

# IMMUNOLOGIE

## ANHANG zu Versuch 7

Immunologische Verfahren bestehen darin, daß mit Hilfe einer Antigen-Antikörper-Reaktion das Vorhandensein oder das Fehlen eines bestimmten Antigens geprüft wird.

Die nachfolgenden, kurzgefaßten Anmerkungen über Antigene, Antikörper (Immunglobuline) und ihre Reaktionsformen sind als Leitfaden für die entsprechenden Kapitel in den genannten Lehrbüchern gedacht, sie können und sollen das Nachschlagen in diesen Lehrbüchern nicht ersetzen.

### Antigene:

Antigene sind körperfremde, natürliche oder synthetische Makromoleküle, insbesondere Proteine und Polysaccharide (MG>2000), sowie Oberflächenstrukturen von Fremdpartikeln, die phagozytierbar sind und eine Immunantwort auslösen. Ein Antigen besteht aus der hochmolekularen Grundsubstanz, dem Träger der Immunogenität, und zusätzlich aus meist mehreren niedermolekularen Gruppen, die für die Spezifität der Immunantwort und der Reaktion der Antigene mit den entsprechenden Immunglobulinen verantwortlich sind. Diese niedermolekularen Bereiche der Antigene heißen determinante Gruppen, liegen an der Moleküloberfläche und bedingen die Valenz der Antigene. Fast alle Antigene sind polyvalent und induzieren daher die der Zahl ihrer determinanten Gruppen entsprechende Anzahl von Antideterminanten unter den Immunglobulinen. Die maximale Größe der determinanten Gruppe liegt bei Proteinantigenen bei 30 Aminosäureresten (MG 3500). Bei den einfachen Polysacchariden umfaßt die Determinante 6 bis 7 Zuckerreste. Bei den Antigenen von Proteinnatur wird zwischen Antigenen mit Konformationsdeterminanten, die durch Denaturierung zerstört werden, und Antigenen mit Sequenzdeterminanten unterschieden. Die Antigene können nach Größe, Form, chemischer Struktur, Vorkommen und nach ihren genetischen Beziehungen zwischen Antigen Spendern und Antigenempfängern eingeteilt werden. Innerhalb dieser und zwischen diesen Antigenklassen gibt es stark und schwach wirksame Antigene. Proteine sind im allgemeinen starke Antigene, besonders wenn sie über ein hohes MG, über Aggregationsformen und einen hohen Tyrosingehalt verfügen.

Körpereigene Antigene (Autoantigene) können zu Autoimmunerkrankungen führen (z.B. die Antigene des Schilddrüsengewebes).

Untersuchungen an synthetischen Antigenen, z.B. hetero- oder copolymeren Peptidketten oder an Träger gekoppelten Determinanten beliebiger Spezifität, haben wesentliche Beiträge zum Verständnis des Antigenwirkungsmechanismus geliefert.

## Immunglobuline

Immunglobuline - Abkürzung Ig - sind spezifische körpereigene Abwehrproteine, Antikörper des Blutplasmas, der Lymphe und vieler Körpersekrete aller Wirbeltiere, die gegen das Antigen, das ihre Bildung induziert hat, gerichtet sind.

Immunglobuline sind Syntheseprodukte der aus den B-Lymphozyten hervorgegangenen Plasmazellen und wandern als Plasmaproteine in der Elektrophorese in der  $\gamma$ -Globulin-Fraktion. Eine weitestgehende Auftrennung der Plasmaproteine gelingt durch Immunelektrophorese.

### Kettenstruktur der Immunglobuline:

Serum-Immunglobuline sind eine stark heterogene Gruppe von Glykoproteinen, die sich in fünf Hauptklassen einordnen lassen: IgG, IgM, IgA, IgD und IgE. IgG, IgD, IgE und die Monomere von IgM und IgA bestehen aus vier Polypeptidketten, zwei leichten oder L-Ketten (MG 22 000 bis 24 000) und zwei schweren kohlenhydrathaltigen oder H-Ketten (MG 50 000 bis 73 500), die durch Disulfidbrücken kovalent verbunden sind.

Die oligomeren IgM und IgA enthalten zusätzlich ein (IgM) bzw. zwei Verknüpfungspeptide (IgA). Während jede Immunglobulin-Klasse durch einen der fünf immunologisch und strukturell verschiedenen H-Kettentypen charakterisiert ist, finden sich die **zwei L-Kettentypen  $\lambda$  und  $\kappa$**  in allen Immunglobulin-Klassen.

