



IMMUNOLÓGIAI ÉS  
BIOTECHNOLÓGIAI  
INTÉZET



6. Praktikum: Organisation, Rekombination und Expressierung der Antigenrezeptorgene. Zentrale B- und T Zell-Differenzierungsprozesse

## Grundlagen der Immunologie

Universität Pécs, Klinisches Zentrum  
Institut für Immunologie und Biotechnologie  
Pécs, 2023.

Alle Blutzellen stammen von den **multipotenten hämatopoetischen Stammzellen** des Knochenmarks

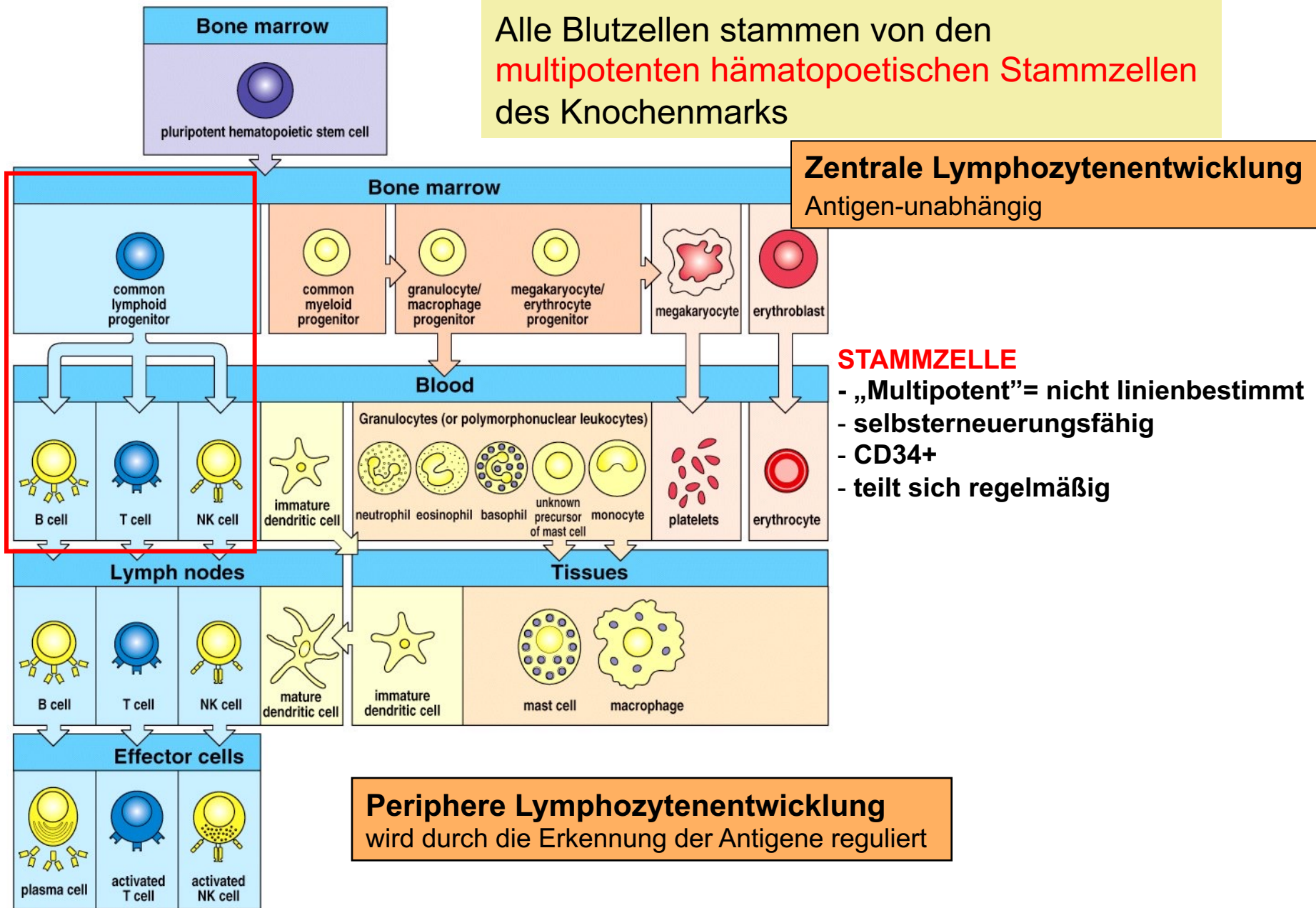


Figure 1-3 Immunobiology, 6/e. (© Garland Science 2005)

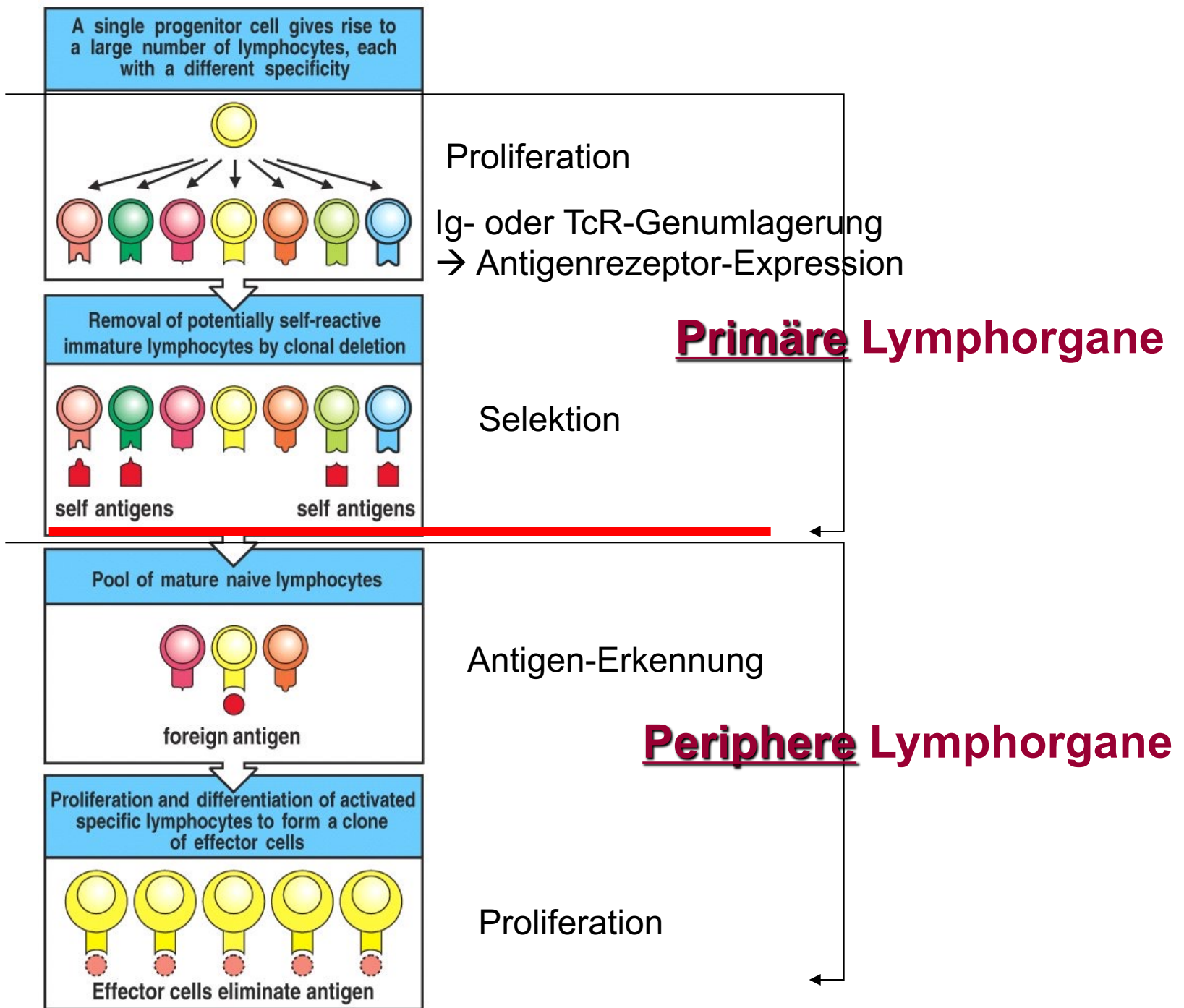
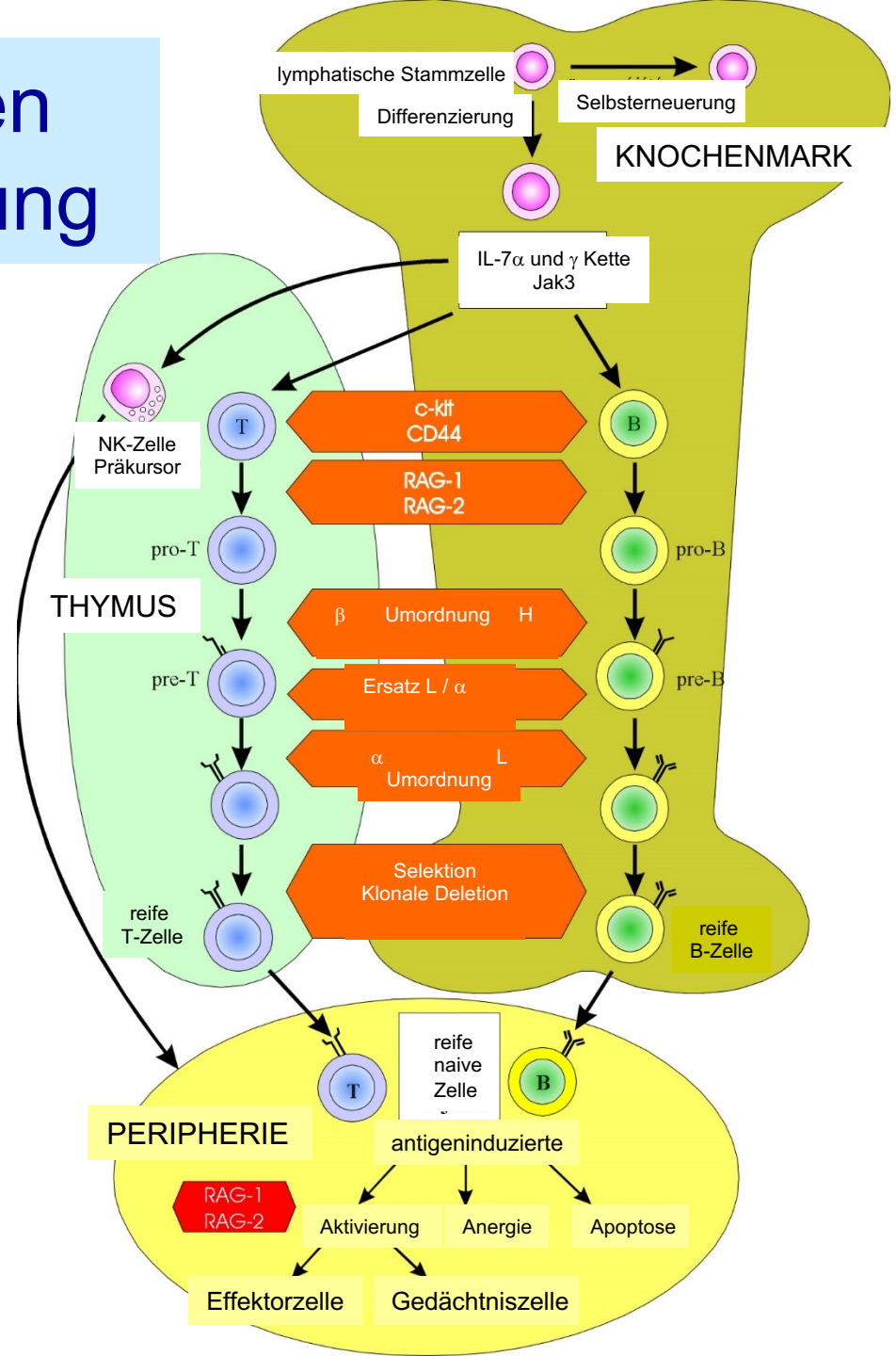


Figure 1-14 Immunobiology, 6/e. (© Garland Science 2005)

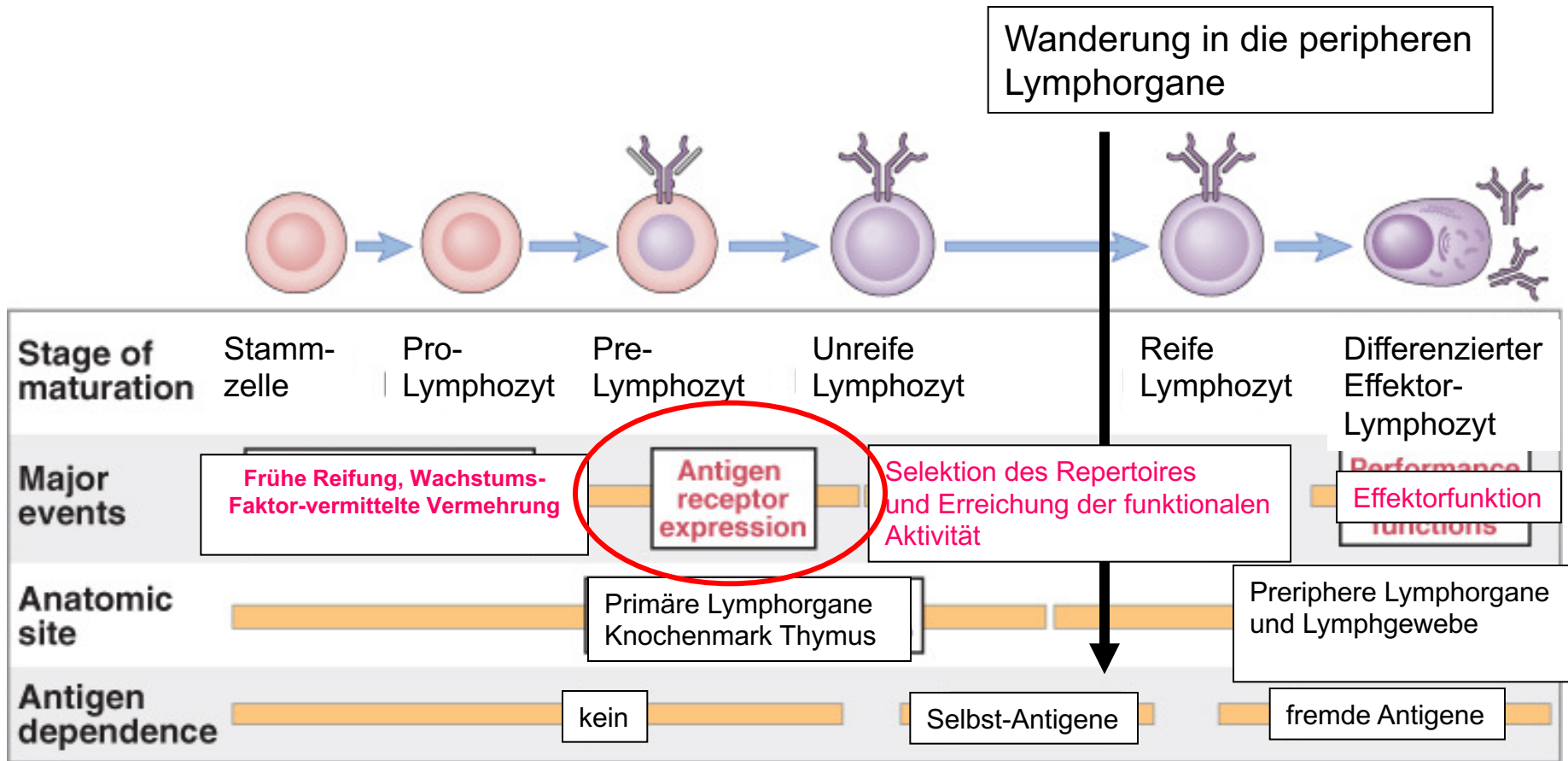
# Allgemeine Eigenschaften der zentrale Lymphozytendifferenzierung

1. **Proliferation**
2. **Rezeptor-Genumordnung**, Expressierung von funktionellen Antigenrezeptoren (Antikörpern) auf der Zelloberfläche
3. **Wanderung (Migration)** – *Knochenmarksstroma* (Adhäsion, Chemokinproduktion)
4. **Selektion** der potenziellen autoreaktiven Zellen
5. **Apoptose**

# Gleiche Eigenschaften der B- und T-Zell-Reifung



# Stadien der Lymphozytenreifung



# Ziel der Lymphozytenreifung

- Exprimierung von Antigenrezeptoren mit unterschiedlicher Spezifität
- Herausbildung des B- und **T-Zell-Repertoires** = Anzahl der Antigenerkennungsmoleküle:  **$10^9$ - $10^{11}$  BcR,  $10^{15}$ - $10^{16}$  TcR;**

