

Molekularbiologie III für Bioinformatiker

Di 23.10.2001

Embryonalentwicklung

Bsp. Embryonalentwicklung der Maus (siehe Kopien)

Definitionen der der Lage:

Medial:	Links von der Mitte
Dorsal:	Rückenseite
Anterior:	Vorne
Posterior:	Hinten
Ventral:	Vorderseite
Lateral:	Rechts von der Mitte

Mausentwicklung:

Befruchtetes Ei:	Zona pellucida: Zellwand Mütterliche und väterliche Pronuclei Polkörperchen
2 Zellstadium	(1,5 Tage)
Monula (8 Zellen)	(2,5 Tage)
16 Zellstadium	(3 Tage)
Blastocyste:	Blastocoel (Zellflüssigkeit) Trophektoderm

Froschentwicklung:

Mittlere Blastula	(4000 Zellen 7 Std. alt)
Frühere Gastrula	(20000 Zellen , 9 Std. alt)
Blastocoel	
Späte Gastrula	(12 Std. alt)

Was wird aus den Keimblättern?

Endoderm:	Magen-Darm, Lunge , Leber
Mesoderm:	Muskel, Knochen, Bindegewebe, Gefäße, Urogenitalsystem
Ectoderm:	Haut, Nervensystem
Neurulation:	Entwicklung des Nervensystems aus dem Ectoderm → neuronale Platte → neuronales Rohr → neuronaler Kamm

Zelladhäsion

Mechanismen:

Zell-Zell-Adhäsion:

Def: Integrale Membranproteine stellen Verbindungen zwischen verschiedenen Zellen über einen homophilen oder heterophilen Bindungsmechanismus her.

Beispiel: Schwämmepopulation (erkennen Artsspezifität: keine Zellmischung), Froschgewebe (Zellen aggregieren gewebespezifisch = zellen können sich selbst erkennen)

Geschichte:

Chemoaffizitätstheorie: 1960

Modulationstheorie: 70'er es existieren 100 tausende Oberflächenmarker (modifizierbar) daher Gewebedifferenzierung. Erste Forschung Entdeckung erster Zelladhäsionsmoleküle.

Mit Hilfe mit Antikörpern Nachweis von Zell-Zell-Kontakte (monoklonale Antikörper)

Zell-Matrix-Adhäsion:

Def: Integrale Membranproteine binden heterophil an Moleküle der extrazellulären Matrix, wie Kollagene, Laminine oder Fibronectin.

Beispiele wo Adhäsionsmoleküle wirken:

- Zell-und Gewebearchitektur
- Proliferation:** Zellteilung
- Bewegung (Auswachsen von Axonen)
- Transendotheliale Migration (z.B. durch das Epithelien wachsen)
- Differenzierung zu Geweben
- Apoptose:** Zelltod, hiermit wird die Zelle in einen geordneten Zelltod überführt wird

Zelladhäsionsmoleküle (siehe Folien):

Diese vier Familien besitzen große molekulare Strukturen:

1. Cadherine:

Def.: Sind für die Zell-Zell-Kontakte im Epithel zuständig – (Cadherine an Cadherine)

brauchen Ca^{2+}

Lokalisation in der [Zonula adherens](#)*

*Als **Gürteldesmosom** (lat. Zonula adhaerens, eng. intermediate junction) bezeichnet man eine streifenförmige Hafte der Schlußleiste zwischen [Epithelzellen](#). Diese Zell-Zell Kontakte finden sich unterhalb der [Tight-junctions](#) und oberhalb der Desmosomen in allen Schlußleisten. Die Za verläuft im apikalen Bereich von [Epithelzellen](#) ringförmig um diese herum und dient dem terminalen Netzwerk

Aufbau:

- Aufrechterhaltung von Gewebestrukturen im adulten Organismus
- Rolle bei der Gewebeorganisation während der Embryonalentwicklung
- Regulation von Signaltransduktionswegen –Wg/Wnt-Signalweg

Verlust oder Mutation von Cadherin-Genen:

Progression in Richtung invasiver, maligner Phänotypen bei epithelalen Tumoren

An der Membran:

Innen sind die Catenine über alpha-Aktinin mit F-Aktin-Filamenten verbunden

Außen sind die Proteinstrukturen mit Ca^{2+} gebunden

Die differentielle Expression von Cadherinen reguliert die Prozesse in der Embryonalentwicklung

Folgende Strukturen: Ektoderm darunter die Neuralleisten-Zellen, um Neuralrohr.

2. Selektine:

Def.: vermitteln Interaktionen von Leukozyten mit Zellen des mikrovaskuläre Epithels während

- **entzündlicher Prozesse**
 - **Lymphozyten-Hom**
- a. drei Typen, enthalten Lectin, mit Zuckern
 - b. **L-Selektin** (Leukozyten), **E-Selektin**, **P-Selektin** (nicht in den Kopien)
 - c. Modell der Leukozyten-Rekrutierung aus dem peripheren Blut (siehe Kopien)

3. Ig CAMs:

Immunglobuline (Superfamilie); größte Gruppe, sind Ca unabhängig (größte Varianz in den Eigenschaften homophile, heterophile)

Funktion:

- a. beeinflussen eine Vielzahl biologischer Prozesse:
- b. Entwicklung des Nervensystems
- c. Vermittlung von Zell-Zell-Interaktionen bei der Immunantwort
- d. Tabelle über die Immunglobulin-Superfamilie (Ig-SF)

Das neurale Zelladhäsionsmolekül (NCAM)

Struktur:

- 5 Ig-ähnliche Domänen; 2FN Typ III repeats
- Isoformen von 180 kD, 140 kD and 120 kD
- Kann polysialyliert sein

Expression auf:

- Neuronen
- Astrocyten
- Oligodendroxyten
- Schwann-Zellen
- Immunsystem
- Muskelzellen

Funktionen:

- Adhäsion
- Axonales Wachstum
- Signaltransduktion

4. Integrine:

Hauptsächlich Matrixmoleküle (Extrazelluläre Matrix)
Ca²⁺/Mg²⁺ abhängig

Funktionen:

Zell-Matrix- und Zell-Zell-Adhäsion
Zell-Wanderung auf Matrix

- Proliferation, Apoptose und Differenzierung
- Gewebe-Bildung und Aufrechterhaltung
- Leukocyten-Wanderung aus den Blutgefäßen
- Wundheilung und Blutgerinnung
- Angiogenese (Entstehung von Blutgefäßen)
- Tumorgenese und Metastasierung

Aufbau von Integrinen: (Grafik)

Integrin-Liganden-Bindung führt zur Bildung fokaler Adhäsionen

Mitglieder der Integrinfamilie

(siehe Internet)

Aktivierung von Integrinen durch Inside-out-Signaling

1. Annäherung
2. Rollen
3. Aktivierung
4. feste Adhäsion
5. Transmigration ins Gewebe durch das Endothel der Blutgefäße

(siehe Folien)

Die extrazelluläre Matrix (ECM) (siehe Folie)

Vorkommen in verschiedenen, spezialisierten Formen:

- Bindegewebe
- Knorpel
- Sehnen, Bändern
- Knochen und Zähne
- Basalmembran

3. Vorlesung Viren (lat. Gift)

Claus Dobrinski:
<http://www.westaqua.de/viren.htm>

Allgemeine Eigenschaften:

- i. Protein / Genom: DNA {RNA} Nukleinsäure liegt je nach Virusart als Doppel- / Einzelstrang vor
- ii. keine Zellstruktur
- iii. kein eigener Stoffwechsel
- iv. Ausschliesslich von von lebenden Zellen repliziert

Größe: 25 nm (Picornaviren bis 250x350 nm Pockenviren.
Vergleich: Auflösungsvermögen des Lichtmikroskops: 300 nm
Bakterien: 500-50000 nm.

Aufbau:

- Viren sind Komplexe aus viruskodiertem Protein und Nukleinsäure
- einzelne Virusarten können zellkodierte Bestandteile mit sich tragen (Membranen, tRNA) mit sich tragen

Vermehrung:

- nur in lebenden Zellen
- Virus liefert Information in Form von Nukleinsäuren für einige wenige Proteine
- lebende Zelle liefert die restlichen Enzyme für den Proteinsyntheseapparat für die Strukturen, an denen die Syntheseschritte ablaufen

Zielgruppe:

- Pflanzen
- Bakterien → Bakteriophagen
- Tier/ Mensch →

Antibiotika:

- unempfindlich
- durch Interferon und andere Chemotherapeutika hemmbar

Viren Morphologie

- a. **nacktes ikosaedrisches** Nukleokapsid: Kapsomere, Nukleinsäure
- b. **nacktes helikales** Nukleokapsid: Kapsomere, Nukleinsäure
- c. **behülltes, ikosaedrisches** Nukleokapsid: Lipidhülle Glykoproteine, Kapsomere, Nukleinsäure
- d. **behülltes, helikales** Nukleokapsid: Lipidhülle Glykoproteine, Kapsomere, Nukleinsäure

Virusreplikation:

Es laufen folgende **Schritte bei der Virusreplikation** ab:

1. Absorption: des Virus an spez. Rezeptoren an der Zelloberfläche
2. Eindringen: des Virus & intrazelluläre Freisetzung der Nukleinsäure
3. Vermehrung: der viralen Komponenten.
viruskodierte Synthese von Kapsid- und Nichtkapsidenproteinen
4. Replikation: der Nukleinsäure durch virale oder zelluläre Enzyme
5. Zusammenbau: von replizierter Nukleinsäure und neuem Kapsidprotein
6. Freisetzung: der Virusnachkommenschaft aus der Zelle

Replikation des Virusgenoms:

Virus * RNA → m.RNA → +-RNA
m.RNA → Protein

- viruseigene Polymerase wandelt eigene DNA Sequenz in einen zellkonformen DNA Codon-Strang um
- benötigt um eine nRNA Sequenz in eine mRNA Polymerase (durch reverse Transkriptase) umzuwandeln (bringt jedes Virus mit, um die aus dem Anticodon einen Codon zu erstellen)

Viren Systematik:

Nukl,-Seq.	NukleoKapsidsymmetrie	Hülle	Virusdurchmesser	ss/ds Polarität	Familie Genes	R(D)NA
------------	-----------------------	-------	------------------	-----------------	---------------	--------

Interferon:

Sie sind speziesspezifische Glycoproteine, die von vielen menschl. /tierischen Zellen im Rahmen der unspezifischen Immunantwort gebildet werden.

Bsp. Der Botenstoff gamma-Interferon, der zur Gruppe der Cytokine gehört, hat die Aufgabe, an der Immunreaktion beteiligte Zellen zu aktivieren und an den Ort der Verletzung oder Infektion zu rufen.

Es werden **drei Typen** unterschieden:

- Leukozyteninterferon = IFN alpha antiviral
- Fibroblasteninterferon = IFn beta antiviral
- Immuninterferon = IFN gamma immunregulatorisch

Wirkung von Interferon:

1. **antiviral**
2. **zellteilungshemmend** für normale / maligne Zellen
3. **immunmodulatorisch** Stimulation / Suppression (Antikörper-Produktion, zellulären Oberflächen Antigenen, T-Lymphozyten-, NK-Zellfunktion)

Interferoninduzierender Substanzen:

1. ds RNA
 2. synth. / nat. Polynucleotide
 3. niedermolekulare Verbindungen
 4. Viren
- Die induzierenden Substanzen bewirken in der 1. Zelle:
 - a. Deprimierung des Interleukingens
 - b. Produktion von Interleukinorstufen
 - c. Glycosylierung von Interleukin & dessen Abgabe in die Umgebung.
 - Das freigesetzte Interferon bewirkt in der 2. Zelle:
 - a. WW mit dem membranständigen Interferonrezeptor
 - b. Deprimierung von Genen & Synthese von virushemmenden Proteinen
 - c. Interferonwirkung: Es werden antivirale Proteine synthetisiert.

