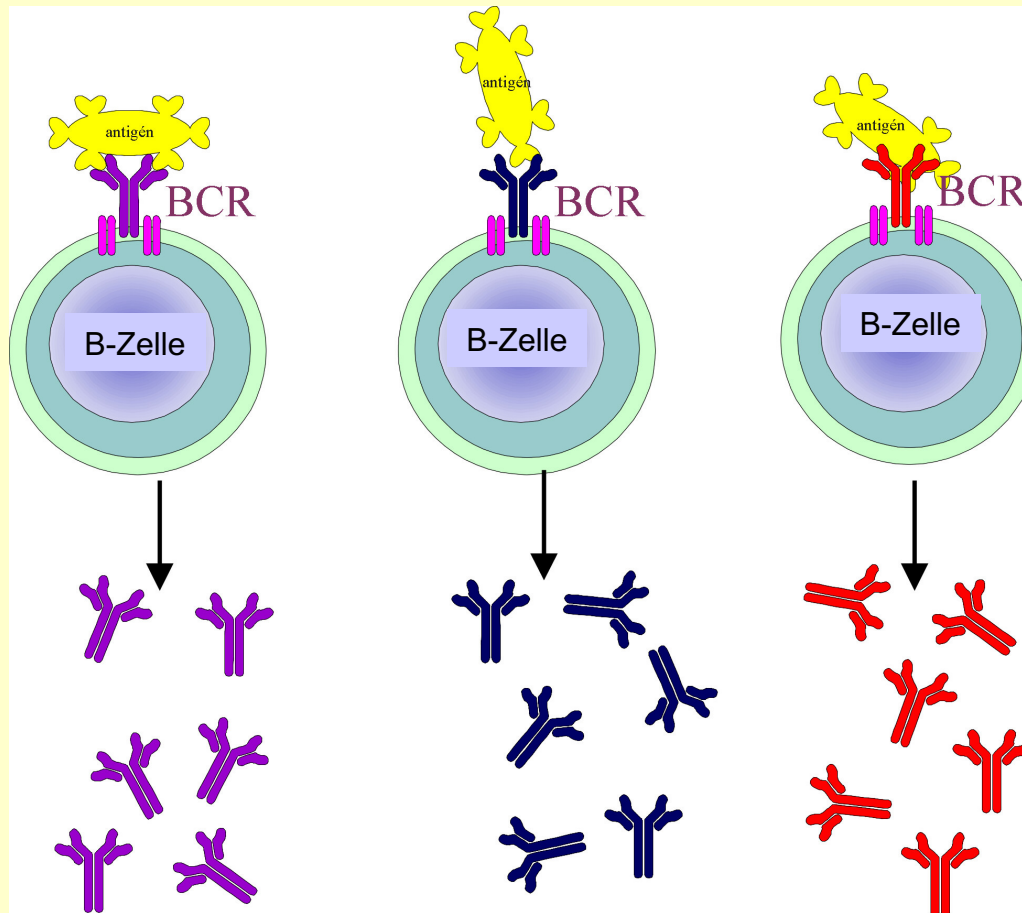


Grundlagen der Immunologie

9-10. Vorlesung

- **Genetik der Immunglobuline, Organisation und Exprimierung der Antigenrezeptorgene**
- **Zentrale B-Zell-Differenzierungsprozesse**
- **Die zentrale (thymische) T-Zell-Entwicklung.**

Antikörper – B-Zell-Repertoire: 10^{11}



Tonegawa (Nobelpreis:1987)

Bei der B-Zellreifung werden die somatischen Immunglobulingene **umgeordnet** und führen **somatische Hypermuation** durch.

Im Verhältnis zum großen Repertoire werden relativ wenige Ig-V Gene vererbt.

Ziel der Lymphozytenreifung

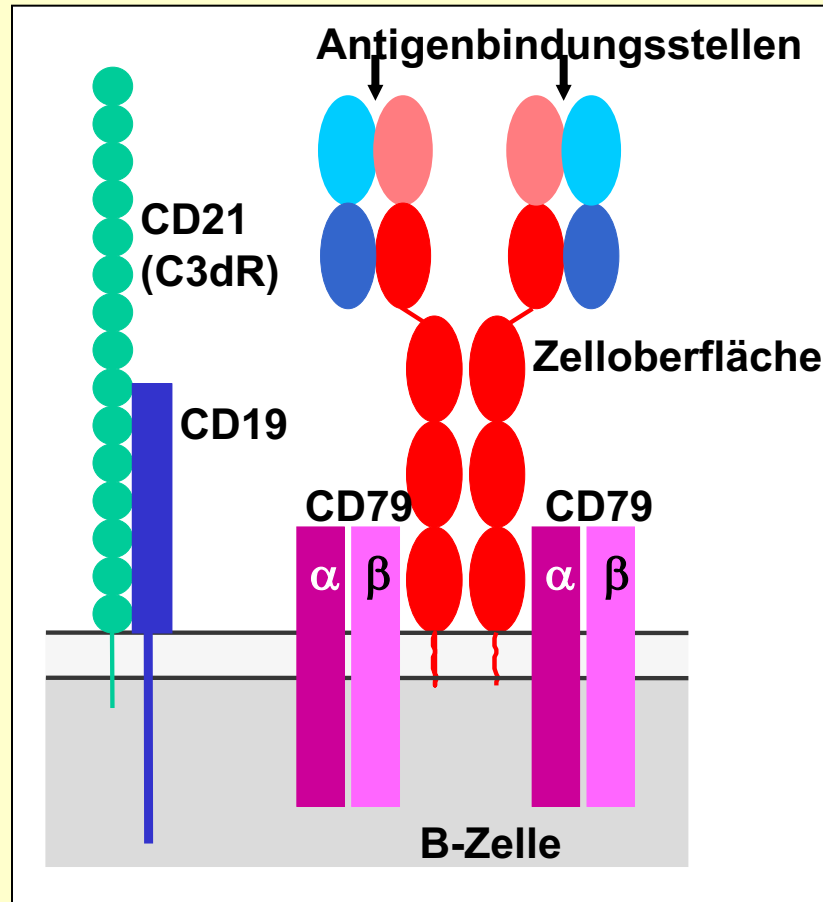
- Exprimierung von Antigenrezeptoren mit unterschiedlicher Spezifität
- Herausbildung des B- und T-Zell-Repertoires = Anzahl der Antigenerkennungsmoleküle: 10^9 - 10^{11} BcR, 10^{15} - 10^{16} TcR;

„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.**

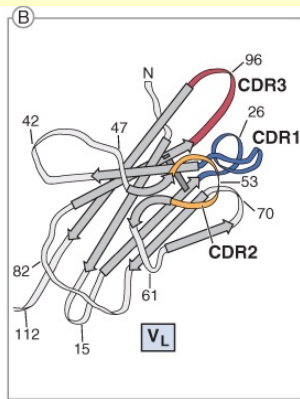
B-Zell-Antigenrezeptor (BcR) = Zelloberflächen-Ig



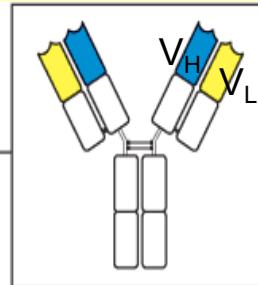
Zelloberflächen-Ig = Membran-IgM und -IgD

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

Die Antigenbindungsstellen der Immunglobuline enthalten die hypervariablen (CDR) Regionen



