

www.immunologic-mainz.de

2a Vorlesung

Klausur

Buch "Immunobiology" Janeway

www.uni-mainz.de/FB/Medizin/immunologic/de

www.cellalive.com

www.blink.biz/immunovaccinations/index.html

www.roitt.com/glossary.htm

www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi

rxblx1.uni-regensburg.de/zeit/fl.phtml?bidid=UBME

} Skript

Klausur voraussichtlich 02. August 14<sup>00</sup> Uhr

mail.uni-mainz.de

Eschmitt@uni-mainz.de

Knochenmark + Thymus  $\Rightarrow$  primär Lymphoide Organe

↓  
Entwicklung  
von Zellen

↓  
Reifung der T-Zellen

$\Rightarrow$  zentrale Toleranzentwicklung der  
"reinen" T-Zellen

$\curvearrowright$  Bildung & Reifung von Leuko- und Erythrozyten

$\rightarrow$  T-Zell-Rezeptoren sehr variabel

$\curvearrowright$  Zusammensetzung aus kleinen "Modulen"

$\rightarrow$  codiert durch kleine Genstücke

$\curvearrowright$  Kombination, "bewusste Schlaupigkeit"

$\curvearrowright$  Entstehen von Zellen, die auch eigene Zellen angreifen

$\rightarrow$  Eliminieren der autoreaktiven Zellen im Thymus

### Sekundäre lymphoide Organe

T- & B-Lymphozyten für Aktivierung erforderlich,  
dass diese in das Milieu der sek. Lymph. Organe

$\rightarrow$  Milz, Lymphknoten, Peyer's Plaques, Appendix, Tonsillen,  
Adenoide (Polypen)

$\curvearrowright$  Antigene werden durch spez. Zellen aufgenommen

$\rightarrow$  Verlassen ihren Platz & suchen nächstes lymphatisches  
Organ an

$\curvearrowright$  nach Aktivierung der T-Zellen Verlassen der sek.  
Lymph. Organe  $\Rightarrow$  "Verwichtung" des Antigenes

$\Rightarrow$  Sowohl krankheitsspezifisches & topologisches Gedächtnis  
des Immunsystems

$\Rightarrow$  B- & T-Zellen bilden adaptives Immunsystem

$\Rightarrow$  angeborenes Immunsystem: Phagozyten, Mastzellen,  
Granulozyten

$\curvearrowright$  Erkennen "Erregerklassen"



→ Rückführung der Lymphe über *Uctus duraticus*  
in dem Blutkreislauf

B1B-Zellen → müssen nicht aktiviert werden, produzieren ständig  
geringe Mengen an IgM ⇒ bakterielle Abwehr (aus Peritonealraum)

B2B-Zellen → aus Knochenmark

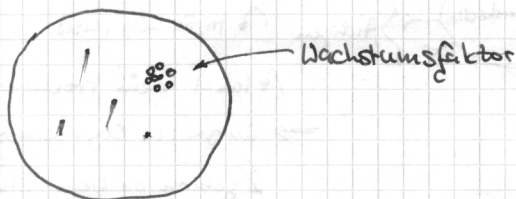
### Pluripotente Stammzellen

• 5-Fluorowacil tötet alle proliferierende Zellen

CSF

SCF ⇒ Stammzellfaktor

→ stimuliert Kolonien spezifischer Zellen



GM-CSF ⇒ Mischkolonien

Multi-CSF ⇒ Mischkolonien

⇒ Nachweis einer einzigen Zelle als Vorläufer für alle  
Zellen im Blut

⇒ andere Faktoren

Mechanismen der angeb. Immunantwort

⇒ LPS ≙ Lipopolysaccharide (Gram-negative Bakterien)

Pattern Recognition Receptors (PRR) z.B. TLR

Pathogen associated molecular Patterns (PAMPs) z.B. LPS

⇒ werden schon in der Keimbahn kodiert

→ Komplementsystem → C1-C9 und Subklassen

→ lokale Vasodilatation

→ IL-8 → Interleukin 8 "lockt" andere Zellen an

→ Start Komplementsystem z.B. "Fünferpaar" an Antikörpern

→ Bildung eines Membranangriffskomplex ("Anlaufen") (MAK)

→ ähnlich aufgebaut zum Perforin

⇒ Osmotierung ("schmackhaft machen")

a) → Makrophagen & Neutrophile } werden aktiviert → Phagozytose

b) Entzündungsvermittlung → Mastzellen

→ lokale Entzündungsreaktion (Anaphylatoxine)

Anaphylaktischer Schock:



IgE-Bindungsstellen

Antigen → Histamin, usw.

