: Somatische Rekombination

Während der Reifung der Lymphocyten wird ein beliebiges V-Gen mit einem beliebigen D-Gen (entfällt bei den leichten Ketten) und einem beliebigen J-Gen kombiniert. Die dazwischen liegenden DNA-Bereiche gehen verloren. *Das bedeutet, dass die embryonale Zelle ein etwas größeres Genom als der B-Lymphocyt hat.* (Die Auswahl der Gene ist übrigens nicht völlig statistisch, einige werden bevorzugt. Die Gründe sind erst teilweise klar.)

μ-Kette als Beispiel:

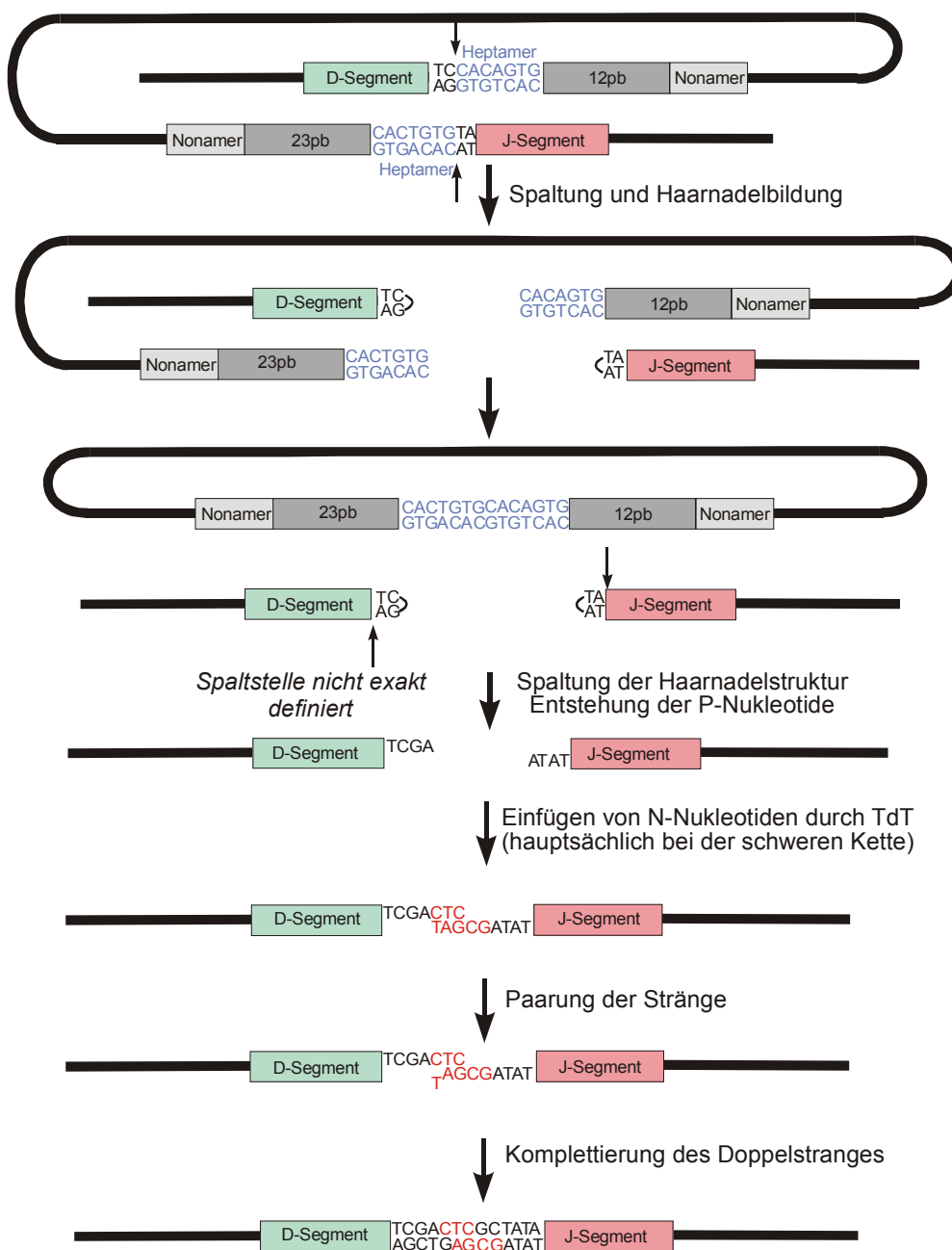


Der Mechanismus des Zusammenfügens der Gensegmente soll hier nicht näher behandelt werden. Er wird durch ein V(D)J-Recombinase Enzymsystem bewerkstelligt, das zum Teil mit den DNA-Reparatursystemen der Zelle identisch ist. Der Ort der Rekombination wird durch flankierende Heptamere bzw. Nonamere rechts und links bestimmt. Diese sind durch Spacer-Regionen mit einer Länge von ein bzw. zwei DNA-Windungen 12 bzw. 23 Basenpaare bestimmt. Dadurch werden die Hepta- bzw. Nonamere auf eine Seite der DNA orientiert und können dadurch spezifischen Kontakt zur V(D)J-Recombinase aufnehmen. (Es tritt vermutlich keine klassische Basenpaarung auf, wie manche Lehrbuchabbildungen andeuten!) Die unterschiedliche Länge der Spacer sorgt z.B. dafür, dass in einer schweren Kette keine Rekombinationen zwischen V und J unter Auslassung von D passieren können.

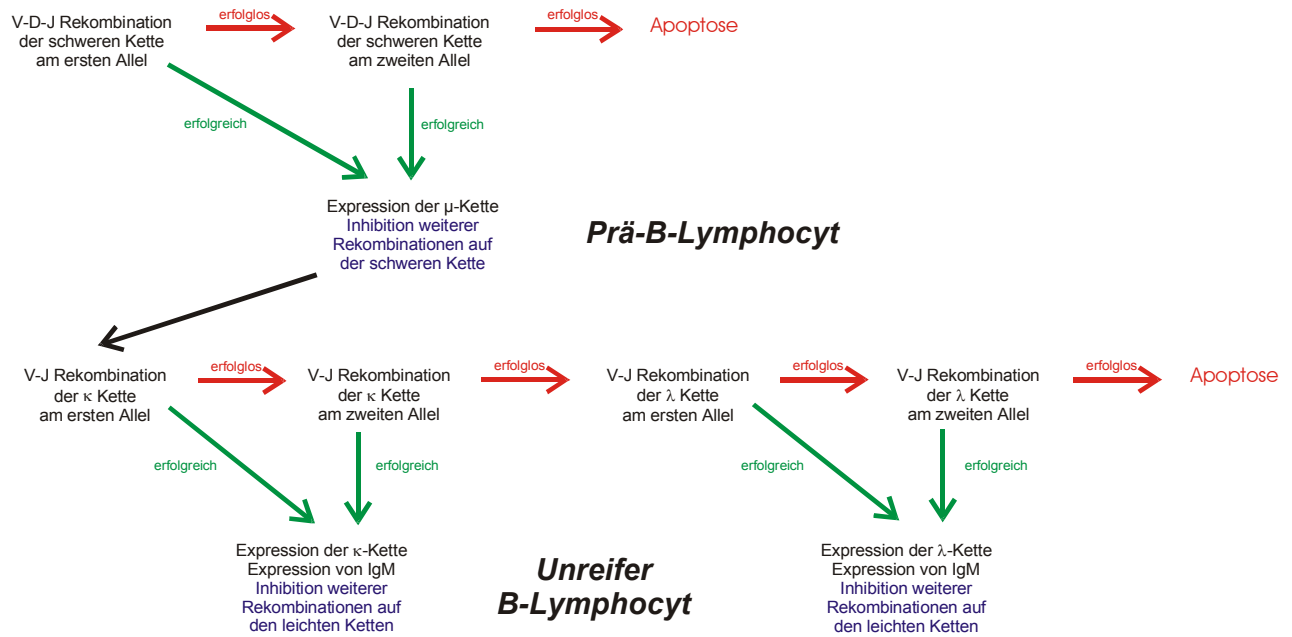
Entstehung der Antikörperdiversität 3) Einfügen zusätzlicher Variationen an den Schnittstellen

Bisweilen tauchen an den Schnittstellen zusätzliche Nukleotide auf. Dafür werden zwei Systeme verantwortlich gemacht:

- 1) Ein erst jüngst charakterisierter Mechanismus fügt Nukleotide über Bildung von Haarnadelschleifen (hairpins) ein. Die eingefügten Stücke werden als **P-Nukleotide** bezeichnet. Der im Rahmen dieses Vorgangs nötige Endonukleaseschnitt, um die Hairpins wieder aufzulösen, kann an verschiedenen Stellen erfolgen, was zusätzlich die Länge der P-Nukleotide beeinflusst
- 2) Die *terminale Desoxyribonucleotidtransferase* fügt ohne Matrize neue Basen ein. Dieser Mechanismus findet hauptsächlich bei den schweren Ketten Anwendung. Die entstehenden Stücke werden als **N-Nukleotide** bezeichnet.



3) Diese Vorgänge haben anscheinend keineswegs selten eine Rasterverschiebung zur Folge. In diesem Falle kommt es zur Expression eines defekten Antikörper. Stellt die Zelle dies fest, wird die Expression eingestellt und eine erneute Rekombination am (sofern noch möglich) gleichen Chromosom oder aber am Schwesterchromosom durchgeführt. Im Falle der leichten Ketten sind mehr Versuche ($2 \times \kappa$, und $2 \times \lambda$!) möglich. Sind alle Möglichkeiten erfolglos ausgeschöpft, stirbt die Zelle. Ist jedoch eine Rekombination erfolgreich, wird das eventuell verbliebene nicht umgeordnete Chromosom stumm geschaltet (*allelische Exklusion*). Eine Ausnahme bildet die erste, also die D-J Rekombination, die auf beiden Allelen abläuft.



Wichtig: Alle bis jetzt diskutierten Mechanismen finden während der Reifung zum B-Lymphocyten also vor dem aktivierenden Antigenkontakt statt. Dies gilt nicht für den folgenden Mechanismus.

Entstehung der Antikörperdiversität 4) Somatische (Hyper)Mutation

Abweichend von dem Grundsatz, dass ein Zellklon nur Antikörper einer Spezifität produziert, kann man in vivo feststellen, dass im Laufe einer Immunantwort Antikörper immer höherer Affinität auftreten. Grundlage dafür ist, dass in stimulierten B-Lymphocyten (also solchen, die bereits Antigen-Kontakt hatten) Mutationen auftreten. Diese Mutationen sind im variablen Bereich der Antikörper deutlich höher als es statistisch zu erwarten wäre. Treten bei diesen Mutationen zufällig solche mit höherer Affinität zum Antigen auf, so werden die zugehörigen B-Lymphocyten durch T-Zellen zur Proliferation angeregt, während die anderen mit niedrigerer Affinität den programmierten Zelltod (Apoptose) erleiden. Als Auslese Kriterium scheint dabei die Konkurrenz um Antigene auf den folliculären dendritischen Zellen (\neq dendritische Zellen, die Antigen auf MHC präsentieren !!!) in den Keimzentren der Lymphknoten und der Milz zu sein. In Summe nimmt die Anzahl der Zellen, die einen höher affinen Antikörper bilden, zu. Das ganze Phänomen wird als *Affinitätsreifung* bezeichnet.

In jüngster Zeit gibt es Befunde, dass diese Affinitätsreifung auch auf einer erneuten Genrekombination beruhen kann. Dabei werden die zugehörigen Mechanismen in Zellen die nur einen mittelmäßigen Antikörper bilden wieder angeschaltet und neue Segmente zusammengefügt.

[Siehe Cell 95, 875-878 (1998)]

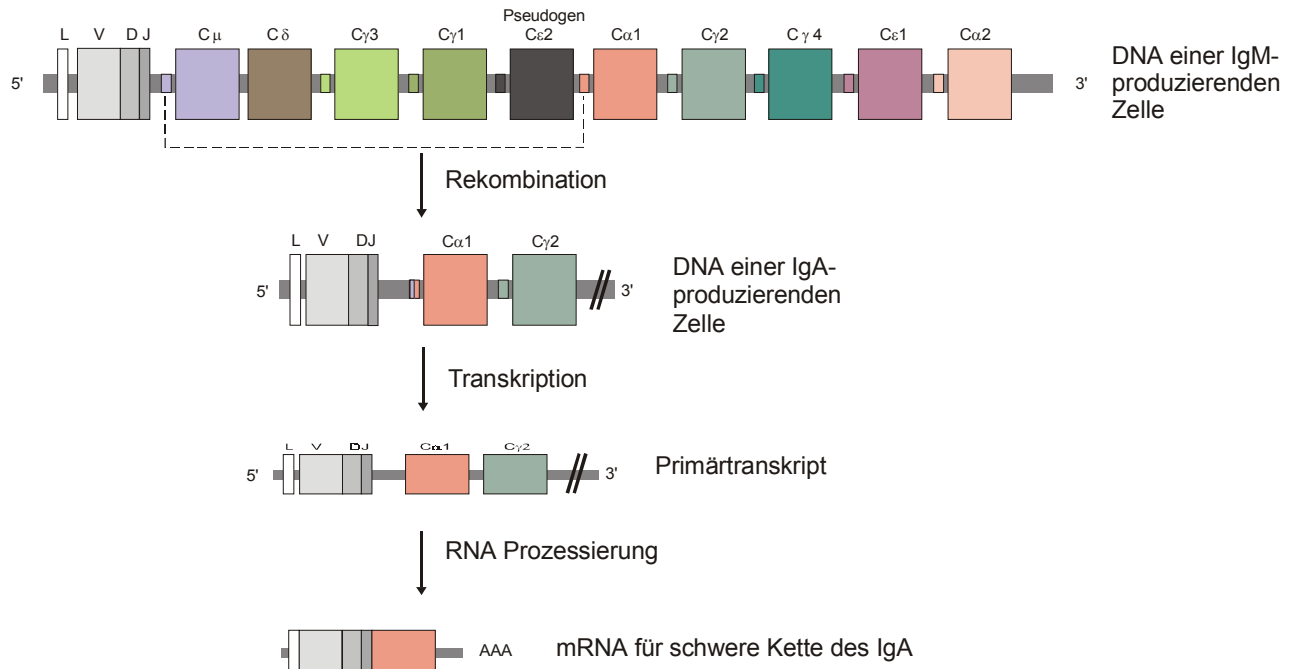
Zusammenfassung der Faktoren, die Antikörper-Diversität erzeugen:

- 1) Große Anzahl verschiedener Gene, die für die variable Region des AK codieren können.
- 2) Somatische Rekombination dieser Gene
- 3) Einfügen zusätzlicher neuer Nukleotide bei der Verknüpfung
- 4) Somatische Mutation
- 5) Kombination der schweren Kette mit zwei möglichen leichten Ketten

Wechsel der Antikörperklasse

(Rückverweis auf primäre und sekundäre Immunantwort)

Im Laufe einer Immunantwort schaltet der Körper von der Produktion von IgM auf andere Klassen meist IgG oder IgA, aber auch IgE um. Dies erfolgt über ein Rekombinationsereignis analog der Herstellung der variablen Region. Dabei lagern sich die *in einem Intron gelegenen* so genannten S-Regionen aneinander. Infolge dessen entstehen bei dieser Rekombination stets funktionelle Proteine.