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



V = Fab

C = Fc

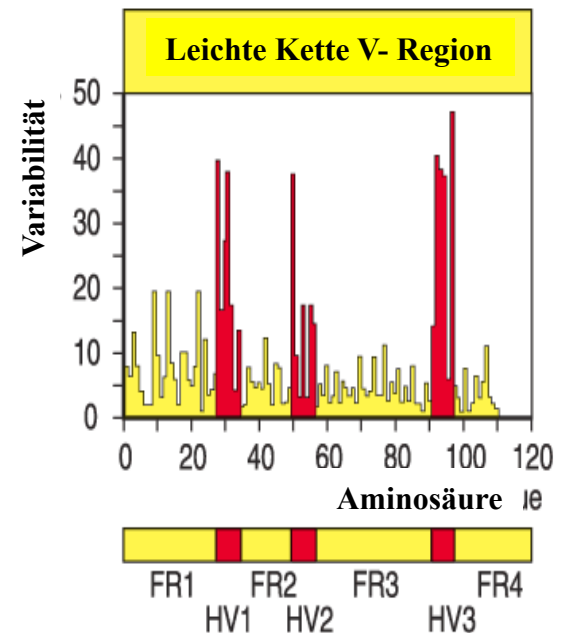
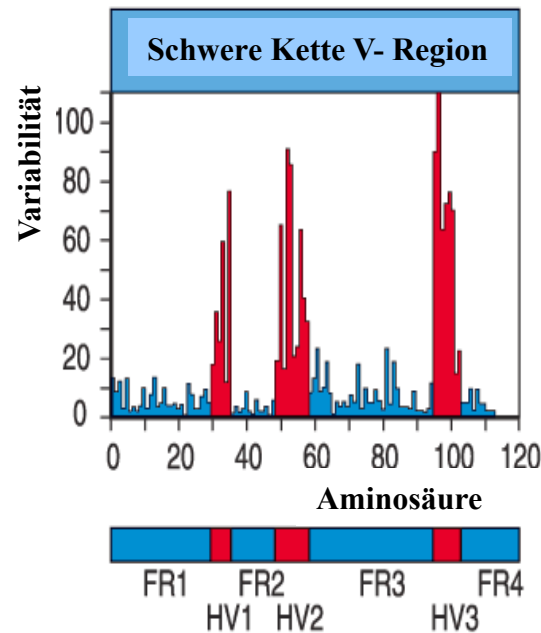
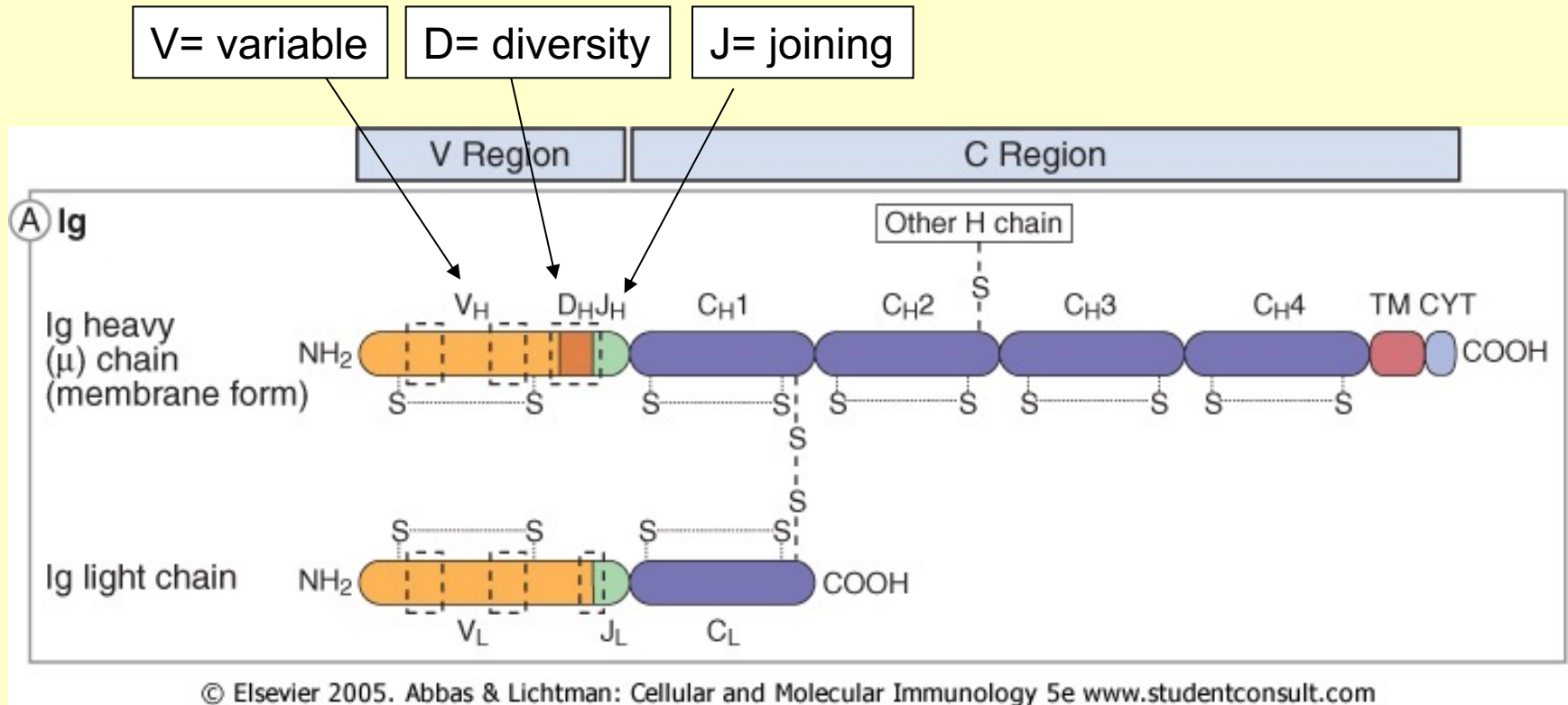


Fig 3.6 © 2001 Garland Science

Domänen der schweren und leichten Ig-Ketten



- 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.

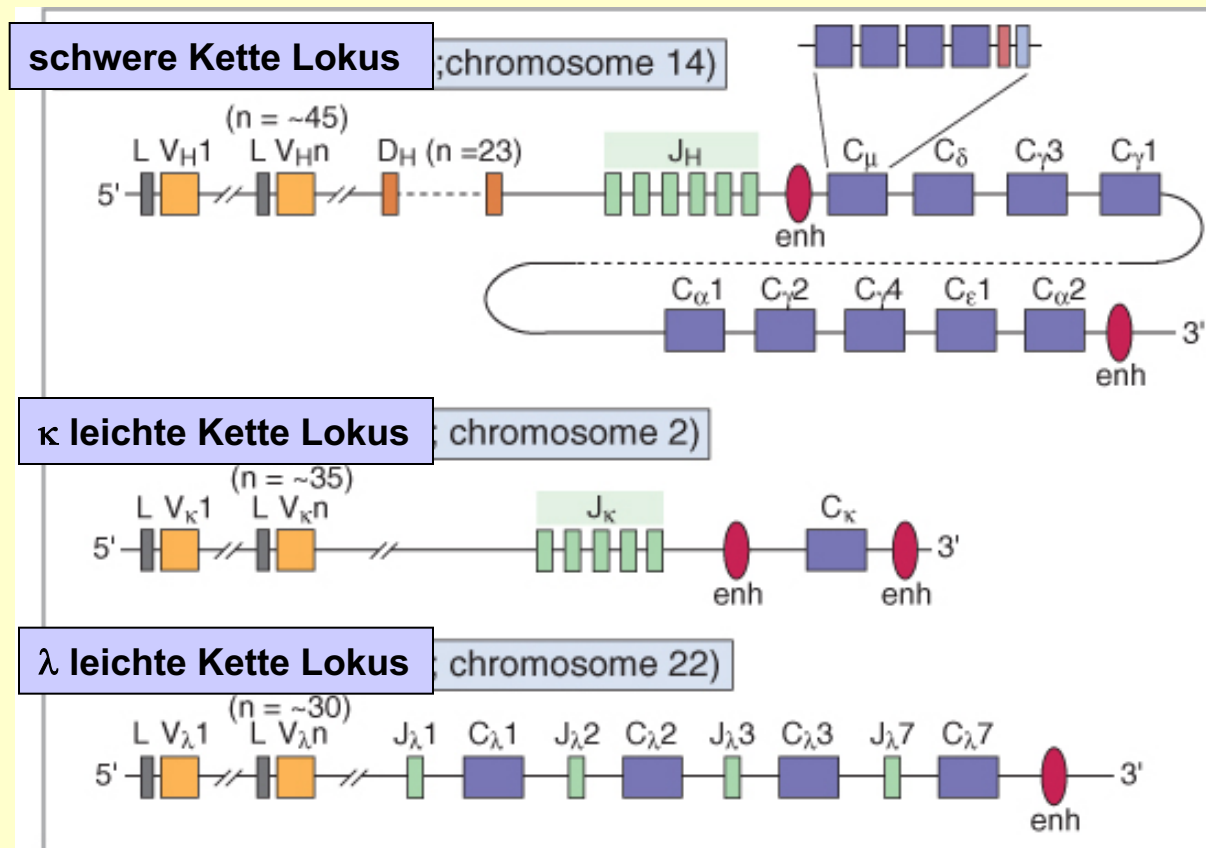
Genenorganisation des Lokus für die schwere und leichte Immunglobulinkette