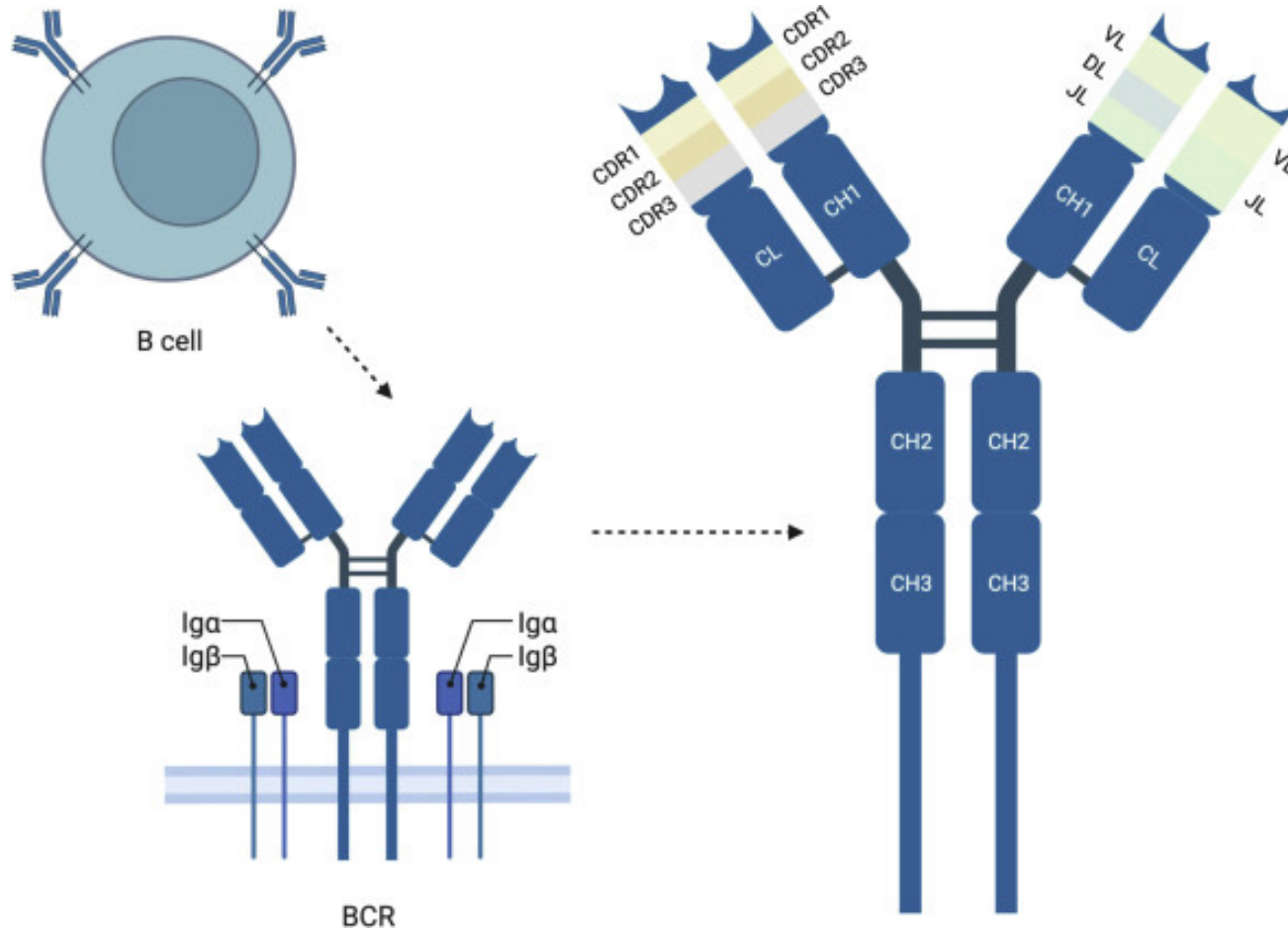
„Lymphozytenbildung = Handschuhfabrik“ – Jan Klein.

Das Immunsystem produziert viele verschiedene Antigenrezeptor-Moleküle im voraus, dann „wählt“ das Antigen den entsprechenden Rezeptor aus. Deshalb ist das Immunsystem auf alle möglichen Antigene vorbereitet.

Der genetische Hintergrund der B- und T-Zell-Rezeptorproduktion ist **die Umordnung der Immunglobulin- und T-Zell-Rezeptorgene in den Vorläuferzellen.**



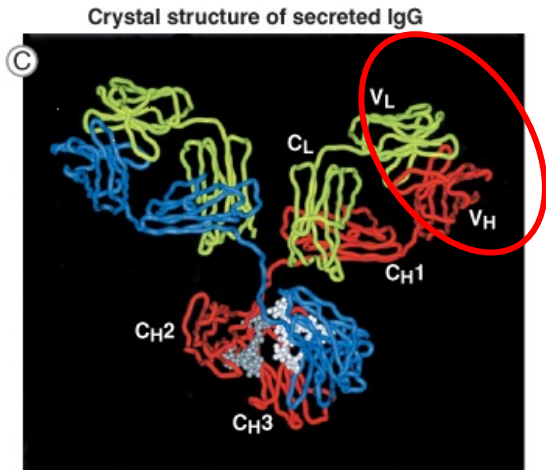
# B-Zell-Antigenrezeptor (BcR) = Zelloberflächen-Ig



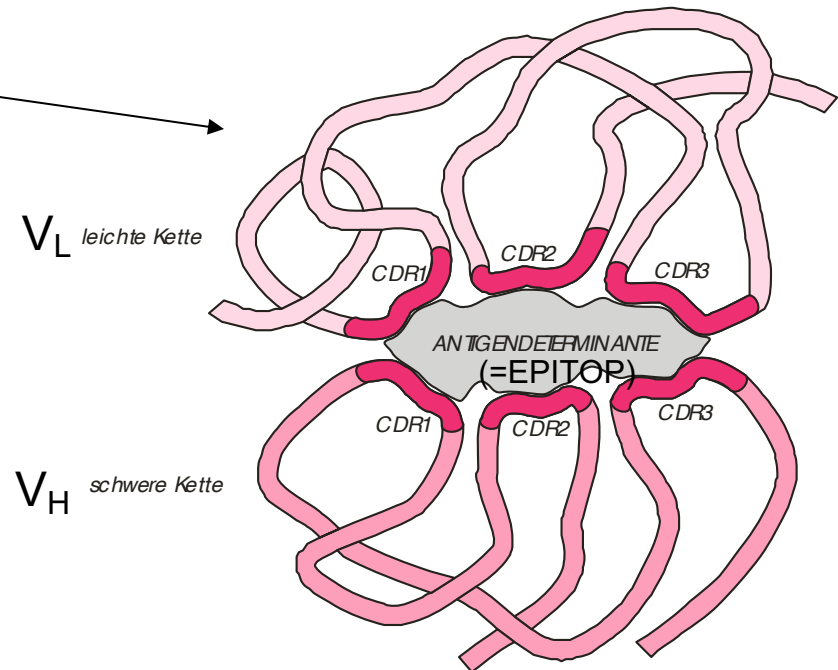
Jede einzelne B-Zelle kann ausschließlich Antikörper (BcR) einer einzigen Spezifität synthetisieren.



# Die Antigenbindungsstelle wird von den CDRs gebildet - Idiotyp



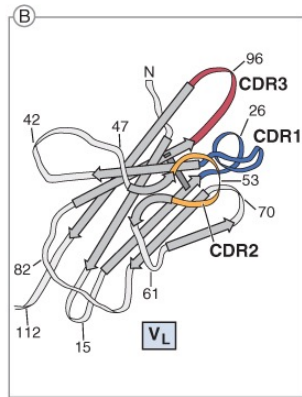
CDR 1,2,3 = Complementarity determining Regions  
= hypervariable Abschnitt



nicht-kovalente Bindung:

- elektrostatische Kräfte
- Wasserstoffbrücken
- Van-der-Waals-Kräfte
- hydrophobe Interaktionen

# Die Antigenbindungsstellen der Immunglobuline enthalten die hypervariablen (CDR) Regionen



© Elsevier 2005. Abbas & Lichtman: Cellular and Molecular Immunology 5e www.studentconsult.com

Individuelle Determinante in den variablen Regionen (V), charakteristisch für jeden spezifischen Antikörper, synthetisiert durch einen bestimmten B-Zellklon.

## Synonyme

CDR,  
hypervariable Region,  
antigenbindende Region der Fab

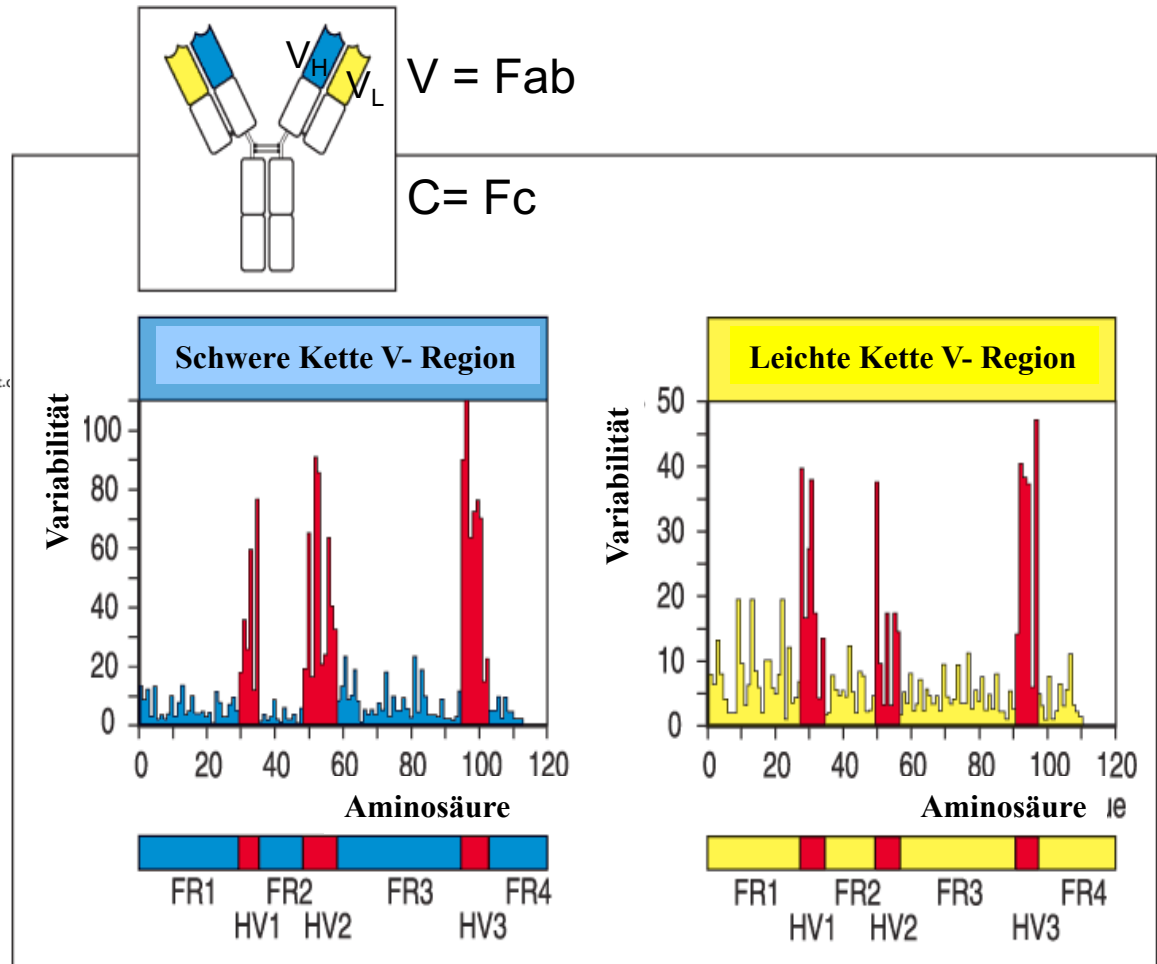
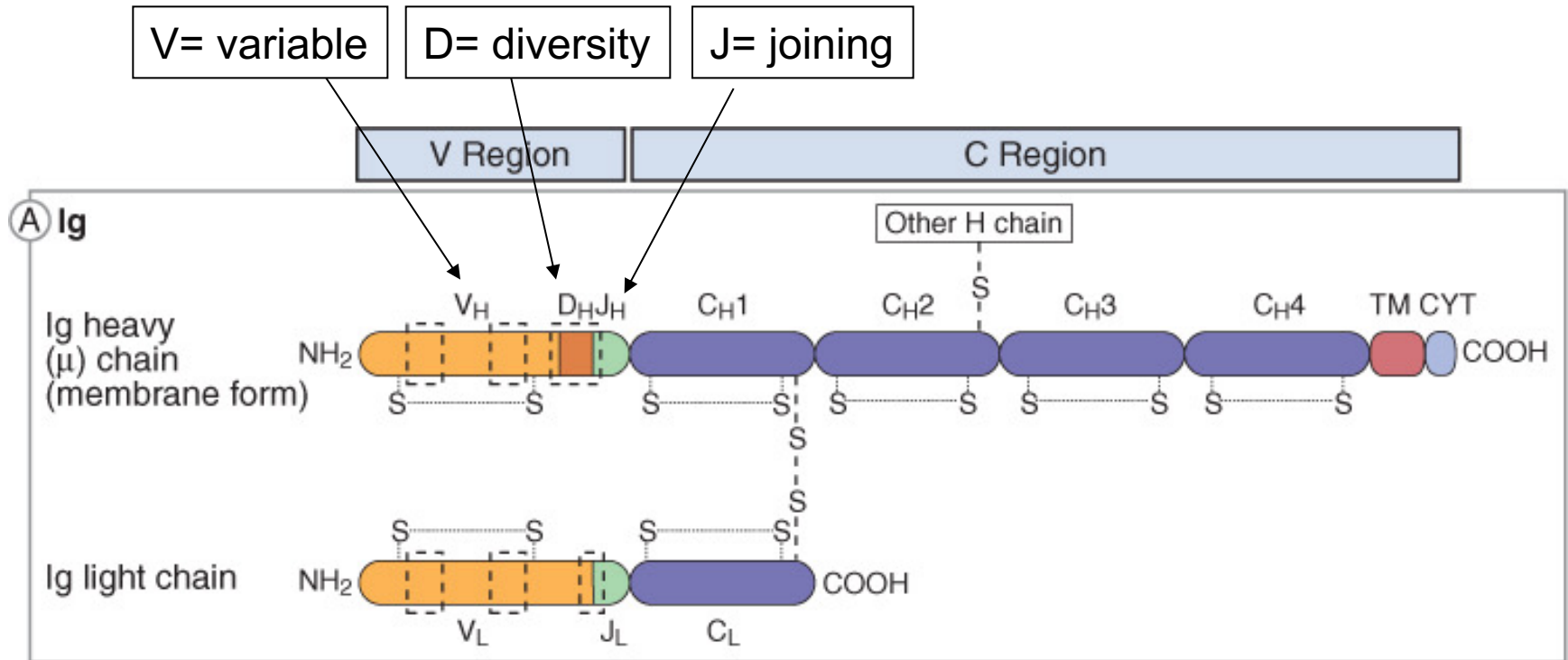


Fig 3.6 © 2001 Garland Science

# Immunglobulin Isotypen = Ig-Klassen

- Benannt nach der konstanten Region (C) von schweren (H) und leichten (L) Ketten
- Immunglobulinklassen (Isotypen) sind nach der schweren Kette (CH) benannt :  $\gamma$ -IgG,  $\mu$ -IgM,  $\alpha$ -IgA,  $\varepsilon$ -IgE,  $\delta$ -IgD.
- Leichte-Kette (CL) hat zwei isotypische Formen: **kappa** ( $\kappa$ ) und **lambda** ( $\lambda$ ), die sich mit allen schweren Ketten Isotypen verbinden können.
- Alle Isotypen sind in einem normalen Serum vorhanden, bis auf IgD, das nur in membrangebundener Form existiert

# Domänen der schweren und leichten Ig-Ketten



© Elsevier 2005. Abbas & Lichtman: Cellular and Molecular Immunology 5e www.studentconsult.com

- Sowohl die **variablen (V)** als auch die **konstanten (C) Domänen (Abschnitte)** der schweren und leichten Polypeptidketten werden durch verschiedene **Genabschnitte** kodiert.
- Die Gene der schweren und leichten Polypeptidketten sind auf unterschiedlichen Chromosomen lokalisiert.