→ lokal kein Problem

→ im ganzen Organismus

↳ Gehirn zu wenig Blut

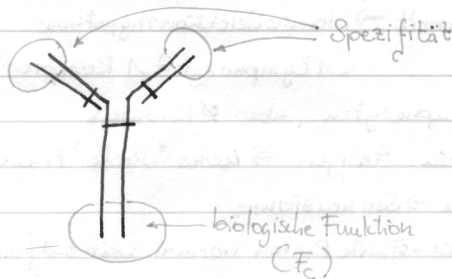
CAPs ähnlich Membranangriffskomplex

chemotaktisch

Antikörperdiversität

## Struktur

→ können verschiedenste Strukturmerkmale erkennen



-  $\beta$ -Faltblatt  $\Rightarrow$  sehr feste Struktur  $\Rightarrow$  Ak

-  $\alpha$ -Helix  $\Rightarrow$  flexibler, für best. Strukturen

$\Rightarrow$  antiparallele Faltblätter

→ die Loops zwischen dem  $\beta$ -Faltblättern bilden Antigenbindungsstelle  
(„fingerartig“)

- Strukturermittlung durch Sequenzierung verschiedener Antikörper  $\rightarrow$  Variabilitätsplot  $\rightarrow$  Feststellen der Bindungsstelle

- Antikörper erkennen immer räumliche Struktur

Antigenbindungsstellen

- |              |   |
|--------------|---|
| wichtig<br>↓ | 1) Elektrostatik                            |
|              | 2) H-Brücken                                |
|              | 3) van-der-Waals                            |
|              | 4) hydrophobe Kräfte ( $H_2O$ -Verdrängung) |

- keine kovalente Bindung!

Entstehung des Ak-Repertoires

- hohe Anzahl verschiedener Antigen-Bindungsstelle

$\hookrightarrow$  zu wenig Gene!

~ 1900 EHRlich  $\Rightarrow$  Seitenkettentheorie

$\downarrow$  Antigen formt Antikörper  $\downarrow$  weitgehend bekannte Determinanten

~ 1950er LANDSTEINER  $\Rightarrow$  Antikörper gegen neue Moleküle

(Synthetische Moleküle)

~ 1960er Jerne / Burnet  $\Rightarrow$  klonale Selektionstheorie  
 $(1 \text{ Lymphozyt} = 1 \text{ Rezeptor})$

$\Rightarrow$  B-Zellen & T-Lymphozyten, aber  $\emptyset$  Nachweis

$\Rightarrow$  1 AK hat nur ein Antigen  $\Rightarrow$  keine "weiche" Masse

~ 1970er Kabat / Wu  $\rightarrow$  Sequenzierung

$\Rightarrow$  variable & konstante Region normal weit entfernt,  
in aktivierten B-Zellen viel weiter zusammen

~ 1980er Köhler / Milstein  $\Rightarrow$  monoklonale Antikörper

~ 1990er Berek  $\Rightarrow$  somatische Hypermutation (z.B. AIDS; AIDS)

### Gene und Antikörper

$\rightarrow$  nur sehr wenige verschiedene Ketten im Genom kodiert

$\Rightarrow$  Gene sind gedupliziert ~~AAA~~

$\rightarrow$  viele verschiedene Teile der variablen Regionen

$\downarrow$  begrenzte Auswahl bei  $\lambda$ -Ketten

$\downarrow$  heavy-chain: zusätzlich D-Region

### B-Zellen-Entwicklung

$\rightarrow$  Knochenmark (Embryo: Leber; Vögel: Bursa fabricii)

1. Stammzelle

$\downarrow$  SCF

2. frühe Pro-B-Zelle:  $D_H - J_H$ -Rearrangement

$\downarrow$  SCF

3. späte Pro-B-Zelle:  $V_H D_H J_H$ -Rearrangement

$\downarrow$  SCF/IL-7

4. große Prä-B-Zelle

$\downarrow$  IL-7

5. große Prä-B-Zelle:

Expression  $\mu$ -H-Kette im Ersatz-L-Kette (AS/Up $\mu$ B)

$\Rightarrow$  Prä-B-Rezeptor  $\rightarrow$  30-fache Vermehrung

$3,5 \cdot 10^7 / \text{Tag}$

↓ IL-7  
5. kleine Prä-B-Zellen a)  $\mu$ -H-Kette nur endogen  
b) Rearrangement der L-Kette ( $V_L$  &  $C_L$ )

↓ IL-7  
6. unreife B-Zelle a) Expression eines kompletten IgH  
b) Eliminierung autoreaktiver Zellen