V-Region:

V = Variable
D = Diversity
J = Joining
Gensegmente

C-Region:

C = Konstant
Gensegmente



C_μ - IgM

C_δ - IgD

C_γ - IgG

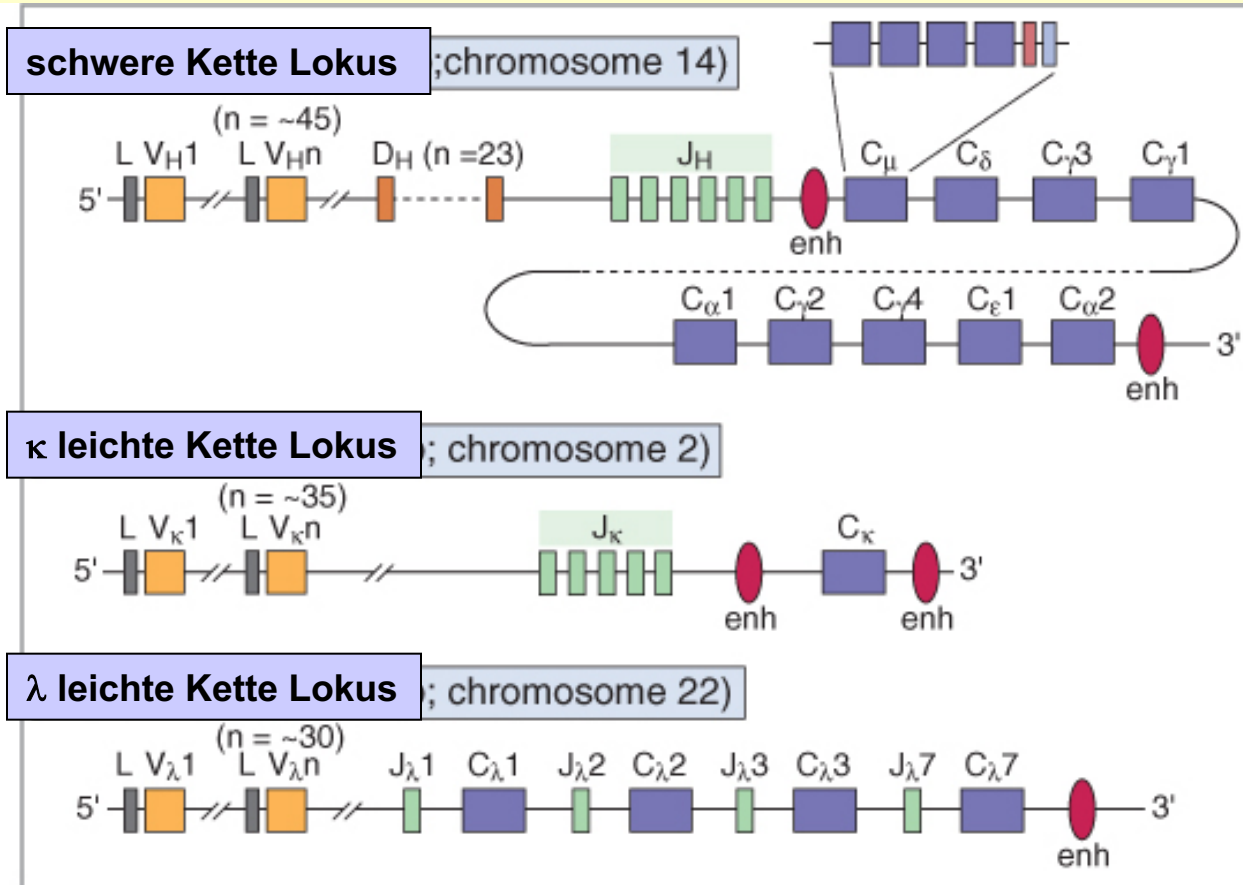
C_α - IgA

C_ε - 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

Die Keimbahn-DNA: Anzahl von V-D-J-Gensegmenten



V- Segment: 45
 D- Segment: 23
 J - Segment: 6
 C - Segment (8):
 C_μ, C_δ, C_{γ1-4},
 C_α, C_ε

V- Segment: 35
 J - Segment: 5
 C - Segment: 1

V-Segment: 30
 J - Segment: 4
 C - Segment: 4

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

Die Keimbahn-DNA wird durch **somatische Rekombination** umgelagert
 = **Rearrangement**

Ablauf der Genumlagerung (Rearrangement)