Poliomyelitis (beispiel für Infektion die mit Interferonen bekämpft werden kann)

→ Picorna-Viren vor allem Entero-Viren (Strukturmerkmale)

NS → Einzelstrang * RNA + /Linearer-Form
Kapsid → Rosaeder
Hülle → keine

Epidemiologie Weltweit: 3 Serotypen Typ I – III

Epidemie:	85 %	Typ I
	3 %	Typ II
	Selten	Typ III

Infektionsmodus: ORAL / FÄKAL (ca. $8 \cdot 10^5$ / Jahr pro Jahr)

- in Entwicklungsländern wenige Infektionen:

- Immunglobuline werden über die Muttermilch auf die Nachkommen übertragen

- diese postresistent

- **Pathogenese:** 98-99% sind subklinisch

- Virus Kontakt / Vermehrung: Oropharynx (Mundhöhle) → Hämatogene Verbreitung
→ ins ZNS vor allem Motoneurone
→ es kommt zur Paralyse

- **Verlaufsform:** Stadien: inapparente → abortive → aparyalytische / zeitweilig meningitische → paralytische

Tumoren

Def.: Geschwüst eine strukturell und funktionell abnorme Wucherung. Sie ist autonom und Gesamtorganismus.

Tumorentstehung:

Erbanlagen	Karzinogene
Umweltfaktoren	Strahlung
Virustheorie	Karzinogenese

Notreparatur der DNA

Tod der Zelle

Reparaturfähig :
- Rekombination (Ausschneidereparatur)
- Exzisionsreparatur (weitere)

Reparaturmechanismen

- Mutation

Krebsvorstufe

Mehrstufenkanzerogenese

1. **Initiation**
 - a. irreversible Genomveränderungen
 - b. Summationswirkung
2. Latenzperiode – Kofaktoren (es muss kein Tumor entstehen)
3. Tumormanifestation: wenn Tumor mit Auge sichtbar zu spät

Einleitung der Geschwülste:

1. nach **Histogenese**: Ist eine die historische Gewebeerwicklung im Organismus
2. epitheliale Blastome
3. mesenchymale Blastome
4. Tumore des pigmentbildenden Gewebes (Melanome)
5. Tumore des Neuroektoderms
6. Mischgeschwülste (Teratome): nicht bösartig, können sich zurückbilden auf einem unterschiedlichen Entwicklungspunkt

Die Benennung der Geschwülste

Name des Ausgangsgewebes + Endung – blastom oder –om

Karzinome (Mama Adenokarzinom)

Sarkome: Bindegewebe

Leukämien und Lymphome: Knochenmark und Leukozyten oder Lymphknoten

benige und maligne Melanome: Unterscheidung zw. gutartig oder bösartig

benigne Tumore	maligne Tumore
langsames Wachstum	schnelles Wachstum
gut begrenzt	schlecht begrenzt
es kann zur Spontanheilungen kommen	Metastasierung
kann in maligne Form übergehen	

Metastasierung

Lymphogene

Hämatogene

Kanikuläre

Implantationsmetastasierung:

Zusammenfassung

1. Ursache von Krebs sind akkumulierende genetische Veränderungen
- durch Punktmutationen und Translokationen in Chromosomen
- die spezifische Gene bzw. Genprodukte betreffen
- und durch epigenetische Vorgänge begleitet sind
2. betroffen sind vor allem Mechanismen
- der Wachstumsregulation
- der Differenzierung und DNA-Reparatur
- der Kommunikation mit der Umgebung
3. Die Veränderungen bewirken autonomes Verhalten durch

- konstitutive Signalanschlaltung bzw. erhöhte Sensivität
- Verlust der Kontrollmechanismen

Oncogenese

Def.: Pathologische Veränderung des Genoms
Prozess der malignen Entartung
Veränderte Genprodukte und Biologie der entarteten Zelle

Ursachen und Folgen genetischer Veränderungen in der Entwicklung maligner Tumoren

Pathologische Veränderungen des Genoms

- Punktmutation (evolutionärer Anteil, wie flexibel inwieweit Änderungen möglich), Carcinogene
- Gentraslokation (verschiebungen innerhalb des Genoms), Retroviren (Vererbung von Retroviren)
- genetische Prädisposition
- experimentelle Definition von Oncogenen und Tumorspressorengen

natürliche Punktmutationen

somatische Mutationen, - treten sehr selten auf ... da doppelsträngige DNA dadurch effektive Reparaturmechanismen.

Basenaustausch (transition, Transversion) Deletion, Insertion

Folgen: silent mutation, missense, nonsense

Änderung der Basenzahl
Deletion, Insertion

Folgen: frame shift, stopp codons

1. Verlust von Purinbasen ... 500/cell*d
2. Desaminierung C → U 500/cell*d häufig in ^{Me}CpG → C:G → T:A
3. Polymerasefehler: 1/2000 bis 1/10000 → G:C ↔ A:T
4. O-Radikale
5. Strahlung

Chemische Karzinogene:

1. Polycyclische Kohlenwasserstoffe (Autoabgase, Kaffe usw.)
2. Aromatische Amine (Teer)
3. Nitrosamine
4. A(spergillus)-fla(vus)-Toxine (Schimmelpilze)
5. Metalle Cadmium, Beryllium, Kobalt

Probleme im Organismus im Umgang mit den Karzinogenen:

1. Aktivierung durch P450 Monooxygenasen
2. Unzureichende Entgiftung
3. elektrophile Addition
4. Interkallierende Adukte
5. Kleine Alkylantien

Oncogene ras

tumorsuppressorgene

p53 (missense Mutationen = AS Substitutionen), APC, MCC,DCC,NF-1, WT-1, RB, BRCA-1, nm23, CDK-4 inhibitor

DNA Reparatursysteme

1. Direkte Revision
2. Basenrezision
3. Nukleotiderezision
4. Methylgesteuerte Mismatch-Rep.
 Fehlpaarung, kleinere Insertionen
 - hemimethylierte DNA
 - hMSH2 bindet Mutation
 - h MLH Reparaturkomplex
 - Endonukleasen
 - Helikasen
 - Exonukleasen
 - Polymerasen, Ligasen

5. Rekombination

- Strangenaustausch mit nicht betroffenen Allel direkt nach der Replikation

Oncogene Retroviren Bsp.