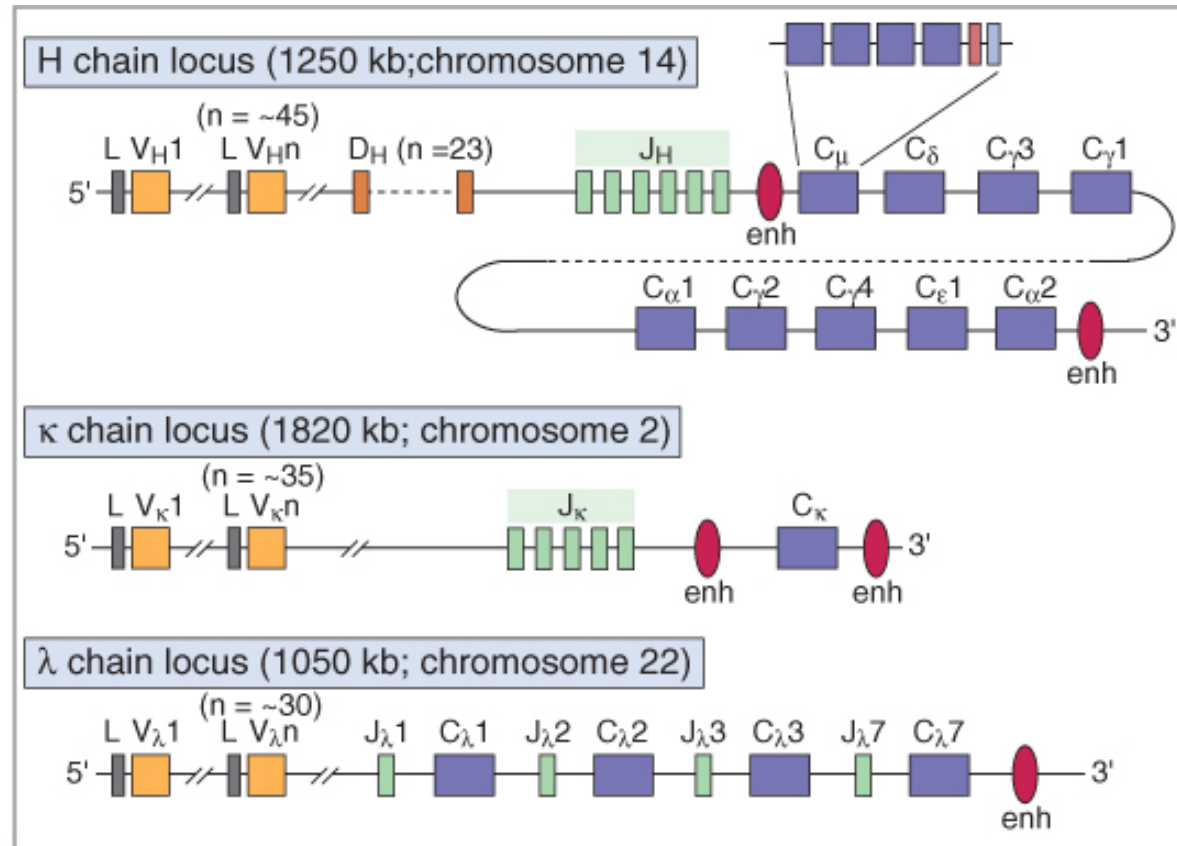
# Genenorganisation des Lokus für die schwere und leichte Immunglobulinkette

## V-Region:

V = Variable  
D = Diversity  
J = Joining  
Gensegmente

## C-Region:

C = Konstant  
Gensegmente



C<sub>μ</sub> - IgM  
C<sub>δ</sub> - IgD  
C<sub>γ</sub> - IgG  
C<sub>α</sub> - IgA  
C<sub>ε</sub> - IgE

© Elsevier 2005. Abbas & Lichtman: Cellular and Molecular Immunology 5e www.studentconsult.com

Die **Keimbahn-DNA** → die Immunglobulingene werden in einem nicht-rekombinierten Zustand vererbt

# Ablauf der Genumlagerung (Rearrangement)

Keimbahn-DNA

DJ-verknüpfte umgeordnete DNA

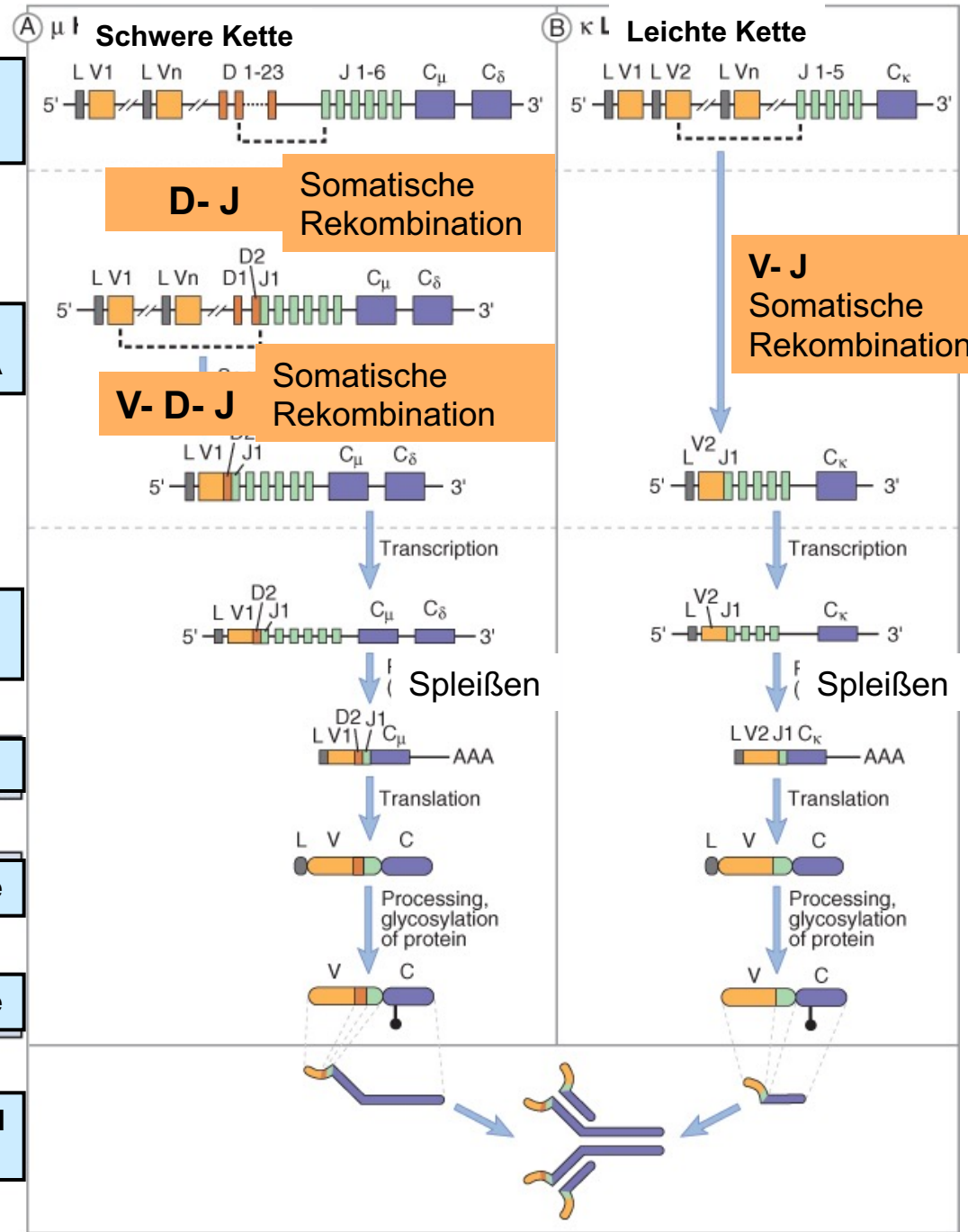
Primäres RNA Transkript

mRNA

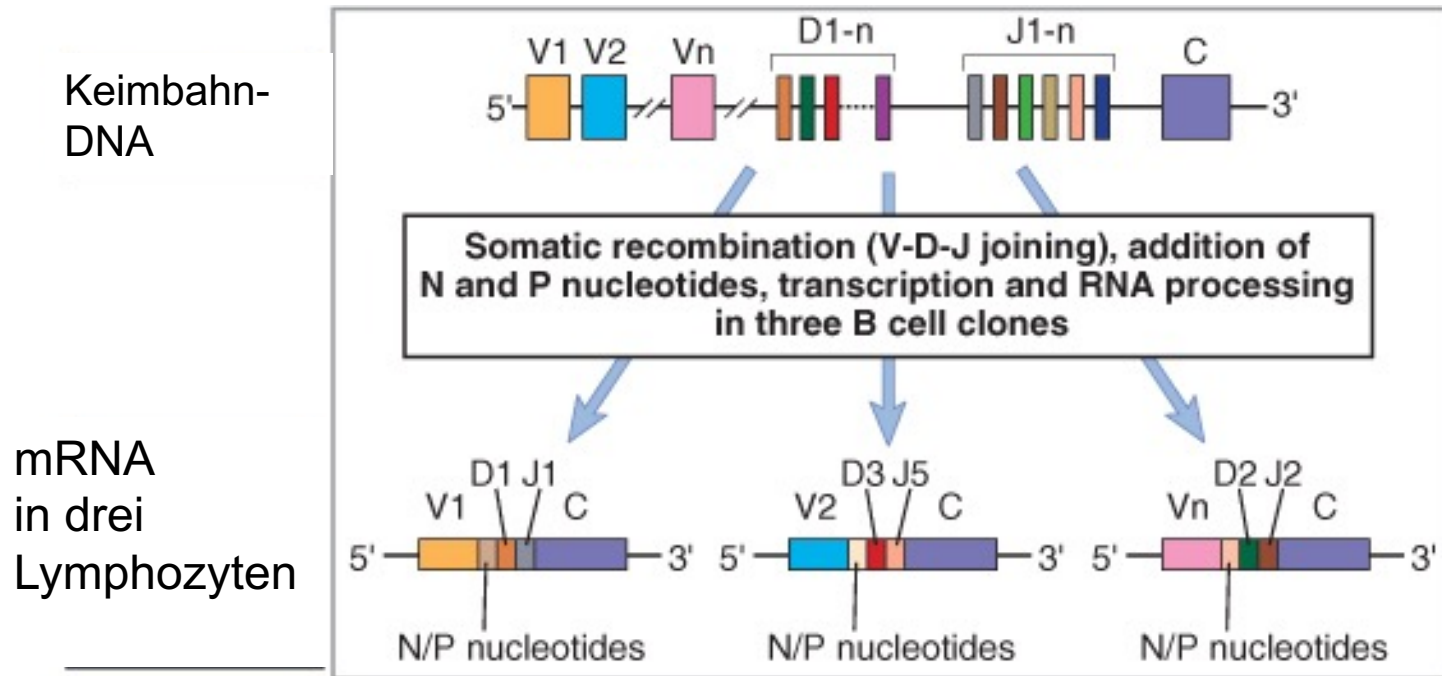
Polypeptidkette

Reife Polypeptidkette

Ig Molekül



# Schwere-Kette-Genumlagerung in drei Pro-B-Zellen



© Elsevier 2005. Abbas & Lichtman: Cellular and Molecular Immunology 5e [www.studentconsult.com](http://www.studentconsult.com)

zufällige Umlagerung

Diversität

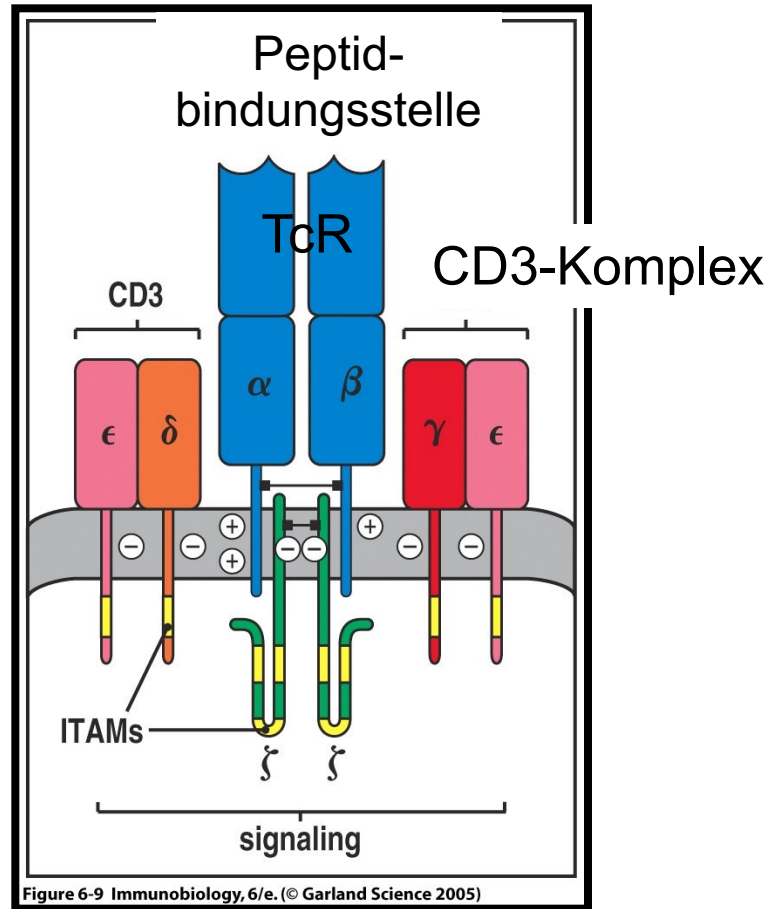


# T-Zell-Rezeptor

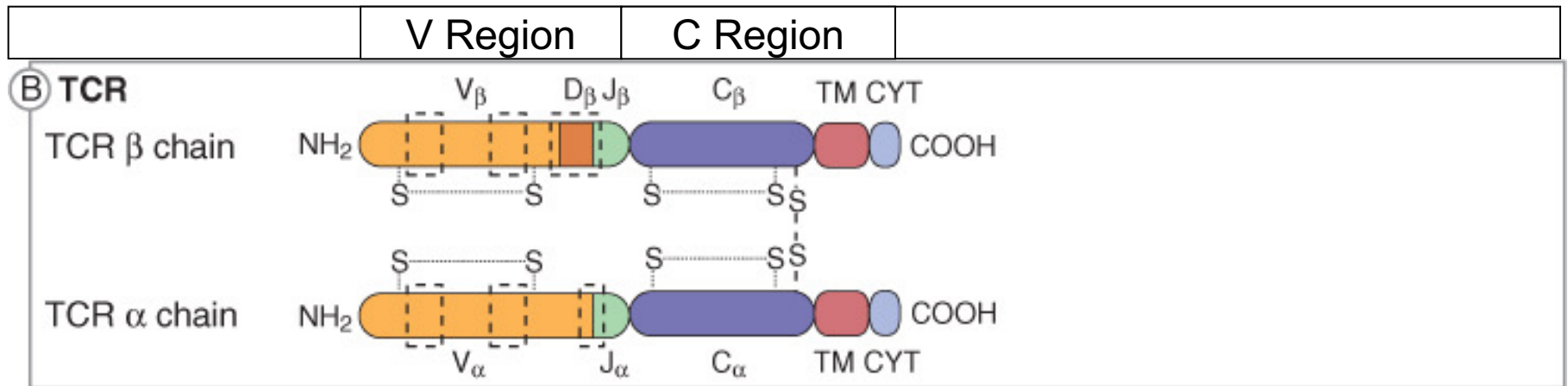
T-Zell-Typen:

1.  $\alpha\beta$  TcR+

2.  $\gamma\delta$  TcR+

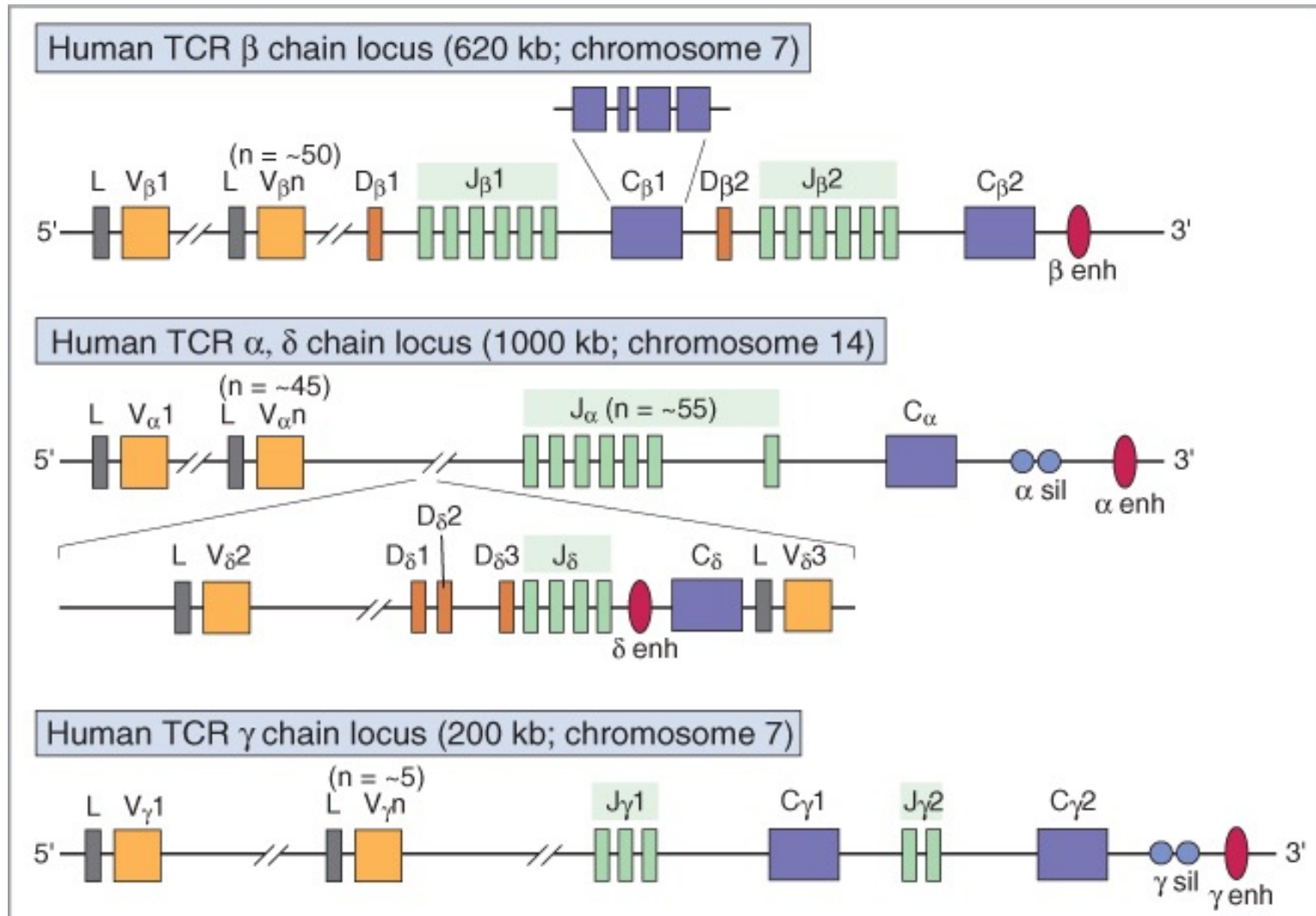


# Domänen der TcR $\alpha\beta$ -Ketten



© Elsevier 2005. Abbas & Lichtman: Cellular and Molecular Immunology 5e [www.studentconsult.com](http://www.studentconsult.com)

# TcR-Gene – Keimbahn-DNA



# TcR-Diversität

**Tabelle 23.** Faktoren, die an der Entstehung der TCR-Diversität beteiligt sind

	<i>TCR</i> $\alpha\beta$		<i>TCR</i> $\gamma\delta$	
	$\alpha$	$\beta$	$\gamma$	$\delta$
<i>V-Gensegmente</i>	100	25	7	10
<i>D-Gensegmente</i>	0	2	0	2
<i>Offene Leseraster</i> <i>N-Region-Diversität</i>	0 V-J	viele V-D D-J	0 V-J	viele V-D1 D1-D2 D1-J
<i>J-Gensegmente</i>	50	12	2	2
<i>Kombinatorische</i> <i>Diversität der</i> <i>V-Region</i>	2500		70	
<i>Vollständiges</i> <i>Repertoire</i>	$10^{15}$		$10^{16}$	

**In: Gergely-Erdei: Immunbiologie in Bildern**

# Die Herausbildung der Diversität

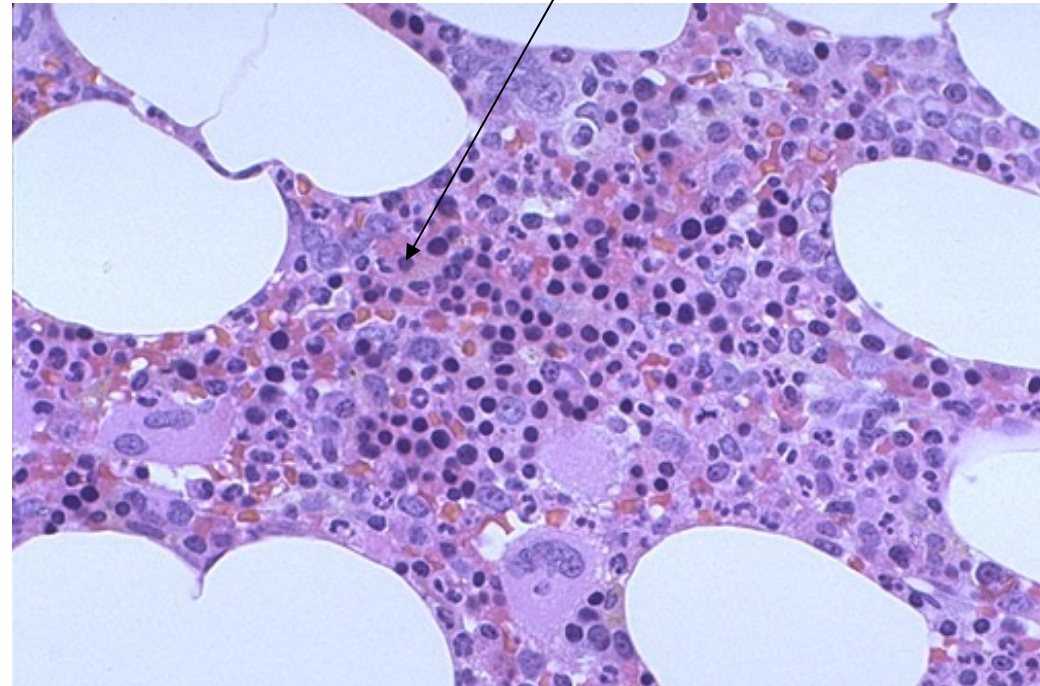
- **Zahl der V- D- und J-Segmente und ihre freie Rekombination**
- **TdT (Terminale Deoxynucleotidyl-Transferase).**
- **Freie Verknüpfung der Untereinheiten**  
**(IgH / IgL, TcR  $\alpha$  /  $\beta$  bzw.  $\gamma$  /  $\delta$ ).**

# Knochenmark

## Stromazellen:

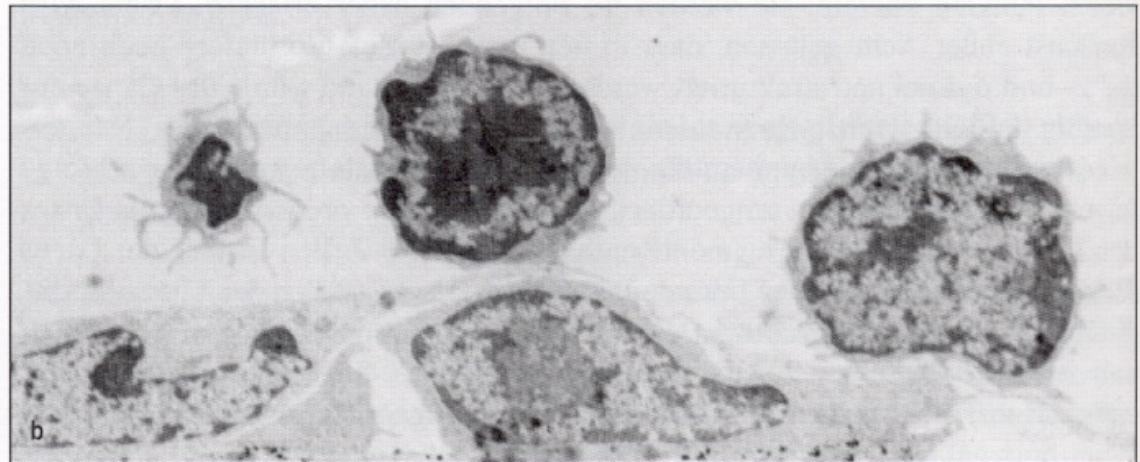
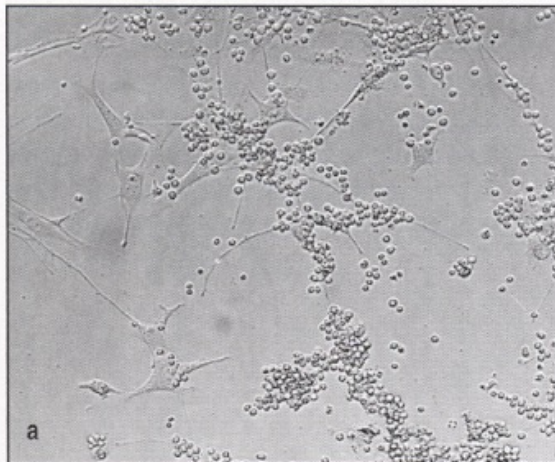
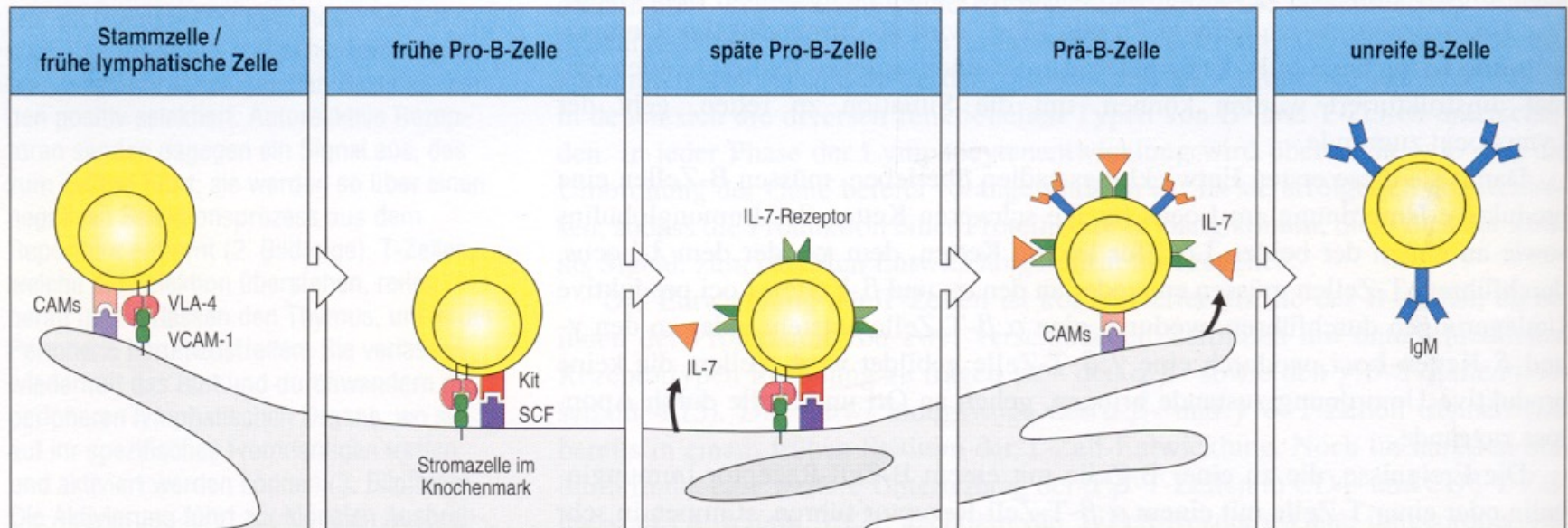
- nicht-lymphoid
- haben Fortsätze
- exprimieren Adhäsionsmoleküle (CD44, VCAM-1)
- produzieren Zytokine (IL-7, IL-3, SCF)
- produzieren Modifikatoren (Wnt-Faktoren, IL-4, extrazelluläre Matrixkomponenten)
- produzieren Chemokine (SDF1/CXCR4-Ligand)
- Selektion

Stromazellen





# Knochenmark-Stromazelle



Die Entwicklung von Stammzellen zu reifen B-Zellen kann auf Grund von phänotypischen und genetischen Merkmalen in funktionell unterschiedliche Stadien eingeteilt werden.