Keimbahn-DNA

DJ-verknüpfte umgeordnete DNA

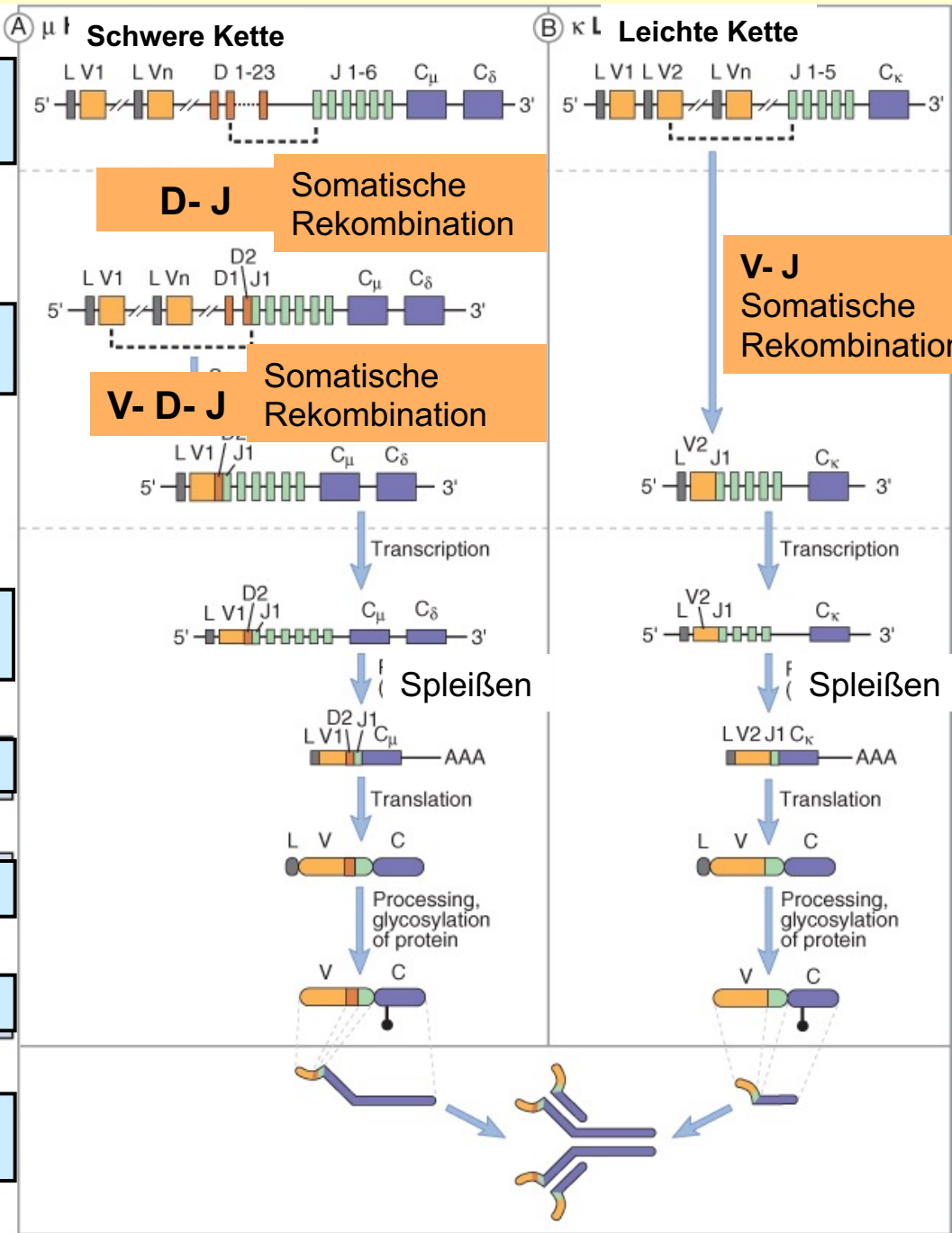
Primäres RNA Transkript

mRNA

Polypeptidkette

Reife Polypeptidkette

Ig Molekül



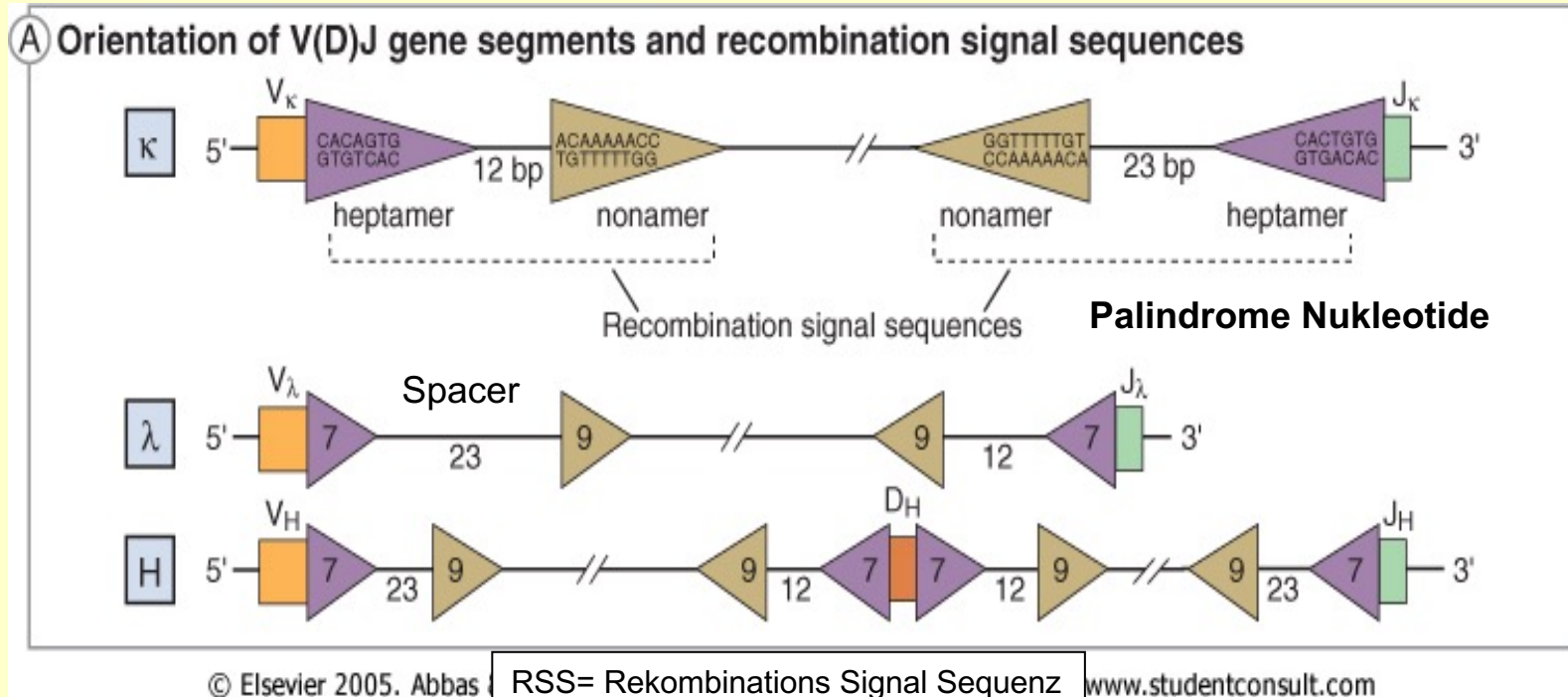
Molekularer Mechanismus der Genumlagerung

1. Schlaufenbildung
2. Spaltung der DNA - Deletion
3. Ligation der freien DNA-Enden

Beteiligte Enzyme:

- VDJ-Rekombinase: **RAG1 und -2**
- Heteromerer Proteinkomplex: **DNA-Ligase, DNA-PK, Artemis-Proteine**
- Terminale Deoxynukleotidyl-Transferase (TdT): →
N-Nukleotide-Einbau – zufällig eingefügte Nukleinsäuren

Die 12/23-Paar-Regel zur Rekombination der Gensegmente:

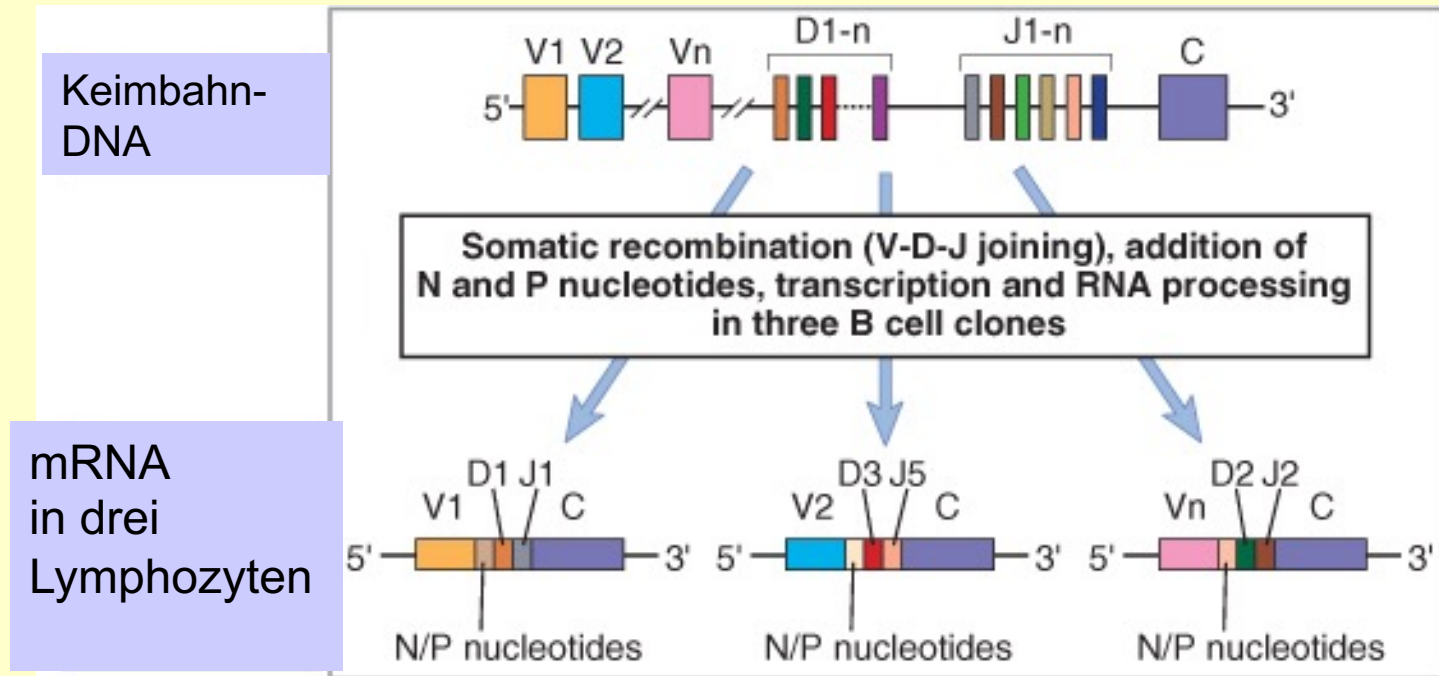


Rekombinations-Signal-Sequenz (RSS):

ist aus einem konservierten Heptamer und Nonamer zusammengesetzt, welche durch einen nicht-konservierten Abstandshalter (Spacer) von entweder 12 oder 23 Basenpaaren getrennt werden.

Dieser Abstand entspricht einer (12) bzw. zweier (23) Drehungen der DNA-Helix.