↓ IL-7  
7. reife B-Zelle  $1-2 \cdot 10^7$  verlassen Knochenmark  
+ exprimieren IgM & IgD

5-10% der gesamten B-Zellproduktion werden  
innerhalb von 2 Wochen erneuert

→ Entscheidung des Isotyps während B-Zellreifung  
→ zuerst IgM-Produktion ⇒ 1. Rezeptor  
→ später IgD durch alternatives Spleißen

- Katalyse der Rekombination → Gene: RAG-1 & RAG-2  
→ spezifisch für B- & T-Zellen  
→ nur im frühen Entwicklungsstadium aktiv

- K-Gene werden später früher rekombiniert  
→ größere Variabilität als L-Ketten

- Allelische Exklusion: Unterdrückung des Rearrangement  
auf dem 2. Chromosom (wenn auf 1. Chromosom funktioniert?)

⇒ funktioniert ein Schnitt nicht wird sie deletiert (siehe Grafik)

- bisher besprochene Mechanismen ermöglichen  $10^6$ -Spezifitäten

### Rekombination

→ keine ideale Rekombination

→ „unsaubere Rekombination“

→ produktive & kontraproduktive Rekombinationen

→ so lange im Leberaste → Veränderung der verbindenden

AS (bei leichter Kette zwischen  $V_L$  &  $J_L$ ) → damit in-Frause  
andere Enzyme beteiligt → zufällig katalysiert durch TdT



→ kombinatorische Diversität (hypervariable Region)

- Kombination  $V_H$  &  $V_L$ -Ketten

Verschiedene Isotypen  $\Rightarrow$  nach Entwicklung! Bei Primärantwort

- nach Aktivierung durch Antikörper aus  $IgM$  &  $IgD$   
sekretorisch  $\leftarrow$  Rezeptor

$\Rightarrow$  Klassenwechsel "nach hinten" möglich

$5' - C_\mu - C_\delta - C_{\gamma 1} - C_{\gamma 2} - C_{\epsilon} - C_\alpha - 3'$

$\Rightarrow$  also Wechsel von  $C_{\gamma 2}$  nach  $C_\epsilon$ , nicht aber umgekehrt möglich

$\rightarrow$  Isotyp entsteht auch wieder durch Rearrangement

- Spezifität des AK ändert sich nicht

- Klassenwechsel erzeugt DNA-Loops, die rausgeschüttet werden

- nur  $IgM$  &  $IgD$  können gleichzeitig produziert werden

### Selektion von Immunglobuline

- bis jetzt ca.  $10^8$  Spezifitäten

### Weitere Spezifitätsveränderungen

- am wichtigsten: Somatische Hypermutation

- für die meisten Viruskrankungen Antikörper am wichtigsten

### T<sub>H</sub>-zell-regulierte B-Zelldifferenzierung

- meist Proteine, dazu meist T-Zellhilfe nötig

- B-Zellen können freie Antigene binden, "auffressen"  $\rightarrow$  Prozessierung

$\rightarrow$  Präsentation  $\rightarrow$  T-Zell-Aktivierung  $\rightarrow$  B-Zell-Stimulation

- CD40-Liganden & CD40-Rezeptoren  $\rightarrow$  Induktion Klassenwechsel

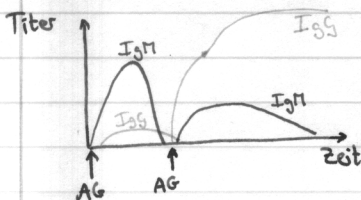
- Cytokine der T-Zellen  $\rightarrow$

Immunisierung  
24.05.2006

IL4  $\Rightarrow$  IgG, IgE

IFN- $\gamma$   $\Rightarrow$  IgG2a

TGF- $\beta$   $\Rightarrow$  IgA, IgE2b



- IgM  $\Rightarrow$  Pentamer, verbunden über eine J-Kette (unabhängig vom J-Bereich im Genom)
- IgG  $\Rightarrow$  wird später produziert wegen Klassenwechsel
- IgM hat eine hohe Avidität  $\Rightarrow$   $\Sigma$  der Affinitäten  
 $\Rightarrow$  „Chelateffekt“ / „Kooperativität“

Affinität: 1AK mit 1Epitop

(Bindungsstärke 1 Bindungsstelle)

- aber IgM hat geringere Bindungswahrscheinlichkeit
- $\rightarrow$  erste Aktivierung  $\rightarrow$  Class-Switch (Teil)
- $\rightarrow$  somatische Hypermutation (Teil)
- $\rightarrow$  höhere Affinität für Rezeptoren