# Knochenmark I: Stammzelle > "große prä-B-Zelle"

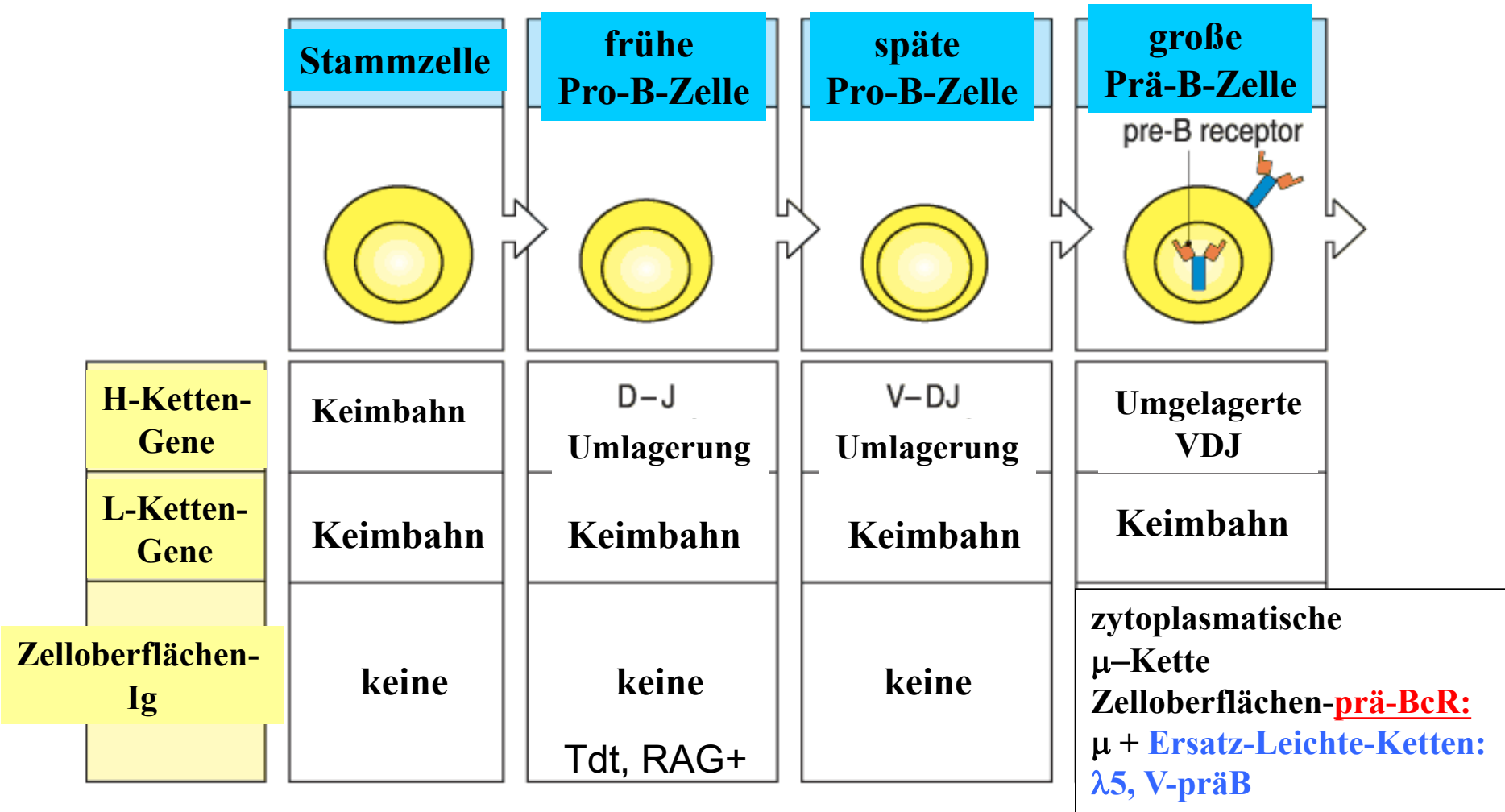


Fig 7.5 part 1 of 2 © 2001 Garland Science

Zelloberflächenmoleküle

**c-kit, CD43, CD45 CD34, CD19, CD10, CD20**

**CD22, CD25**

# Knochenmark II: “kleine prä-B-Zelle” > “reife B-Zelle”

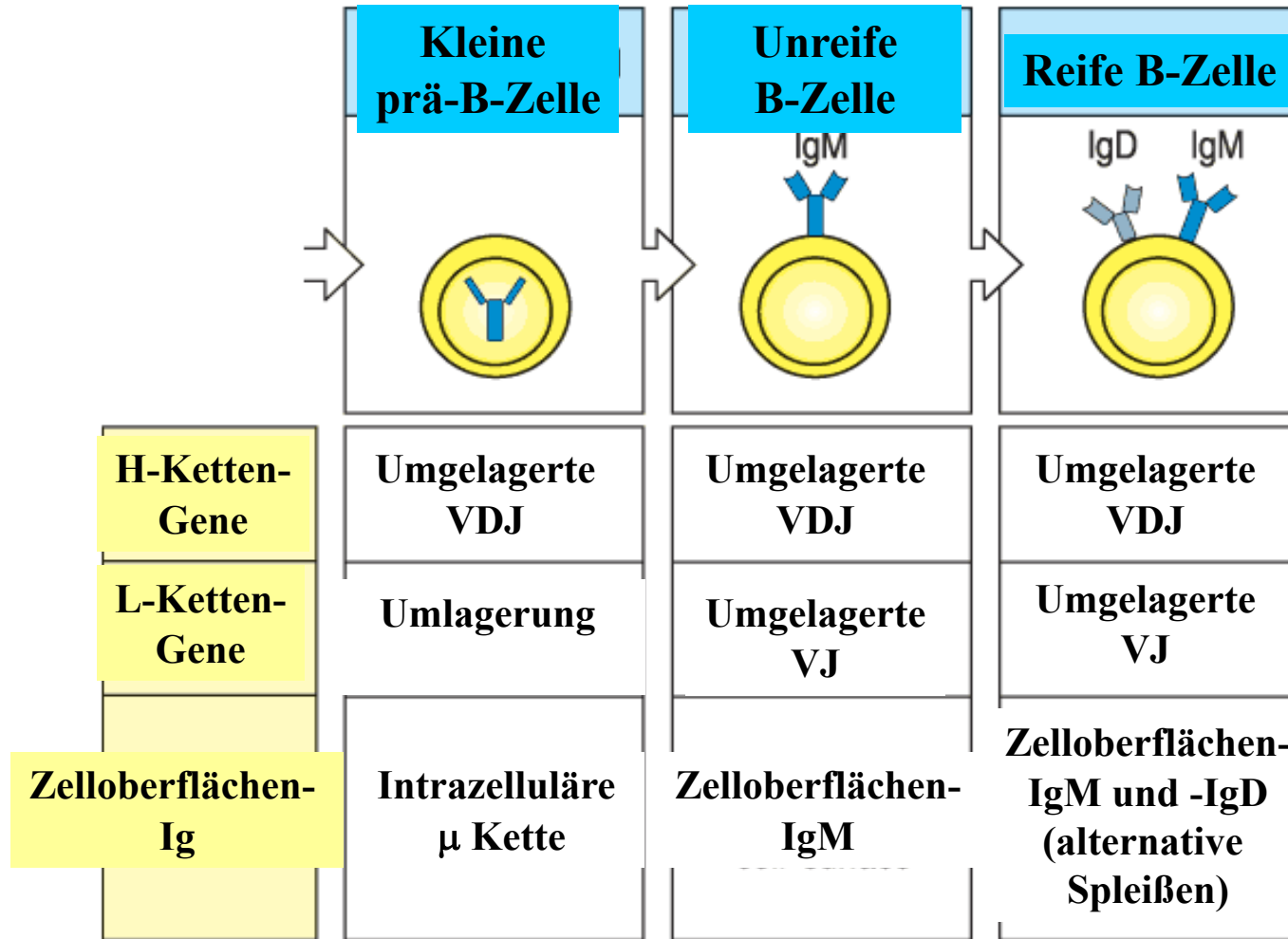


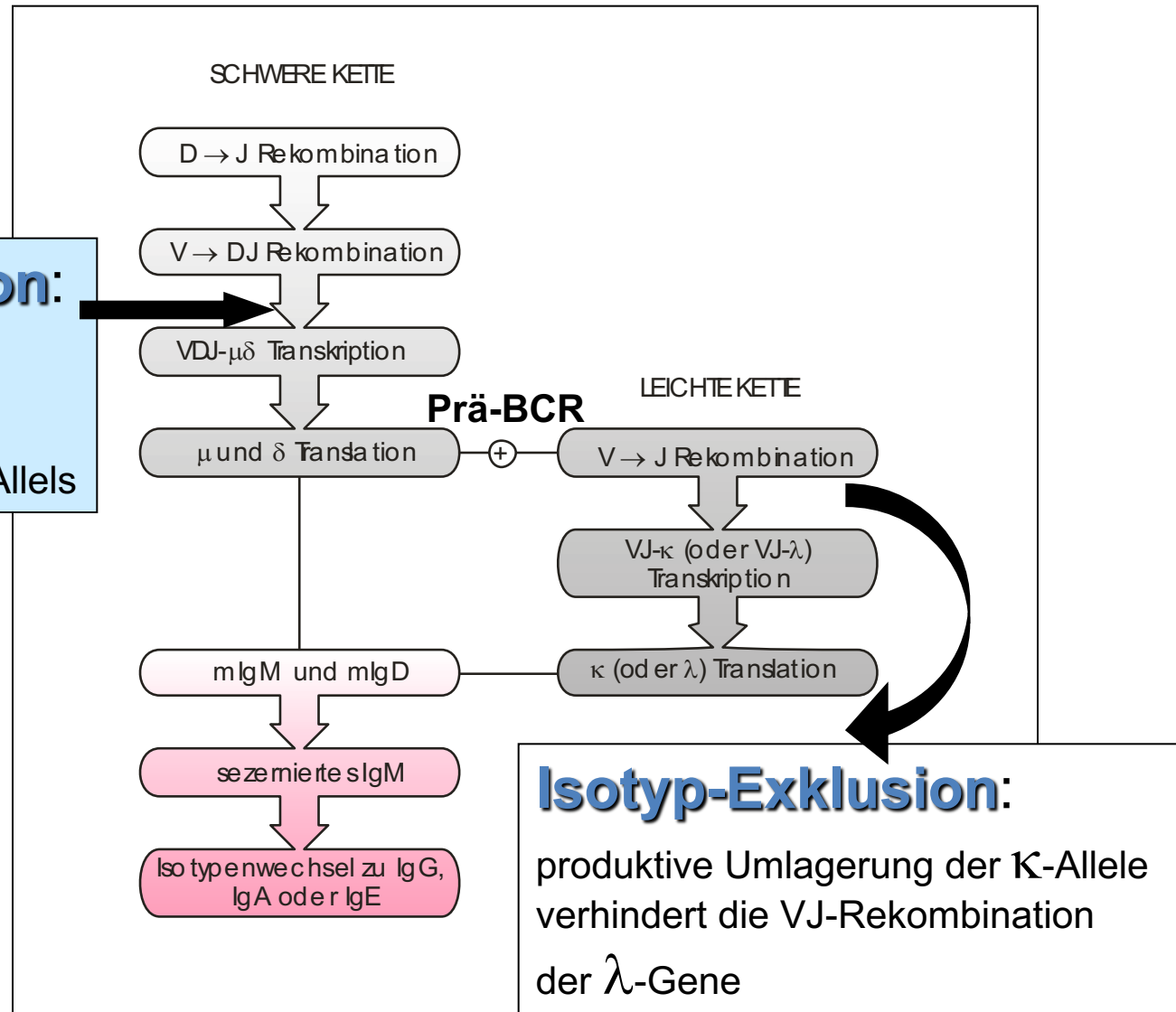
Fig 7.5 part 2 of 2 © 2001 Garland Science

<b>Zelloberflächen-moleküle</b>	<b>CD19, CD20</b>	
	<b>CD25</b>	<b>MHC-II, CD21, CD40</b>

# Ordnung der Ig-Genrearrangierung

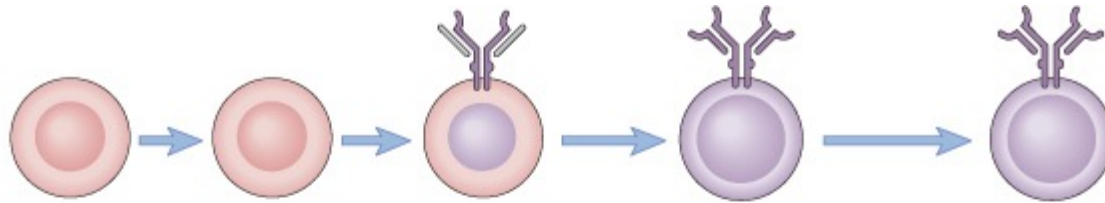
## Allelische Exklusion:

Produktiv bezeichnete Umlagerung verhindert die VDJ-Rekombination des zweiten schwere-Ketten-Allels



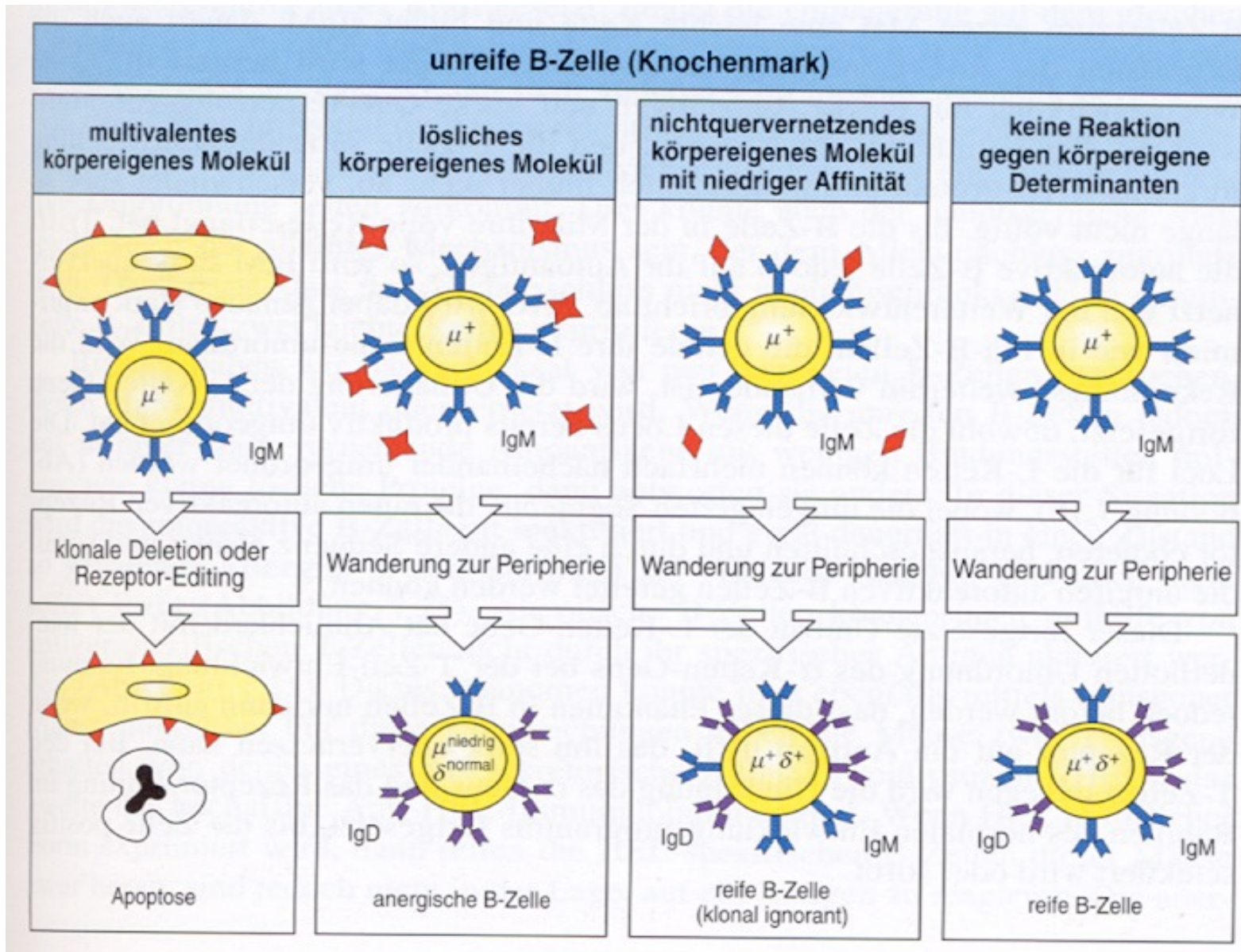
**Jede lymphoide Zelle besitzt nur eine einzige Rezeptorspezifität.**

# Selektionsprozesse im Knochenmark



Stage of maturation	Stem cell	Pro-B	Pre-B	Immature B	Mature B
<b>Proliferation</b>	[Orange bar]			[Orange bar]	
<b>RAG expression</b>			[Orange bar]	[Orange bar]	
<b>TdT expression</b>		[Orange bar]			
<b>Ig DNA, RNA</b>	Unrecombined (germline) DNA	Unrecombined (germline) DNA	Recombined H chain gene (VDJ); $\mu$ mRNA	Recombined H chain gene (VDJ), $\kappa$ or $\lambda$ genes (VJ); $\mu$ or $\kappa$ or $\lambda$ mRNA	Alternative splicing of VDJ-C RNA (primary transcript) to form $C_{\mu}$ and $C_{\delta}$ mRNA
<b>Ig expression</b>	None	None	Cytoplasmic $\mu$ and pre-B receptor-associated $\mu$	Membrane IgM ( $\mu$ + $\kappa$ or $\lambda$ light chain)	Membrane IgM and IgD
<b>Surface markers</b>	CD34+	CD43+ CD19+ CD10+	B220 <sup>lo</sup> CD43+	IgM <sup>lo</sup> CD43-	IgM <sup>hi</sup>
<b>Anatomic site</b>	[Orange bar] Bone marrow			[Orange bar] Periphery	
<b>Response to antigen</b>	None	None	None	Negative selection (deletion), receptor editing	Activation (proliferation and differentiation)

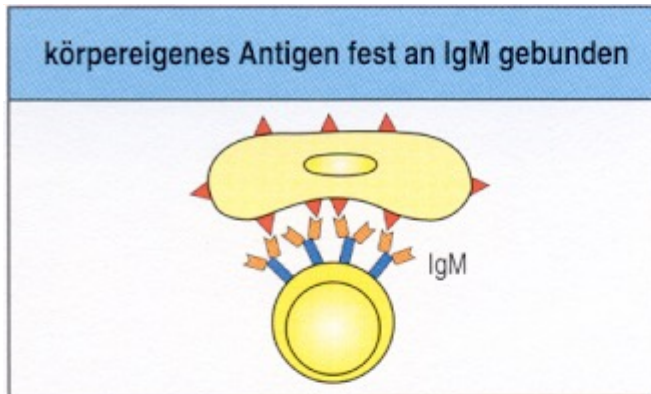
# Selektionsprozesse im Knochenmark



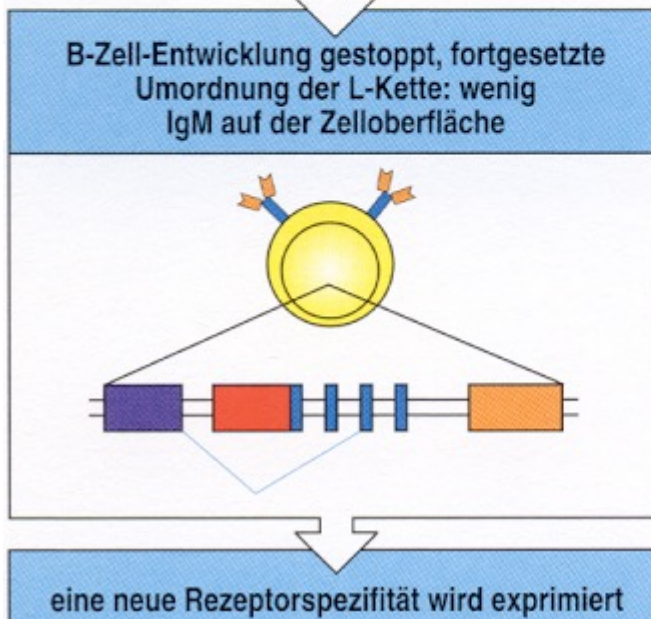


# „Receptor editing“

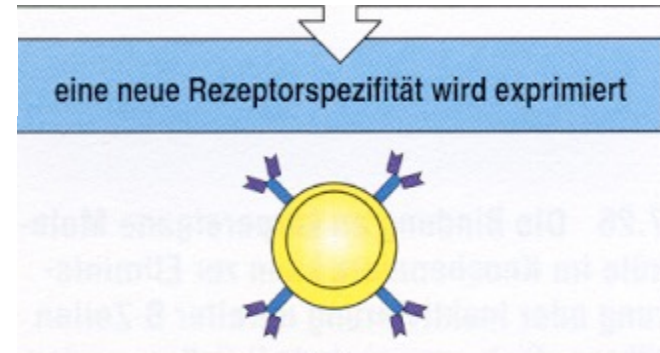
1.