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



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

zufällige Umlagerung

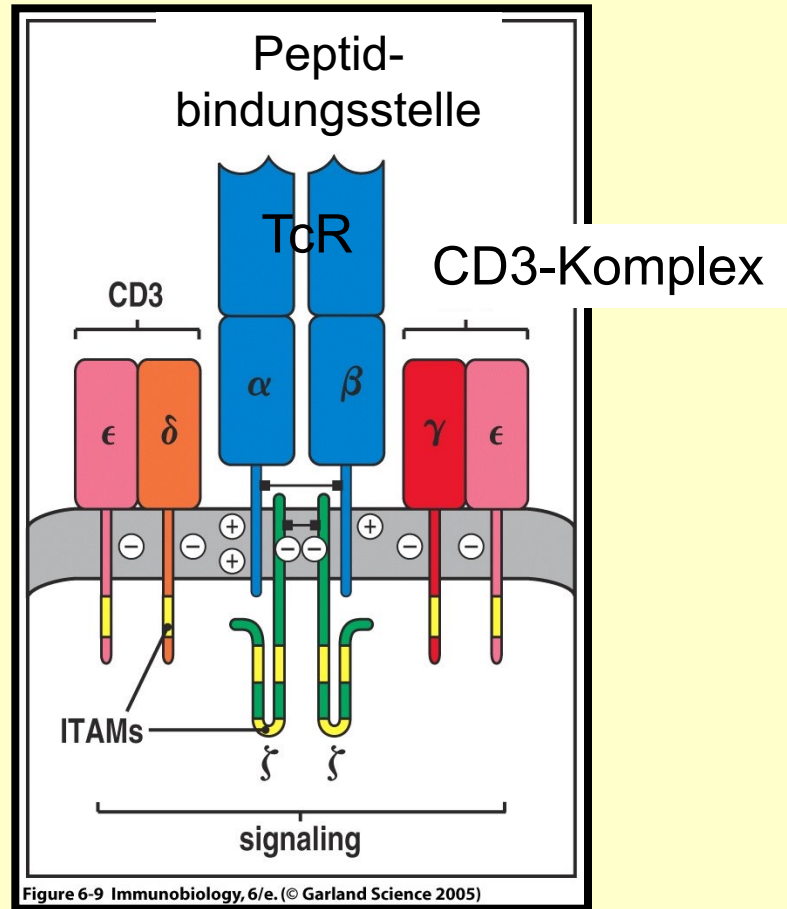
Diversität

T-Zell-Rezeptor

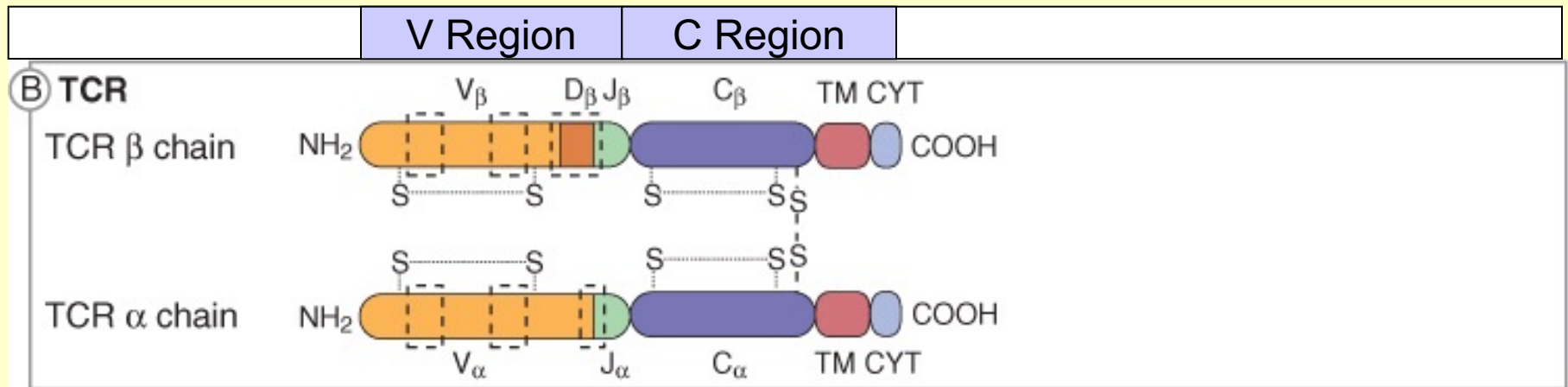
T-Zell-Typen:

1. $\alpha\beta$ TcR+

2. $\gamma\delta$ TcR+

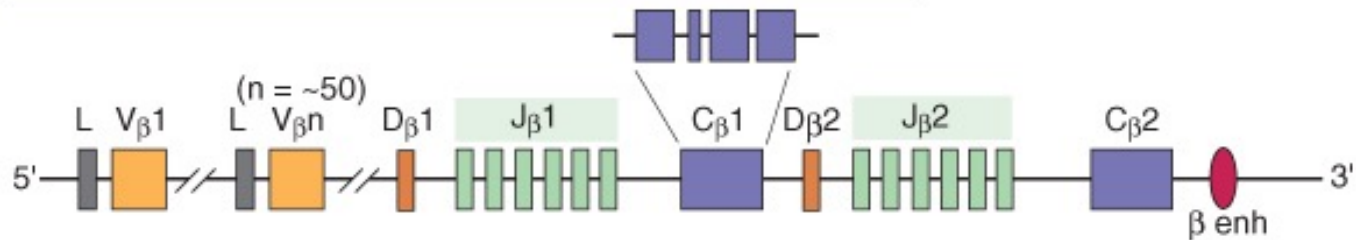


Domänen der TcR $\alpha\beta$ -Ketten

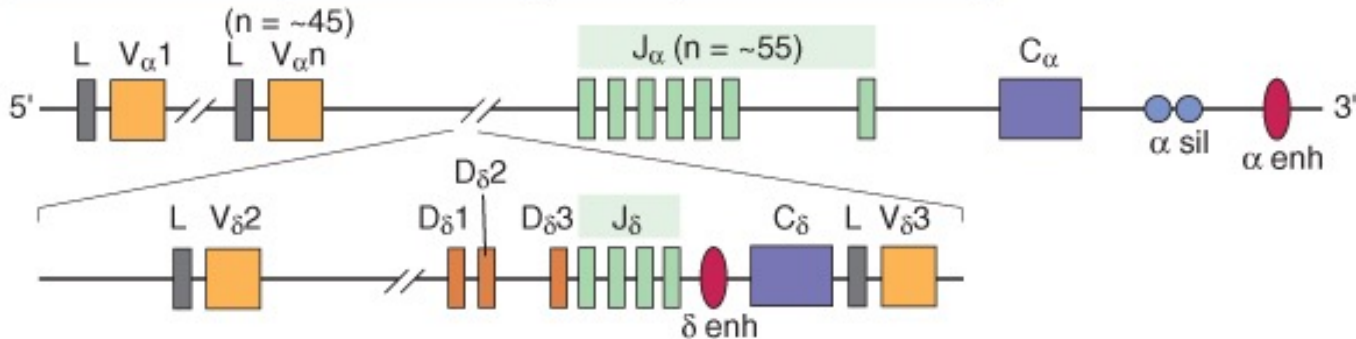


TcR-Gene – Keimbahn-DNA

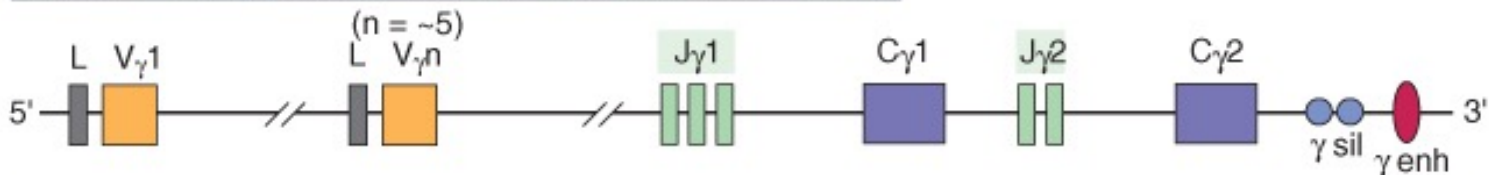
Human TCR β chain locus (620 kb; chromosome 7)



Human TCR α , δ chain locus (1000 kb; chromosome 14)

