

Erkennung, Anpassung und Evolution des Immunsystems bei Immunantworten

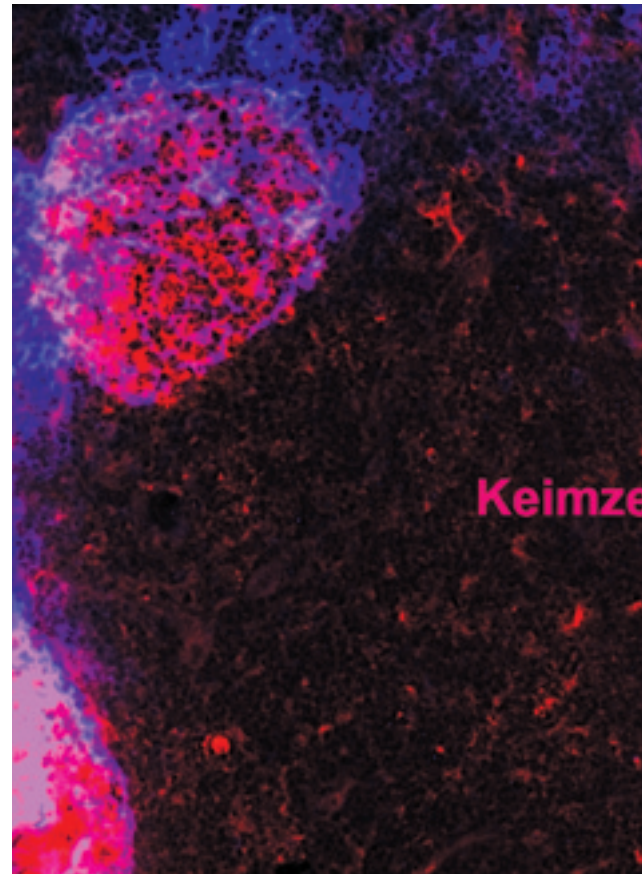
Die Nachwuchsgruppe »Theoretische Immunologie« stellt sich vor

Während der ersten zehn Monate seines Lebens entwickelte sich Bill Grignard prächtig. Im folgenden Jahr allerdings bekam er Lungenentzündung, mehrere Mittelohrentzündungen und eine Wundrose. Wegen all dieser bakteriellen Infektionen bekam er ständig Antibiotika. Eine Untersuchung seines Blutbildes ergab, dass eine bestimmte Art von weißen Blutkörperchen, die B-Zellen, kaum vorhanden war. B-Zellen sind diejenigen Zellen, die Antikörper produzieren. Folglich besaß Bill auch kaum Antikörper. Diese Tatsache fiel erst auf, als er entwöhnt wurde und daher keine Antikörper mehr über die Muttermilch bekam. Sobald er wöchentlich intravenöse Antikörpergaben bekam, wurde er beschwerdefrei. – Dieses Beispiel illustriert die Wichtigkeit der Antikörper für die Bekämpfung von Krankheiten – besonders solche, bei denen die Erreger sich nicht innerhalb der Körperzellen befinden, was häufig bei bakteriellen Infektionen der Fall ist.

Antikörper sind die Späher-Proteine des Immunsystems. Ein Mensch hat davon schätzungsweise eine Million unterschiedlicher Typen. Ihre Wichtigkeit leitet sich aus der Tatsache ab, dass sie an Krankheitserregern und Toxinen haften und diese markieren, damit sie von Abräum-Zellen des Immunsystems gefunden und beseitigt werden können. Ohne Antikörper werden die Pathogene, die sich außerhalb von Zellen befinden, kaum erkannt. Viren hingegen, die sich vor allem innerhalb von Körperzellen aufhalten, können auch durch andere Mechanismen bekämpft werden. Deswegen litt Bill nicht besonders stark unter viralen Infekten.