### **Limitierte Proteolyse des IgG-Moleküls mit Papain ergibt drei Fragmente:**

zwei Fab - Fragmente (fragment antibody) und ein Fc-Fragment (fragment crystalline).

**Fab** (MG 50 000) kann Antigen binden, aber wegen seiner Monovalenz (inkompletter Antikörper) nicht präzipitieren oder agglutinieren.

**Fc** (MG 60 000) umfaßt die C-terminale Hälfte beider H-Ketten und ist für die Komplementbindung und den Plazentadurchtritt der IgG sowie für die Gewebsbindungsfähigkeit der Immunglobuline verantwortlich.

Spaltung durch Pepsin ergibt ein **bivalentes (Fab)<sub>2</sub>-Fragment** (MG 100 000), das als kompletter Antikörper das Antigen präzipitieren oder agglutinieren kann. Elektronenoptische und röntgenkristallographische Befunde weisen auf eine Y-formige Struktur des IgG und auf eine sternförmige Form des pentameren IgM hin.

Die Y-Form ermöglicht die bei der Antigenbindung notwendige Flexibilität des IgG-Moleküls. Die hohe Spezifität der Immunglobuline wird nicht durch eine unterschiedliche Faltung ein und derselben Peptidkette bestimmt, sondern dadurch, daß alle bis jetzt in ihrer Primärstruktur bekannten H- und L-Ketten insbesondere in ihrem N-terminalen Teil unterschiedliche Aminosäuresequenzen aufweisen. Dieser variable Abschnitt erstreckt sich bei beiden Kettentypen bis zum 107. Aminosäurerest. Die innerhalb eines Kettentyps weitgehend konstante oder C-Region erstreckt sich bis zum C-Kettenende und umfaßt bei der L-Kette auch 107 bis 112 Aminosäuren; bei der doppelt so großen H-Kette läßt sie sich in drei gleich große Abschnitte CH 1 bis 3 unterteilen. Bisher wurde die vollständige Primärstruktur von mehreren Bence-Jones-Proteinen, einem IgG- und zwei IgM-Spezies ermittelt.

Durch Sequenzvergleiche der Immunglobuline wird ihre exakte Klassifizierung und die Erforschung ihrer Evolution möglich. Danach sollen sich die Immunglobuline aus einer Urpeptidkette von etwa 110 Resten durch Duplikation des Stammgens divergent entwickelt haben.

Die Tertiärstruktur der Antikörper gibt insbesondere Auskunft über die räumliche Anordnung und Größe der Antigenbindungsstelle mit den hypervariablen VL- und VH-Regionen (**CDR-Regionen und Framework-Regionen**) und über den flexiblen Ort (Beginn der "Arme" im Y-förmigen Molekül) im Antikörpermolekül.

Die erste von Sarma (1971), Poljak (1973) und Padlan (1973) aufgeklärte Tertiärstruktur eines Antikörpers und seines Komplexes mit einem Halbantigen bestätigte die Y-formige Struktur und die Beteiligung der L- und H-Ketten in Form von vier strukturähnlichen Bereichen der Domänen (VH und CH I der H-Kette, CL und VL der L-Kette) bei der Antigenbindung.

## ANTIKÖRPERKLASSEN

- **IgG** sind mengenmäßig vorherrschend und die am besten untersuchte Immunglobulin-Klasse. Primär- (L-Kette 214, H-Kette 446 Aminosäuren), Sekundär- (reich an  $\beta$ -Strukturen) und Tertiär- (Y-Form) -struktur von IgG I wurden ermittelt. Vom IgG sind vier Subklassen (1 bis 4) bekannt, die sich durch ihre Antigenität, Zahl der Disulfidbrücken zwischen den H-Ketten (zwei Brücken bei G 1 und G 4, vier bei G 2, fünf bei G 3), H-Kettengröße (MG G 1, G 2 und G 4 = 50 000, G 3 = 60 000) und durch ihre Komplementbindungsfähigkeit (am höchsten bei G3) unterscheiden. IgG wird zu gleichen Teilen im Gewebs- und Blutplasma sowie im Kolostrum (Milchproteine) angetroffen.

- **IgM** ist ein pentameres und daher das größte Immunglobulin, dessen Primärstruktur ermittelt wurde (L-Kette 214, H-Kette 567 Aminosäuren, MG 73 000). Monomeres IgM findet sich in den IgM-produzierenden Plasmazellen, pentameres IgM nur extrazellulär, fast ausschließlich im Blutplasma, in geringem Maße im Kolostrum. Charakteristisch für IgM sind hoher Kohlenhydratgehalt und die Anwesenheit eines Verbindungspeptides, des j- (joining-) Peptides (MG 16000), das die Polymerisation des monomeren IgM erst ermöglicht. IgM zeigt die stärkste Komplementbindungsreaktion.