Auch hier geht die dazwischen liegende DNA verloren. Das bedeutet, dass alle Antikörperklassen, deren Information in der embryonalen Zelle 5' von der aktuell exprimierten lag, nicht mehr gebildet werden können.

In einer Ausnahme wird die Antikörperklasse jedoch über RNA-Prozessierung bestimmt. Das ist die gleichzeitige Expression von IgM und IgD auf der B-Lymphocytenmembran. IgD besitzt dementsprechend keine eigene S-Region.

Im Wesentlichen bestimmen T-Helferzellen bzw. die durch sie produzierten Interleukine, welche neue Klasse nach einem Wechsel produziert wird. (siehe unten im Abschnitt über Helferzellen)

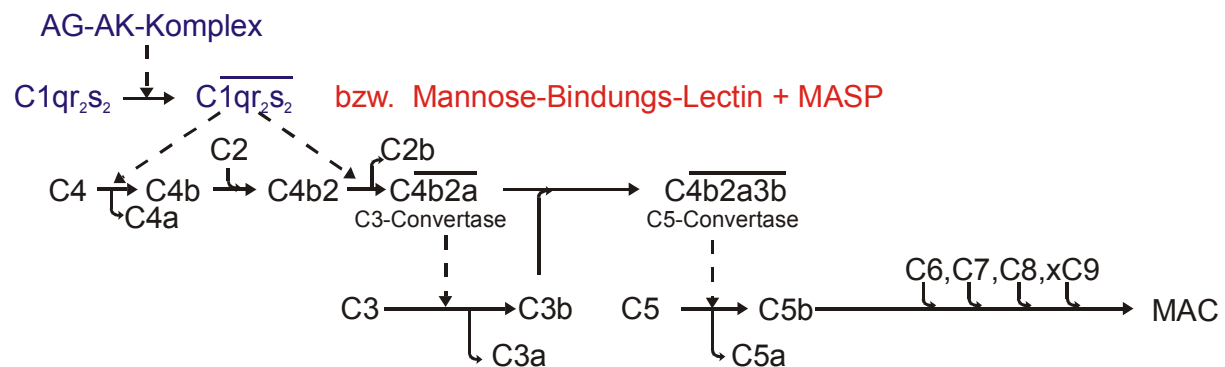
III Complementsystem

Grundlagen:

Das Complementsystem besteht aus inzwischen über 30 Serum- und Zelloberflächenproteinen. Sie sind in verschiedenster Weise an der Immunabwehr des Körpers beteiligt. Analog dem Blutgerinnungssystem handelt es sich um eine Kaskadenreaktion aus proteolytischen Schritten (bis zur Spaltung von C5, danach nur noch Konformationsänderungen).

Die proteolytisch aktive Form wird in der Regel mit einem Querbalken gekennzeichnet. Die Bruchstücke erhalten nach Größe sortiert kleine Buchstaben angehängt (z.B.: C3a kleiner als 3b). Eine Ausnahme bildet der (proteolytisch aktive) Faktor 2a, der größer als 2b ist. Hieraus resultieren vermutlich auch die widersprüchlichen Bezeichnungen in unterschiedlichen Lehrbüchern.

Der Klassische Aktivierungsweg:



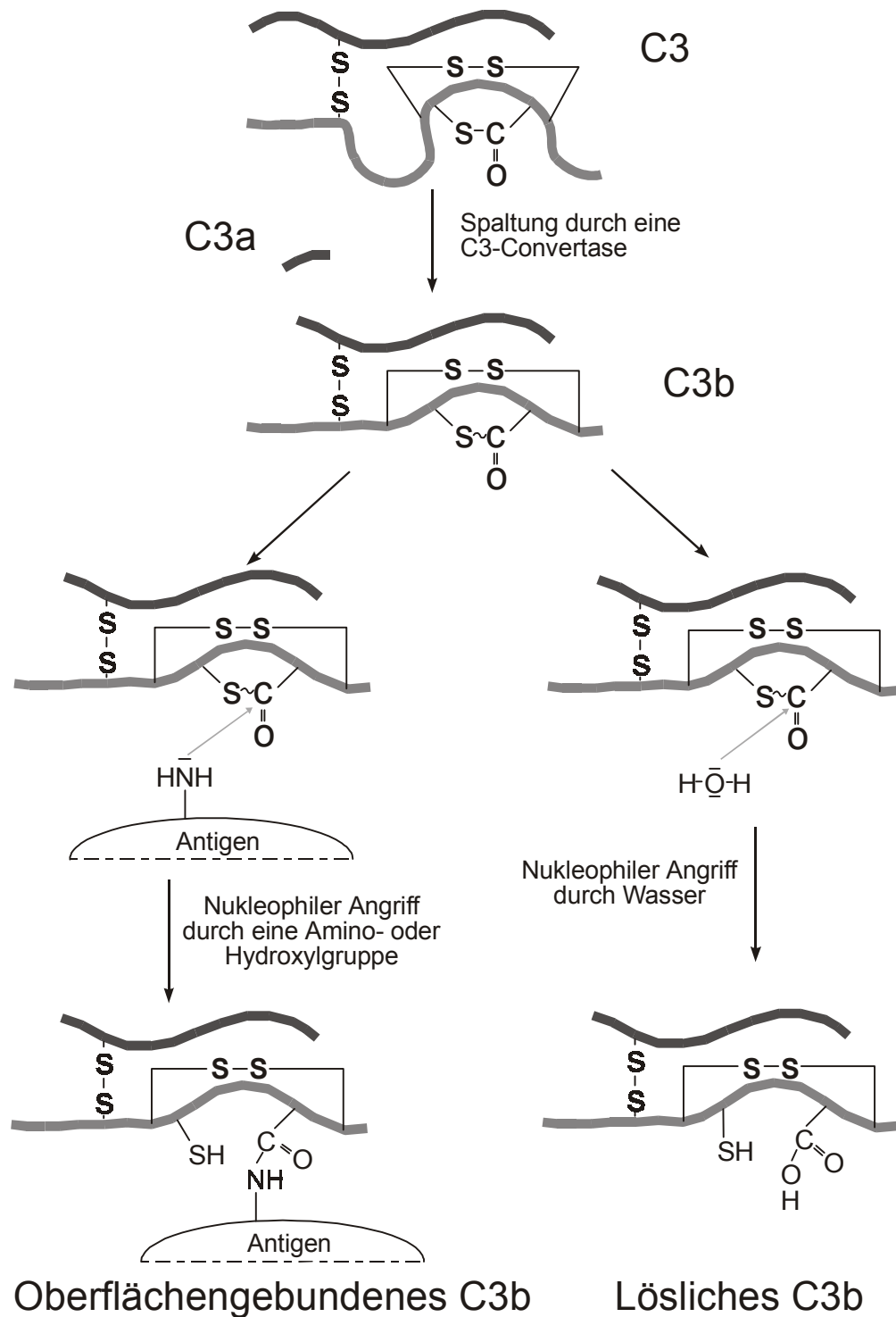
MAC = membrane attacking complex
 MASP = MBL assoziierte Serinprotease

Zur Auslösung des klassischen Weges bedarf es meist eines Antigen-Antikörper Komplexes. Dabei muss das C1q mit zwei Complement-Bindestellen eines Antikörpers wechselwirken. Bei IgM als Pentamer genügt dazu ein Molekül, bei IgG müssen zwei Moleküle in ausreichender Nähe am Antigen gebunden sein. IgA, IgE, IgD können das Komplement nicht aktivieren, auch die verschiedenen Isoformen des IgG unterscheiden sich deutlich (IgG1 und IgG3 aktivieren gut, IgG2 schlecht und IgG4 gar nicht). Für die Tatsache, dass nur Antigen gebundene Antikörper C1q aktivieren können, postuliert man eine Konformationsänderung. Hat C1q gebunden, führt dies zu einer Konformationsänderung von C1r und damit zu dessen Aktivierung. C1r spaltet in Folge dann C1s, welches seinerseits dann (als Serinprotease) C4 und C2 spalten kann.

Neben einem AG-AK Komplex können auch Lipopolysaccharide, Porine aus Gram negativen Bakterien, Liganden gebundenes C-reaktives Protein (ein Akutphase-Protein, das an bakterielle Oberflächen bindet) und eine Reihe von Lectinen (Collectine) das klassische Complementsystem aktivieren. Wenigstens eines davon (MBL = mannose-binding-lectin) hat eine dem C1q sehr ähnliche Struktur und aktiviert die Protease MASP (MBL associated serin protease), sobald es an bakterielle Oberflächenzucker gebunden hat. Von manchen Autoren wird dieser MBL Weg auch als dritte gleichberechtigte Möglichkeit zur Komplementaktivierung geführt.

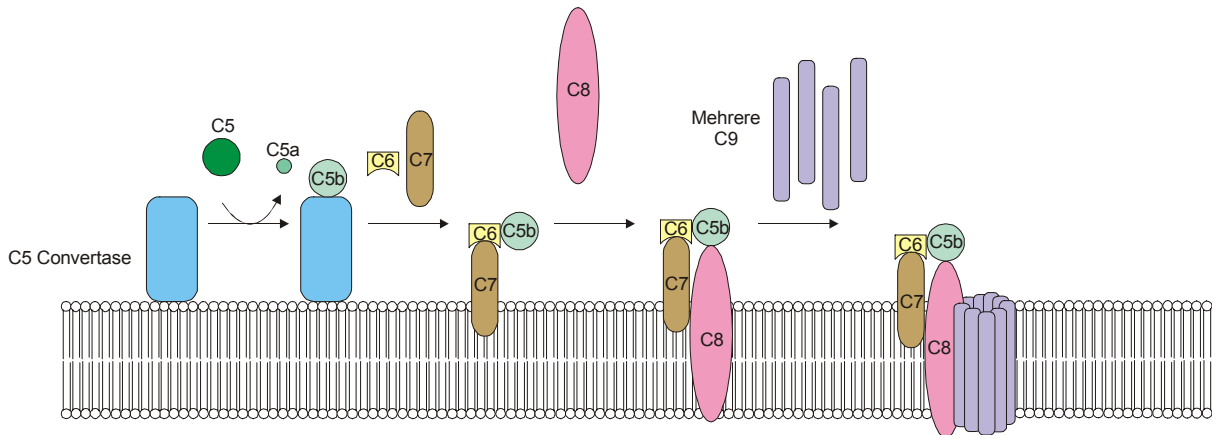
Fixierung des Complementsystems auf der Antigenoberfläche mittels der Reaktion eines Thioesters:

Gilt sowohl für C3 wie analog auch für C4, nur dass letzteres noch eine dritte Kette besitzt. Durch die ursprüngliche Aktivierung des C1 durch einen AG-AK-Komplexes ist bereits eine nicht kovalente Lokalisation am Zielprotein gegeben. Durch nachfolgenden Mechanismus werden C3b bzw. C4b kovalent an das Antigen gebunden.

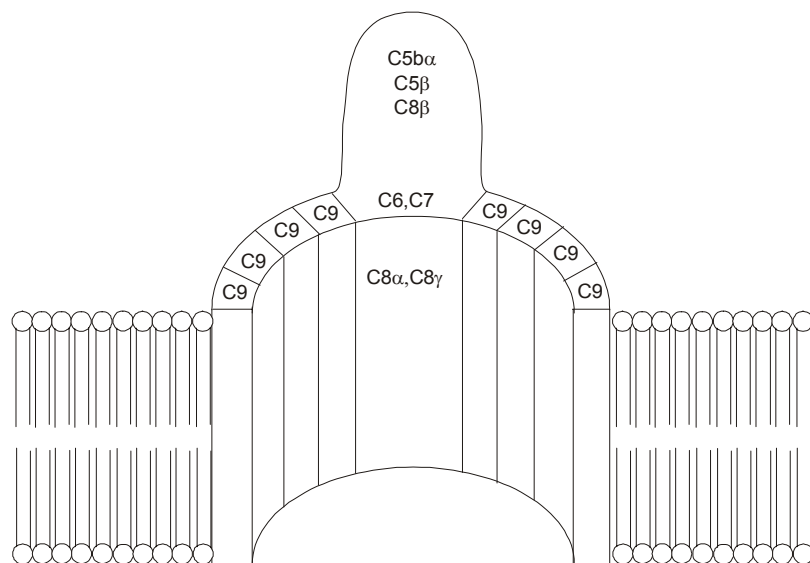


Gemeinsame Endstrecke und der Lysekomplex (Membrane Attack Complex):

Die Zusammenlagerung der Komponenten C5-C8 führt nach neueren Vorstellungen zu einer Art Pflock in der Membran (weniger zu einem kleinen Loch wie früher angenommen).



Lagern sich danach mehrere (die genaue Anzahl ist umstritten) Einheiten C9 dazu, kommt es zur Zellyse. Durch die inzwischen erfolgte elektronenoptische Charakterisierung konnte ein etwas genaueres Modell des Lysekomplexes konstruiert werden.

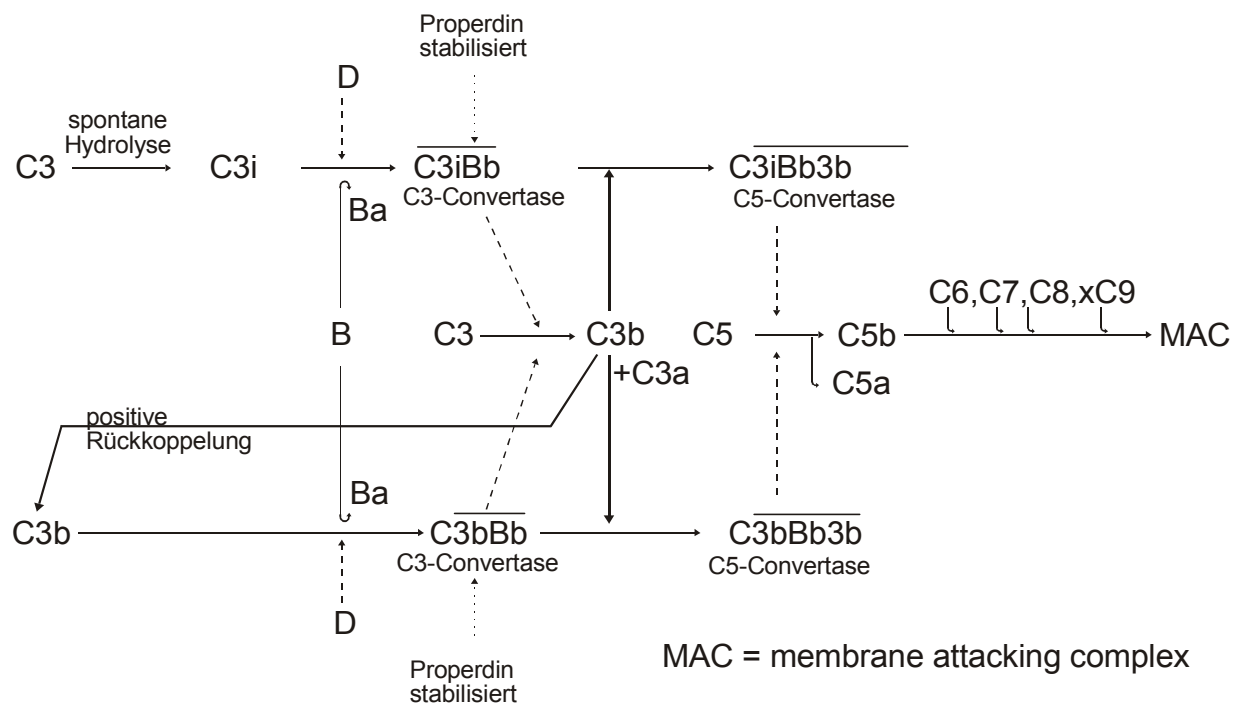


Die Bedeutung des Lysekomplexes für die Effektivität der Komplementwirkung ist in letzter Zeit durch Befunde zu genetischen Defekten eingeschränkt worden. Demnach können Patienten mit Defekten der Faktoren C6-C9 relativ gut existieren. Sie haben allerdings Probleme mit bestimmten Erregern vor allem der Gattung Neisseria. Sehr schwer wiegende Folgen zeigen sich im Gegensatz bei Defekten in den "frühen" Faktoren speziell C3. Das deutet daraufhin, dass andere Wirkungen des Complementsystems (z.B. Die Opsonierung, s.u.) bisher unterschätzt wurden.