Evolution im Immunsystem

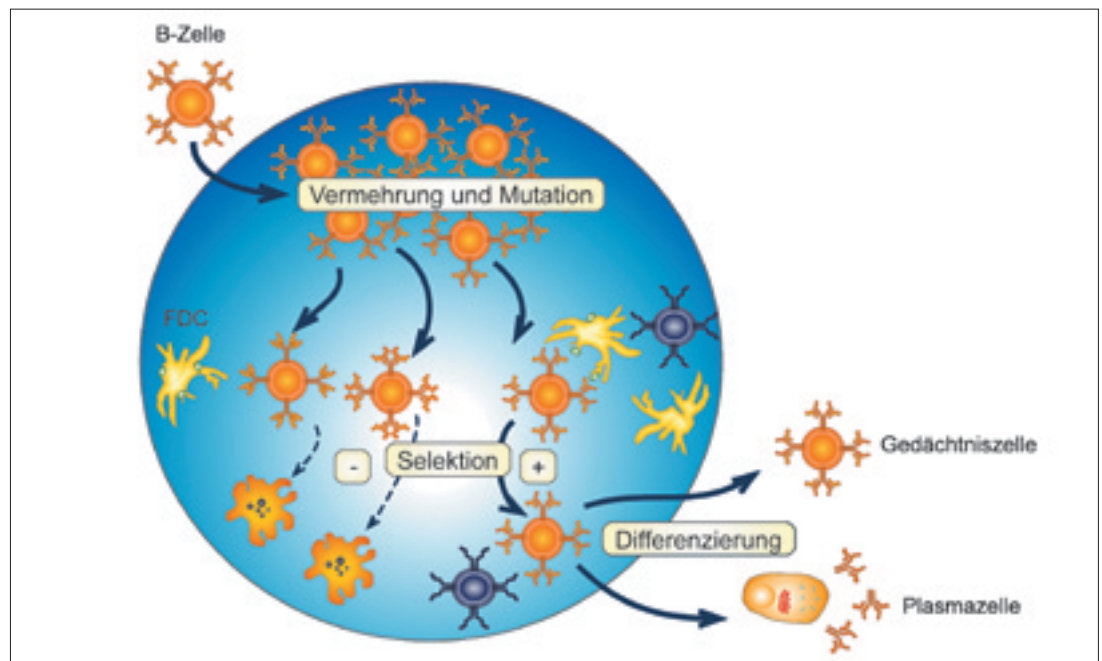
Die Tatsache, dass B-Zellen ihr Antikörpermolekül auch als membranständigen Rezeptor tragen, verleiht ihnen die Fähigkeit, nach Erregern »Ausschau zu halten«. Antikörpermoleküle erkennen kleine, aber bestimmte Strukturen (Determinanten) der Oberfläche von Pathogenen und binden spezifisch an diese Struk-



turen. Die hohe Bindungsaffinität zwischen einem Antikörper und einem Erregermerkmal ist ausschlaggebend für die Erkennung eines Erregers.

Viren und Bakterien müssen stetig ihre äußere Erscheinungsform ändern, um der Erkennung durch Antikörpermoleküle zu entgehen und das eigene Fortbestehen zu sichern. Sie erreichen dies durch eine sehr schnelle Vermehrung bei hoher Mutabilität. Infolge dessen wird das Immunsystem kontinuierlich mit neu generierten, zuvor noch nicht gesehenen Erscheinungsformen von Erregern konfrontiert.

Abb. 1
Die Keimzentrumsreaktion Dargestellt sind die an der Keimzentrumsreaktion beteiligten Zelltypen und die grundlegenden Mechanismen. Eine B-Zelle, die in den lymphatischen Organen den Erreger erkannt hat und infolge dessen aktiviert wurde, beginnt zu expandieren. Während der Expansion mutieren die Gene, die das Antikörpermolekül kodieren. Follikuläre dendritische Zellen (FDC) präsentieren den B-Zellen den Erreger. B-Zellen, die Antikörpermoleküle tragen, die das Antigen binden können, erhalten ein Überlebenssignal und werden positiv selektiert. Anschließend können sie zu Plasma- oder Gedächtniszellen differenzieren. B-Zellen die ihre Bindungsfähigkeit eingebüßt haben, werden aufgrund des fehlenden Überlebenssignals negativ selektiert und sterben. (Grafik: N. Wittenbrink)