- **IgA** kommt in zwei Formen vor, dem monomeren intrazellulären Serum IgA (MG ohne bzw. mit J-Peptid 154 000 bzw. 170 000) und dem dimeren sekretorischen IgA (MG 380 000 einschließlich sekretorischer Komponente). Serum IgA bindet weder Komplement noch präzipitiert oder agglutiniert es Antigene. Es ist somit funktionell monovalent. Als sekretorisches IgA findet es sich insbesondere im Kolostrum sowie in zahlreichen Sekreten, wie Darm-, Nasen-, Speichel- und Bronchialsekret, wo es die Schleimhäute vor lokalen Infektionen schützt. Charakteristische Bestandteile des sekretorischen IgA sind zwei zusätzliche Peptidketten, die sekretorische Komponente (MG 60 000) und das J-Peptid (MG 16 000), über die die beiden Monomeren zum dimeren IgA verknüpft sind. In der IgA2-Subklasse sind die L-Ketten an ihren Carboxylenden nicht an die H-Ketten, sondern untereinander über Disulfidbrücken verbunden.

- **IgD**, ist ein seit 1965 bekanntes ausschließlich intravaskuläres Immunglobulin, das wie IgA weder Komplement binden noch die Plazenta passieren kann. Über seine spezielle Funktion und Primärstruktur ist noch nichts bekannt. Sämtliche Ketten sind nur durch eine Disulfidbrücke untereinander verbunden.

- **IgE (Reagine)**, sind verantwortlich für viele Allergien vom Frühtyp, besonders der Schleimhäute, wie Asthma, Heuschnupfen und Nesselausschlag. Die Überempfindlichkeit ist auf normale Personen, nicht auf Tiere, übertragbar. IgE wird im Gegensatz zu den übrigen Immunglobulin-Klassen für Wochen bis Monate in der menschlichen Haut fixiert und verursacht eine entsprechend lange Hautsensibilisierung. Für die Gewebsspezifität des IgE ist der Fc-Anteil verantwortlich. IgE wird fest über seine Fc-Region und nicht wie IgG und IgM über die Fab-Region an die Oberflächenrezeptoren besonders Histamin enthaltender Zellen gebunden. Die Fab-Region bleibt dadurch frei und kann mit dem Allergen reagieren, wodurch es zur Freisetzung des die Allergie auslösenden Histamins kommt. Eine Komplementbindung durch IgE ist wegen der blockierten Fc-Region unmöglich. Im Gegensatz zu den übrigen Immunglobulinen ist IgE hitzelabil (nach 2 Stunden bei 56°C erfolgt keine Gewebsbindung und Hautsensibilisierung mehr) und kann die Plazentaschranke nicht überschreiten. Außer in der Haut und im Blutplasma wurde IgE auch