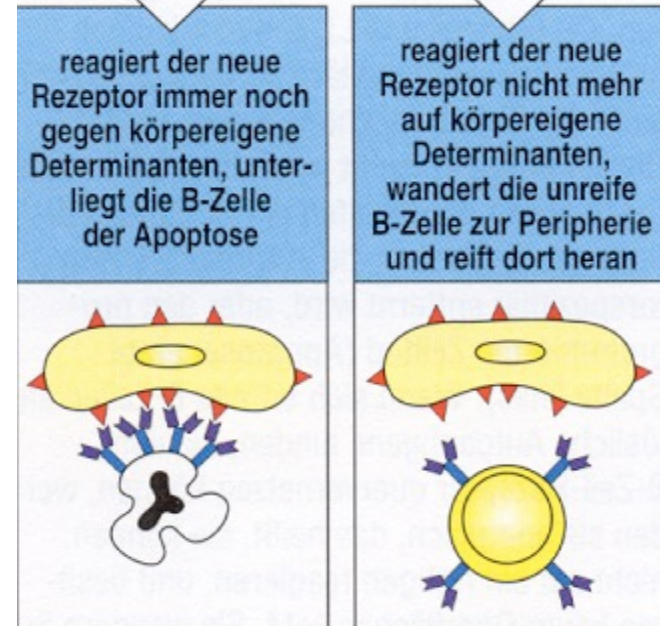
2.



3.



4.



# Funktion der Stromazellen

## Kortikale Epithelzellen:

- chemotaktische Signale für hämatopoetische Vorläuferzellen zu bilden
- Überlebens und Differenzierungssignalen zu bilden
- Sie präsentieren Selbst-Antigenen zur positiven Selektion

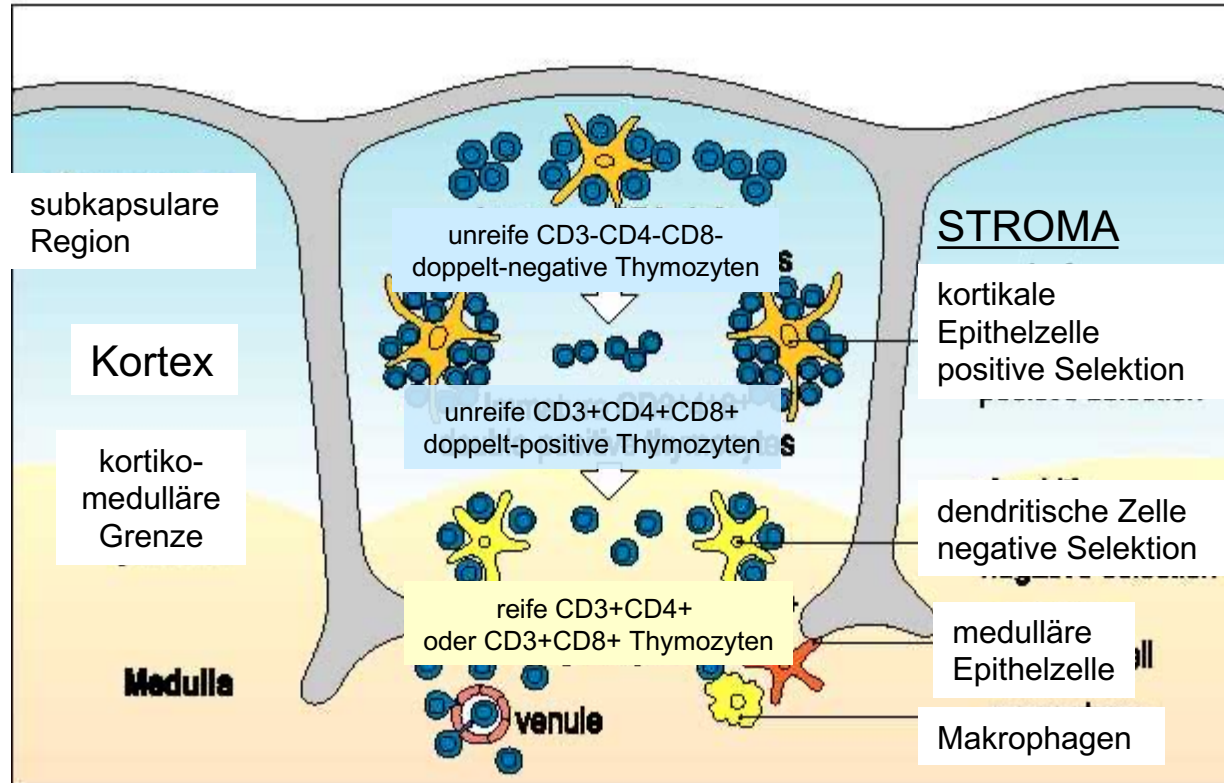
## Medulläre Epithelzellen, Dendritische Zellen und Makrophagen:

- Sie präsentieren Selbst-Antigenen zur negative Selektion
- Sie beseitigen die bei der Apoptose entstandenen Zellfragmente



# Thymozyten-Subpopulationen

Figure 5.14



## Thymozyten:

doppelt-negative  
DN: 2-5 %

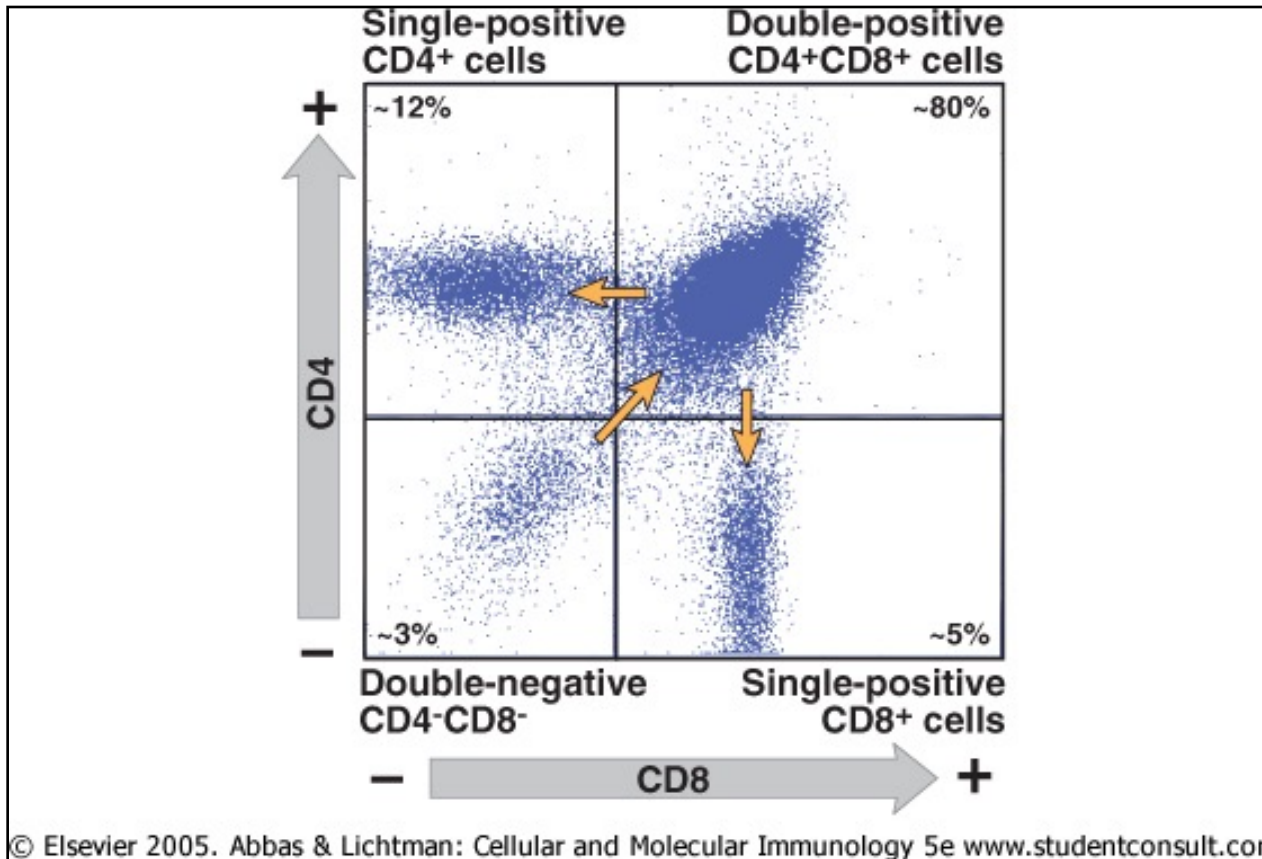
doppelt-positive  
DP: 75-80%

einfach-positive  
CD4 SP: 10-15%  
CD8 SP: 5-8%

In jungen Mäusen bilden sich täglich  $5 \times 10^7$  T-Zellen heraus (25% von allen Thymozyten). Während der Selektionsprozesse sterben 98 % von Thymozyten durch Apoptose ab.

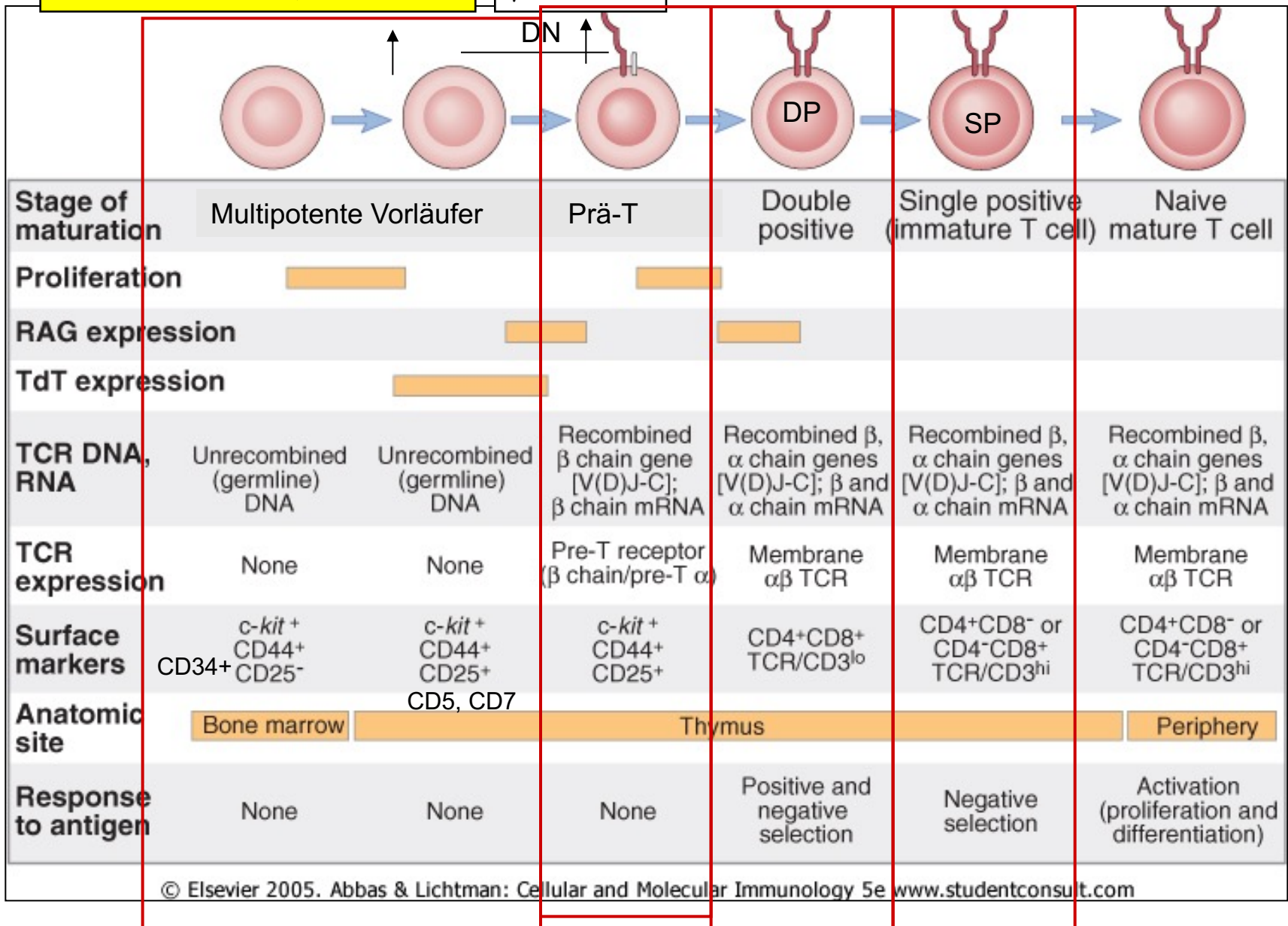
$1-2 \times 10^6$  reife T-Zellen wandern täglich zur Peripherie.

# Thymozytengruppen



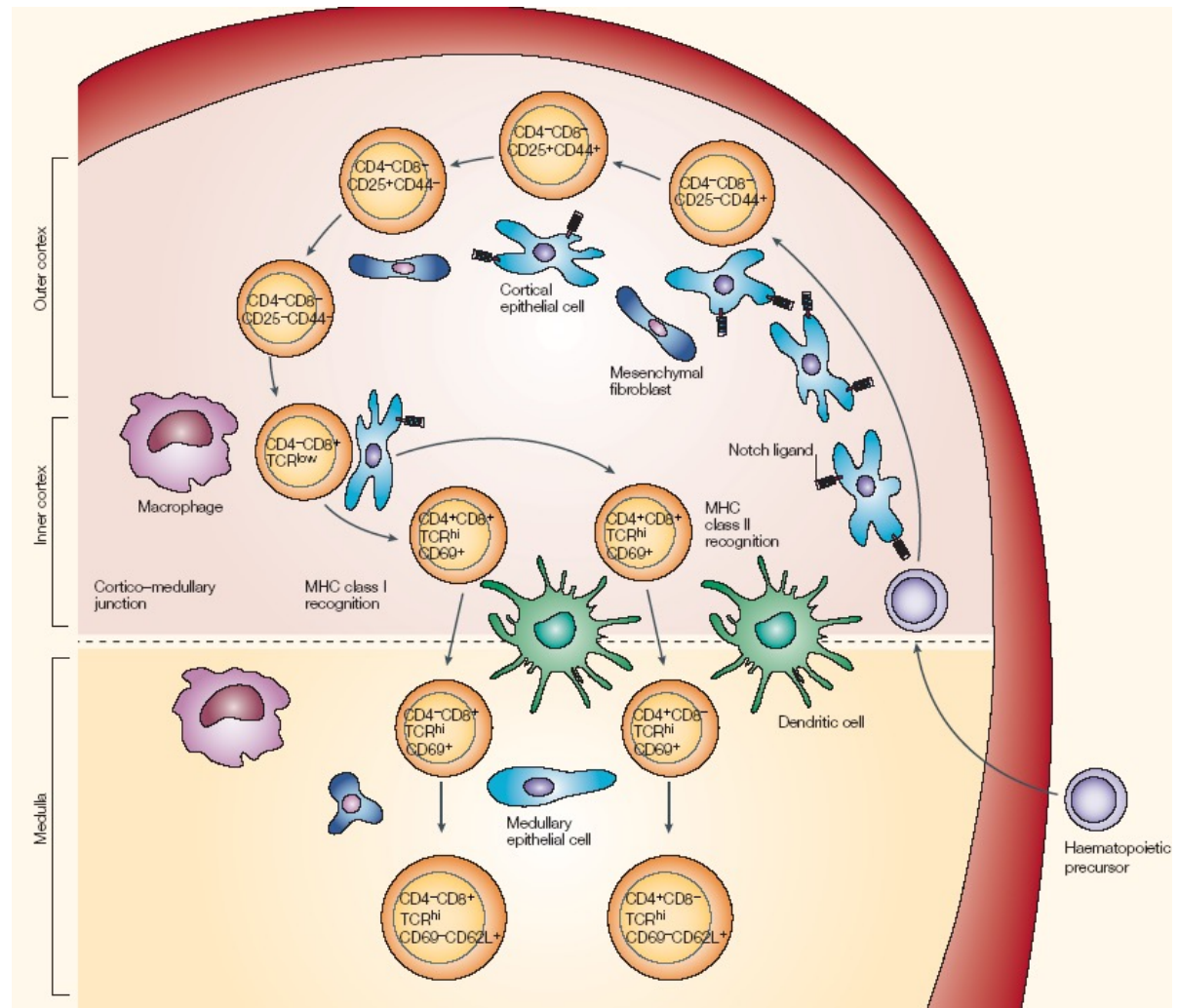
Dendritische Zellen, NK-Zellen

$\gamma\delta$  T-Zellen



# Stromazellen induzieren T-Zell-Reifung

1. Wanderung:  
Chemokine
2. Proliferation  
IL-7
3. Differenzierung
  - TcR-Genumordnung
  - Phenotyp-Veränderungen
4. Selektion  
Apoptose



**FOXP1:** - kontrolliert Thymusepithelzell-differenzierung, Hautzellen  
- Defizienz: "Nacktmaus" (T-Zell-Mangel & Alopezie)