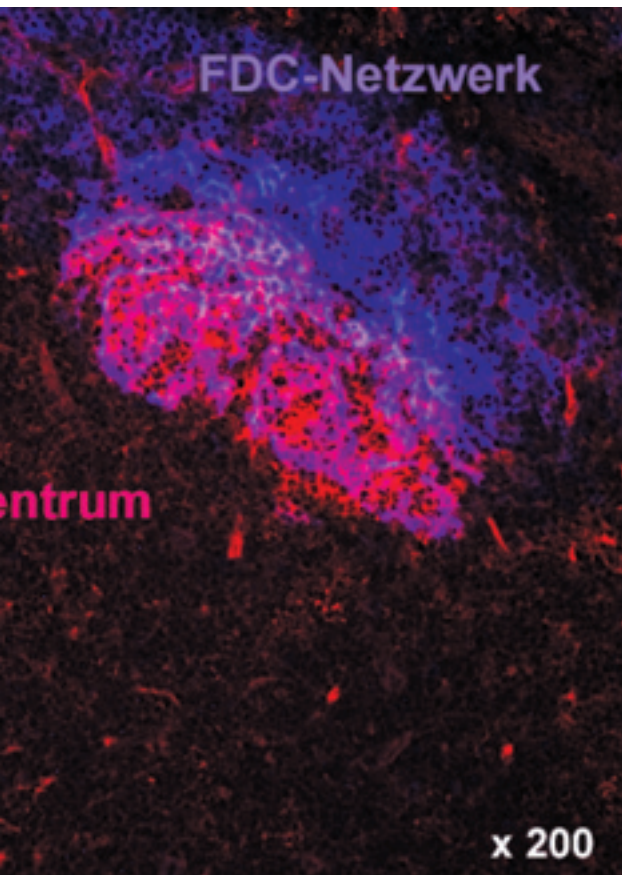


Abb. 2
 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von Keimzentren der Milz einer autoimmunen Maus
 Die Keimzentren wurden mit fluoreszenz-markiertem Peanut-Agglutinin (PNA) – einem Lektin aus der Erdnuss – gefärbt. PNA bindet an der Oberfläche von Keimzentrums-B-Zellen (rot). Das von den follikulären dendritischen Zellen (FDC) gebildete Netzwerk wurde mit dem Antikörper CD21/35 detektiert und durch einen fluoreszenz-markierten Sekundärantikörper sichtbar gemacht (blau). 200-fache Vergrößerung. (Aufnahme: N. Wittenbrink, M. Or-Guil, C. Berek)

Was aber setzt das Immunsystem seinerseits dieser Vielfalt an gänzlich unbekanntem Feinden entgegen? Die Antwort auf diese Frage lautet: Flexibilität. Es bedient sich der gleichen Mechanismen, nämlich schnelle Vermehrung und hohe Mutabilität. Dadurch erlangt es die Fähigkeit, sich den Erregern immer wieder anzupassen. Im Verlauf einer Infektion generiert das Immunsystem neue, »passende« Antikörper, mit denen der Erreger effizient bekämpft werden kann. Diese Anpassung an den Krankheitserreger ist ein evolutionärer Prozess innerhalb einer sehr kurzen Zeitskala.

Evolution basiert auf der Schaffung von Vielfalt und anschließender Selektion (»survival of the fittest«). Im Fall der Antikörper-Immunantwort evolvieren die von den B-Zellen produzierten und an der Oberfläche präsentierten Antikörpermoleküle. Diese werden von einem bestimmten Satz von Genen der B-Zell-DNA kodiert, die unterschiedlich kombiniert werden können. Ändert sich die Kodierung der Gene des Antikörpermoleküls, so ändert sich auch das von der B-Zelle produzierte Antikörperprotein. Die Vielfalt der Antikörper wird durch die hohe Mutabilität der kodieren-

den Gene zusätzlich ins nahezu Unermessliche gesteigert. Zufällig verteilte Punktmutationen auf DNA-Ebene können zu einem Austausch einzelner Aminosäurebausteine des Antikörperproteins führen. Der auf diese Weise erzeugte, leicht abgewandelte Antikörper weist in Folge dessen oft veränderte Bindungs- und Erkennungseigenschaften auf.

Wie aber läuft die Evolution von Antikörpermolekülen ab? Nach der Infektion mit einem »neuen« Erreger werden aus dem vorliegenden Pool an B-Zellen diejenigen aussortiert, die an ihrer Oberfläche die »besten« Antikörperrezeptoren präsentieren. Diese B-Zellen erhalten dann das Signal, sich stark zu vermehren. Während dieser Expansionsphase weisen speziell einige Abschnitte der Antikörpergene eine gesteigerte Mutabilität auf. Die Mutationsrate ist im Vergleich zur natürlich vorkommenden Mutationsrate millionenfach erhöht. Auf diesem Weg wird in kürzester Zeit ein heterogener Pool an B-Zellen mit unterschiedlichen Antikörpermolekülen erzeugt. Ein Teil der in diesem Pool enthaltenen Antikörper hat aufgrund der spontanen, zufälligen Mutationen die Fähigkeit verloren, den Erreger zu erkennen oder erkennt ihn »schlechter« als zuvor; ein anderer Teil jedoch weist verbesserte Erkennungs- und Bindungseigenschaften auf. Es gilt nun, gezielt die B-Zellen mit verbesserten Antikörpermolekülen aus dem Gesamtpool zu filtern. Diese Selektion findet durch »Abgleich« der Antikörpermoleküle mit dem Erreger statt. Für den Selektionsprozess müssen daher die B-Zellen und der Erreger aufeinander treffen.