$\rightarrow$  B-Zellen im Keimzentrum  $\rightarrow$  Lymphknoten & Milz

$\rightarrow$  dort T-Zell-Interaktion & Hypermutation

- Mutation liegen fast immer in den CDR-Regionen, aber auch außerhalb (außerhalb-Mutationen werden aussortiert)

$\Rightarrow$  gibt auch Steuerung durch Moleküle wie z.B. AID

$\Rightarrow$  Umwandlung von Cytosin zu Uracil (Desaminierung)

$\rightarrow$  andere Mutationen durch PAX5

# Immunologic

31.05.06

- B-Zelle kann entweder AKs produzieren oder hat membranständige Rezeptoren

- B-Zelle ~~produziert~~ wechselt nur bei Antigenen mit T-Zell-Hilfe

~~CD40 B-Zellen & CD154 T<sub>H</sub>-Zellen~~ CD40 Ligand  $\hat{=}$  CD154 Rezeptor

Prod. durch T-Helferzellen

}	DL-4 $\rightarrow$ IgG <sub>1</sub> ; IgE $\rightarrow$ Parasiten (T <sub>H</sub> 1)
	Interferon- $\gamma$ $\rightarrow$ IgG <sub>2a</sub> $\rightarrow$ Bakterien (T <sub>H</sub> 2)
	Transforming Growth Factor- $\beta$ (TGF- $\beta$ ) $\rightarrow$ IgA, IgG <sub>2b</sub> (T <sub>H</sub> 3)

$\rightarrow$  Rezeptor auf Oberfläche wird über 2 zusätzliche Ketten

(I $\gamma$  $\alpha$  & I $\gamma$  $\beta$ ) ins Zellinnere übertragen

$\rightarrow$  bei Reifung schon schwere Kette exprimiert mit 2 „Ersatzketten“

$\rightarrow$  führt zu Proliferation & später zur Rekombination

(unter „Einzig“ des „Pseudo“-Rezeptors)

## Zellendifferenzierung in sek. lymph. Organen

Achtung: folliculäre dendritische Zellen haben nichts mit dendritischen Zellen zutun

$\rightarrow$  Hypermutation  $\sim$  nur bei hochaffinen Rezeptoren und

bei geringem Antigenkonz. Stimulus  $\sim$  nur dann

T-Helferzellunterstützung  $\sim$  nur dann Proliferation

$\rightarrow$  die setzen sich durch

2 Typen:

① Plasmazellen: AK-Produktion

$\emptyset$  Membranrezeptoren

kurze Lebensdauer

② Gedächtniszellen: Rezeptoren (Membranständig)

wird primär sezernieren, sekundär schnelle Reaktion

lange Lebensdauer: Monate bis Jahre

- Achtung: B1B-Zellen produzieren AK ohne Stimulus
  - ⇒  $\emptyset$  Klassenwechsel  $\uparrow$  nur IgM
  - B2B-Zellen zeigen beschriebenes Verhalten

→ Erhaltung der Gedächtniszellen wahrscheinlich durch  
Sollikuläre, dendritische Zellen

### Thymusabhängige & Thymusunabhängige AK-Bildung

#### Thymusabhängige

- ⇒ benötigen Th-Zellen (kleine Antigene),  
weil wenig repetitive Sequenzen  
 $\uparrow$  nur schwaches Ag-Signal ⇒ 2. Signal durch Th-Zellen

#### Thymusunabhängige:

3 Klassen

- ① B-Zell-Mitogene (LPS von gram-neg. Bakterien) ⇒ CD14  
⇒ Proliferation reifer & unreifer B-Zellen  
⇒ aber keine antigenspezifische Proliferation!
- ② hochrepetitive Sequenzen ⇒ intensive Vernetzung  
⇒ wirken nur auf reife Zellen, Deletion unreifer Zellen

⇒ frühe Bakterielle Abwehr ⇒ Opsonisierung, Komplement

→  $\emptyset$  Ig-Klassenwechsel

⇒ keine Affinitätsreifung

→ keine Gedächtniszellen

→ wahrscheinlich durch B1B-Zellen getragen

14.06.2006

- nach Antigenkontakt → Aufnahme in B-Zellen
- Prozessierung (proteolytische Spaltung)
- Präsentation in MHC-Molekülen auf Oberfläche
- ⇒ MHC: Major Histocompatibility Complex
- Erkennung durch T-Zellen (nur Peptide!)
- Produktion von Zytokinen durch T-Zellen
- Klassenwechselregulation der B-Zellen
- T-Helfer-Zellen erkennen Proteinanteil des Antigens