Der Alternative Aktivierungsweg des Complementsystems

Auch beim alternativen Aktivierungsweg sind in den letzten Jahren deutliche Auffassungsänderungen bzgl. der Aktivierung zu verzeichnen. Wurden früher vor allem bakterielle Oberflächenproteine als Auslöser der alternativen Kaskade genannt, neigen die meisten Autoren heute zu der Auffassung, dass es sich um ein stetig auf niedrigem Level selbst aktivierendes, mit einem positiven Rückkoppelungsmechanismus ausgestattetes System handelt. Negative Folgen für den Organismus werden durch eine Vielzahl von inhibitorischen Faktoren im Serum und vor allem auch auf Körperzellen wie den Erythrocyten vermieden (s.u.). Bakterien besitzen diesen Schutz in der Regel nicht und sind daher dem Angriff verstärkt ausgesetzt. Inwieweit zudem noch Bestandteile von bakteriellen Zellwänden aktivierend wirken, muss die exakte Charakterisierung zeigen. So scheint z.B. der niedrige Gehalt an Sialinsäuren bei Bakterien (im Vergleich zu Körperzellen) die Bindung des Faktors B zu fördern.

Der biochemische Ausgangspunkt liegt in der spontanen Hydrolyse des oben geschilderten Thioesters. Dies führt zu einer partiell aktiven löslichen Form des C3, die die weitere Kaskade antreiben kann, indem sich in der Folge eine alternative C3-Convertase bildet. Dadurch entsteht C3b, das wiederum B anlagern kann. Wird dies durch D gespalten, entsteht weitere C3 Convertase und die positive Rückkoppelungsschleife des Systems ist geschlossen. Lagert sich das neu gebildete C3b an die C3 Convertase an, kommen wir zur C5 Convertase des alternativen Weges. Damit ist die gemeinsame Endstrecke mit dem klassischen Weg erreicht.



Regulation des Complementsystems an Beispielen:

Auf Grund seines hohen zerstörerischen Potentials muss das Complementsystem extrem gut reguliert werden.

Die erste wesentliche Einschränkung erfährt das System dadurch, dass die meisten genannten Komplexe nur für Bruchteile von Sekunden stabil sind. Daneben gibt es eine Vielzahl von inhibitorischen Faktoren.

Die Anzahl der bekannten Regulatoren des Complementsystems übersteigt inzwischen die Anzahl der Complementfaktoren. Im Folgenden seien nur einige Beispiele für die Regulation genannt:

C1 Inhibitor: Serinproteaseinhibitor (Serpine), der in hoher Konzentration im Serum vorkommt. Der C1 Inhibitor wird kovalent von den Proteasen s bzw. r gebunden.

Faktor H: Kompetitiver Inhibitor zu B. Faktor H verdrängt Bb und lagert sich an C3b an, welches damit dem Abbau durch den Faktor I ausgesetzt wird.

Faktor I + membranständige oder lösliche Faktoren (z.B. MCP oder auch Faktor H): führen zum Abbau von membranständigem C3b. Faktor I ist eine Serinprotease.

S-Protein: Bindet an C7 bevor sich dieses in die Membran einlagert

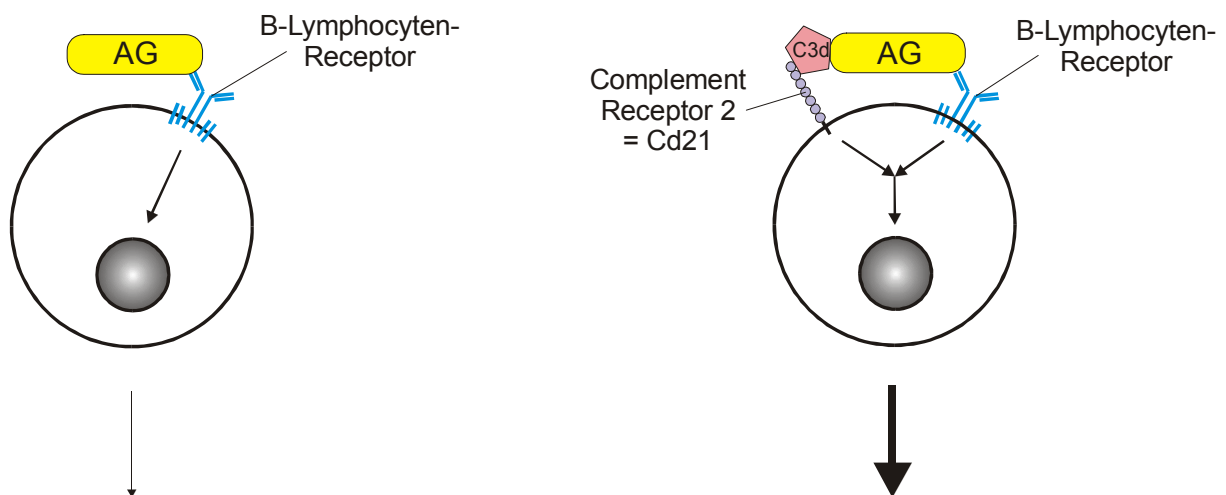
Einige der membranständigen Faktoren sind über ein Glycolipid verankert. Ihre Bedeutung wurde durch die so genannte *paroxysmale nocturnale Hämoglobinurie* deutlich. Patienten mit dieser Krankheit zerstören ihre Erythrocyten mit ihrem eigenen Complementsystem. Der zu Grunde liegende genetische Defekt stört die Synthese der Glycolipidanker. Die Folge ist, dass die membranständigen Schutzmechanismen durch CD55=DAF (inhibiert oder destabilisiert die C3-Konvertase) bzw. CD59 (inhibiert den C5-C9 Komplex) ausfallen. Das betroffene Gen ist eine N-Acetylglucosamintransferase und ist auf dem X-Chromosom lokalisiert. Dadurch kann diese Krankheit durch somatische Mutationen auf dem aktivierten X-Chromosom irgendwann im Leben eines Patienten auftreten. (Daneben treten mannigfaltige weitere Störungen des Immunsystems auf, die in schweren Fällen letal sein können)

Funktionen des Complementsystems:1) *Bakterienlyse*

2) *Steuerung der Entzündung* Mehrere der abgespaltenen Bruchstücke wirken als Chemotaktikum für andere Zellen des Immunsystems, erhöhen direkt den Muskeltonus der Gefäße und ihre Flüssigkeitsdurchlässigkeit oder lösen z.B. die Histaminfreisetzung aus.

3) *Opsonierung* von Bakterien mit z.B. C3b. Über C3-Receptoren wird auch hier die Phagozytose durch Fresszellen gefördert. Dieser Vorgang ist entscheidend an der Beseitigung von Immunkomplexen beteiligt, vor allem solchen, deren Antikörper-Besatz für eine effektive Phagozytose mittels Fc-Receptoren nicht ausreicht.

4) *Stimulation der spezifischen Immunantwort* unter anderem dadurch, dass B-Lymphocyten ebenfalls Receptoren (CR2=CD21) für C3d (ein C3b Abbauprodukt) haben. Sie werden dadurch bei Antigenen mit gebundenem C3d effektiver d.h. mit geringerer Auslöseschwelle stimuliert. Die Notwendigkeit derartiger costimulatorischer Signale ist weit verbreitet innerhalb des Immunsystems.



IV Das MHC-System

Entdeckt als die Proteine die als "Hauptverantwortliche" für die Gewebsabstoßung dienen. Die physiologische Rolle im Rahmen der Immunabwehr wurde erst 20 Jahre später erkannt. Wegen der Begriffsverwirrung ein kleiner historischer Rückblick:

Bei ersten Versuchen zur Gewebstransplantation (Hautübertragung bei Brandopfern) stellte sich Hereaus, dass die übertragenen Gewebe nicht überlebten. Bei der Suche nach den Ursachen für diese Transplantatabstoßung gab es zwei verschiedene Forschungsansätze.

1) In tierischen Systemen (Maus) wurde mit klassischen Methoden der Genetik nach den Erbanlagen gesucht, die für die Transplantatabstoßung verantwortlich sind. Daraus entwickelte sich die Major Histocompatibility Complex (*MHC* = Haupthistokompatibilitätskomplex.)-Nomenklatur als eine übergeordnete Nomenklatur, die für alle Spezies gilt. Daneben gibt es noch ein spezielles Nomenklatursystem für Mäuse.

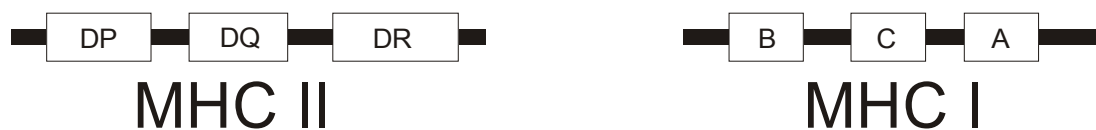
2) Im menschlichen System wurden und werden Seren (z.B. von Schwangeren oder Transplantatempfängern) darauf untersucht, ob sie Antikörper gegen Lymphocyten anderer Individuen enthalten und welche Antigene dabei erkannt werden => human lymphocyte antigen (*HLA*)-Nomenklatur.

Zusätzlich gibt es für alle weiteren wichtigen Versuchstierspezies z.B. kaninchen noch eigene Nomenklatursysteme.

Die biochemische Charakterisierung der zu Grunde liegenden Proteine zeigte, dass in beiden Fällen am gleichen Subjekt geforscht wurde. Trotzdem existieren noch alle Nomenklatursysteme.

Auf einen knappen Nenner gebracht stellt sich die Situation im Menschen folgendermaßen dar:

Jedes Individuum trägt in seinem Genom die Information für verschiedene Typen von MHC-Proteinen: (MHC II vereinfacht, MHC III wird hier nicht behandelt)

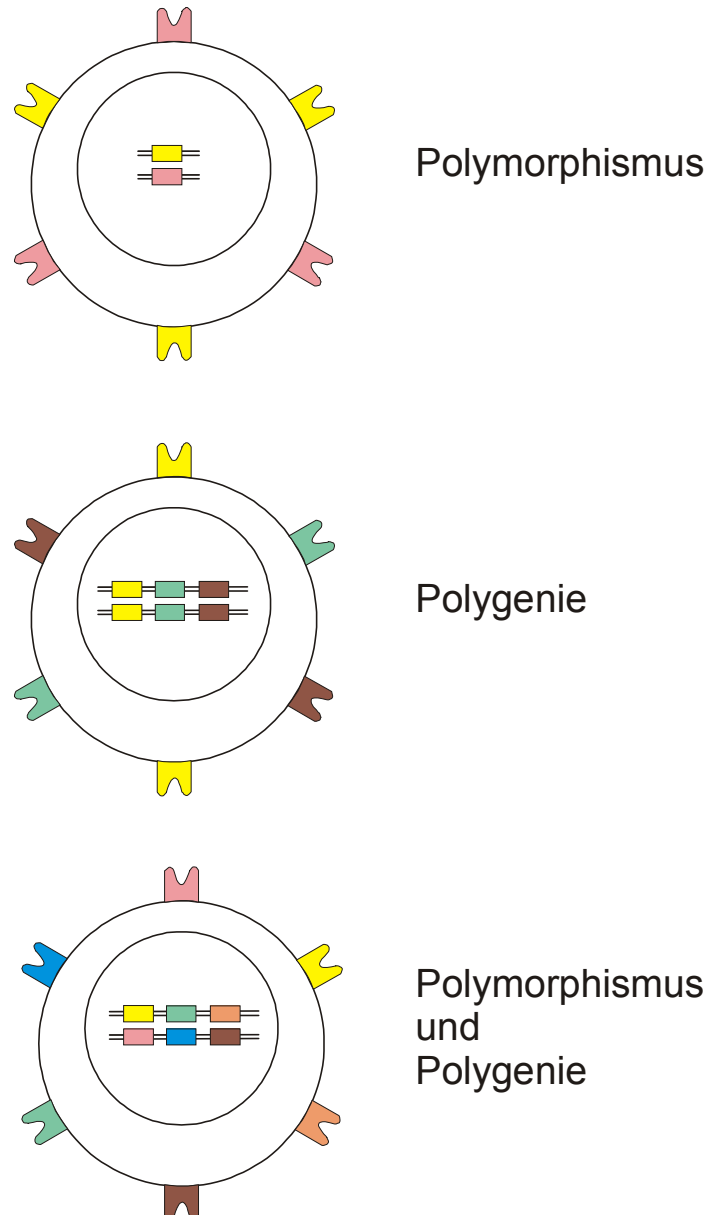


Diese werden in folgender Weise exprimiert:

- MHC I auf allen (bis jetzt untersuchten) kernhaltigen Körperzellen. Die Expression kann durch Interferon- α , Interferon- β , Interferon- γ , Tumor Nekrose Faktor und Lymphotoxin erhöht werden.
- MHC II zusätzlich auf einer Reihe von weiteren Zellen entweder konstitutiv) oder nach Interferon- γ -Stimulation (Makrophagen, B-Lymphocyten, dendritische Zellen der Lymphknoten - entstanden aus Langerhanszellen der Haut - und Gefäßendothelzellen).
- Es werden alle drei Loci exprimiert (Polygenie) und zwar ohne allelische Exklusion d.h. vom väterlichen wie mütterlichen Chromosom gleichermaßen (d.h. bis zu 6 verschiedene pro Zelle, bei MHC-II sogar mehr , s.u.).