Treffpunkt von Antikörper und Erreger: Das lymphatische Gewebe

Erreger und ihre Toxine sind zumeist sehr klein im Verhältnis zu einer Zelle. Ihr Zusammentreffen mit den Zellen des Immunsystems wird aber nicht dem Zufall überlassen, sondern aktiv gefördert. Die Erreger werden aus Entzündungsherden durch spezialisierte Immunzellen in die (sekundären) lymphatischen Gewebe transportiert, zu denen man u.a. die Milz und die Lymphknoten zählt. B-Zellen und andere Leukozyten zirkulieren kontinuierlich durch diese Gewebe, transportiert von der Lympheflüssigkeit. Wenn eine zirkulierende B-Zelle dort den Erreger schwach erkennt, wird sie aktiviert und der Evolutionsprozess eingeleitet. Dieser Prozess findet in speziellen Bereichen der lymphatischen Organe statt, den Keimzentren. Im Verlauf einer Immunantwort entstehen Hunderte dieser Keimzentren. Im Verlauf der Keimzentrumsreaktion (Abb. 1) expandiert und mutiert die aussortierte B-Zelle. Bereits zwei Wochen nach dem ersten Kontakt mit dem Erreger weisen viele Keimzentren eine große

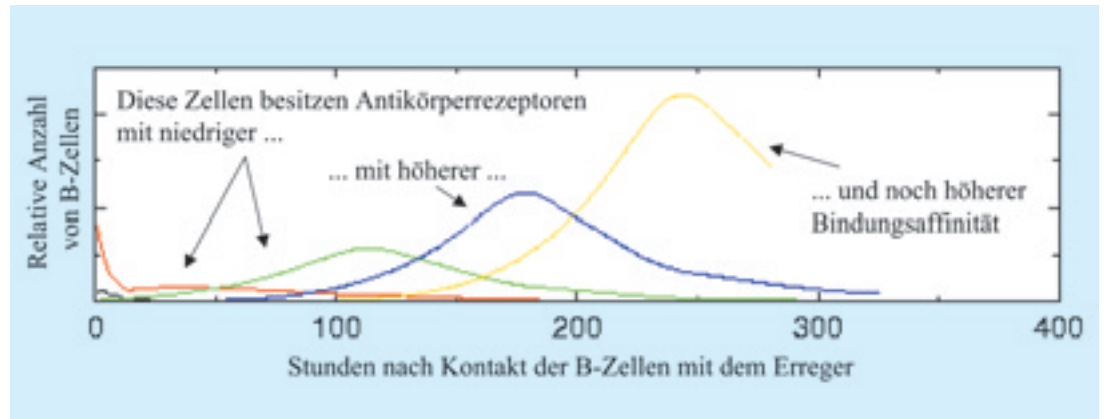


Abb. 3
Computersimulation der Selektion von B-Zellen während einer Keimzentrumsreaktion
 Jede Kurve entspricht der Anzahl der Zellen, deren Antikörperrezeptoren eine bestimmte Bindungsaffinität zum Erreger besitzen. Je höher die Affinität, desto besser »passt« der Antikörper zum Erreger. Die Berechnung wurde so gemacht, dass die Zellen um die Bindung an den Erreger im Keimzentrum konkurrieren müssen um zu überleben. Sobald durch Mutationen zufällig Zellen mit einem »besser passenden« Antikörperrezeptor entstehen, gewinnen diese den Wettbewerb um Bindungsplätze an der Erregeroberfläche, vermehren sich und setzen sich durch. Dabei sterben die Zellen mit »weniger passendem« Antikörperrezeptor, da diese keine Chance mehr haben, an den Erreger zu binden – ihre Anzahl sinkt wieder. Am Ende bleiben nur Zellen mit hoher Bindungsaffinität.
 (Grafik: M. Or-Guil, E. Ferretti-Manffra)

Bandbreite an B-Zellen mit geeigneten, neu generierten und im Vergleich zur Ursprungszelle leicht abgewandelten Antikörpermolekülen auf. Wie kommt es zu dieser Ansammlung von B-Zellen mit »guten« Bindungseigenschaften für den Erreger? Und welchem Schicksal erliegen die Zellen, die ihre Bindungsfähigkeit eingeübt haben?