### T-Zellen

- binden kein natives Antigen
- AS-Sequenzen MHC I ⇒ klein 5-10 AS CD8
- MHC II ⇒ 10-15 AS CD4
- keine Tertiärstruktur, nur erkannt in Verb. mit MHC

### - Rezeptoren

- Heterodimer  $\alpha$ - $\beta$  oder  $\gamma$ - $\delta$ )
- nur 1 Bindungsstelle, membranständig (nur sezerniert)
- keine abh. Weiterleitung, sondern CD3-Komplex
- auf DNA-Ebene prinzipiell analog zur schweren/leichten Kette (vgl. B-Zellen)
- ebenfalls Rearrangement auf DNA-Ebene, Variabilität abalgs
- allelic Exklusion, katalysiert durch RAG1 & RAG2, aber nicht bei  $\alpha$ -Kette (viele T-Zellen mit 2 Rezeptortypen)
- (Mensch: ca. 30%)
- Thymuserziehung (bei B-Zellen im Knochenmark)
- Test der MHC-Bindung, ansonsten Depletierung
- (2 Rezeptoren → 2 versch. Spezifitäten)
- keine Affinität ⇒ Depletierung
- zu hohe Affinität (Autoreaktivität) ⇒ Depletierung

Theorie: 2. Typ des Rezeptors kann autoreaktiv sein

⇒ Autoimmunerkrankungen

- Achtung: T-Zellen haben keine Affinitätsreifungen  
(also  $\neq$  somatische Mutationen)

⇒ wegen zu hoher Gefahr der Entstehung autoreaktiver Zellen

- Rezeptor ist nur Teilschritt / Signalteil der Aktivierung,  
wegen schwerer Reaktionen die T-Zellen auslösen  
(Kontrolle) „Immunologische Synapse“

→ 2 verschiedene Zelltypen: Effektorzellen, Gedächtniszellen  
(nach Proliferation (Faktor 10-100))

### Was tun T-Zellen?

- Glykoproteine (Cytokine, etc.) → T-Helferzellen  
IFN- $\gamma$ ; IL-2, IL-3, TGF- $\beta$ , TNF- $\beta$
- toxische Proteine ⇒ T<sub>C</sub>-Zellen

- T-Zell-Entwicklung analog B-Zellen, aber findet im  
Thymus statt

→ am Ende zuerst doppelpositive Zellen CD4 & CD8

⇒ Aufteilung in CD4 positive & CD8 positive Zellen

### Gentransfer

- Transgen: genetisches Material von außen
- Amplifikation der cDNA in Plasmiden (E. coli)  
Einbringen in Zellen

• Kristalle können DNA binden

•  $\text{PO}_4^{3-}$ -Puffer mit DNA → Zugabe von  $\text{Ca}^{2+}$  ↓  $\text{CaPO}_4^{2-}$ -Komplex

⇒ teilweise Aufnahme durch Endozytose

• Wenn DNA in Zellen kommt ↑ Expression z.B. durch CMV-Promotor

Immunologie

21.06.2006

21.06.2006

transientes Phänomen

- heutzutage: 90-95% Zellen, die das Konstrukt aufnehmen
- aber: gesucht → stabile Klone

(Voraussetzung: Aufnahme im Wirtsgenom nötig)

⇒ Begründung: ∅ passender Ori verfügbar

→ Aufnahme in Wirtsgeno m selten (1 von 1000)

↳ Selektion durch Neomycin ↳ stabile Linien

-  $Ca_3(PO_4)_2$ -Präzipitation funktioniert nur bei adherent wachsende Zellen (also am Kulturboden)

- Moleküle die amphipatisch sind können DNA binden

↳ Lipidanteil ermöglicht Membranfusion

- Methode der Wahl: Elektroporation

• Küvetten mit 2 Elektroden (Zellen in DNA-Suspension)

→ Kondensator ↳ starker Stromstoß (300-400V bei 100-200µA)

↳ Membran wird löchrig

- weitere Methode: virale Infektion

- Schicksal der DNA: nur im Zellkern ↳ Abbau

oder Ausdünnen (Vermehrung)

→ Problem: Einbaustelle der DNA nicht spezifisch & statistisch verteilt

Transgene Organismen

→ Ziel: Eizelle oder Blastula/Embryonale Stammzellen

- klassisch: Mikroinjektion in die Eizelle

Knock-Out-Mäuse

↔ Gene Targeting

Zygote

Embryonale Stammzelle

natürliche Gene oder cDNA

mutiertes Gen



Transgene Mäuse

Knock-Out-Mäuse

- embryonale Stammzellen bilden Embrioblast

- Ziel: ersetzen eines gens durch defekte Kopie

(Gene Targeting)