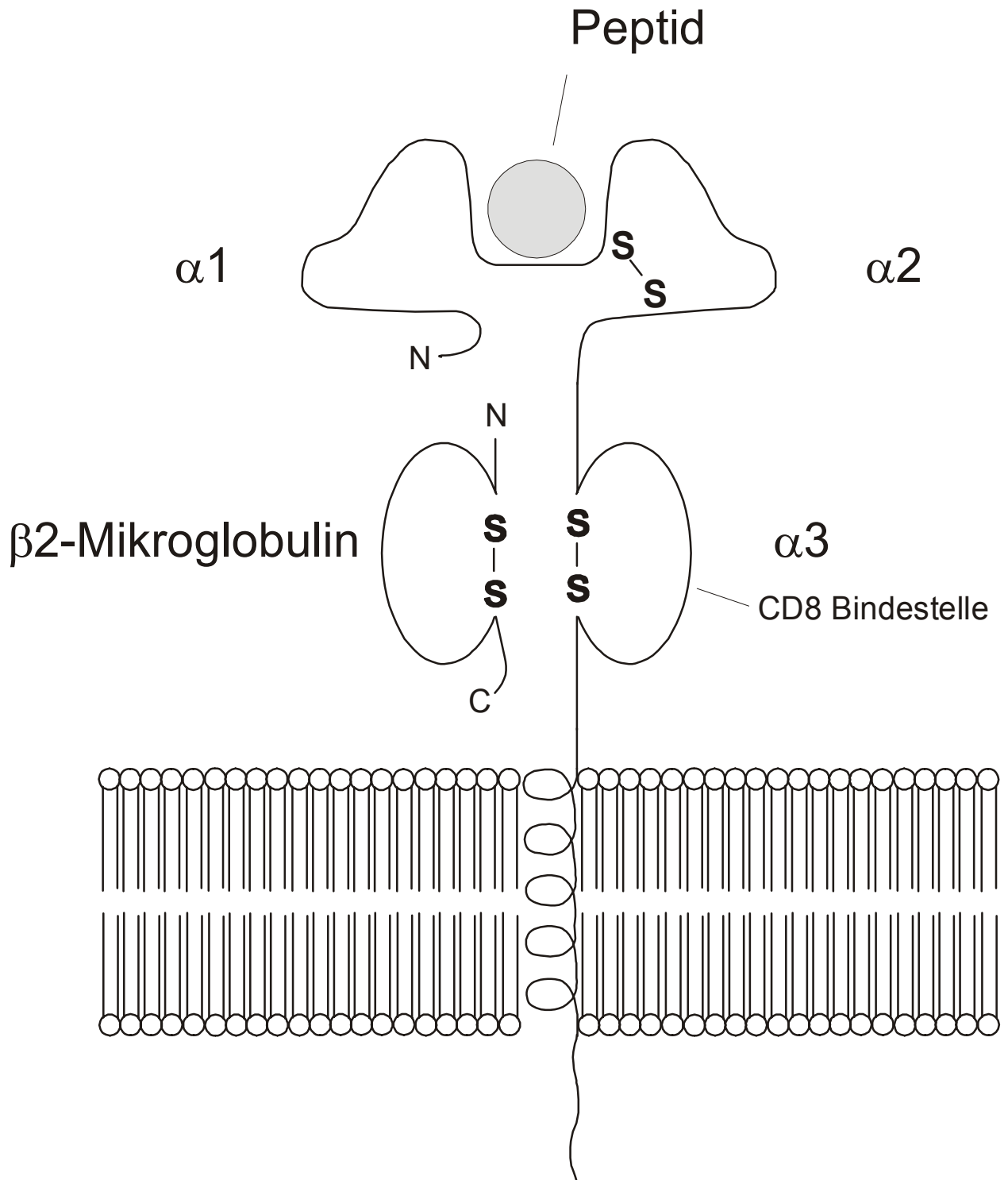
Zudem herrscht für die einzelnen Loci innerhalb einer Population ein extremer Polymorphismus. Dieser ist vermutlich durch hohen Selektionsdruck entstanden und stellt sicher, dass wenigstens einige Mitglieder einer Population mit ihren MHC in der Lage sind, neuen Erregern zu begegnen. (siehe bei Besprechung der physiologischen Rolle des MHC)
 Beim Menschen liegen die MHC-Loci auf Chromosom 6 und umfassen einen Bereich von ca. 3500 Basenpaaren (Man vergleiche dies mit dem Genom von *Escherichia coli*, dessen gesamtes Genom ca. 4500 Basenpaare umfasst !)

Grafik zur Verdeutlichung der Auswirkungen von Polymorphismus und Polygenie



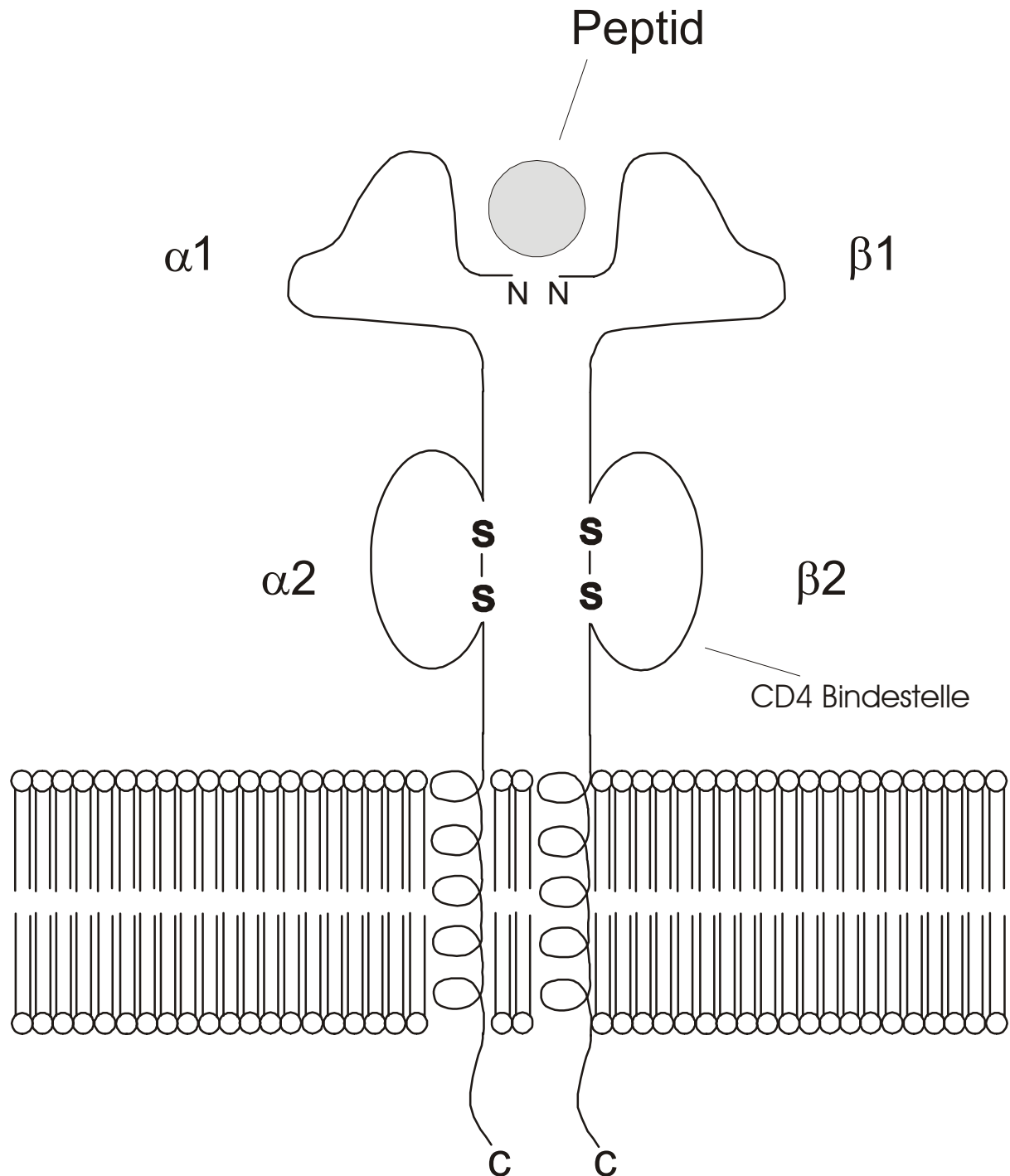
Gleichzeitig ist diese Polygenie bzw. dieser Polymorphismus aber auch der Hintergrund für die Gewebsabstoßung bei Transplantationen. Da kaum ein Individuum die gleichen MHC Proteine exprimiert wie ein anderes, werden diese körperfremden Proteine vom Immunsystem des Transplantatempfängers erkannt.

Struktur des MHC I-Proteine



Das präsentierte Peptid ist 8-10 optimal 9 AS lang. Die beiden Enden werden fest in der Spalte gebunden, eventuelle 'Überlänge' durch Ausstülpungen im Mittelteil ausgeglichen. α₃ tritt in Kontakt mit CD8 auf cytotoxischen Zellen. Das β₂-Mikroglobulin ist zur Stabilisierung des Komplexes obligatorisch.

Struktur MHC II Proteine:



Die antigenbindende Region wird aus beiden Ketten zusammen gebildet. Der Aufbau der Peptid-bindenden Spalte ist sehr ähnlich der von MHC I mit dem Unterschied, dass die Enden offen sind. Die gebundenen Peptide sind entsprechen länger (15 - 22 AS) und ragen auf beiden Seiten heraus.

Die Genstruktur ist noch etwas komplizierter als oben dargestellt weil sich unter DP,DQ bzw. DR jeweils z.T. mehrere α bzw. β -Ketten verbergen, die sich beliebig kombinieren können. Dadurch erhöht sich auch die Anzahl der verschiedenen möglichen MHC-II Moleküle auf einer Zelle. Die β 2-Domäne tritt in Kontakt mit CD4 auf Helferzellen.

Physiologische Funktion der MHC Proteine: Antigenpräsentierung

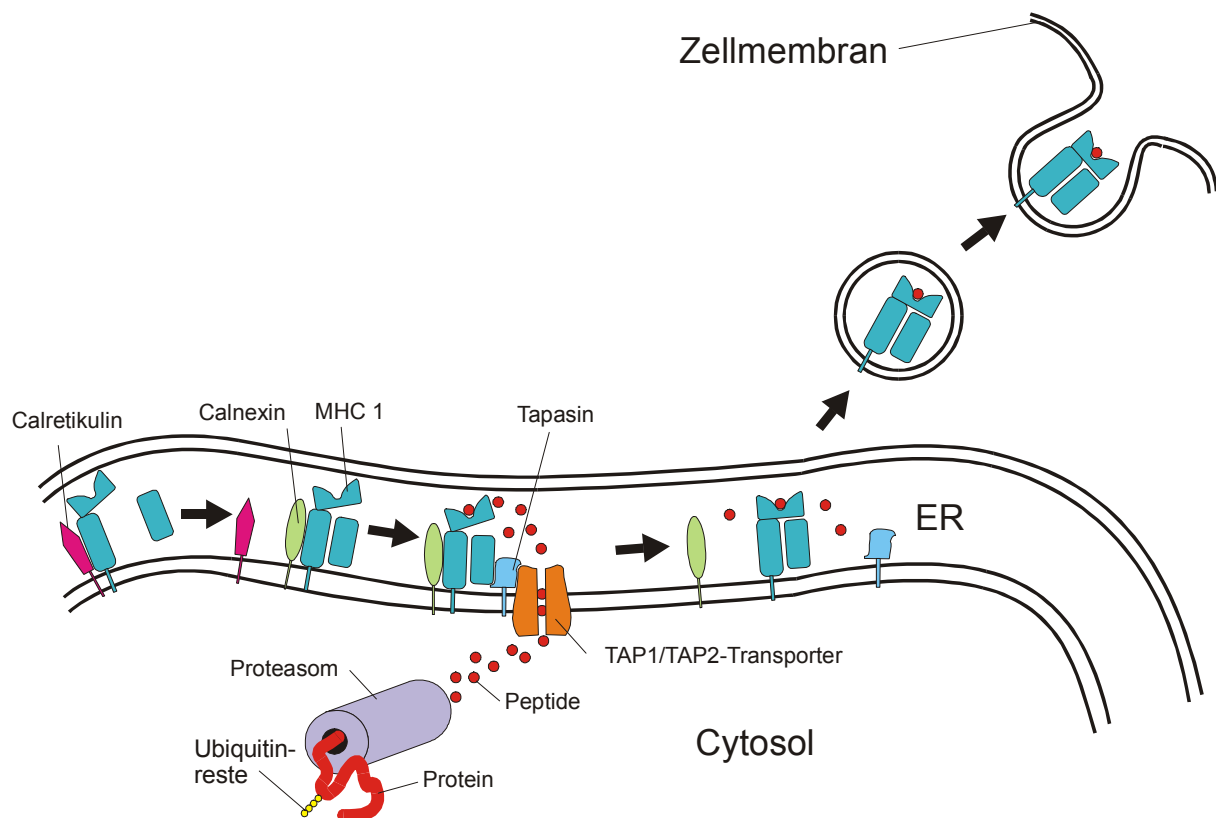
Die physiologische Funktion der MHC Proteine besteht darin Antigenbruchstücke auf der Zelloberfläche der Trägerzellen zu präsentieren und dadurch T-Lymphocyten zu aktivieren oder stimulieren. Die Bindungsstärke zwischen Peptid und MHC ist um Größenordnungen schwächer als bei Antikörpern. Jedes der MHC Moleküle kann aber mit einer ganzen Reihe verschiedener Peptide in Wechselwirkung treten. (wenige verschiedene MHC Moleküle müssen ja auch reichen um mit allen existierenden Antigenen fertig zu werden).

Bezüglich der Herkunft der Peptide besteht ein deutlicher Unterschied zwischen den beiden Klassen.