Die Antwort ist: positive und negative Selektion. Obwohl die Dynamik und der präzise Ablauf dieses Selektionsprozesses bis zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht gänzlich aufgeklärt werden konnten, hat sich eine generell akzeptierte Vorstellung etabliert. Das Grundprinzip beruht darauf, dass alle Keimzentrums-B-Zellen Überlebenssignale benötigen. In den Keimzentren wird den B-Zellen der Erreger von follikulären dendritischen Zellen (FDC) präsentiert, die ein dichtes Netzwerk ausbilden (Abb. 2). B-Zellen, die Antikörpermoleküle mit guten Bindungseigenschaften produzieren, können an das Antigen binden und erhalten daraufhin das so wichtige Überlebenssignal. Man spricht

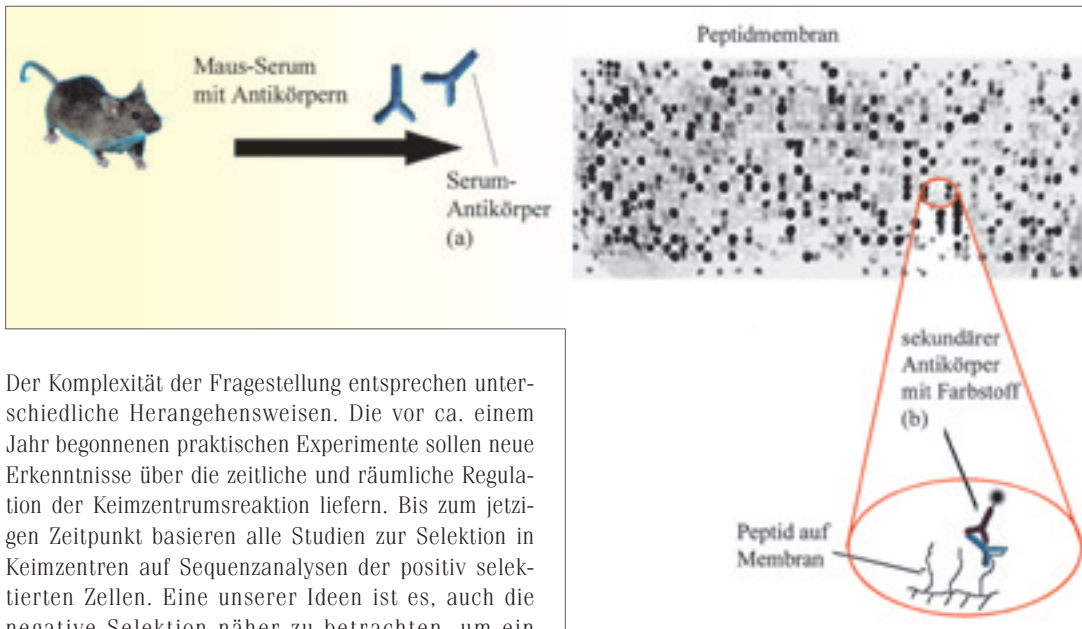
in diesem Fall von positiver Selektion. Die Zellen, die ihre Bindungsfähigkeit eingeübt haben und somit kein Überlebenssignal erhalten, werden dagegen negativ selektiert und sterben.

Ein Teil der positiv selektierten B-Zellen, die so genannten Plasmazellen, beginnt mit der Produktion und Ausschüttung von Antikörpern. Der andere Teil reift zu so genannten Gedächtniszellen heran, die im Falle einer zweiten Ansteckung mit dem selben Erreger sofort rekrutiert bzw. aktiviert werden. Im Zusammenspiel mit weiteren Zellen des Immunsystems leiten Gedächtniszellen eine schnelle und effektive Antwort auf den zweiten Erregerkontakt ein. Die Wirksamkeit von Impfungen basiert auf dieser Eigenschaft von Gedächtniszellen.