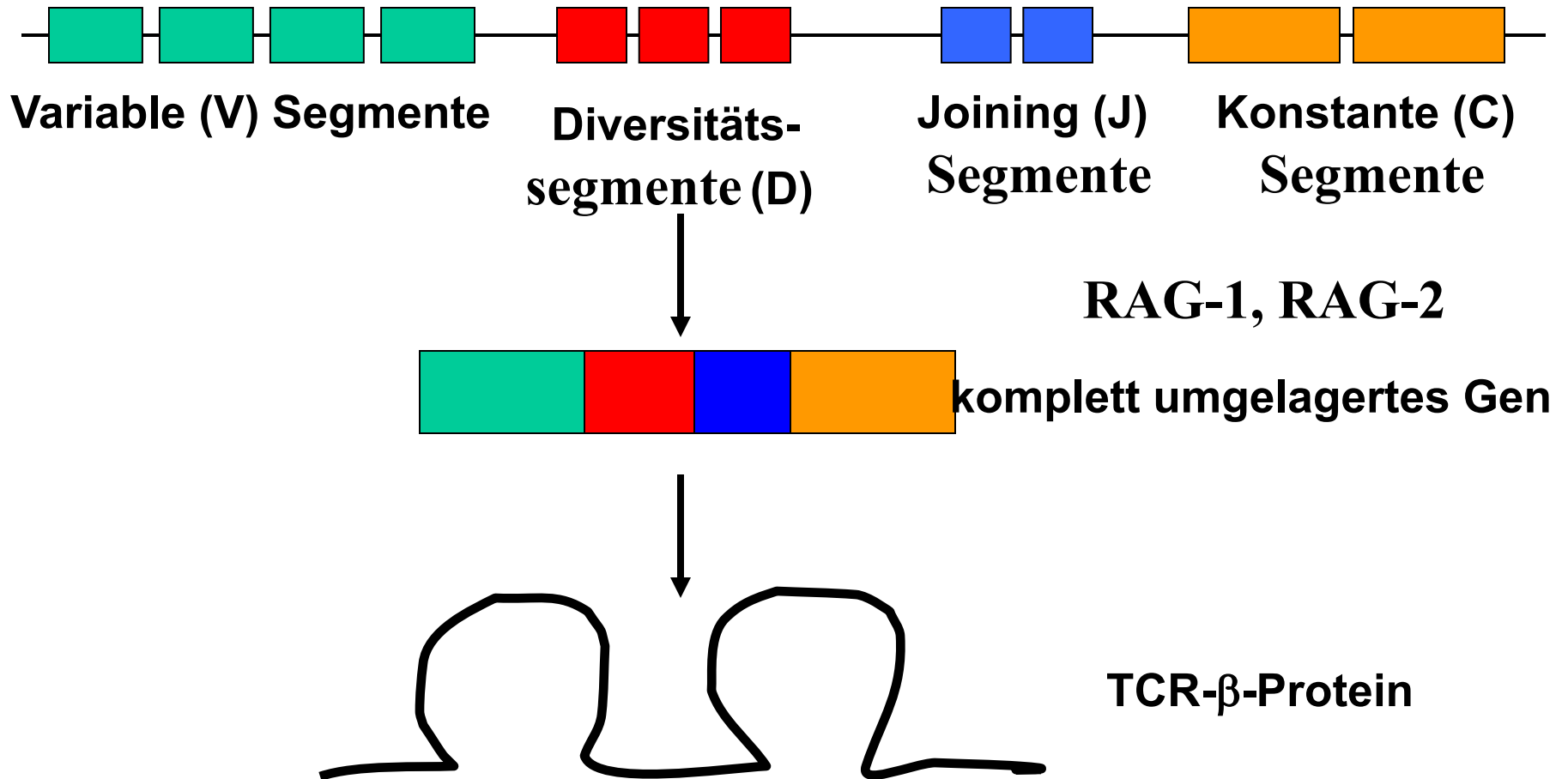


Human TCR γ chain locus (200 kb; chromosome 7)



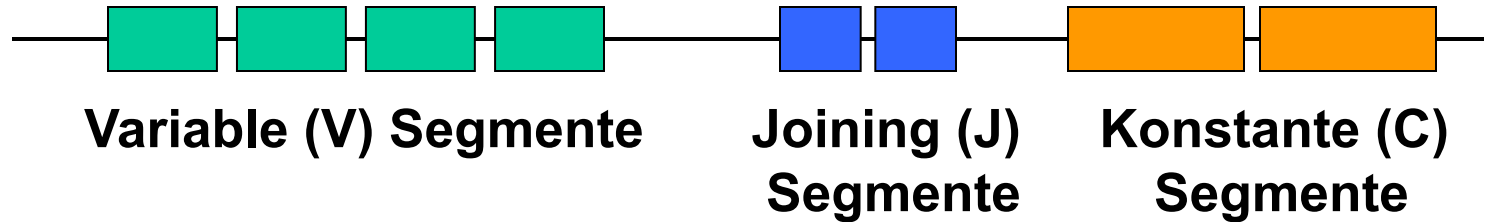
TcR-Genumlagerung I

TcR- β -Ketten-Gen

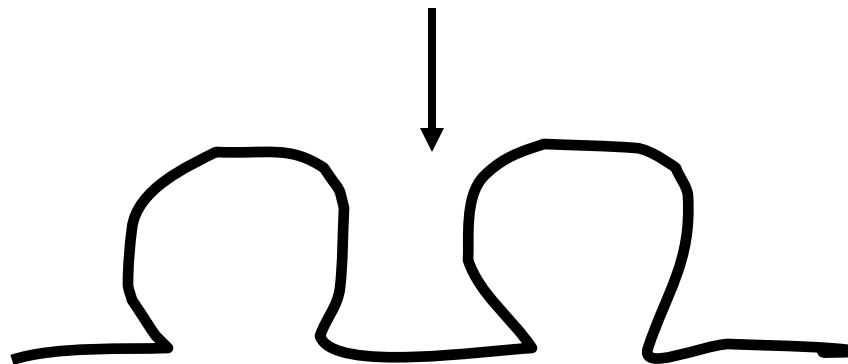


TcR-Genumlagerung II

TcR- α -Kette



1. β / γ Umlagerung
2. α / δ Umlagerung



TCR- α -Protein

TcR-Diversität

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

	<i>TCR</i> $\alpha\beta$		<i>TCR</i> $\gamma\delta$	
	α	β	γ	δ
<i>V-Gensegmente</i>	100	25	7	10
<i>D-Gensegmente</i>	0	2	0	2
<i>Offene Leseraster 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 Diversität der V-Region</i>	2500		70	
<i>Vollständiges Repertoire</i>	10^{15}		10^{16}	

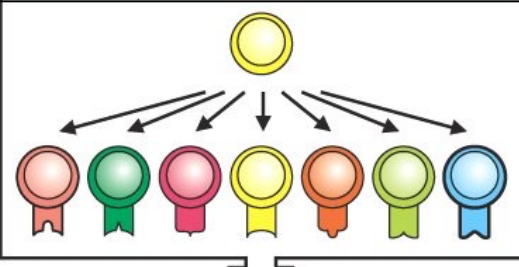
In: Gergely-Erdei: Immunbiologie in Bildern

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 α / β bzw. γ / δ).