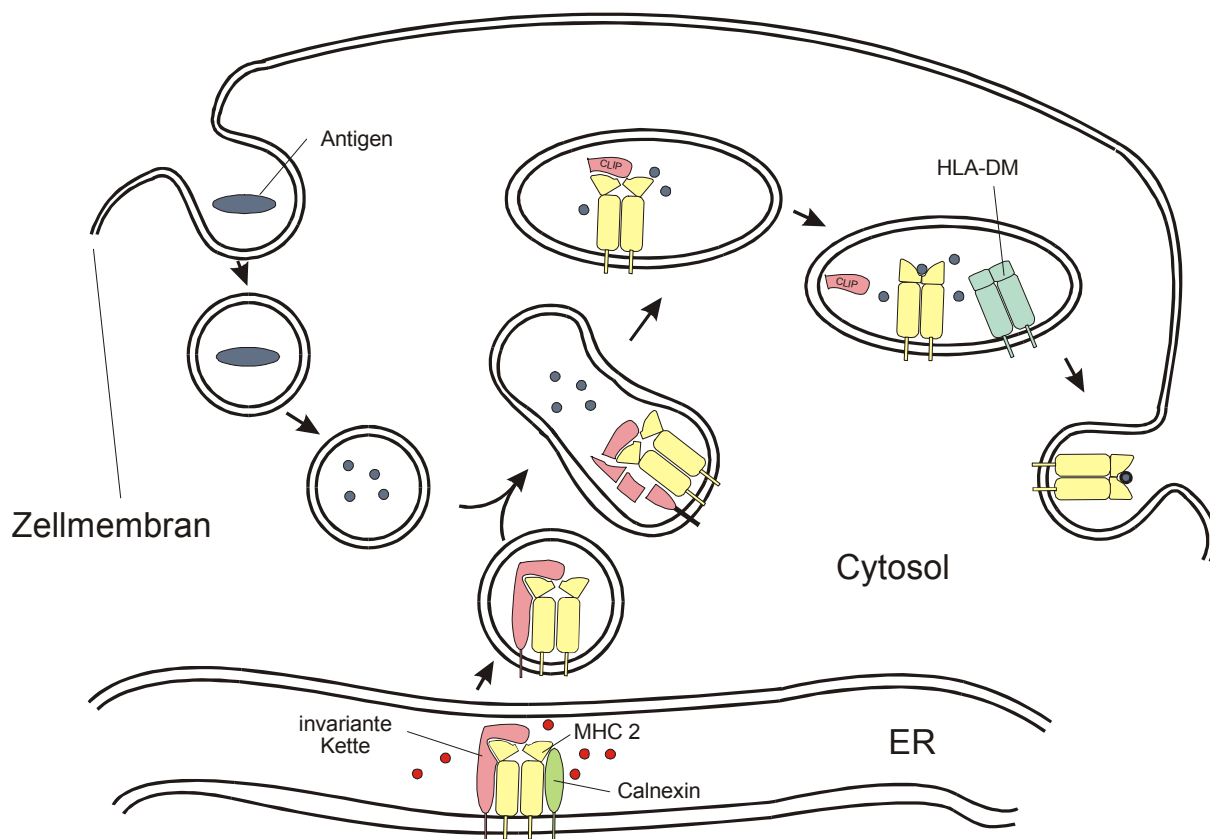
MHC-I: An MHC-I werden Peptide aus cytosolischen Proteinen präsentiert, die vorher meist in der Zelle synthetisiert und danach an Proteasomen wieder zerschnitten wurden. Die Bruchstücke werden anschließend durch spezielle ATP-abhängige Transporter (TAP) vom Cytosol ins ER-Lumen geschleust, wo sie mit MHC-I assoziieren. Dieses wird dort durch die Chaperone Calnexin/Tapasin fest gehalten und stabilisiert. Nach der Assoziation des Peptides fallen Calnexin/Tapasin ab und das MHC-I kann an die Zelloberfläche exportiert werden. Bei den prozessierten Antigenen handelt es sich in aller Regel um zelleigene Proteine, aber auch um virale Proteine, die nach einem Virusbefall im Cytosol synthetisiert werden.

[Interferon γ kann die Zusammensetzung der Proteasomen so verändern, dass hauptsächlich hinter basischen und hydrophoben Resten geschnitten wird. Die so entstehenden Bruchstücke passen besser auf MHC I].

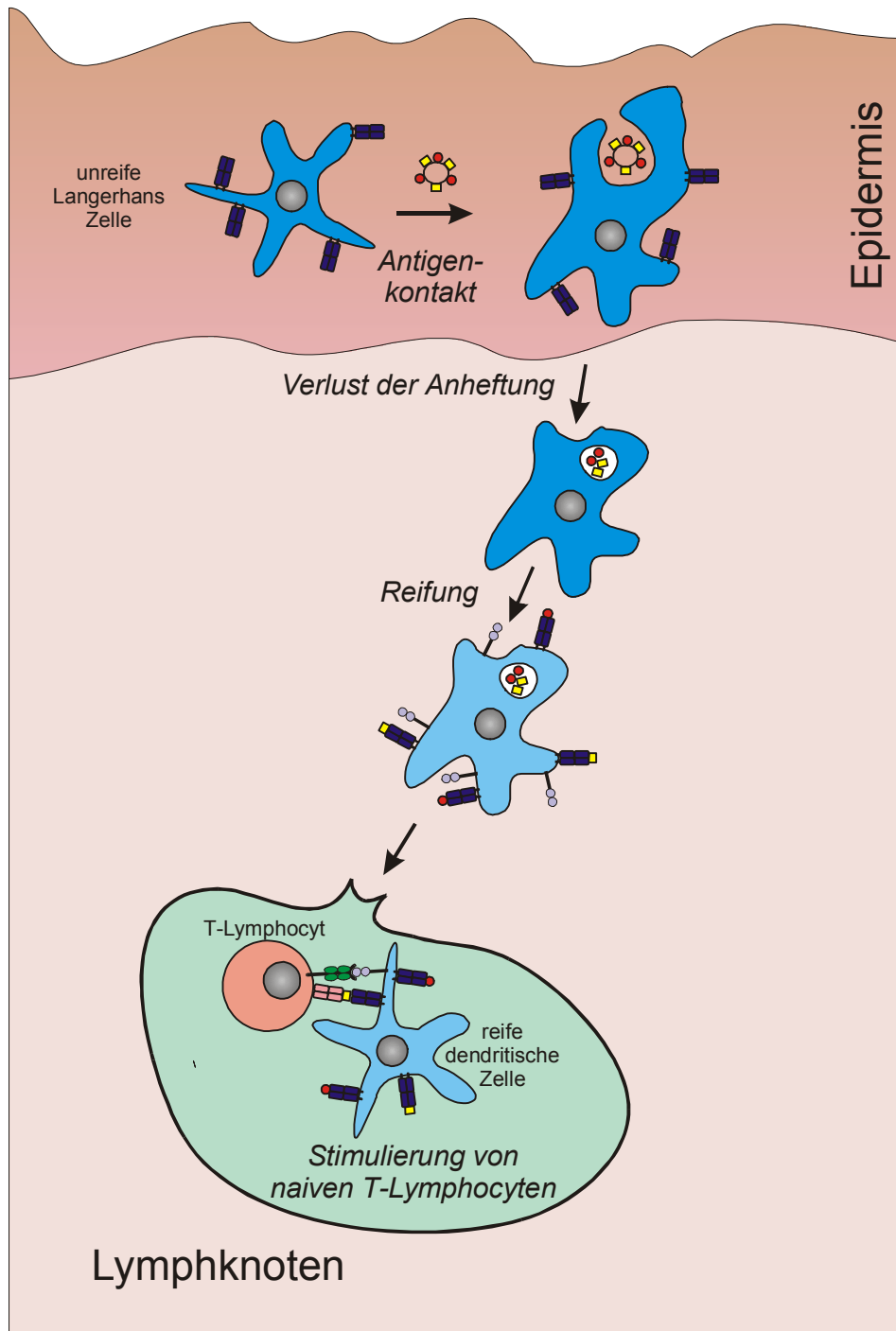
In jüngerer Zeit wurden allerdings auch Subpopulationen von Makrophagen beschrieben, die auf noch nicht genau geklärte Weise(n) auch extracelluläre Antigene auf MHC-I präsentieren.



MHC-II: An MHC-II werden Peptide aus Proteinen präsentiert, die von außen per Phagozytose in die Zelle aufgenommen und dann in Lysosomen verdaut wurden. (Alternativ kommen auch Proteine aus Pathogenen in Frage, die bereits innerhalb von Vesikeln in der Zelle existierten z.B. Mycobakterium tuberculosis.) Nach Verschmelzung der Lysosomen mit MHC-II enthaltenden Vesikeln erfolgt die Assoziation von Peptid mit MHC-II. Um zu verhindern, dass bereits im ER-Lumen Peptide an MHC-II binden, ist dort das Ii Protein (ein Chaperon) angelagert, welches dann nach Verschmelzung mit den Lysosomen verdaut wird und somit die Bindestelle freigibt. Dabei bleibt das so genannte CLIP-Fragment, das die Bindestelle blockiert am längsten erhalten. Das Protein HLA-DM, das Ähnlichkeiten zu MHC Proteinen aufweist, scheint die Abdissoziation von CLIP zu erleichtern.



Festzuhalten bei diesem Vorgang ist die Tatsache, dass der Ort der Antigenaufnahme und der Antigenpräsentation keineswegs identisch sein müssen. Besonders deutlich wird dies bei der Betrachtung der Entwicklung der dendritischen Zellen (\neq folliculäre dendritische Zellen) der Lymphknoten. Deren Vorläuferzellen sind die Langerhans Zellen, die in der Epidermis vorkommen. Haben diese Langerhans Zellen ein Antigen phagozytiert, verlassen sie die Epidermis und wandern über die Lymphgefäße in die Lymphknoten. Während dieser Wanderung reifen sie zu vollwertigen "Antigen präsentierenden Zellen" heran (d.h. sie neben Peptid + MHC II auch weitere costimulatorische Proteine auf ihrer Membran, s.u.). Dadurch können sie dann in den Lymphknoten - jetzt als reife dendritische Zellen - die dort ebenfalls eingewanderten T-Lymphocyten stimulieren.



Wichtig:

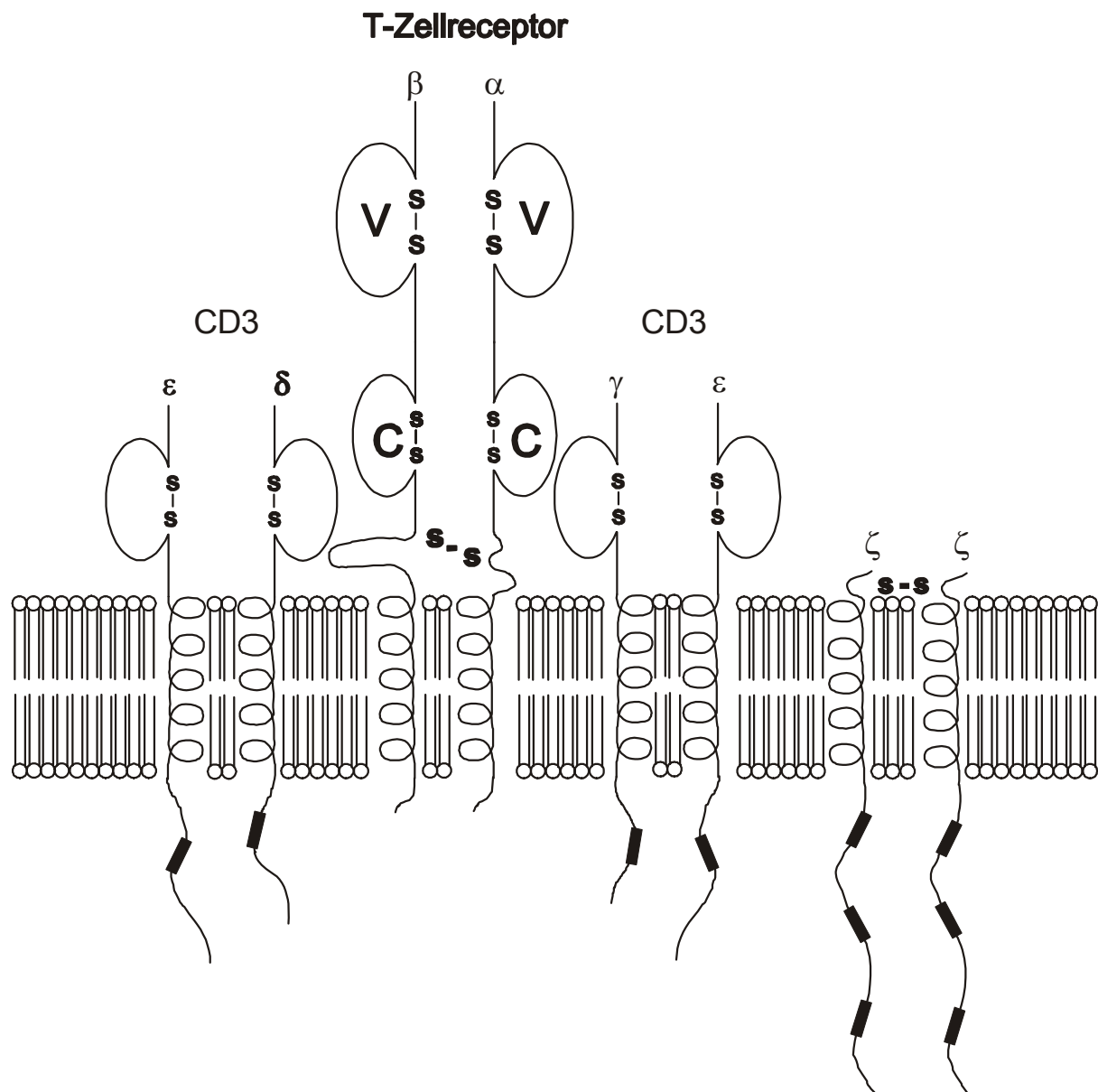
Entgegen der immer noch existierenden Behauptung in vielen schlechten Skripten ist der grundlegende funktionelle Unterschied zwischen den MHC Klassen **nicht** darin, dass MHC I körpereigene und MHC II körperfremde Antigene präsentiert. An beiden MHC Klassen werden sowohl körpereigene wie körperfremde Peptide präsentiert. Die Unterscheidung zwischen Eigen und Fremd wird durch die erkennenden T-Lymphocyten festgelegt, und zwar dadurch, dass es in einem gesunden Organismus keine oder keine aktivierbaren T-Lymphocyten gibt, die auf körpereigene Peptide reagieren.

V. T-Lymphocyten und der T-Zellreceptor

Der Zweck der Peptidpräsentierung an MHC ist wie schon gesagt der, dass T-Lymphocyten dadurch aktiviert (also zur Proliferation angeregt) oder in sonstiger Weise z.B. zur Interleukinproduktion angeregt werden.

Dabei ist wesentlich, dass es in einem gesunden Organismus nur solche T-Lymphocyten mit T-Zellreceptoren gibt, die ein MHC Molekül mit einem assoziierten Peptid erkennen, nicht jedoch eines von beiden allein. (Nobelpreis 1996 für Doherty/Zinkernagel) Die MHC Klasse, die von einem bestimmten Receptor erkannt wird, ist nicht von vornherein festgelegt. Vielmehr "bemerkt" der sich entwickelnde T-Lymphocyt, welche MHC Klasse er erkennt und entwickelt sich dann zu einem entsprechenden T-Lymphocytentypus.

Die T-Zellreceptorstruktur



Der Kernkomplex des T-Zellreceptors besteht also aus zwei Ketten mit jeweils zwei Immunglobulinomänen und weiteren Bereichen u.a. der Transmembrandomäne. Auch hier findet sich ein so genannter variabler Bereich, der sich bei den T-Zellreceptoren auf verschiedenen Zellen unterscheidet und dementsprechend auch verschiedene Peptide an MHC erkennt.

Die so genannten Akzessorischen Proteine (CD3-Komplex) sind für einen funktionellen T-Zellreceptor unerlässlich. Ihre Zusammensetzung kann variieren. Sie sind wesentlich an der Signaltransduktion beteiligt.