Viele Teilaspekte der Keimzentrumsreaktion sind noch nicht verstanden und es bleiben viele offene Fragen. Mit welcher Wahrscheinlichkeit erzeugen zufällige Mutationen besser bindende Antikörper? Wie viele der positiv selektierten Mutationen sind wirklich für die Erhöhung der Bindungseigenschaft unverzichtbar? Wie sieht die den Mutationen entsprechende Fitnesslandschaft aus? Wie viele Selektionsschritte durchläuft eine Zelle, ehe sie zur Plasmazelle wird? Konkurrieren die B-Zellen untereinander um Erregerbindungsplätze?

Forschungsthema Keimzentrum

Die Nachwuchsgruppe hat sich zum Ziel gesetzt, insbesondere zu einem besseren Verständnis des im Keimzentrum stattfindenden Selektionsprozesses und dessen Dynamik beizutragen. Die Erforschung der einzelnen Prinzipien und deren Zusammenspiel sollen nicht nur dazu beitragen, das Verständnis von Immunantworten zu verbessern, sondern auch helfen, den Weg zur *in vitro* Produktion von neuen Antikörpern zu ebnen. Auf diesem Wege soll ein Beitrag zur Entwicklung medizinischer Wirkstoffe geleistet werden.



Der Komplexität der Fragestellung entsprechen unterschiedliche Herangehensweisen. Die vor ca. einem Jahr begonnenen praktischen Experimente sollen neue Erkenntnisse über die zeitliche und räumliche Regulation der Keimzentrumsreaktion liefern. Bis zum jetzigen Zeitpunkt basieren alle Studien zur Selektion in Keimzentren auf Sequenzanalysen der positiv selektierten Zellen. Eine unserer Ideen ist es, auch die negative Selektion näher zu betrachten, um ein Gesamtbild zu erhalten. Zur Lösung dieser Fragestellungen wenden wir u.a. Techniken wie immunohistologische Färbungen, Licht- und Fluoreszenzmikroskopie, Laser-Mikrodissektion und Sequenzanalyse an. Um aber anhand der im Keimzentrum nachgewiesenen Sequenzen die Effektivität der Selektion zu untersuchen, werden Werkzeuge der Bioinformatik eingesetzt. Weiterhin bilden mathematische Modelle die Dynamik der Zellpopulationen nach, um damit Größen und Mechanismen, die sich der experimentellen Beobachtung entziehen, zugänglich zu machen. Abb. 3 zeigt ein Beispiel für ein solches Modell.

Forschungsthema Antikörper im Blutserum

Die in den Keimzentren produzierten Antikörper können bereits nach einigen Tagen im Blutserum nachgewiesen werden. Im Blutserum findet sich ein regelrechter Cocktail von Antikörpern. Während die meisten der neuen Antikörper zur Klasse der IgG gehören, sind die Antikörper, die bereits vor einem Kontakt mit Erregern vorhanden waren, meist von der Klasse der IgM. Diese Antikörper, die produziert werden, ohne dass der Kontakt mit einem spezifische Erreger ihre Synthese angeregt hat, werden natürliche Antikörper genannt. Natürliche Antikörper sind polyreaktiv, d.h. ein einzelnes Molekül kann unterschiedliche Proteinstrukturen erkennen. Unter anderem können natürliche Antikörper auch körpereigene Proteine erkennen.

Während die neuen Antikörper speziell für die Bekämpfung bereits in Erscheinung getretener Erreger produziert werden, ist die Funktion der natürlichen Antikörper weniger eindeutig. Da ist es dann interes-

Abb. 4

Das Serum, also die Blutflüssigkeit, von Mäusen enthält sehr viele unterschiedliche Typen und fünf Klassen von Antikörpern (a). Peptidmembrane enthalten bis zu Tausenden von verschiedenen Peptiden. Die Erkennung/Nicht-Erkennung (= Bindung/Nicht-Bindung) der Antikörper lässt sich mittels sekundärer Antikörper, die mit einem Farbstoff (b) markiert sind, detektieren. Durch statistische Analyse dieser Bindungsmuster lassen sich Unterschiede und Ähnlichkeiten der Immunsysteme der einzelnen Mäuse und Mäusestämme untersuchen. (Grafik: N. Bruni; Foto o.l.: European Molecular Biology Laboratory)

sant zu untersuchen, was für Proteine dieser Antikörpercocktail überhaupt binden kann, und mit welcher Bindungsaffinität.