# Thymische Selektionsprozesse

## Positive Selektion:

Epithelzelle – DP-Thymozyten-Wechselwirkung im Thymus-Kortex

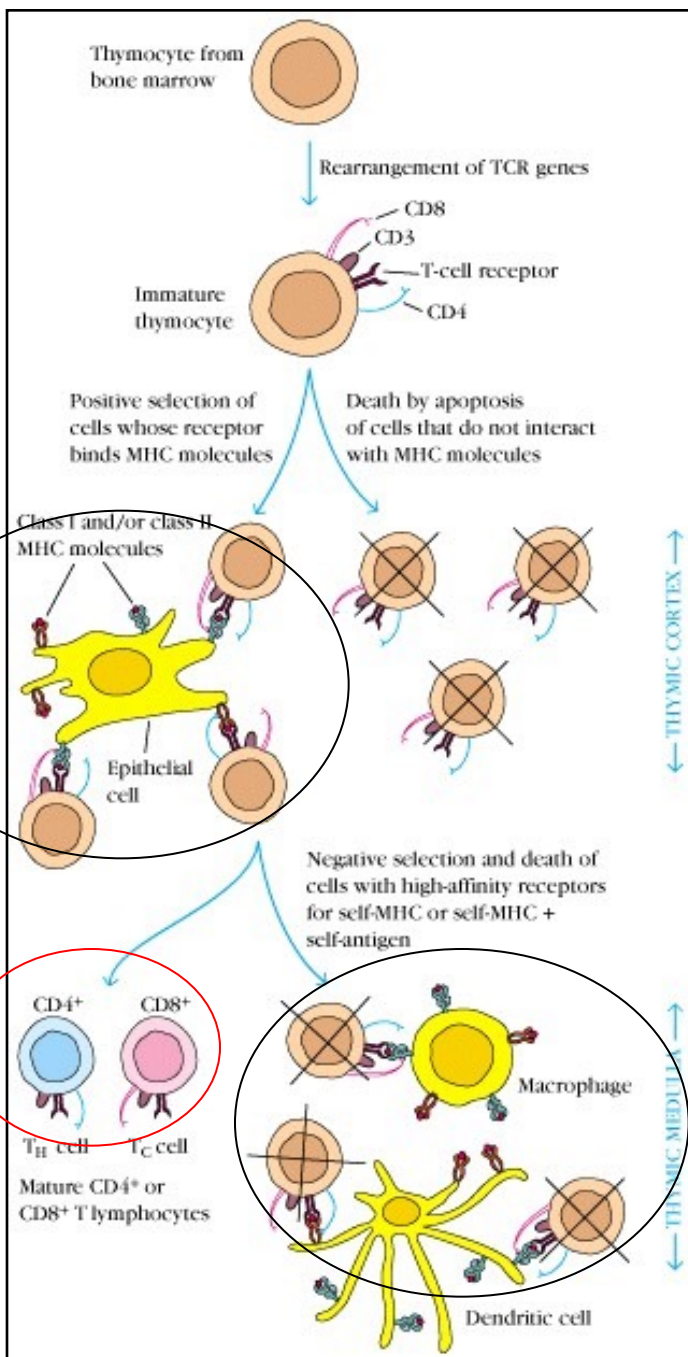
DP-Zellen, die Selbst-MHC-Moleküle erkennen können, werden überleben  
→ MHC-RESTRIKTION

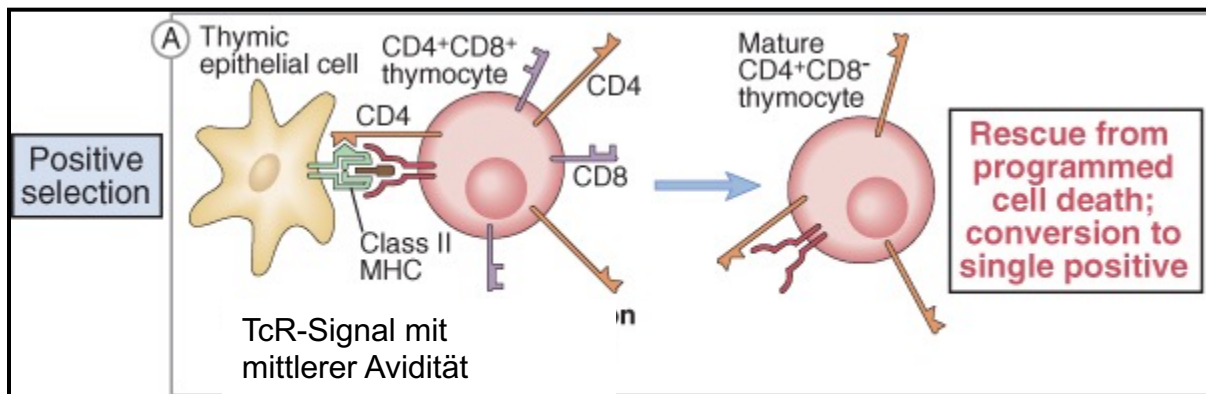
## Negative Selektion:

APC (Makrophage oder DC) – DP-Thymozyten-Wechselwirkung im Thymus-Medulla

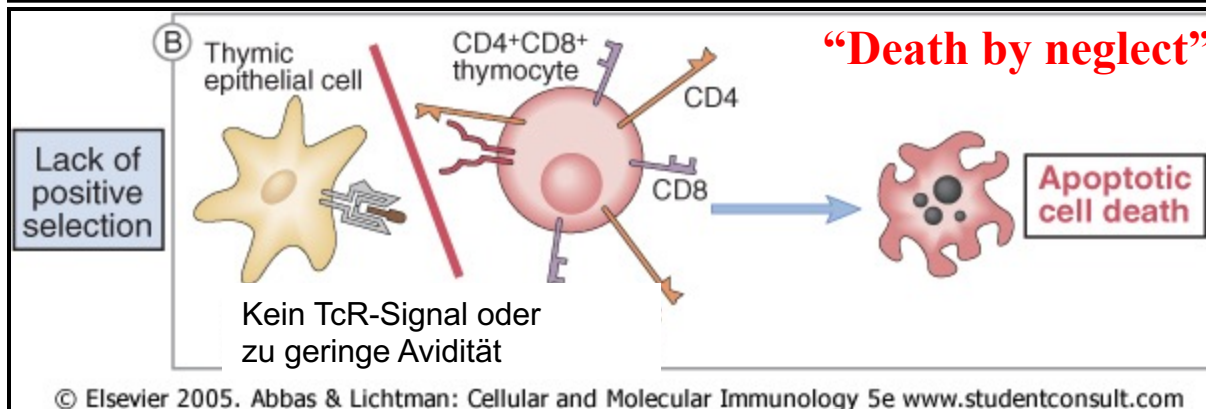
Apoptose von Zellen mit hoher TcR-Affinität gegen Selbst-Antigene  
→ TOLERANZ

Differenzierung zu reifen T-Zellen

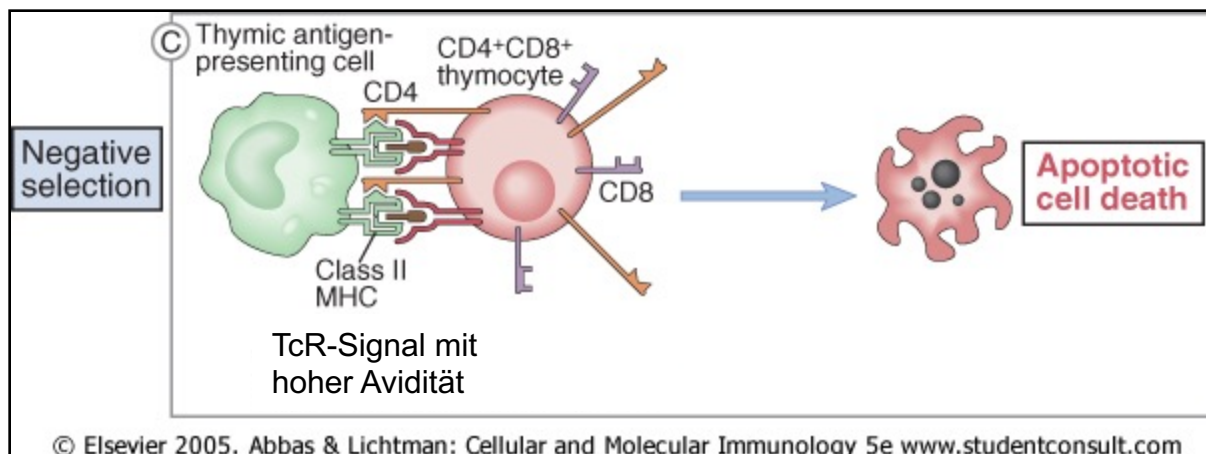




© Elsevier 2005. Abbas & Lichtman: Cellular and Molecular Immunology 5e www.studentconsult.com



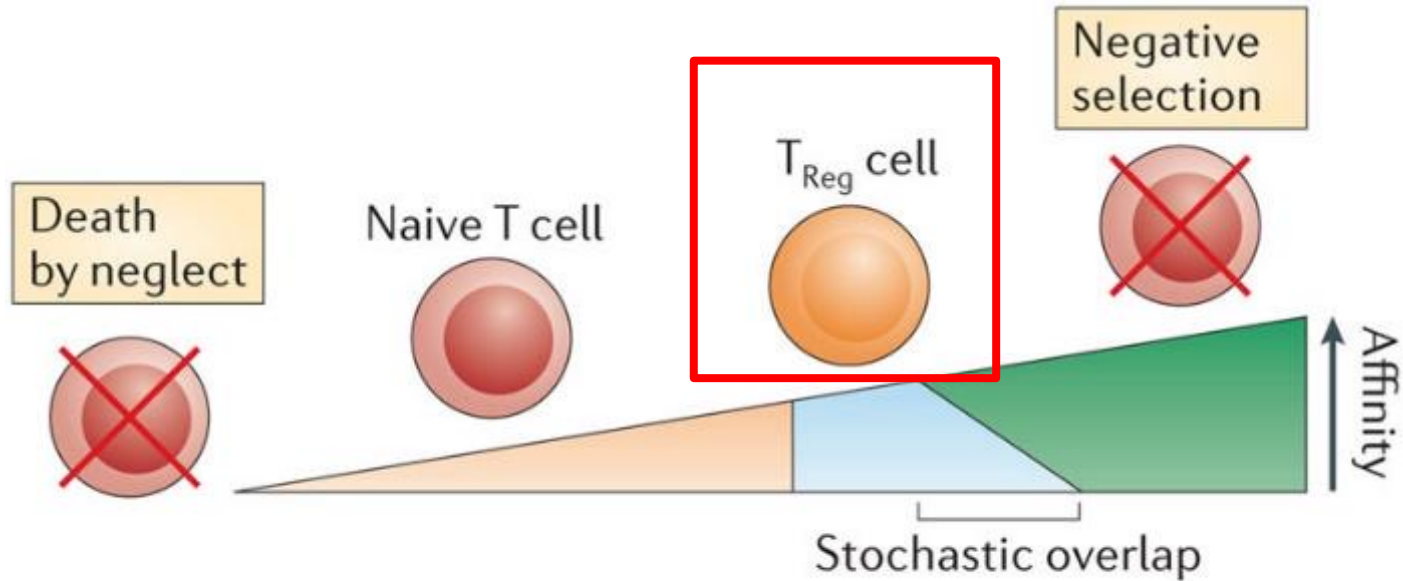
© Elsevier 2005. Abbas & Lichtman: Cellular and Molecular Immunology 5e www.studentconsult.com



© Elsevier 2005. Abbas & Lichtman: Cellular and Molecular Immunology 5e www.studentconsult.com