- **Rous-Sarcoma Virus (Huhn)**
 - Tumorinduktion durch einen filtrierbaren Faktor aus Sarkomhomogenat
 - Identifizierung als Retrovirus (Oncorna-Virus)
 - Virus enthält ein transformierendes Gen
 - ein homologes Gen ist auch im Wirtsgenom vorhanden
 - 5'-LTR- GAG- POL-ENV-LTR-3'
- **RNA-Viren mit reverser Transkriptase**
- **Integration ins Wirtsgenom über LTR**
- **Oncorna-Viren**
 - chronisch transformierend
 - akut transformierend
 - transregulierend

Humane Tumoviren (s. a. Folienkopien)

Virusfamilie	Bsp. human Typ	Tumor	genom. Integration	Mechanismen
RNA-Viren				
Retro	HTLV-1 HTLV-2			
DNA	HBV			
Hepadna	HPV			
Papillom a-				
Polyom a-				
Adeno-				
Herpes				

Oncogene & Tumorsuppressorgene

Multiple Mutation an vielen beliebigen Stellen oder an wenigen Schlüsselstellen?

- Transformierende DNA aus Tumoren und Viren
- Punktmutationen in Hotspots
- Chromosomale Translokation in der Umgebung spezifischer Gene

Spezifische zelluläre Gene sind kritisch verknüpft mit der Oncogenese

- Funktions-Gewinn bzw. Verstärkung insb. durch Einfluss falscher Regulationsmechanismen nach Translocation; dominant → Oncogene
- Funktions-Verlust insb. durch somatische Punktmutation & vererbte Prädisposition; rezessiv → Tumorsuppressorgene

Signaltransduktion über RAS (Darstellung als Zyklus)

Veränderungen der Chromosomenzahl

Apoptose

Apoptose ist der Mechanismus, der zum programmierten Zelltod führt und damit zu einer gesteuerten Selbstzerstörung (Selbstmord) von Zellen. Apoptose ist ein aktiver Prozess, d.h., die Zelle benötigt dafür E!
Apoptose ist das zelluläre Selbstmordprogramm.

Erstmals von Kerr, Wyllie & Currie (1972) beschrieben und deutlich von der Nekrose abgegrenzt.

siehe Folien zum Thema Apoptose/Nekrose. (Internet suchen nach Teilschritten)

Apoptose	Nekrose
Induktion durch physiologische Signale	Induktion durch Noxen (Chemikalien)
Untergang einzelner Zellen	Untergang ganzer Zellgruppen
kontrollierter Stoffwechselprozess	Verlust der zellulären Homeostase
energieabhängiger Prozess	energieunabhängiger Prozess

Apoptose	Nekrose
aktiver Prozess (mit Proteinbiosynthese)	passiver Prozess (ohne ~)
Zellmembran intakt	Zellmembran wird durchlässig
Zellschrumpfung	Zellschwellung / Zellyse
intakte Lysosomen	Freisetzung lysosomaler Enzyme
keine inflammatorische Reaktion	heftige inflammatorische Reaktion
Phagocytose durch Nachbarzellen und Macrophagen	Phagozytose u.a. durch Entzündungszellen (Granulocyten und Makrophagen)
internukleosomale DNA-Fragmentierung	randomisierte DNA-Fragmentierung

Induktionsphase: bekommt Todessignal:

1. Entzug von Wachstumsfaktoren
2. Hormonen
3. Zell-Zell-Kontakten
4. Aktivierung von Todesrezeptoren
5. DNA-Schädigung
6. Stoffwechsel- oder Zellzyklusstörungen
7. zytotoxische T-Zellen

Exekutionsphase:

Endphase:

Morphologie der Zelle während der Apoptose

- verliert Kontakt zu Nachbarzellen
- Veränderung der Phospholipidkomposition der Zellmembran: Phosphatidylserin von der Innen- zur Außenseite (->Phagocytose), Zellmembran bleibt intakt
- „membrane blebbing“: bläschenartige Ausstülpungen der Plasmamembran
- Zellvolumen nimmt stark ab, wegen Wasser- und Ionenverlust, Dichte der Zelle nimmt zu
- Zellorganellen bleiben intakt (insbes. Mitochondrien, aktiver Prozess!)
- Verdichtung der Chromatinstruktur
- Spaltung der DNA durch Endonukleasen
- „apoptotic bodies“: Abschnürung membranumschlossener Vesikel, die Membranbestandteile enthalten
- Phagocytose der „apoptotic bodies“ durch Makrophagen oder durch Nachbarzellen

Möglichkeiten der Apoptoseerkennung:

Morphologische Eigenschaften von Zellen in Apoptose:

1. DNA Fragmentierung
2. Große Aktivität von Proteasen
3. Störungen in der Zellmembran
4. Veränderung der Mitochondrienaktivität

Definition der Caspasen (Cysteinylnaspartasen typ. Motiv DXXD):

- drei Caspasen-Familien beim Menschen
- Casp-8 MACH FLICE Mch5
- Casp-9 ICE-LAP6, Mch6
- Casp-3 CPP32, apopain, Yama

The Bcl-2 Family
Anti-Apoptotic Bcl-2
Pro-Apoptotic Bax

AIF	Apoptosis-inducing factor
Apaf-1	Apoptotic protease-activating factor-1
CARD	Caspase recruitment domains
DD	Death domain
DED	Death effector domain
DISC	Death inducing signalling complex
FADD	Fas associated death domain protein
FLICE	Caspase 8 (FADD-like ICE)
FLIP	FLICE-inhibitory protein
MORT1	Mediator of receptor induced toxicity

RIP	Receptor-interacting protein
ROS	Reactive oxygen species
SODD	Silencer of death domain
TNF	Tumor necrosis factor
TRAAD	TNF-R1-associated death domain protein
TUNEL	Terminal Dioxiribosyl-transferase mediated dUTP Nick End Labeling (DNA Fragmentation)

Zellzyklus

Caspasen (Cysteinyl-Aspartasen)

- enthalten Cystein im aktiven Zentrum, spalten Substrate nach Aspartat (DXXDcut) in jeder Zelle vorhanden
- erst durch Signale aktiv (limitierte Proteolyse, d.h., durch zweimaliges Spalten entstehen eine große und eine kleine Untereinheit -> aktive Form: 2große und 2 kleine Untereinheiten, aktiviert bei Apoptose (?))