Entstehung der variablen Regionen des T-Zellreceptors

Die Entstehung wird hier nicht näher behandelt. Es sei jedoch erwähnt, dass sehr ähnliche Mechanismen wie bei der Entstehung der variablen Region der Antikörper beteiligt sind (Somatische Rekombination, mehrere Gene etc.)

Entwicklung von T-Lymphocyten

Auch auf die Entwicklung der T-Lymphocyten kann hier nur sehr knapp eingegangen werden. Analog den B-Lymphocyten muss erst ein vollständiger T-Zellreceptor exprimiert werden, bevor die T-Zelle aktiviert werden kann. In vorangeschalteten Entwicklungsstadien sind bereits alle oder zumindest die Mehrzahl der T-Zellen ausgeschaltet worden, die z.B. körpereigene Peptide oder ein leeres MHC erkennen.

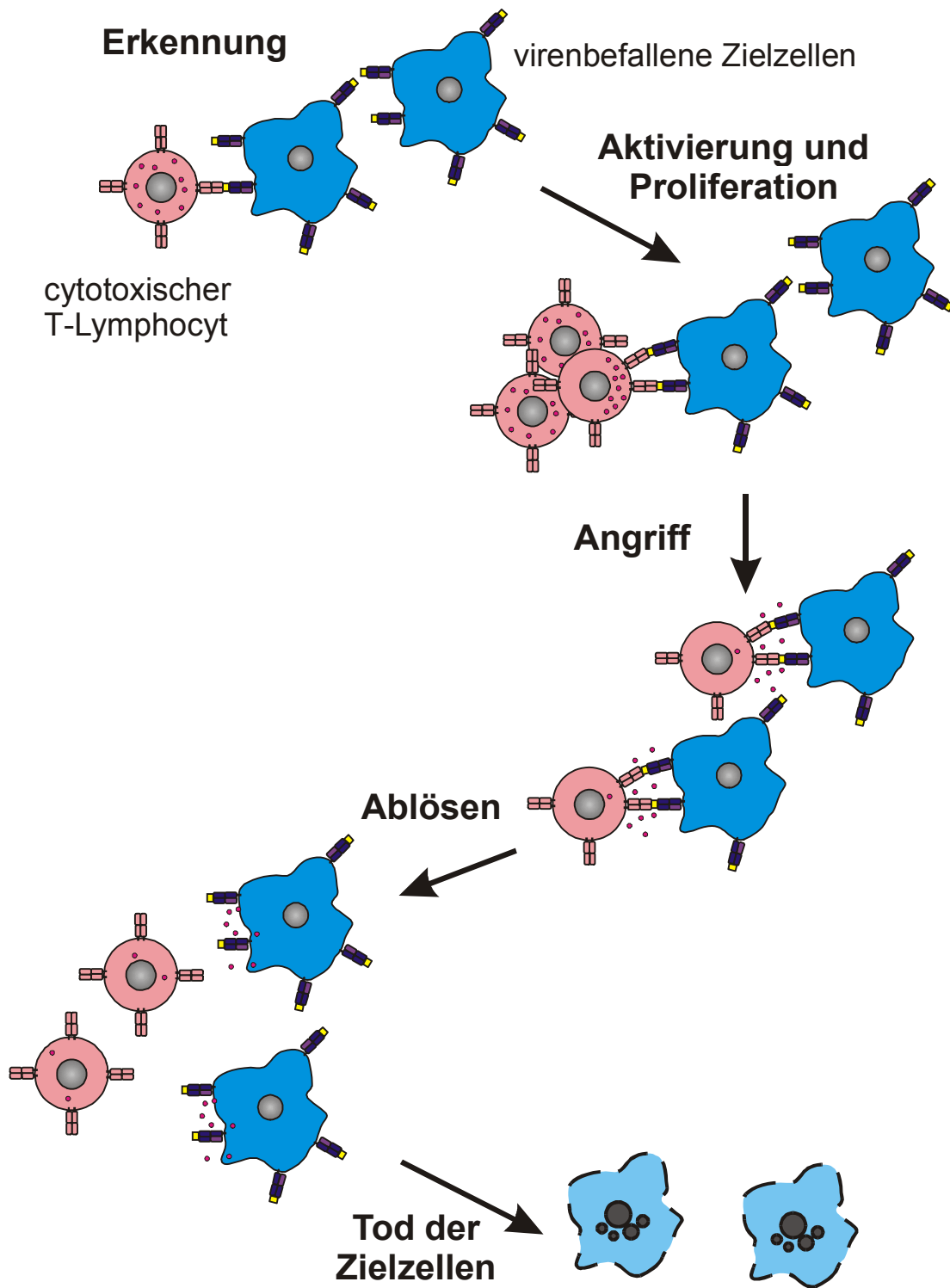
Hat ein T-Lymphocyt ein passendes Peptid + MHC erkannt, beginnt er IL-2 und andere Interleukine zu sezernieren. Da er gleichzeitig einen IL-2 Receptor besitzt regt er sich und benachbarte T-Zellen dadurch zur Proliferation an.

Die weiteren Reaktionen des T-Lymphocyten hängen von seinem Typus ab. Zwei Typen von T-Zellen werden im Folgenden exemplarisch in ihrem gesamten Wirkungszusammenhang dargestellt: T-Helferzellen und cytotoxische T-Zellen

Cytotoxische T-Zellen:

Ausgangspunkt der Betrachtung sei eine durch einen Virus befallene Körperzelle. Diese präsentiert wie oben dargestellt einen Teil ihrer Proteine in Bruchstücken auf MHC I. Produziert diese Zelle nun Virusproteine, so sind diese auch unter den präsentierten Peptiden vertreten. Diese fremden Peptide werden nun von cytotoxischen T-Zellen erkannt. In Folge kommt es zur Aktivierung dieser T-Lymphocyten, die dann die virustragenden Körperzellen lysieren. Damit ist gleichzeitig der Vermehrungszyklus des Virus unterbrochen. Eine wichtige Rolle spielt dabei der Lymphocyten Marker CD8. Er tritt in Wechselwirkung mit *konstanten* Bereichen des MHC I Moleküls auf den Körperzellen.

(in jüngerer Zeit sind jedoch auch MHC II abhängige cytotoxische T-Zellen beschrieben, die CD 4 tragen und deren Funktionsweise noch nicht gut geklärt ist.)



Helferzellen

Ausgangspunkt hier ist eine phagozytierende Zelle (z.B. ein Makrophage oder eine folliculäre dendritische Zelle), die ein Antigen (also z.B. einen mikrobiellen Erreger) aufnimmt, verdaut und die Peptide auf MHC II präsentiert. Wird dies von einem passenden T-Lymphocyten erkannt, kommt es zur Aktivierung und Proliferation dessen, mit nachfolgender Differenzierung zu einer Helferzelle. (einige Befunde deuten darauf hin, dass „resting T-cells“ nur von dendritischen Zellen aktiviert werden können, während Makrophagen hauptsächlich mit bereits aktivierten T-Zellen zusammenarbeiten). Ihre Helferfunktion kann die T-Zelle jedoch erst erfüllen, wenn sie einen B-Lymphocyten "gefunden" hat, der das gleiche Antigen, den gleichen Erreger erkennt. Diese Erkennung zwischen B- und T-Lymphocyten wird nun abermals durch MHC II vermittelt, weil der B-Lymphocyt seinerseits ebenfalls das Antigen (für das er ja in Form seines membranständigen AK einen hochspezifischen Receptor besitzt) phagozytiert und an MHC II präsentiert.

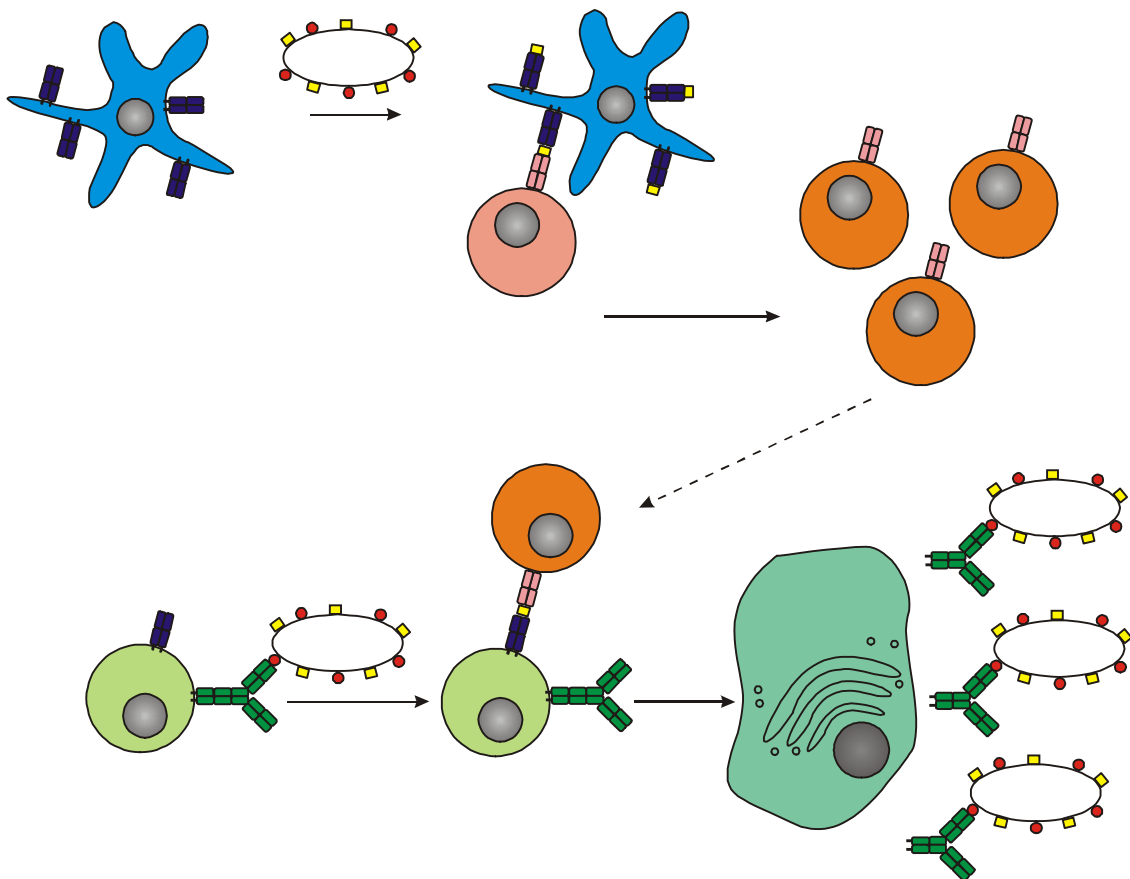
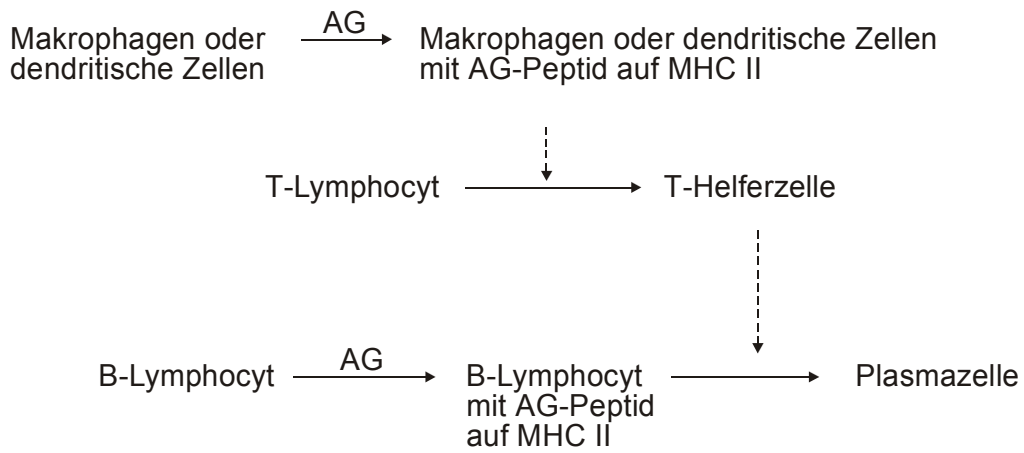
Ein T-Lymphocyt muss demzufolge in seiner Laufbahn *mindestens zweimal* sein Antigen auf MHC II präsentiert bekommen. Erst dann erfüllt er seine Helferfunktion und stimuliert die B-Zelle zur weiteren Proliferation und Antikörperproduktion.

Wichtig ist auch festzustellen, dass das durch die membranständigen AK erkannte Epitop in der Regel **nicht** identisch ist mit den auf MHC-II präsentierten Peptid (siehe den zweiten Teil der folgenden Grafik: Epitope entsprechen den roten Kugeln, präsentierte Peptide den gelben Kästchen). Dies erkannte man zuerst beim Umgang mit Haptenen, die ja erst in trägergekoppeltem Zustand die AK-Produktion auslösen können. Dabei werden dann die B-Lymphocyten, die AK spezifisch gegen das Hapten haben, durch T-Helferzellen stimuliert, die ein Peptid aus dem Trägerprotein an MHC-II erkennen.

Auch beim Impfen macht man sich dieses Phänomen bisweilen zu Nutze, indem man „schlechte“ Antigene an solche koppelt, die bei einer vorhergehenden Impfung bereits erfolgreich eingesetzt wurden (z.B. Tetanustoxin). Dann können B-Lymphocyten gegen das „schlechte“ Antigen durch T-Helferzellen aus der vorhergehenden Impfung, die Peptide aus dem gekoppelten „guten“ Antigen erkennen, stimuliert werden.

Einige Antigene (meist bakterielle Oberflächenbestandteile) können allerdings auch ohne Unterstützung durch Helferzellen B-Lymphocyten aktivieren.