Allgemeine Eigenschaften der Lymphozytendifferenzierung

A single progenitor cell gives rise to a large number of lymphocytes, each with a different specificity



Proliferation

Ig- oder TcR-Genumlagerung
→ Antigenrezeptor-Expression

Removal of potentially self-reactive immature lymphocytes by clonal deletion



Selektion

Primäre Lymphorgane

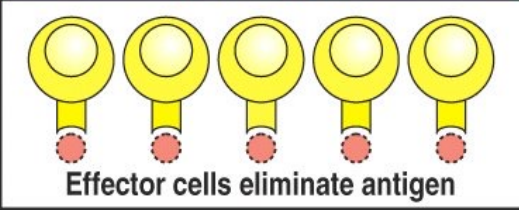
Pool of mature naive lymphocytes



Antigen-Erkennung

Periphere Lymphorgane

Proliferation and differentiation of activated specific lymphocytes to form a clone of effector cells



Proliferation

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

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

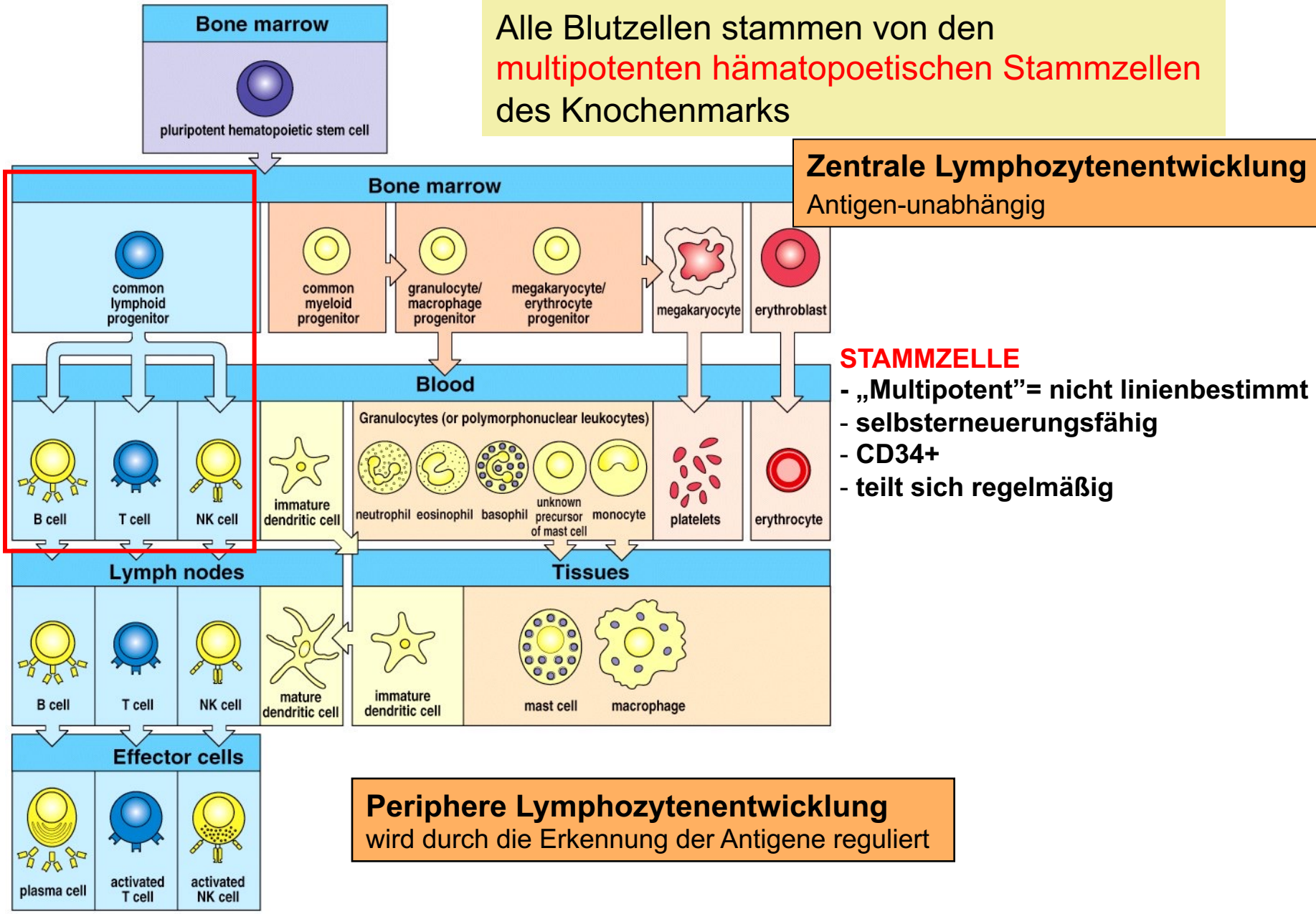
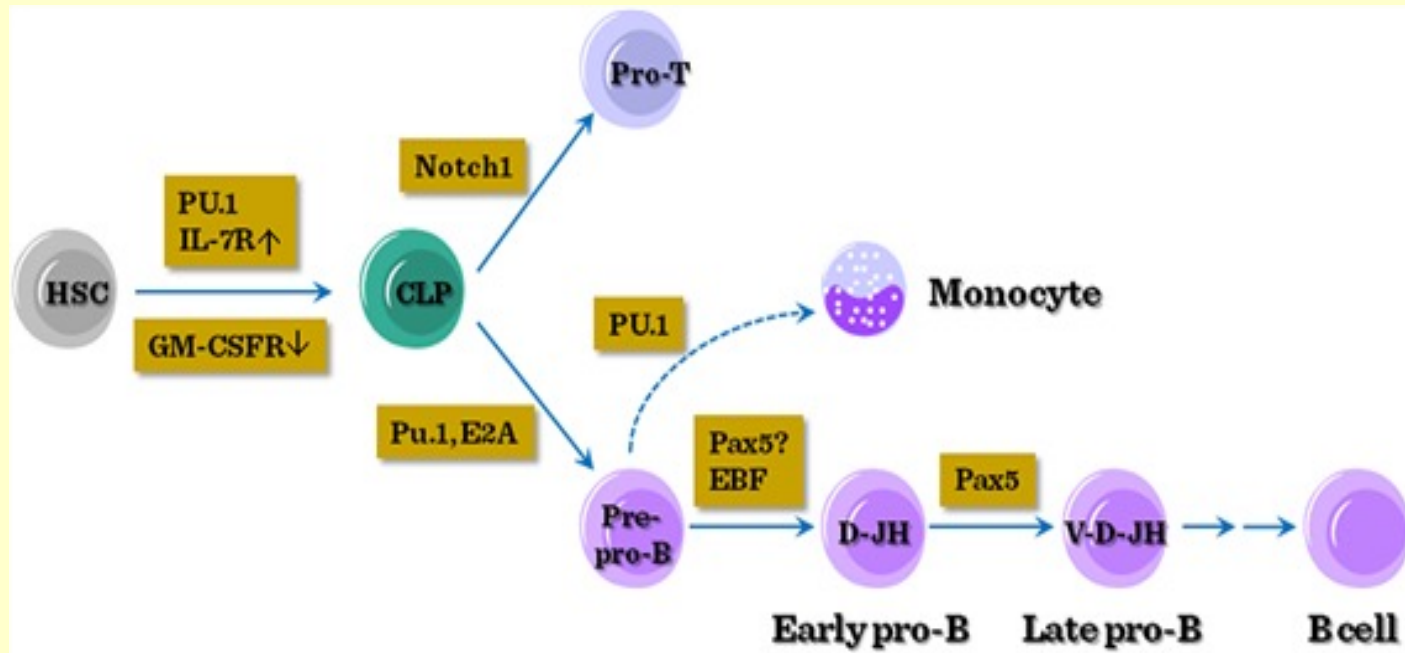


Figure 1-3 Immunobiology, 6/e. (© Garland Science 2005)