3 Gruppen:

Regulation inflammatorischer Prozesse

Initiatorcaspasen

- Weiterleitung apoptischen Signals, Aktivierung "ausführender" Caspasen (z. Bsp. Caspase 8 und 9)

Effektorcaspasen

- Spaltung zellulärer Proteine => verantwortlich für morphologische Veränderungen beim apoptischen Zelltod

Substrate

- DNA-Reparaturenzyme (PARP)
- DNasen (CAD)
- Kernhüllenproteine (Lamine)
- Cytoskelettproteine (Fodrin und Actin)

Phasen

bei frühen Zellen (Furchung): keine G1 und G2 Phase

- M: 1h
 - Mitose: Kernteilung und Zellteilung
- G1: 6-12h
 - RNA und Protein Synthese, DNA-Reparatur
 - Dauer bei Leberzellen bis zu einem Jahr
 - am Ende der Phase: Restriktionspunkt: nach Durchschreiten => zwangsläufig S-Phase
- S: 6-8h
 - DNA-Verdopplung, RNA und Protein-Synthese
- G2: 3-4h
 - RNA und Protein-Synthese

Cycline

- regulatorische Einheiten: nur in bestimmten Zellzyklus-Phasen vorhanden, schneller Abbau (<30 Minuten), sind entscheidend für den Übergang von Phasen (z.B. bei DNA-Schäden: p53 Aktivierung => p21 Translation => Inhibition Cyclin-Cdk-Komplex)

WICHTIG!

Die Kaskaden von: **p53 und Bax**; CD95/CD95L, Fas-L und APo-2L, TNF. (sollte man laut Dozenten kennen)

Vorlesung Molekularbiologie III VI Immunologie 11.12.2001

Claus Dobrinski, Selna Alijagic'

Ablauf der Immunreaktion

A Erkennungsphase

- AG im Körper phagozytiert, Epitope präsentiert (Bruchstücke der Oberflächenstrukturen des AG)
- T-Helferzelle aktiviert zusammen mit B-Lymphocyten, T-Killerzellen

B Differenzierungsphase

- a. starke Vermehrung von B-Lymphozyten (Plasmazellen > Akt – Gedächtniszellen (wenige))
- b. Bildung von T-Unterdrückerzellen

C Wirkungsphase (Effektorphase)

- a. Antigen-Antikörper-Reaktion > Immunkomplexe (Präzipitate)
- b. Immunkomplexe aktivieren das Komplementsystem
 - Abbau von Fremdprotein
 - Stimulieren von phagoцитierenden Zellen
 - Chemotakt. Anlockung von Freßzellen

Agglutination: AK binden sich an AG – Bruchstücke, die aus körpereigenen Zellen herausragen > Verkleben, Verklumpen

	spezifische/adaptive Immunabwehr	unspezifische Immunabwehr
	erworben	angeboren
lösliche Faktoren:	Antikörper	- Lysozym (Tränenrüse) - Akutphasenproteine (APPs) zur Opsonisierung von Antigenen (CRP, Interferon) - Komplementsystem
zelluläre Faktoren:	T-Lymphozyten (zell vermittelt Teil) B-Zellen (humoraler Teil)	- Phagozyten (Makrophagen) - natürliche Killerzellen (NK-Zellen) - Haut, Blut-Hirn-Schranke
Zeitraum der Aktivierung:	langsam > 96 h	sofort 0-4 h NKs Phagozyten mittelfristig 4-96 h Cytokine, APP
Eigenschaften der Wirkungsweise:	1. Spezifität gegen bestimmte Antigene 2. Hohe Variabilität in den Erkennungsstrukturen (MHC-Komplex) 3. Immunologisches Gedächtnis 4. Selbst/Nichtselbst Erkennung Regulation der Immunabwehrreaktion klonale Selektion spezifischer Lymphocyten	1. anatomische Barrieren (Haut) Muköse Schranken (Schleim, Zilien) 2. physiologische B. (Temp. pH-Wert, chem. Mediatoren Lysozym, Interferon) 3. Zelluläre B. Endozyten, Monozyten, Makrophagen 4. Entzündungsinduzierte B. (Gewebeschäden mit entzündungshemmenden Serumproteinen, Chemotaxis)

Opsonisierung:

Die spontane Phagozytoseaktivität der Makrophagen ist relativ gering. Sie erhöht sich dramatisch nach der Bindung von bestimmten körpereigenen Substanzen an Fremdkörper.

Diese aktiviert Zellen mit Fc-Rezeptor:

- Makrophagen → IgG → Phagocytose
- NK-Zellen → IgG → Tötung virusinfizierter Zellen
- Mastzellen → IgE → Entzündungsverstärker

Komplementsystem:

Das Komplementsystem ist eine Gruppe von Serumproteinen, die konzentriert die Immunantwort und Entzündungsreaktion modulieren können.

Die Proteine der Komplementkaskade können über zwei Wege aktiviert werden, die als "klassisch" und "alternativ" bezeichnet werden.

Die Komplementaktivierung hat vier prinzipielle Folgen:

- a. Opsonisierung von Pathogenen
- b. Zerstörung von Pathogenen
- c. Anlocken weiterer Effektorzellen
- d. Veränderungen der Struktur des Gewebes

Der klassische Weg:

Der klassische Weg wird nach der Bildung eines Ag-Ak-Komplexes oder durch gebundene Lektine ausgelöst.