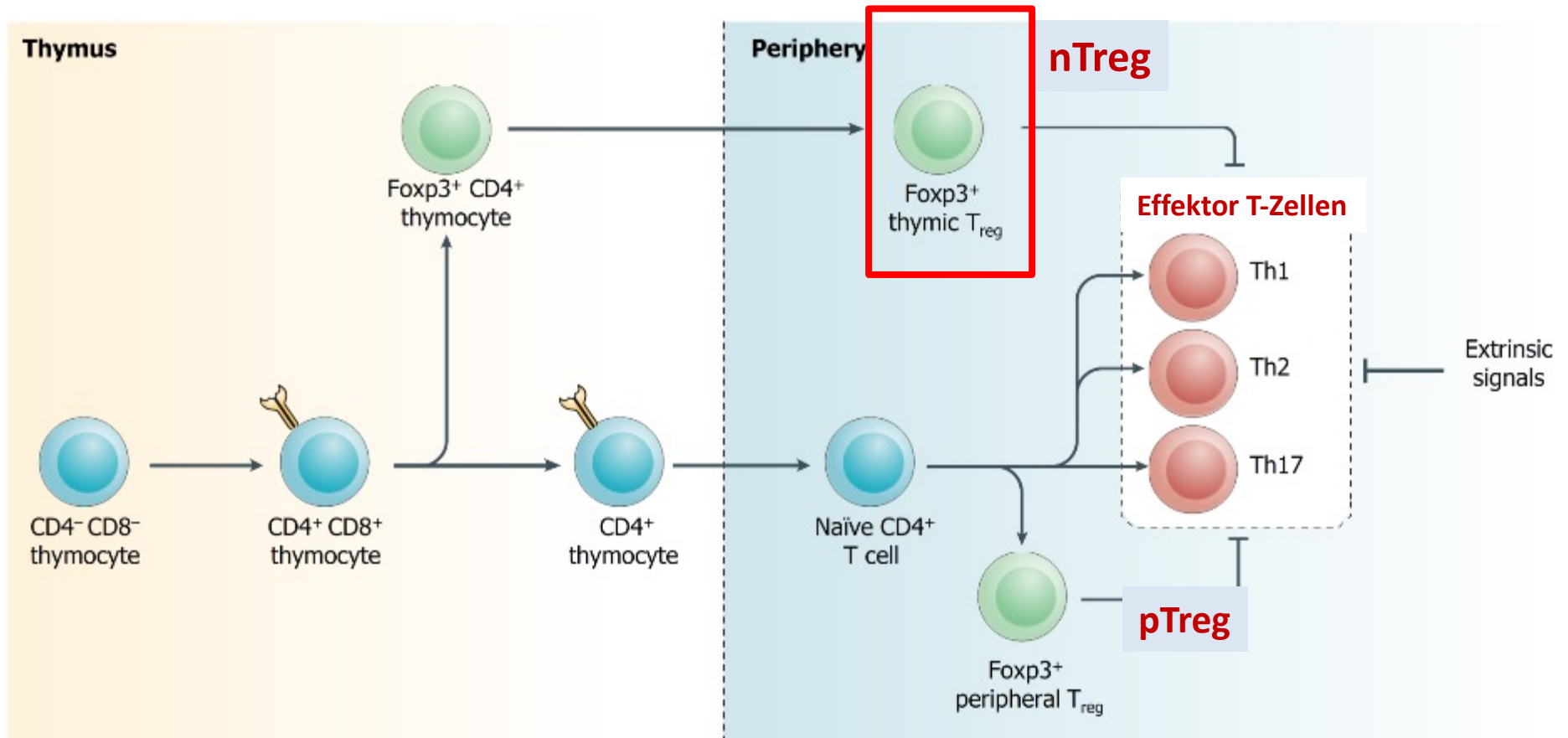
# Affinitätsmodell der T-Zell-Selektion



Nature Reviews | Immunology

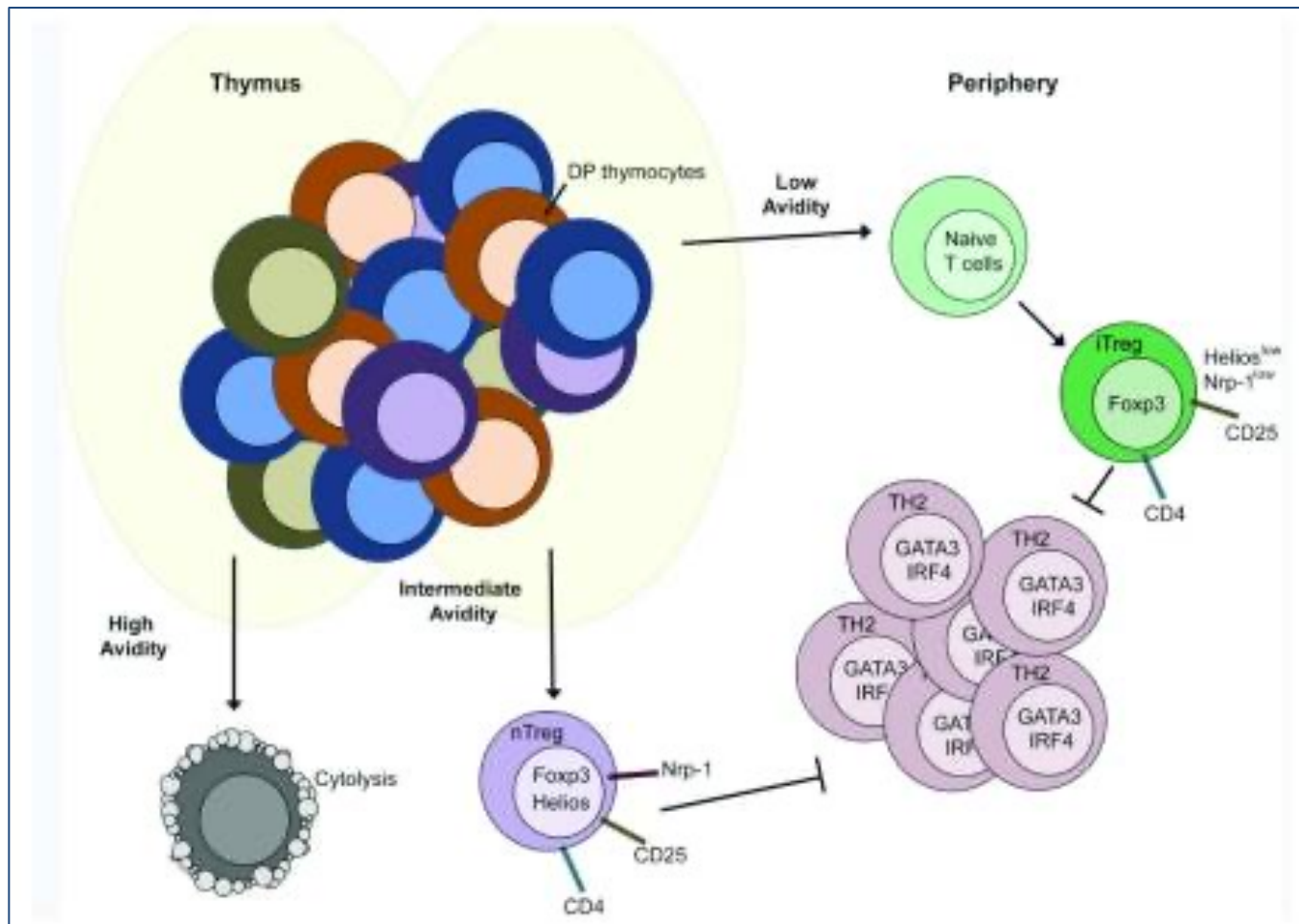
The affinity model of thymocyte selection centres on the strength of the interaction of the T cell receptor (TCR) with self-peptide–MHC complexes as a crucial determinant of cell fate. Weak interactions are required to protect thymocytes from death by neglect and to promote the positive selection of naive T cells. Strong interactions cause negative selection by apoptosis

# Entwicklung von regulatorischen T-Zellen (Treg)

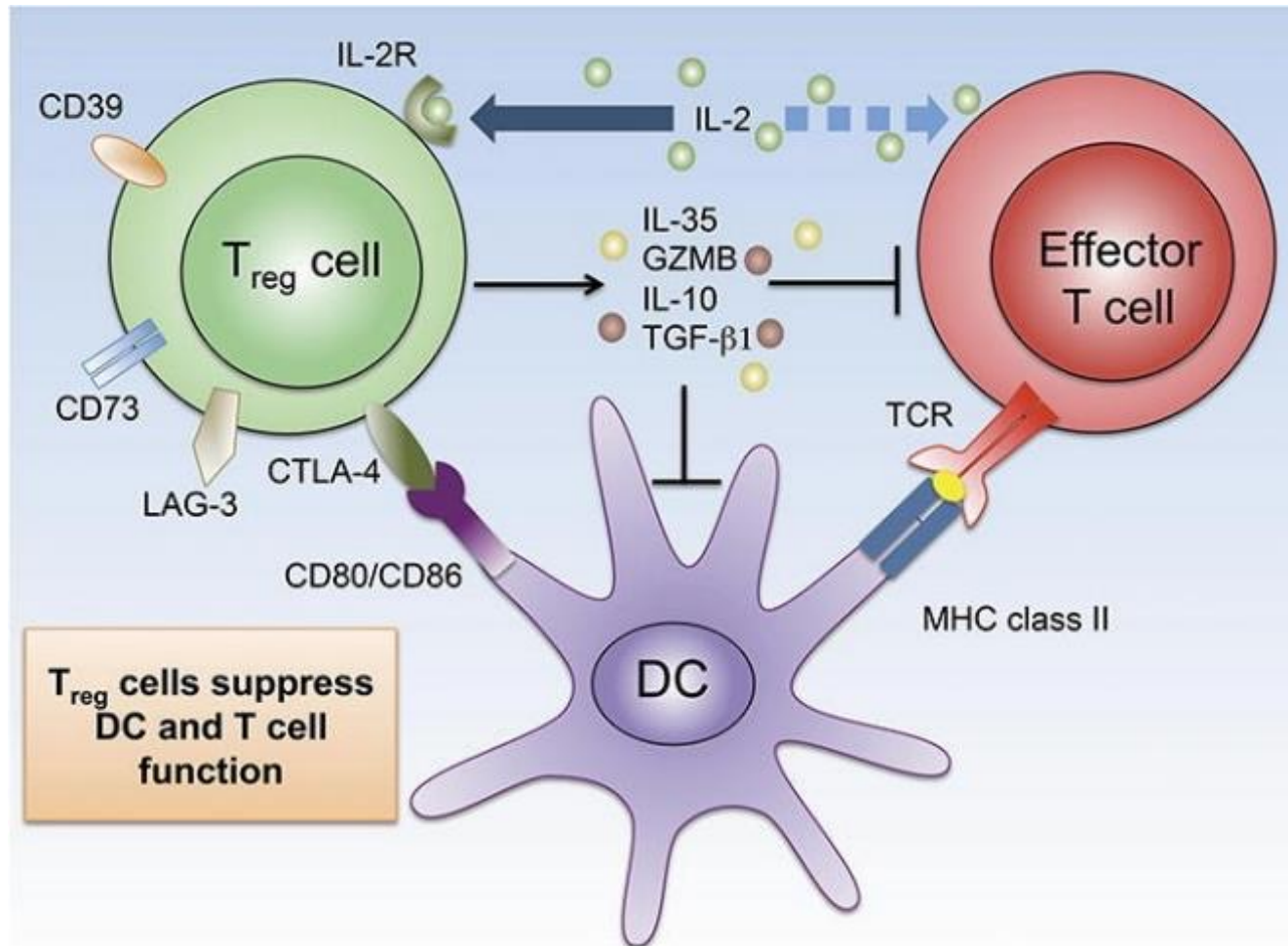


**Charakteristische Marker: CD4<sup>+</sup>, CD25<sup>+</sup>, CTLA4<sup>+</sup>  
Foxp3, IL-10, TGFb**

# Entwicklung von regulatorischen T-Zellen



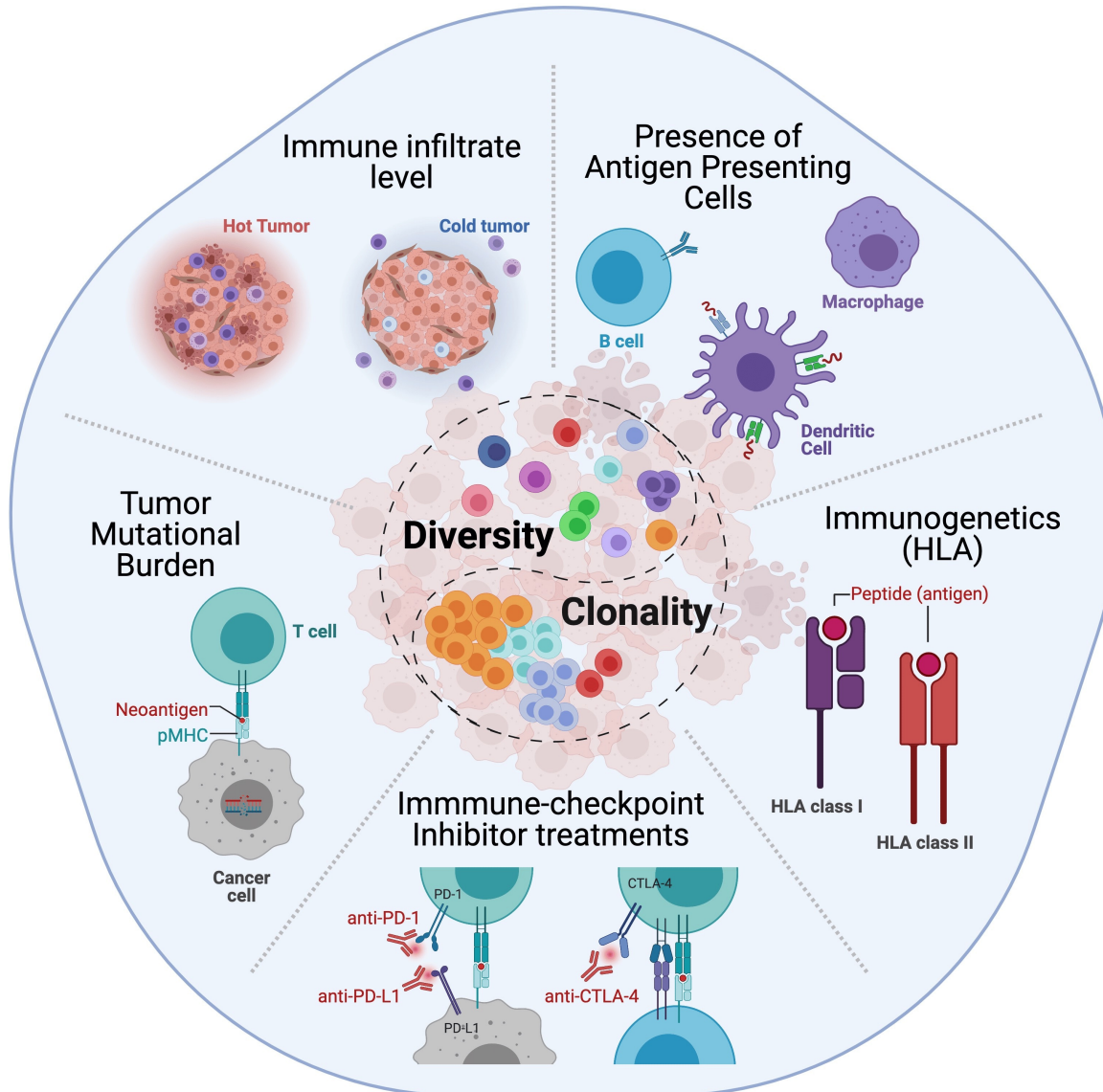
# Hemmungsmechanismen von regulatorischen T-Zellen



# AIRE: autoimmune regulator

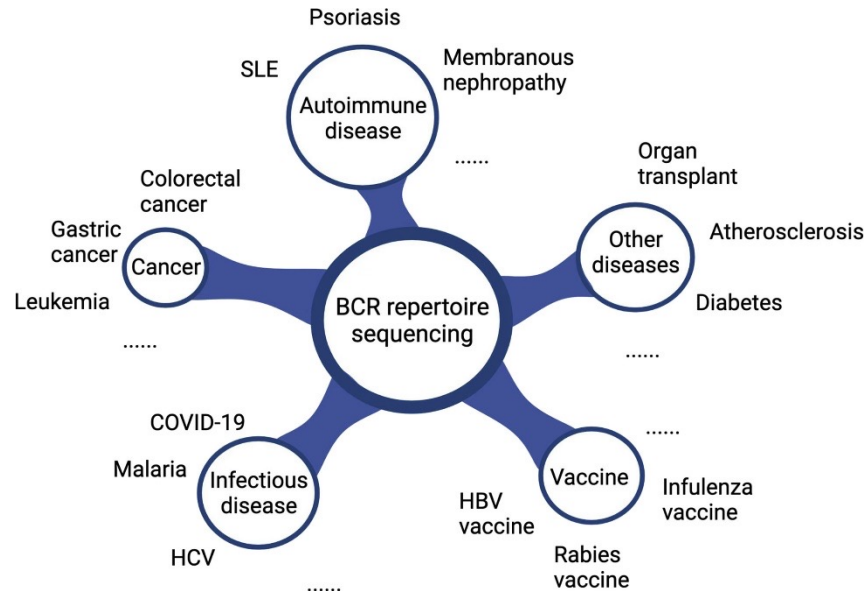
- AIRE ist ein Transkriptionsfaktor, der im Mark (innerer Teil) der Thymusdrüse exprimiert wird und einen Mechanismus kontrolliert, der verhindert, dass das Immunsystem den Körper angreift.
- Im Thymus führt AIRE zur Transkription einer breiten Auswahl von organ-spezifischen Genen. Diese selbstantigenreaktiven T-Zellen, die stark an Selbstantigene binden, werden im Thymus in der negativen Selektion eliminiert.
- Das AIRE-Gen ist bei dem seltenen Autoimmun-Syndrom Autoimmune Polyendocrinopathy Syndrome Typ 1 (APS-1), auch bekannt als Autoimmune Polyendocrinopathy-Candidiasis-Ectodermal Dystrophy (APECED), mutiert. Die Unterbrechung von AIRE führt zur Entwicklung einer Vielzahl von Autoimmunerkrankungen.

# Die höhere TCR-Repertoire-Diversität als prognostischer Biomarker bei Krebs





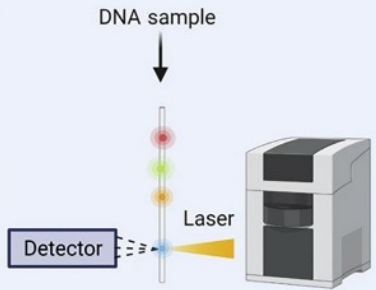
# BCR-Repertoire-Sequenzierung



Um eine Vielzahl von Antigenen aus der Außenwelt zu erkennen, müssen Individuen eine große Anzahl von B-Zell-Rezeptoren (BCRs) erzeugen. Die enorme Variation von BCRs wird durch die Neuordnung variabler (V), Diversitäts- (D) und verbindender (J) Gene erzeugt. BCR verfügt über drei komplementaritätsbestimmende Regionen (CDRs), nämlich CDR1, CDR2 und CDR3, wobei die Diversität hauptsächlich aus der komplementaritätsbestimmenden Region 3 (CDR3) resultiert. Fortschritte in der Hochdurchsatzsequenzierung verbessern weiterhin unser Verständnis von Krankheiten, insbesondere bei der Anwendung des BCR-Repertoires. In den letzten Jahren wurde berichtet, dass die BCR-Repertoire-Sequenzierung auf Dutzende immunvermittelte Erkrankungen angewendet wird, insbesondere bei systemischem Lupus erythematodes (SLE) und Impfungen

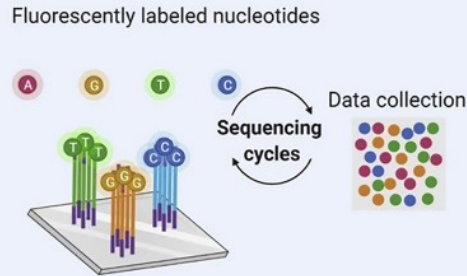
1

### Sanger sequencing



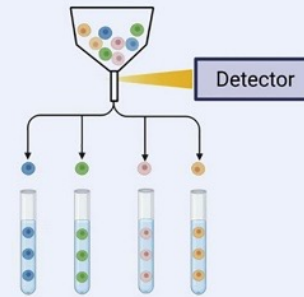
2

### Next-generation sequencing



3

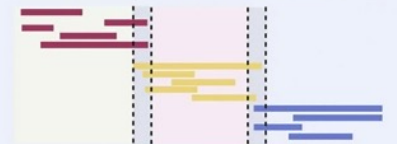
### Single-cell sequencing



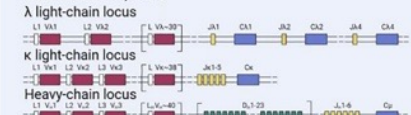
4

### Alignment and data analysis

Contigs (overlapping regions)



Assembled sequence



# Malignant haematopoietic diseases originated from immature cells of lymphoid cell lineage

Disease	Cell	Characteristic cell-surface markers	Location
	Stem cell	CD34	Bone marrow
Common acute lymphoblastic leukemia (C-ALL or B-ALL)	Lymphoid progenitor	CD10 CD19 CD20	Thymus
Thymoma	Thymic stromal cell or epithelial cell	Cytokeratins	
Acute lymphoblastic leukemia (T-ALL)	Thymocyte	CD1	
Sézary syndrome Adult T-cell leukemia Mycosis fungoides Chronic lymphocytic leukemia (CLL) T prolymphocytic leukemia (TPLL)	T cell	CD3/TCR CD4 or CD8	Periphery

Figure 7-43 Immunobiology, 7ed. (© Garland Science 2008)