→ Ersetzung durch Resistenzgen (z.B. Neomycin)

→ Selektion möglich

- ungerichteter Einbau → Thyminidinkinase ebenfalls

→ kann aus <sup>Sanger</sup> ~~genetisch~~ Zellgift umwandeln,

bei homologer Rekombination kein Einbau von Thyminidinkinase

→ Selektion ⇒ Blastozysten → chimäre Mäuse  
(verschiedene Zellfarben)

⇒ Rückkreuzung auf Spendermaus

→ F1-Generation braune Mäuse

⇒ danach Inzucht → homozygot

immunologie-mainz.de

„Knock-in“ ⇒ gezielte Modifikation von Genen

28.06.2008

- Problem: teilweise Erzeugung von Defekten, die nicht mit dem Leben vereinbar, teilweise Faktoren für

Immunsysteme & andere Körperteile

→ „Knock-Out“-Mäuse einfach generierbar

→ Erweiterung der Technik

Cre-lox-System

- loxP-Elemente aus Bakteriophagen

(Rekombinationsstellen)

- Cre-Enzym (causiert Rekombination)

→ Cre-Enzym schneidet zwischliegende DNA aus

(zwischen den loxP)

→ Gen nicht von Anfang an kaputt (Embryonalentwicklung)

- loxP-Elemente in Gen (Intron) eingebaut

⇒ „floxed“ Mäuse, d.h. Gen o.k.



28.06.2006

- Cre-Enzym kann gezielt aktiviert werden

(Promotor Metallothionin)

⇒ zellspezifische Promotoren

## Signaltransduktion

≙ Kommunikation zwischen den Zellen

- Möglichkeiten des Signalaustausches:

- endokrin (Transport über Blut ⇒ Hormone)
- paracrin (Gewebe: „benachbarte“ Ziel & Effektorzellen)
- autocrin (wirkt auf die selbe Zelle zurück)
- über Plasmamembranverankerte Proteine  
(also direkter Zell-Zell-Kontakt)

- Möglichkeit der Signalerkennung:

- direkte Diffusion in Zelle (Steroidhormone)  
⇒ Rezeptoren im Zellplasma
- spezifische Oberflächerezeptoren  
⇒ Übersetzung in „innere“ Signal  
(Signaltransduktion)

- Rezeptoreinbau:

- G-Protein-gekoppelt (GPCR)
  - Ionenkanäle
  - mit intrinsischer Enzymaktivität  
(Ser/Thr-Kinase, Tyrosin-Kinasen, Guanylyltransferase)
  - ohne Enzymaktivität (assoziiert mit Enzymaktiven)  
⇒ Protein-Tyrosin-Kinasen (Zytokinrezeptorfamilie)
- ⇒ Signalwege häufig über Phosphorylierungen und Dephosphorylierungen  
(Kinase & Phosphatasen) ⇒ schnell & einfach & reversibel

↑ Regulation von Kinasen wichtig, Phosphatasen eher unreguliert & ubiquitär

### T-Zell-Rezeptor:

- Aktivierung von ZAP70 (ζ-assoziiertes Protein 70)
  - ⇒ CD4 (bzw. CD8) hat im Cytosol assoziierte Tyrosinkinase (LCK & FIN) aus SRC-Kinasefamilie
  - ⇒ Phosphorylierung des T-Zell-Rezeptors an den ITAMs
  - ↑ Andockstellen für Schlüsselprotein ZAP70
  - ↑ Phosphorylierung von ZAP70 → Aktivierung der Kinase
- CD45 → Phosphatase
  - LCK & FIN deaktiviert durch Phosphorylierung
  - Bindung → räumliche Nähe → LCK & FIN dephosphoryliert → Aktivierung
- ZAP70 ist Schlüssel für die folgende Signalwege (MAP-Kinase; PLC-γ (IP<sub>3</sub>; DAG))
- Zelloberfläche ist nicht homogen → hierarchische Strukturen (z.B. Lipid rafts)
  - ⇒ bei Ligandenbindung → Rezeptor-Clustering
  - ⇒ teilweise führen Liganden auch zu Rezeptorquervernetzungen
- oft Signalwege nicht nur durch Enzymaktivität sondern oft auch Strukturdomänen (z.B. SH2-Domänen, SH3-Domänen)
  - ↑ Zelle nicht nur auf Diffusion angewiesen durch Zinler-Moleküle