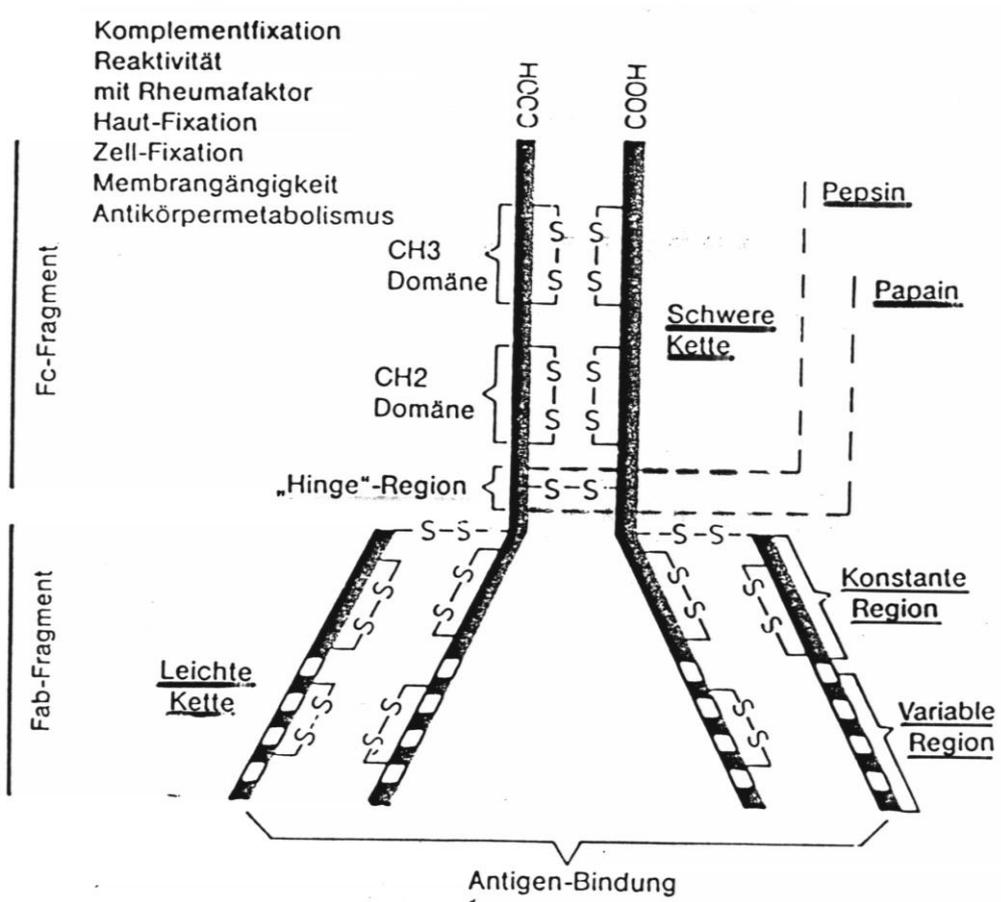
im Sputum, in der Nasen- und Tränenflüssigkeit sowie im Kolostrum gefunden. IgE weisen die größten H-Ketten unter den Immunglobulinen auf (MG 75 500).