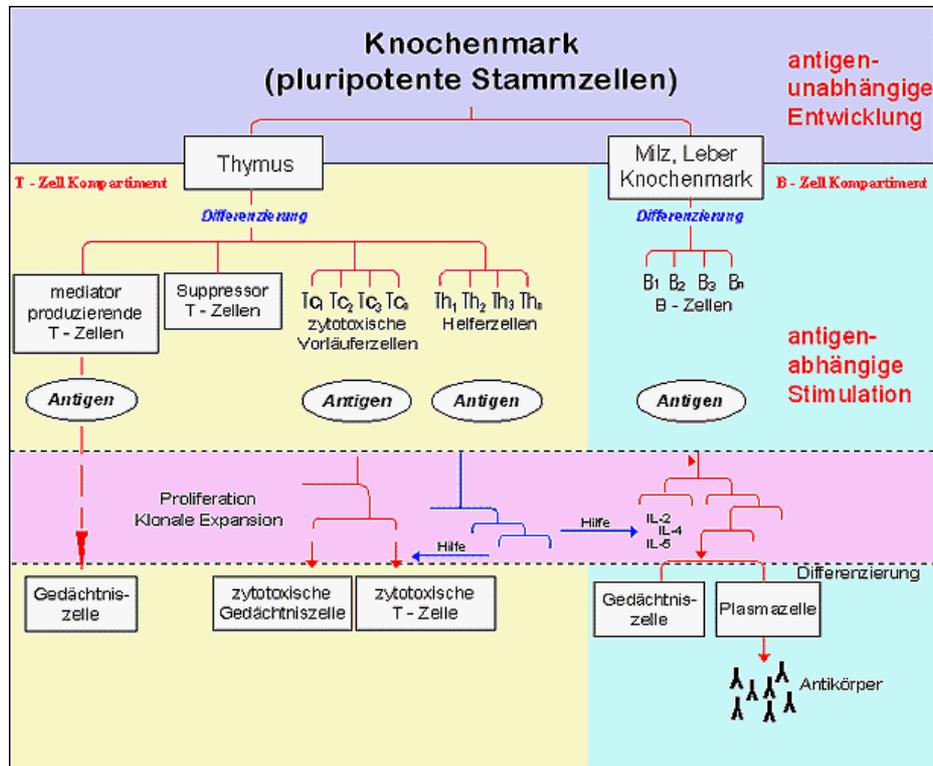
Die für die Phagozytose essentiellen Schritte sind die enzymatischen Prozesse C1 - C4 - C2 - C3 bis zur Spaltung des C3 und Anlagerung des C3b, eines starken Opsonins, für das phagozytische Zellen potente Rezeptoren tragen. Die restlichen Schritte stellen eigentlich nur noch passive Anlagerungsreaktionen ohne enzymatische Aktivität dar. Im letzten Schritt entsteht ein als "pore-forming complex" oder "membrane attack complex" bezeichneter makromolekularer Komplex (MAC), der in der Lage ist Zellmembranen zu durchdringen, damit das Ionengleichgewicht zu zerstören und letztlich den Zelluntergang auszulösen. Diese funktioniert offenbar nur bei zellwandfreien (unverkapselten) Bakterien, jedoch werden auch diese durch C3b opsoniert. Der C3a, C4a und C5a Komplex binden über Rezeptoren auch an Mastzellen und Basophile und leiten deren Granulation ein → Entzündungsverstärkung.

Der alternative Weg:

Der alternative Weg der Komplementaktivierung basiert auf dem spontanen Zerfall des C3 durch Hydrolyse. Nach Bindung der als B und D bezeichneten Plasmaproteine wird auch hier weiteres C3 gespalten und schließlich der MAC gebildet. Kritischer Punkt dieser Reaktion ist der Niederschlag des spontan zerfallenen C3 auf Zelloberflächen, der in Verbindung mit der B- und D-Bindung zu einer Stabilisierung der enzymatischen Aktivität führt. Menschliche Zellen verfügen auf ihrer Oberfläche über spezielle Proteasen, die den gebildeten Komplex wieder abbauen und die Zelle damit am Leben erhalten können.

Abb. zeigt die Hämatopoese (Lymphozyten entstehen alle aus pluripotenten Stammzellen aus dem Knochenmark)

Entwicklung und Stimulation der immunkompetenten Zellen. Pluripotente Stammzellen (Vorläuferzellen) wandern aus dem Knochenmark an ihre Reifungsorte, d.h. T-Vorläuferzellen wandern in den Thymus, B-Vorläuferzellen in die Milz oder die Leber. Dort entwickeln sie sich zu antigen-spezifischen T- bzw. B-Lymphozyten. T-Lymphozyten differenzieren dann weiter zu „Helferzellen“ (Th), Suppressorzellen (Ts) und Vorläufern von zytotoxischen T-Lymphozyten (Tc). Nach Kontakt mit einem Antigen proliferiert der dafür spezifische Klon (B- oder T-Zell Klon), wobei die „Helferzellen“ sowohl für die B- als auch die T-Zell-Reaktivität notwendig sind. T-Zellen differenzieren zu zytotoxischen Zellen, B-Zellen entweder zu antikörperproduzierenden Plasmazellen oder (einige) zu Gedächtniszellen, die bei erneutem Kontakt mit dem bekannten Antigen direkt zur Antikörperproduktion übergehen.

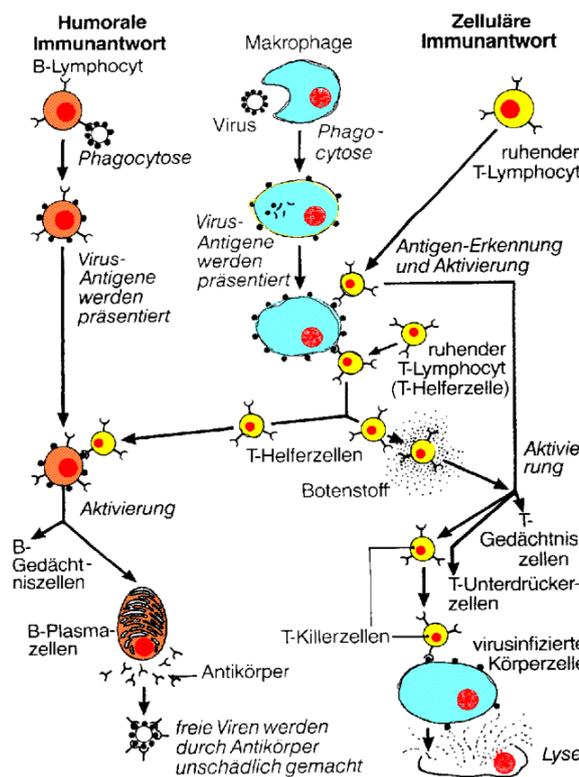


Lymphknoten & Lymphe

Blutplasma wird auf Grund des hohen Blutdrucks in Zellzwischenräume gedrückt (Makromoleküle passen nicht durch die Poren). Diese Flüssigkeit in den Zellzwischenräumen nennt man **Gewebsflüssigkeit** oder Lymphe.

Ein Teil der Lymphe wird in **Lymphgefäßen**, ein Drainagesystem, abgeleitet, und später dem Blut über Venen zurückgeführt. An den **Lymphknoten** sammeln sich große Leukozyten.