Dafür hätte man gerne möglichst viele Daten, getrennt nach Antikörperklassen, über die Erkennung möglichst vieler Proteine. Dazu bietet sich die Erstellung von Proteinbibliotheken an. Statt aber Bibliotheken von ganzen Erreger- oder Körperproteinen herzustellen, kann man deren Stellvertreter erzeugen: Da die Hüllen von Erregern oft aus Proteinen, also gefalteten Aminosäureketten bestehen, werden Teile dieser Ketten bestimmt, die am nächsten an der Oberfläche liegen, und diese werden dann künstlich synthetisiert. Kurze Aminosäureketten heißen Peptide, und Peptidbibliotheken können relativ leicht in großer Anzahl hergestellt werden. Diese Peptidbibliotheken lassen sich dann nutzen, um die Erkennungsfähigkeit der Antikörper in unterschiedlichen Seren zu testen. Die Methode ist in Abb. 4 illustriert.



Dr. Michal Or-Guil

Studium der Physik an der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster. 1997 Promotion über Elementare Anregungen und ihre Wechselwirkungen in Reaktions-Diffusions-Modellen an der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster; Postdoktorandin am Max-Planck-Institut für Physik komplexer Systeme in Dresden (1997–2002); Auslandsaufenthalte an der Universität São Paulo, Brasilien, und in den USA. Seit März 2002 Nachwuchsgruppenleiterin an der Humboldt-Universität zu Berlin.

Kontakt

Humboldt-Universität zu Berlin
 Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät I
 Institut für Biologie
 Fachinstitut für Theoretische Biologie
 D-10115 Berlin
 Tel.: +49 30 2093-9105
 Fax: +49 30 2093-8801
 E-Mail: m.orguil@biologie.hu-berlin.de



Die Nachwuchsgruppe »Theoretische Immunologie«

u.v.l.: Nicole Bruni, Nicole Wittenbrink, Michal Or-Guil;
 o.v.l.: Fabio Luciani, Victor Tapia

Mitglieder der Nachwuchsgruppe »Theoretische Immunologie«

- Dr. Michal Or-Guil* (Leiterin)
- Dipl.-Ing. Nicole Wittenbrink* (Untersuchungen am Keimzentrum von Mäusen: Experimente und Datenanalyse)
- Dipl.-Biol. Nicole Bruni* (Wechselwirkungen von Peptidbibliotheken, Seren und Antikörpern: Datenanalyse und mathematische Modelle)
- Dipl.-Phys. Fabio Luciani* (Mathematische Modelle zur Dynamik von Proteasomdegradation und Keimzentrumsdynamik)
- Victor Tapia* (Quantifizierung des Verfahrens für die Messung von Antikörperbindungen an Peptidbibliotheken)

Mittels statistischer Analyse lassen sich Zufallsschwankungen in den Messungen von Schwankungen in den Seren, die auf Unterschieden in der Erkennungsfähigkeit der Antikörper beruhen, die z.B. spezifisch für einen Mausstamm sind, trennen. Solche Unterschiede können durch den additiven Einfluss der jeweiligen genetischen Kodierung der Antikörper, Unterschiede in der Selektion der B-Zellen, die später das Zellrepertoire ausmachen werden, sowie Unterschiede in den Wechselwirkungen mit anderen Immunsystemzellen entstehen. Ein Ziel der Nachwuchsgruppe ist die Entwicklung einer Peptidbibliothek, mit der man die unterschiedlichen Erkennungsfähigkeiten schnell und einfach erfassen kann.

Die Arbeit der Nachwuchsgruppe

Somit beschäftigt sich die Nachwuchsgruppe mit der Evolution von Antikörpern während einer Immunantwort und der Wirkung und Quantifizierung von Serumseigenschaften. Dabei wird interdisziplinäre Arbeit groß geschrieben; die Gruppenmitglieder kommen aus unterschiedlichen Fachgebieten. Die Gruppe ist am Fachinstitut für Theoretische Biologie im Institut für Biologie angesiedelt. Enge Kooperationen bestehen in Berlin mit dem Deutschen Rheuma-Forschungszentrum, mit dem Institut für Medizinische Immunologie und dem Institut für Biochemie der Charité sowie mit der Universität Utrecht in den Niederlanden und dem Institut Gulbenkian in Portugal. Durch gemeinsame Anstrengung streben wir die Gewinnung neuer Einblicke in die Funktionsweise des Immunsystems an.

Internet

<http://itb.biologie.hu-berlin.de/research/or-guil-group.html>