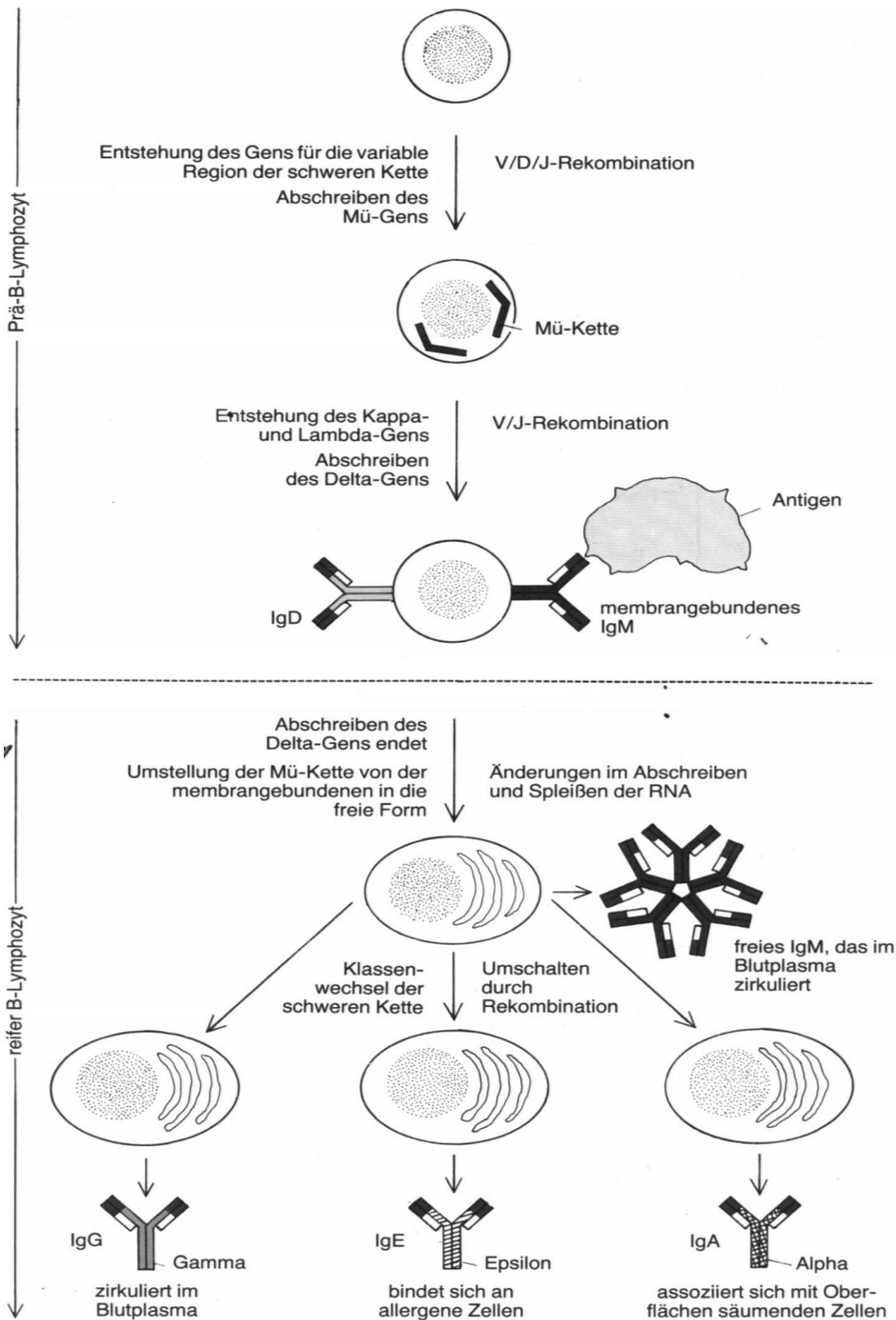
Die Synthese der Immunglobuline erfolgt getrennt für L- und H-Ketten an den Polyribosomen der Plasmazellen. Die Verknüpfung zu H-L-Halbmolekülen und wahrscheinlich zum kompletten  $H_2L_2$ -Molekül geschieht noch im endoplasmatischen Retikulum nach Ablösung vom Ribosom. Die Synthese einer L-Kette dauert 30 bis 40, die einer H-Kette 60-90 Sekunden. Je Sekunde werden in einer Antikörper bildenden Zelle 2000 identische Immunglobulin-Moleküle synthetisiert. Dagegen vergehen 30 Minuten, bis die gebildeten Immunglobuline außerhalb der Zelle nachweisbar sind. In dieser Zeit werden die Zuckereinheiten angeheftet (zuletzt Fucose oder Sialinsäure). Die oligomeren IgM- und IgA-Formen bilden sich erst während der Sekretion. Die Kohlenhydrate der Immunglobuline machen etwa 2 bis 3 % (bei IgG) und 8 bis 12 % (bei IgA, IgM, IgE, IgD) des MG aus. Kohlenhydrate finden sich stets an der H-Kette, nicht oder sehr selten (bei IgM zuweilen) an der L-Kette in kovalenter Bindung. Die Kohlenhydratkette (MG 2500) umfaßt etwa 15 Zuckermoleküle. Fünf verschiedene Typen in der Reihenfolge ihrer Verkettung, von der Peptidkette aus gesehen, N-Acetylglucosamin, Mannose, Galaktose, Fucose oder N-Acetylneuraminsäure, sind in der Kohlenhydratkette enthalten. Die am nicht reduzierenden Kettenende stehenden Typen -Fucose oder Neuraminsäure - werden unmittelbar vor oder während des Membrandurchtrittes an das Ig-Molekül gebunden. Die Kohlenhydrate sind für die Mikroheterogenität zumindest der kohlenhydratreichen IgM- und IgA-Klassen verantwortlich. Die Frage, ob die Kohlenhydrate für die Konformation, die Sezernierbarkeit und/oder den Schutz vor proteolytischem Angriff der Immunglobuline mitverantwortlich sind, ist noch nicht geklärt.

## **1. Antigen-Antikörper-Reaktion**

Die Antigen-Antikörper-Reaktion ist neben der Phagozytose der wichtigste Schutzmechanismus des tierischen Organismus gegen eingedrungene Fremdstoffe. Die Antigen-Antikörper-Reaktion erfolgt durch die spezifische Vereinigung von Antigen und Antikörper zum unlöslichen Antigen-Antikörper-Komplex. Mit löslichen Antigenen kommt es zur Präzipitation, mit zellgebundenen Antigenen zur Agglutination. Wegen ihrer auch in vitro großen Spezifität und Empfindlichkeit (bis in den Pikogrammbereich) wird die Antigen-Antikörper-Reaktion zur Antigen- oder Antikörperbestimmung diagnostisch eingesetzt. Die Bindungsarten zwischen Antigen und Antikörper sind nebervalenzartig und werden fast ausschließlich von van-der-Waalschen Kräften und Coulombschen Kräften bzw. Wasserstoffbrücken, die sich zwischen den Amino-, Carbonyl- und Hydroxylgruppen ausbilden, repräsentiert.