Abb. Spezifische/erworbene Immunantwort



Zelluläre und humorale Immunantwort

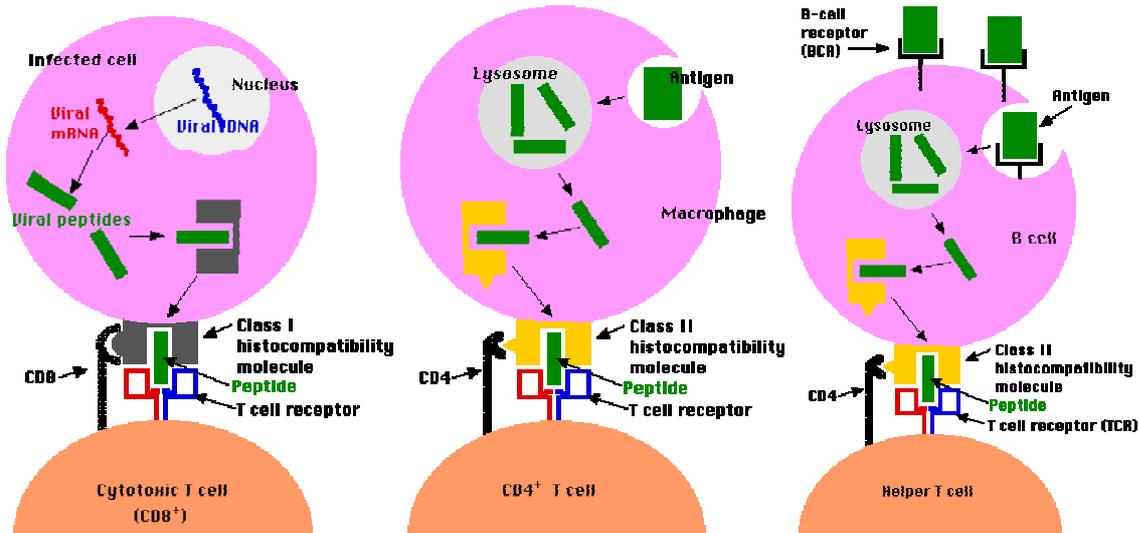


Abb. Antigenpräsentation durch MHC I & MHC II & B Cell

Je nachdem, ob ein Antigen zusammen mit einem MHC-I oder einem MHC-II Molekül exprimiert wird, ist die Antigenverarbeitung und die angesprochene T-Zelle unterschiedlich. Die Verarbeitung von Antigenen in kurze Peptide (9 Aminosäuren für MHC I, 7-20 Aminosäuren für MHC II), die dann an MHC-Moleküle binden können, findet in intrazellulären Organellen statt (Endosomen, Phagolysosomen, Proteasomen). Hierbei spielt die entstehende Aminosäuresequenz (2-3 Aminosäuren) eine erhebliche Rolle, ob das Peptid später an den MHC binden kann.

→ wichtige Rezeptoren/ Antigene:

MHC-I – CD8
MHC-II – CD4

Antigenprozessierung:

TAP-Transporter: Finden sich im Lumen der ER TAP-1 und TAP-2. Zum Cytosol zeigt die ATP-binding cassette (ABC) domain

<http://www.ukbf.fu-berlin.de/copharma/students/immuntox2/toc.htm>

Cytokin	Bildungsort	Wichtigste Wirkungen
Interleukine:		
IL-1	Makrophagen/T-Lymphocyten/Gliazellen	Aktivierung von B-Lymphocyten, Bildung von IL-2
IL-2	T-Lymphocyten	Proliferation von T-und B-Lymphocyten
IL3 = G-CSF/M-CSF/GM-CSF	Monocyten/Fibroblasten/T-zellen	Stimulation der Hämatopoiese
IL4 = B-Zell-Faktor	T-Lymphocyten	Differenzierung von B-Lymphocyten
IL5	T-Lymphocyten	B-Zell-Aktivierung
IL6 = Interferon β 2	Fibroblasten/Tumorzellen/Makrophagen	Synthese und Sekretion von Ig durch B-Zellen
IL7	Knochenmarkzellen	Proliferation von T-und B-Lymphocyten
Tumornekrosefaktor α (TNF α)	Makrophagen	Fieber, Knochenauflösung
Tumornekrosefaktor β (TNF β)	T-Zellen	Fieber, Knochenauflösung
α -Interferon (IFN α)	Leukocyten	Antivirale Wirkung; Wachstumshemmung; Induktion von MHC-I auf Lymphocyten
β - Interferon (IFN β)	Fibroblasten	Antivirale Wirkung; Wachstumshemmung
γ - Interferon (IFN γ)	T-Lymphocyten/Killerzellen	Aktivierung von Makrophagen; Induktion von MHC-II auf Makrophagen
Plättchenfaktor (PDGF)	Thrombocyten, Endothelzellen	Thrombocyten-Aggregation; mitogene Wirkung auf glatte Muskulatur. "Kompezenzfaktor"

Molekulare Analytik Vorlesung vom 22.1.2002

Differenzierung :
Komplexität jenseits der Gensequenz

Modulationsebenen Expression:

- Transkription
- RNA-Prozessierung
- Translation
- posttranslationale Modifikation

Sekundäre Genprodukte:

- Metaboliten
- Makromoleküle

Beobachtete Größen:

- m-RNA > cDNA
- Polypeptide
- funktionale Proteine
- subzelluläre Verteilung
- diverse „kleine“ Moleküle
- Glykane, Lipide

Ziele:

Beschreibung der molekularen Basis von Lebensvorgängen

- Welche Moleküle
- in welcher Beziehung stehen sie: Verknüpfungen in Netzwerken

biologische Phänomene (möglichst einfach & eindeutig)

Komplexe Gemische:

- Homogenisate mit einer Vielzahl von Komponenten
- Heterogenität innerhalb einer Komponente
- Artificielle Fragmentgemische durch Spaltung (Komplexe Mischung diverser Moleküle)

Vorliegende Hilfsmittel und Befunde:

- Sonden, substanz- oder gruppenspezifisch:
- cDNA, monoklonale AK, Lektine, Liganden

Vorbefunde:

- Literatur, Datenbanken

Resultat:

Identifizierung:

- einzelner Komponenten mit Korrelation zum biologischen Phänomen
- Phänomenspezifische Veränderung an den Komponenten der Komposition