28.06.2006  
Immunologie

## ZAP70 & MAP-Kinase-Kaskade

- MAP-Kinase: Mitogen activated proteine kinase  
klassische MAPK: ERK (Extracellular regulated kinase)

→ Vermittlung für Wachstumsfaktoren

3 kleine G-Proteine (z.B. ras)

ras mit GDP inaktiv, mit GTP aktiv

⇒ GEF tauscht GDP gegen GTP → ras aktiv

- ras aktiviert MAPK-Weg

- große G-Proteine haben GTP-Aktivität

- kleine G-Proteine können nur mit GAPs effektiv GTP hydrolysieren

→ GEF (Guanin Exchange Factor)

→ GAP (~~GTPase~~ GTPase activating factor)

→ AP-1 (Aktivating Protein 1)

GEF → ras → MAPKKK → MAPKK → MAPK

⇒ Sarkom → aktiviert AP-1

⇒ sehr schnell, sehr große Verstärkung, schnell wieder abgeschaltet

⇒ selten Alles-oder-Nichts-Prinzip, oft eng reguliert

05.07.06.

## T-Zell-Rezeptor

- 2 Ketten für Erkennung

⇒ weitere Ketten des T-Zell-Rezeptorkomplexes

⇒ Enzymaktivität, aber ITAMs (können phosphoryliert werden)

3 Rezeptor-CLCK & FIN ⇒ SARC-Kinasen) assoziierte Kinasen

LCK an CD4 (oder CD8), FIN in Membran verankert

⇒ phosphorylieren ITAMs

↓ Assoziation von ZAP70 an  $\zeta$ -ketten

↓ ZAP70 wird phosphoryliert

⇒ Vielzahl weitere Moleküle an Bindung beteiligt

⇒ Clustering von vielen Rezeptorkomplexen

2005.01.8.2  
signalerweiterung?

⇒ ZAP70 aktiviert Src-Kinase-Exchange Faktoren (SFKs)  
↓ aktiviert dadurch ras ⇒ MAP-Kinase-Weg (s.o.)  
⇒ MAP-Kinase aktiviert AP1 (Transkriptionsfaktor)

- ZAP70 aktiviert Phospholipase C- $\gamma$   
⇒ generiert Diacylglycerin (Membran)  
& Inositoltrisphosphat  
(Ausgangsstoff: Phosphatidylinositol bisphosphat-PIP<sub>2</sub>)  
→ Diacylglycerin bindet Proteinkinase C an Membran  
(aktiviert TF NF $\kappa$ B)

→ Inositoltrisphosphat bindet an Ca<sup>2+</sup>-kanäle im ER  
↑ Ca<sup>2+</sup> im Cytoplasma ⇒ PKC aktiviert  
⇒ PKC (Proteinkinase Ca<sup>2+</sup>)

→ NF $\kappa$ B (Familie weit verbreitet) normal inaktiv  
assoziiert mit inhibitorischer I $\kappa$ B (I $\kappa$ NB)  
I $\kappa$ NB wird phosphoryliert, ubiquitiniert & abgebaut  
↑ NF $\kappa$ B ⇒ aktiviert Vielzahl von Genen  
(z.B. IL-2-Promoter) TNF- $\alpha$

→ Ca<sup>2+</sup> aktiviert NFAT (normal durch Phosphorylierung  
inaktiv ⇒ maskiert Kernlokalisationssignale)

⇒ Dephosphorylierung durch Phosphatase? Calcineurin?  
(vermittelt durch Ca<sup>2+</sup>-Calmodulin)

NFAT geht in Kern (IL-2, TNF- $\alpha$ , ...)  
(⇒ WW mit AP-1)

↑ Zusammen: frühe & schnelle T-Zell-Reaktion

↓ „Prinzip des 2. Signals“ ⇒ T-Zell-Rezeptoraktivierung  
reicht nicht aus, benötigt „Co-Signal“ z.B. CD28  
(erkant antigenpräsentierende Zelle)

↓ feine Regulation (z.B. Kernlokalisation (rein & raus))

⇒ Cyclosporin A & FK506 ⇒ Klinik

(unterdrückt T-Zell-Aktivierung)

↳ Bindung an  $Ca^{2+}$ -Nebulin (↳ NF-AT-Aktivierung)

- Problem: auch in anderen Zellen, z.B. Herzkloppen-  
entwicklung im Embryo

### ⇒ FRÜHE IMMUNREAKTIONEN

- Entzündungsreaktionen

⇒ PAMPs (Muster an Pathogenen)