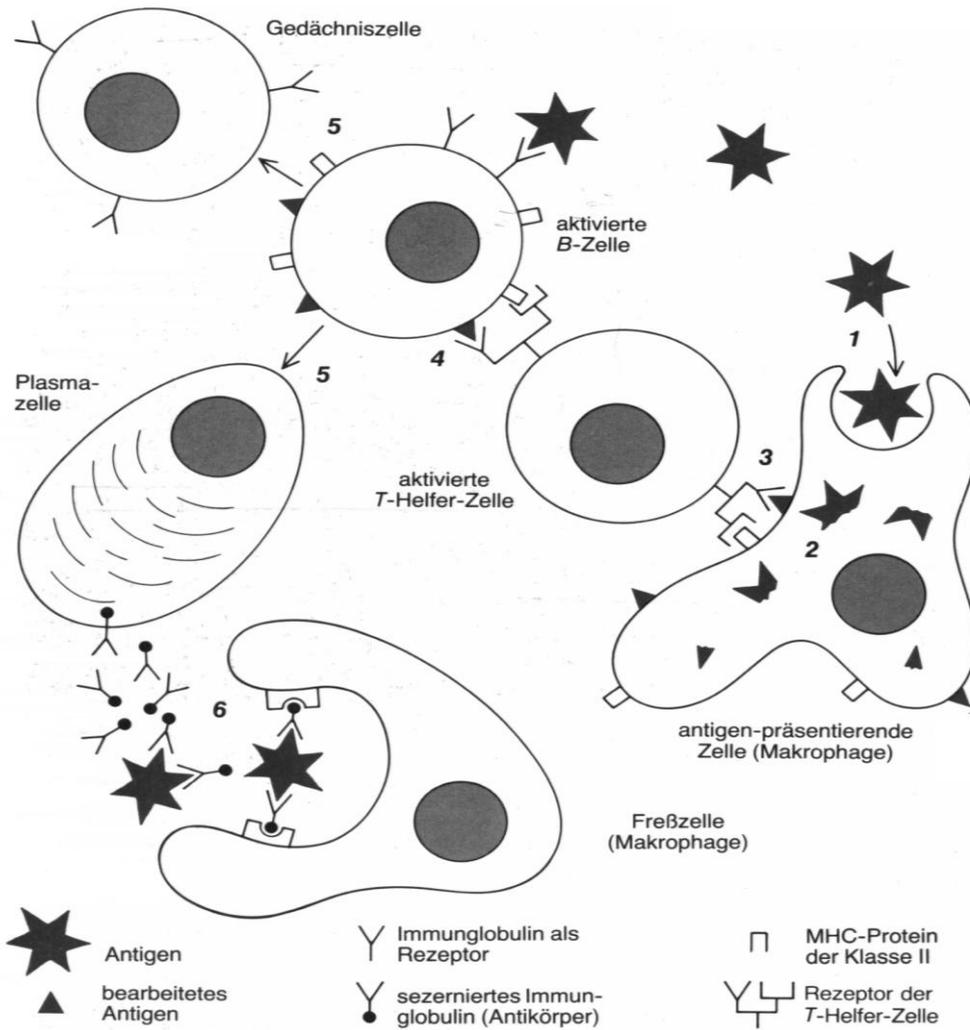
Abb. Eigenschaften eines IgG-Moleküls





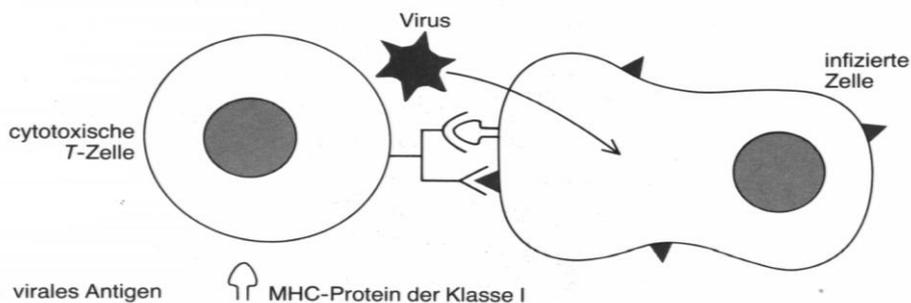
**Bild 11:** Die Differenzierung einer Antikörper produzierenden Zelle beginnt mit einem Prä-B-Lymphozyten. Die genetischen Vorgänge, die die Differenzierung begleiten, sind jeweils links der Pfeile, die dazugehörigen Umordnungsmechanismen rechts aufgelistet. Zuerst wird die schwere Mü-Kette, dann die leichte Kette (Kappa oder Lambda) sowie die schwere D-Kette hergestellt. Die fertigen Immunglobuline der Klasse M und D (IgM und IgD) erscheinen gleichzeitig an der Oberfläche der Zelle. Wenn ein bestimmtes Antigen erkannt und von einem solchen Oberflächenantikörper gebunden wird, entwickelt sich die Zelle weiter:

Sie vermehrt sich und bildet einen Klon reifer B-Lymphozyten, die darauf spezialisiert sind, große Mengen IgM zu synthetisieren und in das umgebende Medium abzugeben. Die reifen Lymphozyten können nun von der Produktion einer Klasse von Antikörpern auf die nächste umschalten. Das Resultat: Zellen, die Antikörper mit unterschiedlichen Funktionen herstellen. Denn meist bleibt die variable Region und damit die Antigen-spezifität gleich, während sich die Zielfunktion mit der Klasse der schweren Kette ändert. Punktmutationen können allerdings dazu führen, daß sich die variablen Regionen im Laufe der Zellreife ändern.



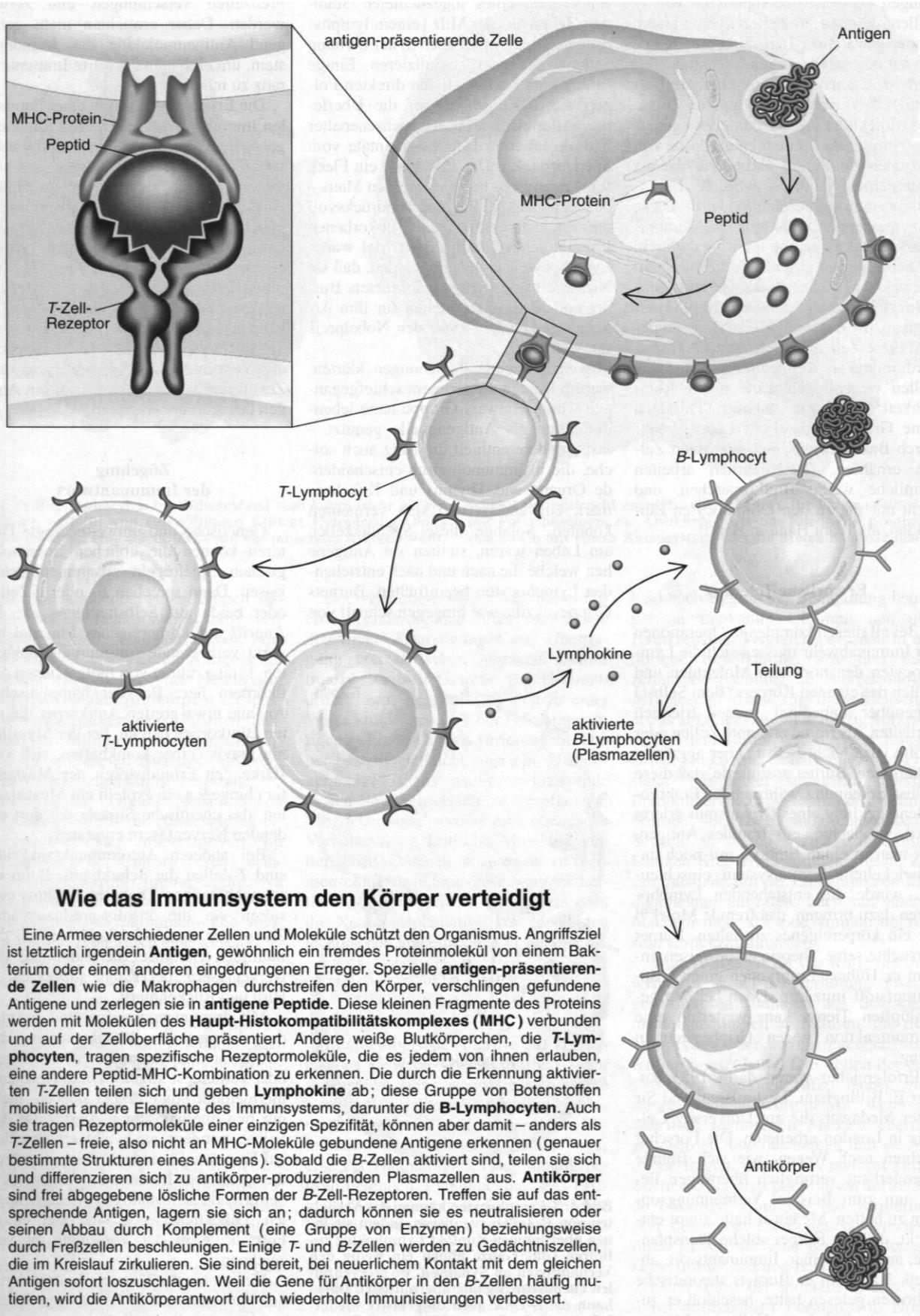
**Bild 2:** Eine Infektion mobilisiert mehrere kooperierende Populationen von Immunzellen. Die *B*-Zellen tragen Immunglobuline als Oberflächenrezeptoren, die zirkulierende Antigene erkennen und sie binden. Im allgemeinen jedoch werden sie allein davon nicht aktiviert. Zuerst muß das Antigen von einer antigen-präsentierenden Zelle aufgenommen werden (1); diese Funktion kann ein Makrophage übernehmen. Das Antigen wird von ihm bearbeitet (2) und erscheint dann an seiner Oberfläche. Wenn eine *T*-Helfer-Zelle es erkennt, wird sie akti-