Dokumentation

- Publikation
- Speicherung von Datenbanken
- Gewinnung spezifischer Sonden

Methodik:

Abbildung:

- Erstellung von Mustern (Fingerprinting)

Fraktionierung:

- Separierung und Anreicherung von Komponenten

Beschreibung:

- Bausteine, Sequenz, Struktur, physikal. und chem. Eigenschaften
- Identifizierung:

Beispiel: Proteomanalytik:

Frage: „Welche Proteine eines Zelltyps lassen sich nach maligner Transformation in veränderter Konzentration, in veränderter Form neu oder gar nicht mehr finden?“

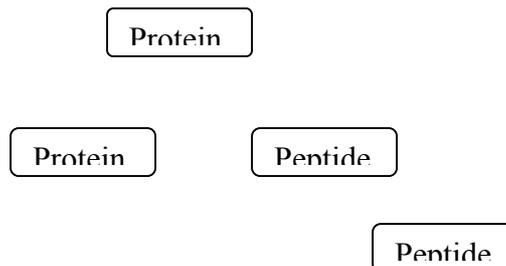
Methoden 2D-Elektrophorese

- Gewebehomogenat
- Solubilisierung in Harnstoff
- Isoelektrische Fokussierung
- Reduktion S—Alkylierung
- SDS-Solubilisierung
- SDS-PAGE
- Fixierung, Färbung
- Bildverarbeitung

Analyse von Spots in 2D-Gelen

Protein (intakt)

Aminosäuren



Sequenzierung

MALDI-MS
DNA- und Protein-Datenbank
PSD: Messung von Peptidfragmentmustern

Frage 2: Analyse von N-Glykanen

Frage: „Wie ist ein Glykoprotein mit Oligosacchariden substituiert?“

- positionen im Polypeptid
- Verteilung nach Ladung, Größe, Verzweigungen
- Besondere Strukturen (Verknüpfungen und Substituenten)
- Detailaufklärung einzelner Strukturen

Funktionen von N-Glykanen

Allgemeine

- Löslichkeit
- Ladung
- Proteinfaltung
- Stabilisierung
- Proteolyseschutz

Spezifische

- Antigenpezifität
- Antigenität
- Liganden

Biosynthese – potentielle Strukturen

Vektorielle Synthese

- RER: Übertragung eines Vorläufer-OS auf wachsende Peptidkette
- RER/Golgi: partieller Abbau der Vorläuferstruktur
- Golgi: Verlängerung und Verzweigung – Reifung

Begrenzte Strukturvielfalt

Regulation des Strukturspektrums durch differenzierte Expression der spezifischen Transferasen

N-Glycosylation

Structural epitopes I

-

Spezifität/ Heterogenität

Sekundäres Genprodukt

Spezifität

Organspezifität

Proteinspezifität

Peptidspezifität

Mikroheterogenität innerhalb jeder Glykosylierungsstelle etc.

Abhängigkeit von Stoffwechsellage

Sensitiv ggü. Toxinen

Systematik der N-Glykan-Analyse

Glykoprotein

Glykopeptid

N-Glykane

2AB-N-Glykane

Enzymatischer Abbau

Chromatographien

MALDI-TOF-MS

identifizierte einzelne 2AB-N-Glykane

1. Fraktionierung nach Ladung (Anionenaustausch HPLC)

2. Hydrophile HPLC

MALDI-TOF Massenspektroskopie

“Matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight”

- Die Matrix ist sauer
- Je kleiner desto schneller fliegen sie. 0,003 – 10000 (eine Masse ist ein Proton)
- Grafik: Massenspektroskopeter
- mögliche Fragmente im „Post-Source Decay (PSD)“
- alle Aminosäuren werden mit Variablen für ihre Masse gespeichert und aus den Sequenzstücken zusammengerechnet

Messen der molekularen Masse der desialysierte N-Glykane

[M+Na]⁺

Gesamtpool und Fraktionen

Zuordnung einer Summenformel/ Erstellung einer Datenbank

- HN_xHydHz (a priori keine Strukturinformation)

Strukturzuordnung aufgrund

- RT in <= 4 Chromatographen
- spez. Enzymverdau
- Muster mit Enzymarrays

Type of Fucosylation:

Application of specific Fucosidases

Bindungsstellen weiterer Lektine

- o RCA (Christpalme)
- o UEA (Stechginster)
- o LFA (Schnecke) alle Sialinsäuren

Methoden zur Detektion von Kohlenhydraten mittels spezifischer Antikörper oder Lektine

Info: Zucker bindende, vernetzende Proteine meist pflanzlicher Herkunft, aber auch MBP, werden als Lektine bezeichnet.

1. Western-Blot oder Lektin-Blot

Enzym (z.B. Peroxidase): Antikörper-Lektine

Laden der Proteinmischung mit SDS-Polyacrylamid-Gel → Elektrophorese

Elektrophoretischer Transfer → Nitrozellulose Membran

Inkubation mit Antikörper (klassisch) oder mit Lektin → Autoradiogramm, Fluorogramm, Farbreaktion

Vorteil: Identifizierung einzelner Proteine über die Größe

Nachteil: nur Proteine

2. „Fluorescence-activated Cell Scanning“ (FACS)

Analyse von Einzelzellsuspensionen

Bestimmung von Oberflächenantigenen (Marker)

Zugabe von fluoreszenzmarkierter Antikörper

Zellen passieren den Laser → Anregung der Fluoreszenz

Erfassung von zellulären Parametern wie Zell-Größe und Granularität

Methoden zur Veränderung der Struktur von Kohlenhydraten

1. Inhibition von Glycosyltransferasen im Golgi durch spezifische kompetitive Inhibitoren (Substratanaloga)
2. → Geringe Veränderung der Kohlenhydratstruktur, gut geeignet zur Untersuchung der Funktion spezifischer Zuckerstrukturen

Herstellung von Knock-Out-Mäusen der Glycosyltransferasen → Mäuse oft lebensfähig, Effekte in vivo zu beobachten

Transfektion embryonaler Stammzellen (ES-Zellen) mit dem Targetvektor

Methoden zur Veränderung der Struktur von Kohlenhydraten

3. Inhibition von Enzymen der N-Glycoan-Biosynthese durch natürliche Substratanaloga