⇒ Mustererkennung durch Pattern recognition receptor

- antigenpräsentierende Zellen werden so aktiviert

(↳ Wanderung in Lymphknoten)

⇒ „Toll-like-Rezeptoren“ (z.B. Lipopolysaccharide)

→ Wichtig welcher Toll-like für was? (z.B. Peptidoglycane)

(z.B. CpG-Motire in bakterieller DNA (ohne Methylierung) strängige RNA)

PAMP: Pathogen-associated molecular Pattern

- Toll-like-Rezeptoren haben gemeinsamen Signaling  
(sehr „altertümlich“) aktivieren schwerpunktmäßig

$nf\kappa B$  ⇒ Cytokineelie

Entzündungen fördern (z.B. TNF $\alpha$ )

- Bsp.: LPS-Rezeptor: LPS-Bindeprotein (frei) bindet LPS

↳ Bindung an LPS-Rezeptor, CD14 assoziiert

↳ Enzymaktivität → Adaptor (MyD88)

↳ IRA-Kinase → phosphoryliert TRAF-6

MAP-Kinase

AP-1

I $\kappa$ B $\kappa$ -Komplex

$nf\kappa B$

Achtung hier fehlt der 12.07.2006!

- ⇒ MHC ⇒ verschiedene Gene beim Menschen
- ⇒ Polymorphismus (ca. 100 verschiedene Formen)
- ↳ bei MHC II vor allem in  $\beta$ -Kette
- ⇒ jeder Mensch  $3 \times 2$  verschiedene MHC I
- $3 \times 2$  - " - MHC II
- MHC II nur auf prof. antigenpräsentierende Zellen (überwiegend)

### MHC-Rezeptoren & T-Zellentwicklung

- gibt MHC-Restriktion der T-Zellen
- Ort: Thymus
- T-Zell-Vorläufer stammen aus Knochenmark & besiedeln Thymus
- ↳ nach Entwicklung: periphere (lymph. Organe (teilw. Blut & Lymphe))
- T-Zellen durchlaufen verschiedene Bereiche (außen Cortex, innen Medulla)
- ↳ cortikale Epithelzellen
- medulläre Epithelzellen
- Makrophagen & dendritische Zellen ⇒ Medulla
- T-Zellen wandern von außen nach innen, verlassen durch medulläre Blutgefäße
- Vorläufer: negativ (CD4 & CD8) ⇒ „doppelt negative Thymozyten“
- ⇒ „doppelt positive Thymozyten“ ↓ Cortex zur Medulla
- ⇒ am Ende: „einfach positive Thymozyten“
- ebenfalls wichtig: CD44 → Adhäsionsmolekül (zu Beginn vorhanden)
- CD25 → IL-2-Rezeptor (zu Beginn negativ, später positiv)
- ⇒ kurz bevor doppelt positiv Verlust von CD25 & CD44

## T-Zell-Rezeptorentwicklung

- $\beta$ -Kette (CD25<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>) wird ungelagert
- Hilfs- $\alpha$ -Kette (präT $\alpha$ ) stabilisiert  $\beta$  & transportiert diese an Oberfläche

⇒ Aktivierungssignal & Vermehrung

↳  $\alpha$ -Ketten-Umlagerung

⇒ richtiger T-Zell-Rezeptor (CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>  
CD25<sup>-</sup>, CD44<sup>-</sup>)

↳ Bereit für Selektion (positive & negative Selektion)

⇒ Positive Selektion (corticale Zellen)

1) Entscheidung der → CD4 → einfach negativ  
↳ CD8

→ verschiedene Theorien

(z.B. T-Zell-Rezeptor passt zu MHC I

↳ CD8-unterstützt ↳ CD4 herunterreguliert)

2) negative Selektion: (medulläre Zellen)

- bei Überschreitung der „oberen“ Schwelle

↳ negative Selektion durch zu starke Reizung  
(Peptide des MHC-Peptid-Komplexes spielen wichtige Rolle)

⇒ fremde Peptide können nicht gezeigt werden

↳ Eliminierung der T-Zellen, die mit eigenen Peptiden reagieren würden

↳ ~~positive~~ negative Selektion gegen Peptide, die nicht im Thymus gezeigt werden

⇒ „zentrale Toleranzinduktion“

→ medulläre Zellen beherrschen „ektopische Expression“

↳ also Expression „fremdspezifischer Proteine“

Immunologie  
19.07.2006

⇒ für negative Selektion zeichnen aus dem  
Knochenmark stammende Zellen verantwortlich

hier fehlt noch der 26.07.2006