viert (3) und aktiviert ihrerseits *B*-Zellen, die das gleiche bearbeitete Antigen tragen (4). Diese *B*-Zellen vermehren sich und differenzieren sich aus (5): Einige Nachkommen werden zu Gedächtniszellen, die bei neuerlicher Infektion eine schnellere Immunreaktion ermöglichen, andere entwickeln sich zu antikörperausscheidenden Plasmazellen. Die freien Antikörper (ebenfalls Immunglobuline) binden sich an das Antigen und markieren es damit für die Zerstörung durch andere Elemente des Immunsystems, unter anderem durch Makrophagen (6).



**Bild 3:** Virusinfektionen rufen andere Elemente des Immunsystems auf den Plan. Dringt ein Virus in eine Zelle ein, so bleiben virale Proteine in der Zellmembran zurück. Cytotoxische *T*-Zellen (Killer-Zellen) erkennen spezifisch solche fremden Moleküle, die zusammen mit

charakteristischen wirtseigenen Proteinen dargeboten werden, und zwar mit den Klasse-I-Proteinen des Haupthistokompatibilitäts-Komplexes (englisch *major histocompatibility complex*, abgekürzt *MHC*). Die infizierte Zelle wird dann von der cytotoxischen *T*-Zelle getötet.



## Wie das Immunsystem den Körper verteidigt

Eine Armee verschiedener Zellen und Moleküle schützt den Organismus. Angriffsziel ist letztlich irgendein **Antigen**, gewöhnlich ein fremdes Proteinmolekül von einem Bakterium oder einem anderen eingedrungenen Erreger. Spezielle **antigen-präsentierende Zellen** wie die Makrophagen durchstreifen den Körper, verschlingen gefundene Antigene und zerlegen sie in **antigene Peptide**. Diese kleinen Fragmente des Proteins werden mit Molekülen des **Haupt-Histokompatibilitätskomplexes (MHC)** verbunden und auf der Zelloberfläche präsentiert. Andere weiße Blutkörperchen, die **T-Lymphocyten**, tragen spezifische Rezeptormoleküle, die es jedem von ihnen erlauben, eine andere Peptid-MHC-Kombination zu erkennen. Die durch die Erkennung aktivierten T-Zellen teilen sich und geben **Lymphokine** ab; diese Gruppe von Botenstoffen mobilisiert andere Elemente des Immunsystems, darunter die **B-Lymphocyten**. Auch sie tragen Rezeptormoleküle einer einzigen Spezifität, können aber damit – anders als T-Zellen – freie, also nicht an MHC-Moleküle gebundene Antigene erkennen (genauer bestimmte Strukturen eines Antigens). Sobald die B-Zellen aktiviert sind, teilen sie sich und differenzieren sich zu antikörper-produzierenden Plasmazellen aus. **Antikörper** sind frei abgegebene lösliche Formen der B-Zell-Rezeptoren. Treffen sie auf das entsprechende Antigen, lagern sie sich an; dadurch können sie es neutralisieren oder seinen Abbau durch Komplement (eine Gruppe von Enzymen) beziehungsweise durch Freßzellen beschleunigen. Einige T- und B-Zellen werden zu Gedächtniszellen, die im Kreislauf zirkulieren. Sie sind bereit, bei neuerlichem Kontakt mit dem gleichen Antigen sofort loszuschlagen. Weil die Gene für Antikörper in den B-Zellen häufig mutieren, wird die Antikörperantwort durch wiederholte Immunisierungen verbessert.