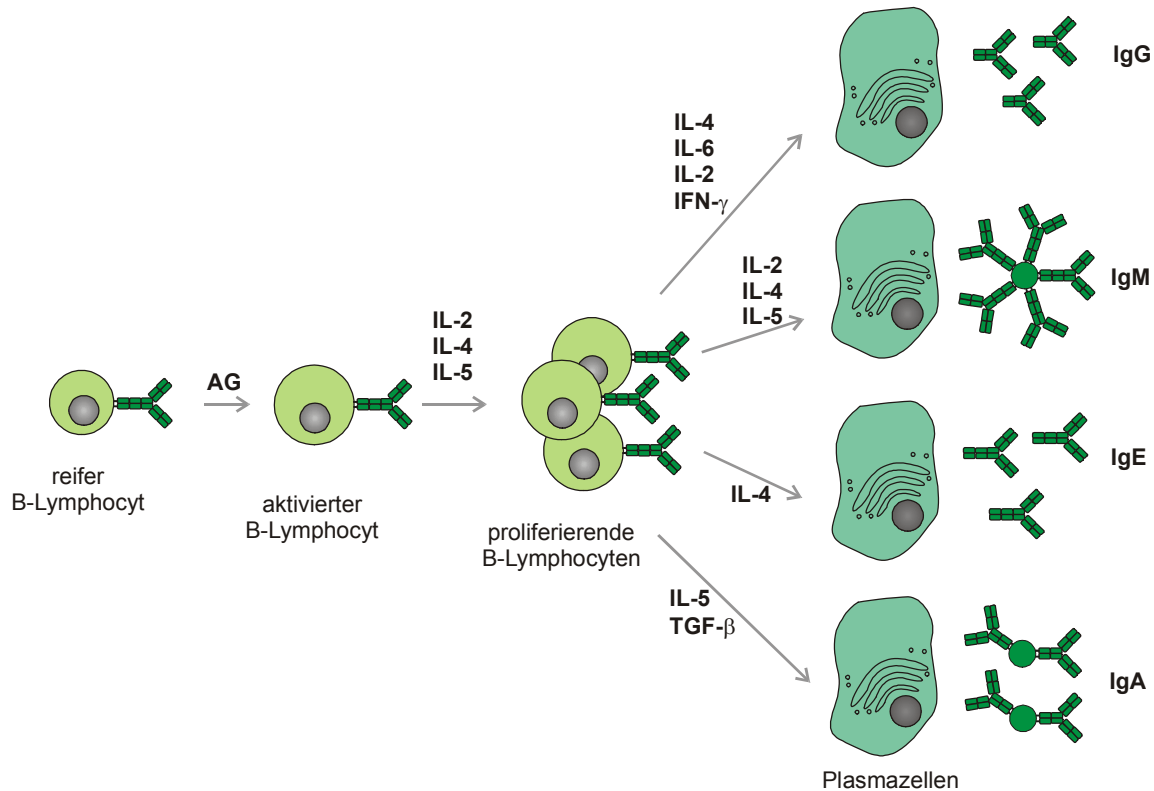
vereinfachtes Beispiel für die Wechselwirkungen zwischen B- und T-Zellen



Es muss ausdrücklich darauf hingewiesen werden, dass dieses Beispiel stark vereinfacht ist und zudem je nach Ausgangssituation (z.B. primäre Immunantwort versus sekundäre Immunantwort) unterschiedlich aussehen müsste.

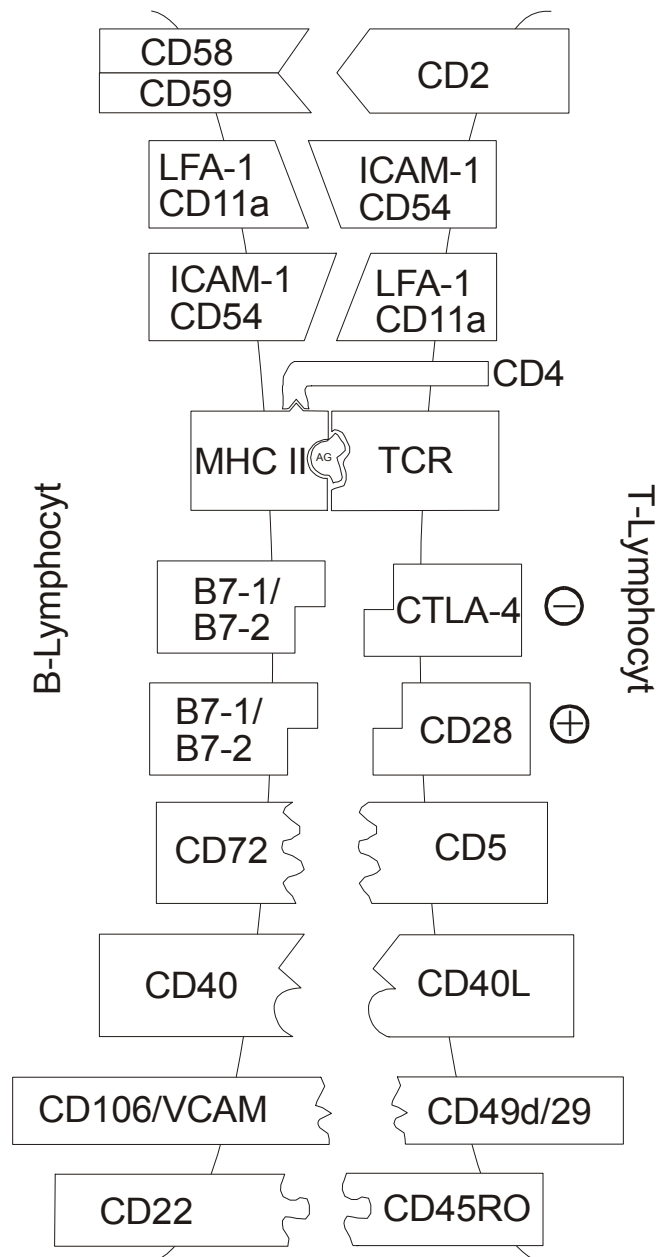
Bei der Signalübermittlung zwischen B- und T-Zellen sind zwei unterschiedliche Wege von Wichtigkeit:

Zum einen sezernieren die T-Zellen lösliche Botenstoffe, die *Interleukine*, die von entsprechenden Rezeptoren auf den B-Lymphocyten erkannt werden. Sie fördern nicht nur die Proliferation der aktivierten B-Lymphocyten, sondern bestimmen auch die Art eines eventuellen Wechsels der Antikörperklasse.

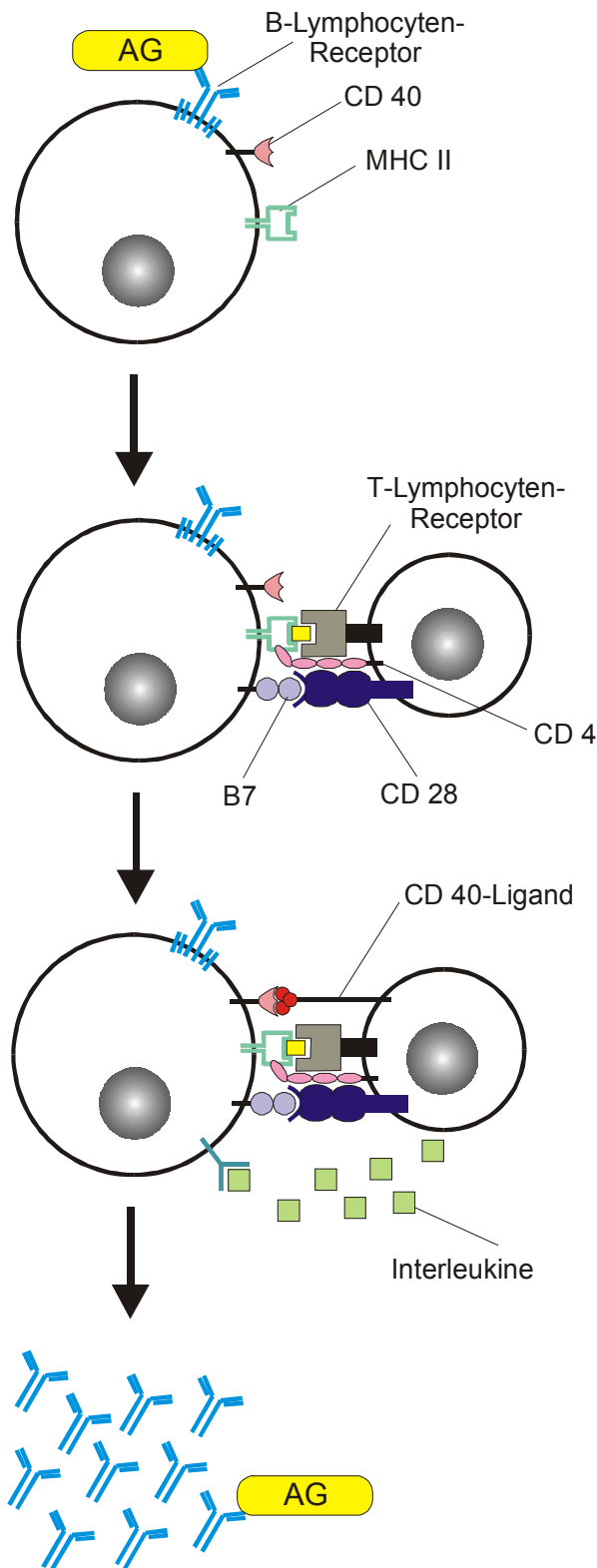


Zusätzlich zu den Interleukinen müssen die Zellen über eine Reihe von Oberflächenproteinen in direkten Kontakt treten. Zu diesen gehört u.a. auch der Marker CD4, der mit dem konstanten Teil von MHC II wechselwirkt. Folgende Grafik listet einige bekannte Beispiele für Oberflächenproteine auf, die an der Kommunikation zwischen B- und T-Lymphocyten beteiligt sein können

Nach:
EA Clark, JA Ledbetter
Nature 367, 425-428,
(1994) verändert



Allerdings treten diese Oberflächenmoleküle je nach Situation nicht alle auf und zudem in unterschiedlicher zeitlicher Abfolge, wobei sie sich gegenseitig beeinflussen können. Ein Beispiel, wie dies ablaufen kann, gibt die folgende Graphik wieder:



1) Ein naiver B-Lymphocyt bindet und internalisiert ein Antigen.

2) Das Antigen wird verdaut und auf MHC-Protein präsentiert. Gleichzeitig kommt es zu einer Stimulation der B7 Expression.

3) Eine T-Helferzelle bindet mit ihren T-Zellreceptor und dem Coreceptor CD 4 an das MHC-Molekül mit gebundenem Antigen-Peptid. Gleichzeitig verbindet sich CD 28 mit B7 auf der B-Lymphocyten Oberfläche.

4) die T-Helferzelle wird nun aktiviert und exprimiert dadurch den CD 40 Liganden. Gleichzeitig schüttet sie Cytokine aus.

5) durch die Cytokine und die Bindung des CD 40 Liganden an CD 40 wird der B-Lymphocyt zur Antikörper Produktion angeregt.

VI Methoden der Immunologie

Polyklonale Antikörper

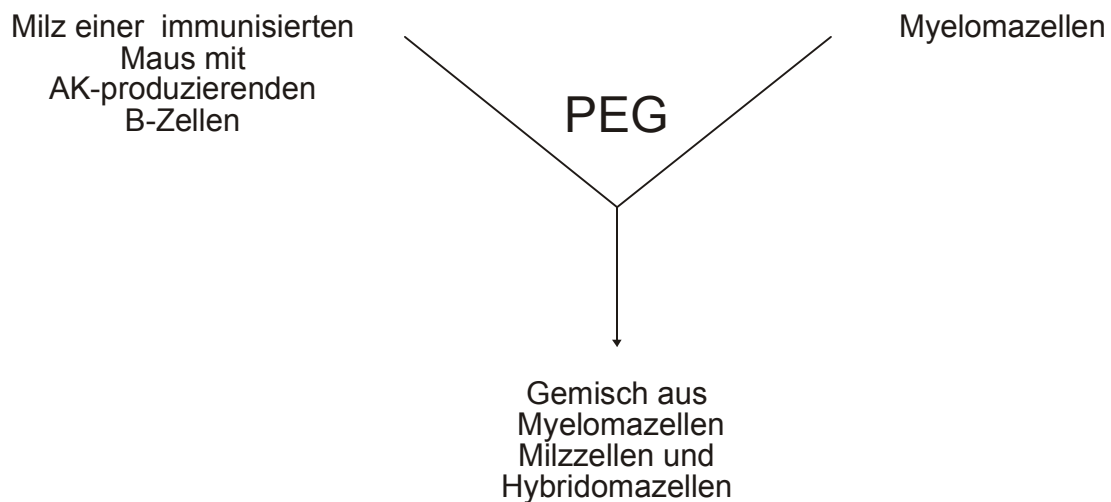
Vorraussetzung ist die sehr saubere Aufreinigung des Antigens. Mit diesem wird dann ein Versuchstier, in der Regel ein Kaninchen immunisiert. Dieses bildet gegen verschiedene Epitope des Antigens Antikörper. Diese verschiedenen Antikörper werden jeweils von verschiedenen B-Zellklonen produziert. Das Serum des immunisierten Tieres enthält daher einen polyklonalen Antikörper.

Monoklonale Antikörper

Bisweilen ist es wünschenswert einen Antikörper zu haben, der nur ein bestimmtes Epitop erkennt, also von einem einzelnen Zellklon produziert wird. Das Problem dabei ist, dass aktivierte, aber noch teilungsfähige B-Zellen keinen oder kaum Antikörper produzieren, sodass die Spezifität nicht ermittelt werden kann. Plasmazellen aber sind nicht mehr teilungsfähig und daher für Antikörper Produktion im großen Maßstab ebenso untauglich.

Zum Erfolg würde ein Zelltyp führen, der die Fähigkeit der Antikörper Produktion mit erhaltener Proliferationsfähigkeit verbindet. Dies ist künstlich durch Verschmelzung von Zellen erzeugbar.

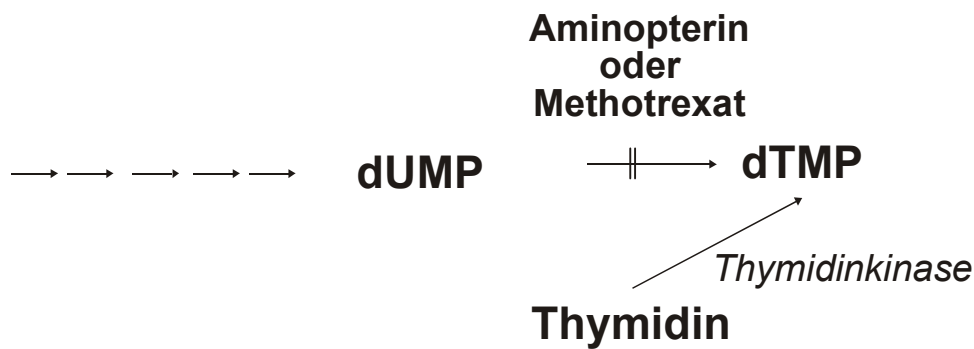
(Köhler und Milstein)



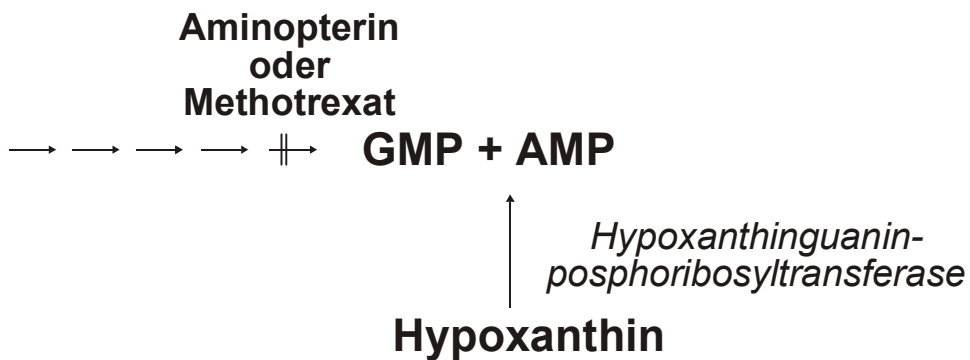
Problem: Diese Zellen sind optisch zum Teil nicht unterscheidbar

Folgender Trick hilft weiter: Man nehme Myelomzellen mit Gendefekten für Enzyme der sogenannten „salvage pathways“, nämlich der Thymidinkinase (TK) und Hypoxanthin-guaninphosphoribosyltransferase (HGPRT). Diese Myelomzellen können im Normalmedium ihre Nukleotide auf normalem Weg synthetisieren. Bei Zugabe von Aminopterin, einem Hemmstoff des Folsäurestoffwechsels aber sterben sie ab. Hybridomzellen hingegen haben durch die Zellverschmelzung z.T. auch die HGPRT und TK aus den B-Zellen der Milz bekommen und können daher bei Anwesenheit von Thymidin bzw. Hypoxanthin trotz Aminopterin überleben.

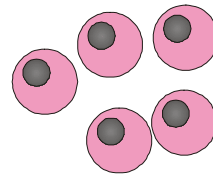
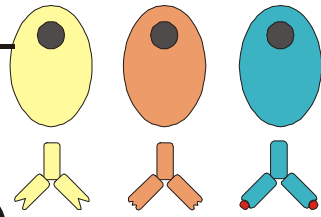
Pyrimidinsynthese:



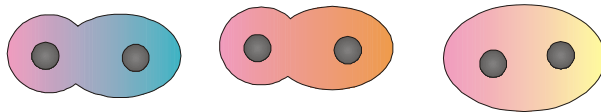
Purinsynthese:



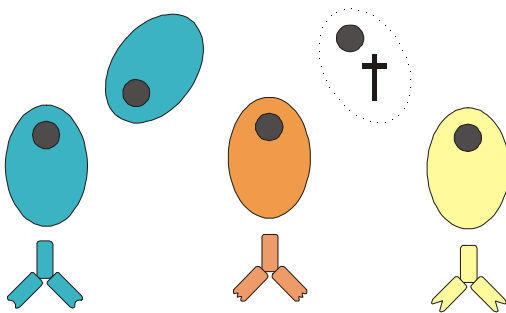
AK-produzierende Zellen (sterblich)



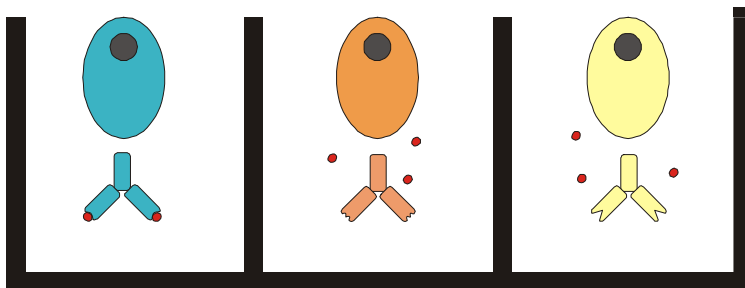
Myelomzellen (unsterblich)



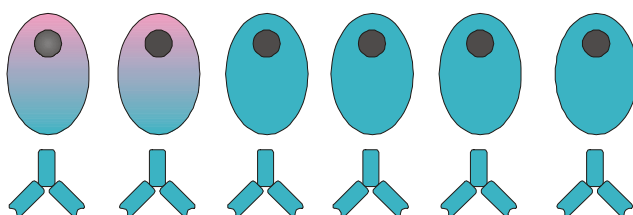
Zellfusion mit PEG



Selektionsmedium mit Hypoxanthin Aminopterin Thymidin (HAT-Medium)

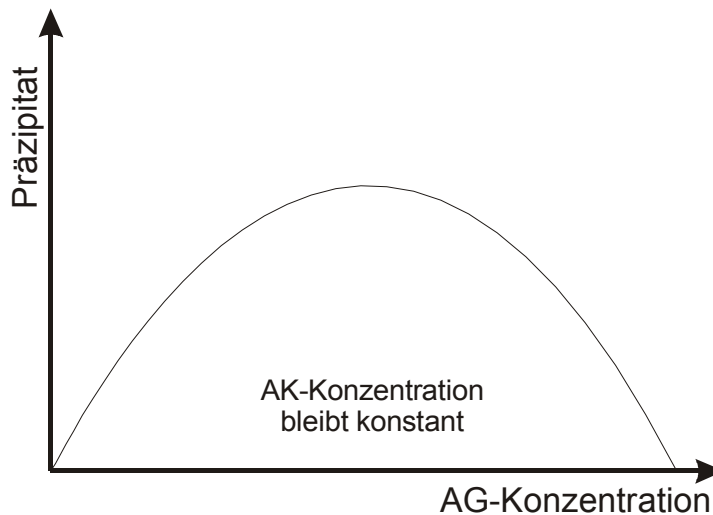
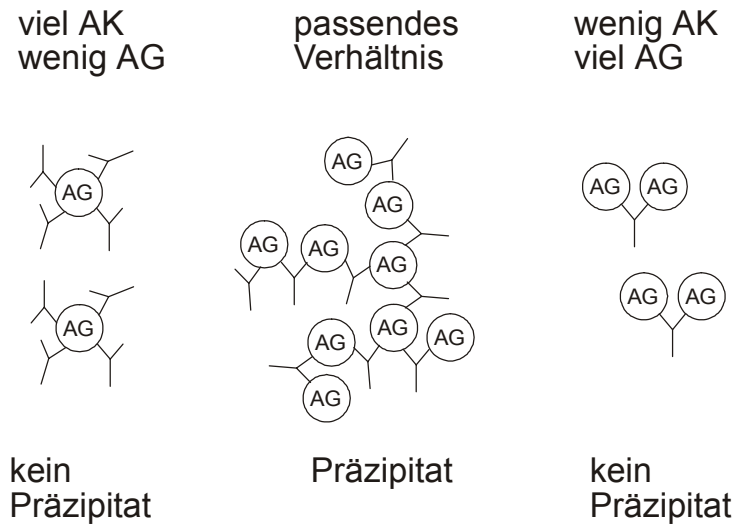


Vereinzelnung und Test auf AK-Produktion



Klon mit unsterblichen Hybridomzellen, die Antikörper produzieren

Anwendung der Antikörper in Nachweisverfahren
Präzipitationsverfahren



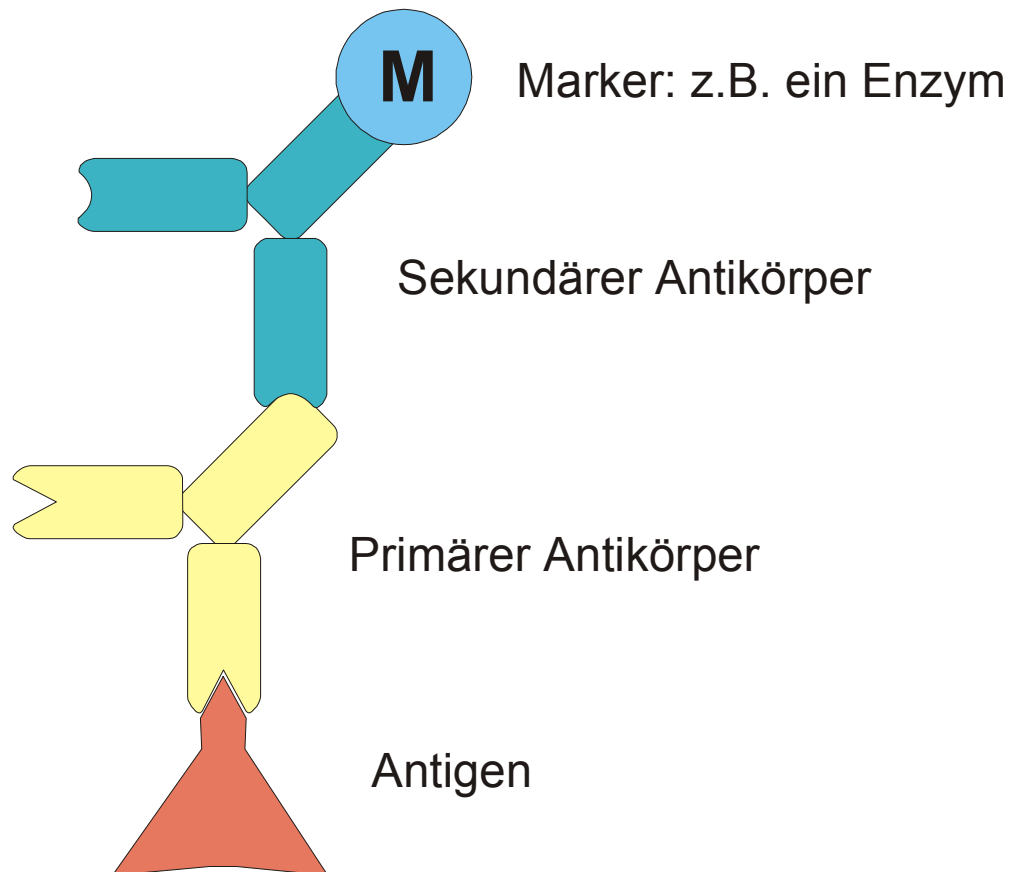
Bei geeignetem Verhältnis von Antikörper zu Antigen bildet sich ein großmolekulares Präzipitat

Zu den Verfahren, die auf der Präzipitation beruhen, gehören:

- Ouchterlony Test: Hier lässt man Antikörper und Antigen in einem Agar gegeneinander diffundieren und kann dann durch direkte Betrachtung des Ergebnis ablesen. In unserem Fall untersuchen wir zum einen wie sich die Präzipitationslinie in Abhängigkeit von der Antigenkonzentration verhält. Zum anderen versuchen wir den Verwandtschaftsgrad verschiedener Antigene zu bestimmen
- Nephelometrie: Hierbei wird die Lichtstreuung, die durch das Präzipitat hervorgerufen wird, gemessen. Vorteil: leicht zu automatisieren

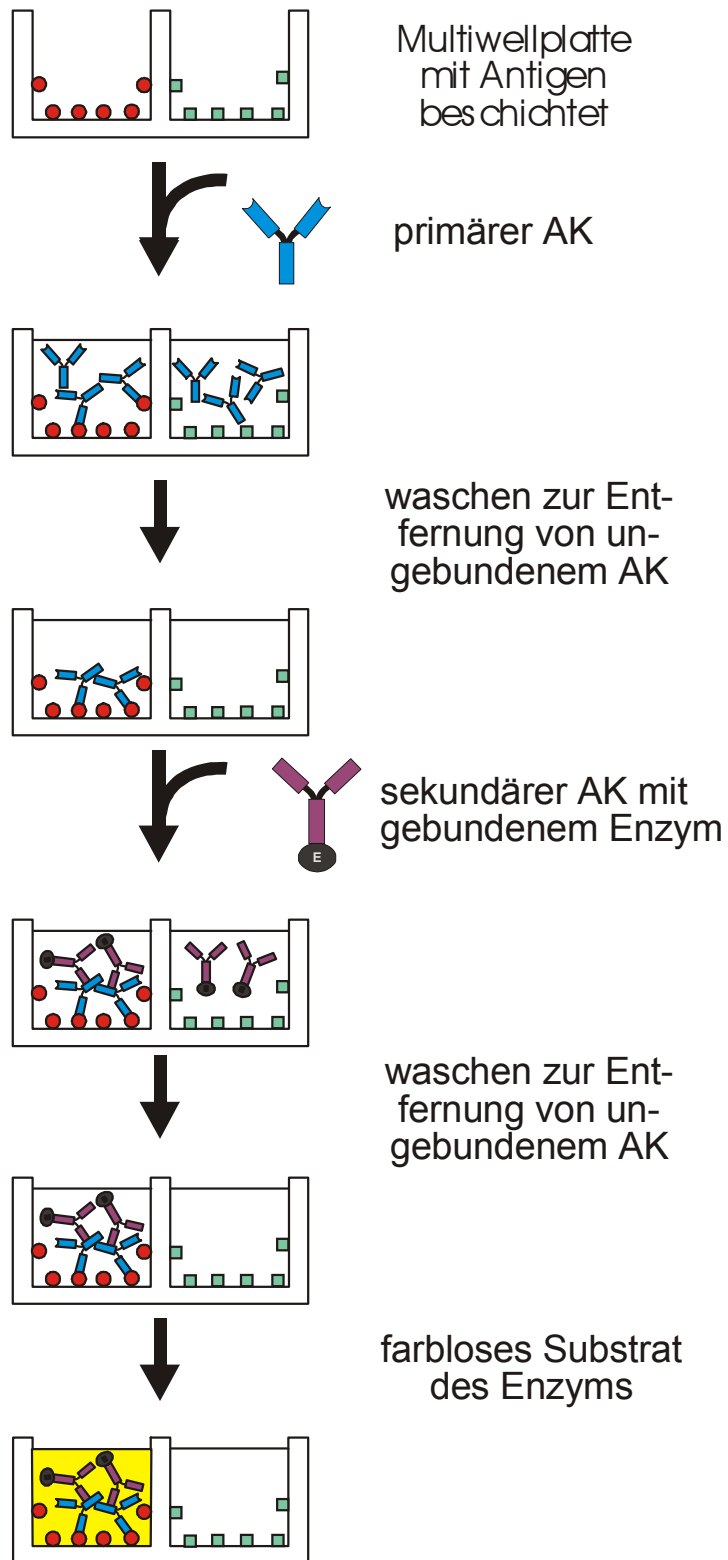
Methoden, die sich markierter AK bedienen:Immunoassays

Immunoassays treten in sehr mannigfaltige Formen auf, aber viele davon lassen sich aus einem einfachen Schema ableiten:



die Testformen heißen dann z.B. FIA, RIA, EIA, PIA, ELISA, CLIA etc., wobei der erste Buchstabe jeweils einen Hinweis auf die Art der Markierung gibt und IA die Abkürzung für Immunoassays darstellt. So ist dann z.B. ein EIA ein enzyme immuno assay, bei dem der sekundäre Antikörper an ein Enzym gekoppelt ist, das seinerseits einen Farbstoff bilden kann. Die weit verbreiteten ELISAs sind eine Spezialform dieser EIAs. Ihre Durchführung wird in der folgenden Grafik gezeigt.

Beispiel: zweistufiger ELISA



Wenn der prim. AK das Antigen erkannt hat, bildet das Enzym des sek. AK einen Farbkomplex

Complementbindungstest

Macht sich die Tatsache zu Nutze, dass es eines AG-AK-Komplexes bedarf, um die klassische Complementkaskade auszulösen.

Unser Test verläuft zweistufig:

Erst wird durch eine unbekannte Menge eines AK-AG-Komplexes (Antigen im Überschuss, Antikörper aus dem Patientenserum) von einer definierten Menge an Complement ein mehr oder weniger großer Teil abreagiert.

Im zweiten Teil wird dann die verbliebene Menge an Complement mit dem AG-AK-Komplex aus Erythrocyten plus gegen sie gerichtete AK (Amboceptor) rücktitriert. Das dabei eventuell freigesetzte Hämoglobin wird photometrisch vermessen. Um daraus auf die ursprüngliche Menge an Serum-Antikörper zu schließen, muss die eingesetzte Complementmenge genau die sein, die gerade alle unserer Erythrocyten lysieren kann. Dazu dient der Vorversuch.