Allgemeine Eigenschaften der Lymphozytendifferenzierung

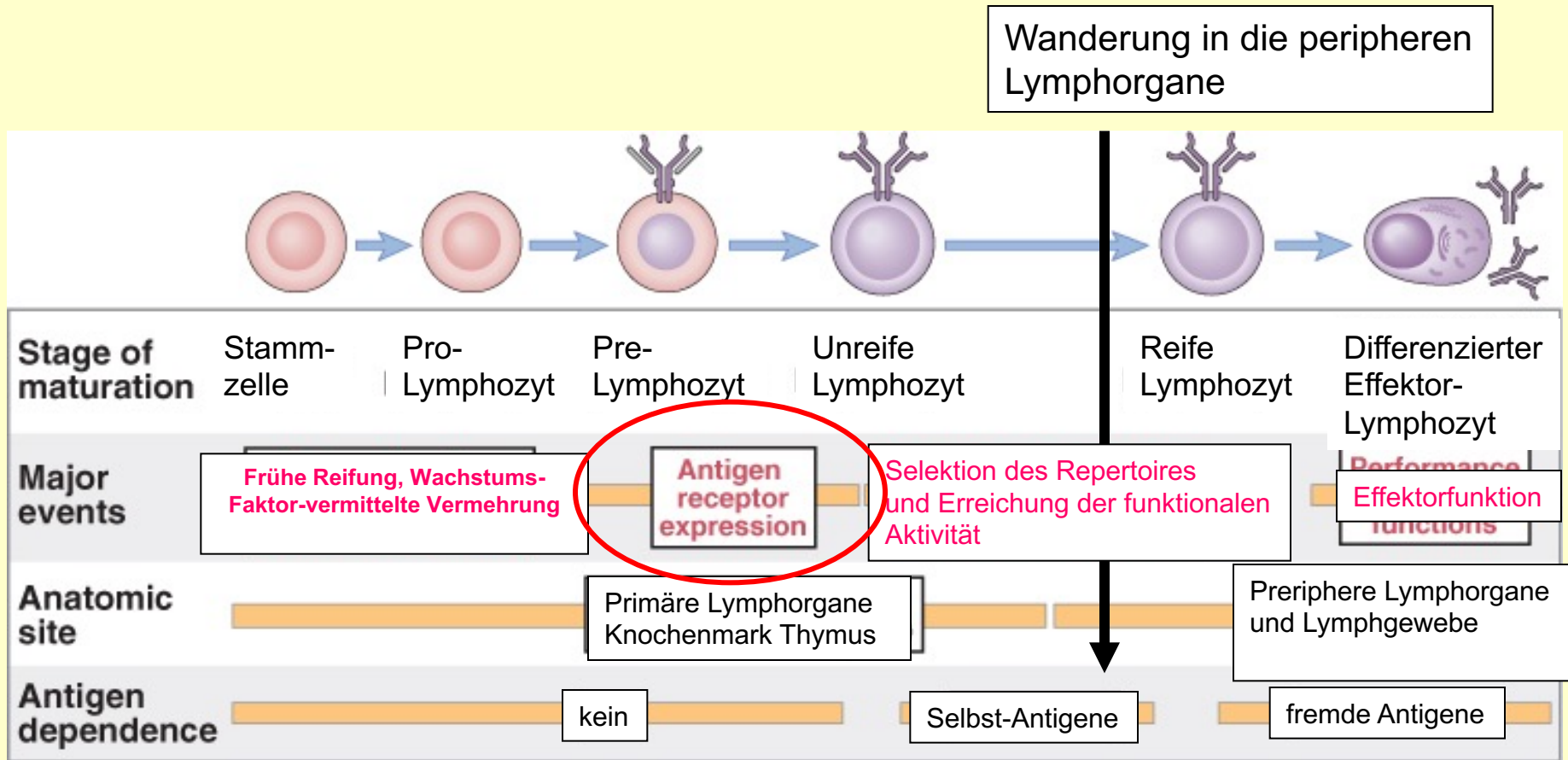
1. **Proliferation**
2. **Rezeptor-Genumordnung**, Expressierung von funktionellen Antigenrezeptoren (Antikörpern) auf der Zelloberfläche
3. **Wanderung (Migration)** – *Knochenmarksstroma* (Adhäsion, Chemokinproduktion)
4. **Selektion** der potenziellen autoreaktiven Zellen
5. **Apoptose**

Lymphatische Verpflichtung - Transkriptionsfaktoren



von: Transdifferentiation and regenerative medicine (Prof. Dr. Péter Balogh, Dr. Péter Engelmann (2011); University of Pécs)

Stadien der Lymphozytenreifung



Die B-Zell-Entwicklung

1. Zentrale: Antigen-unabhängig - im Knochenmark

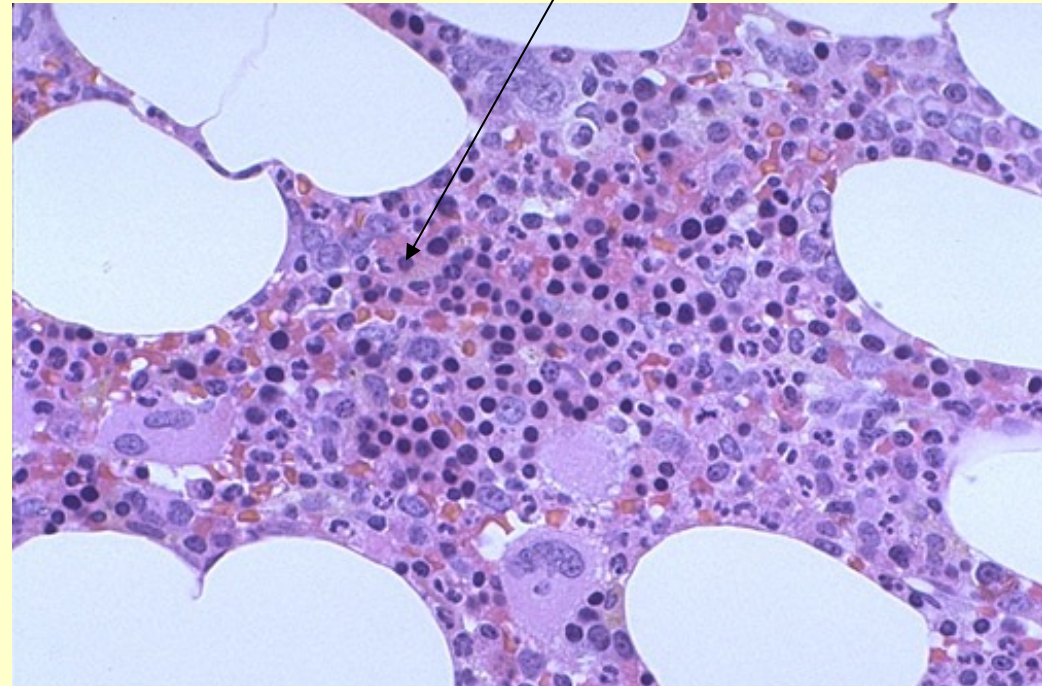
2. Peripherie: von Antigen reguliert - in sekundären lymphatischen Geweben

Knochenmark

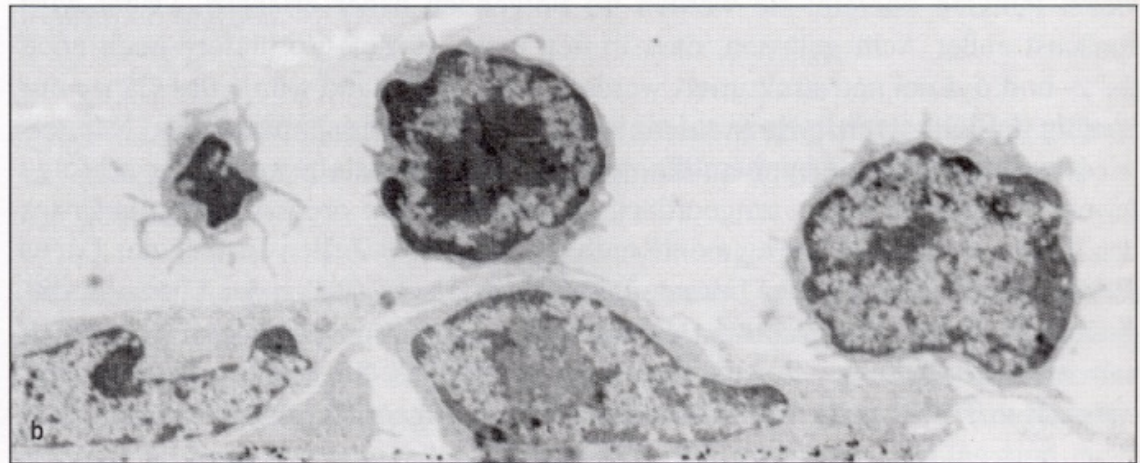
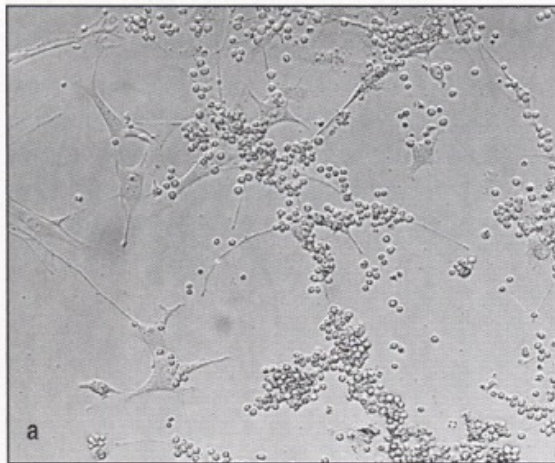
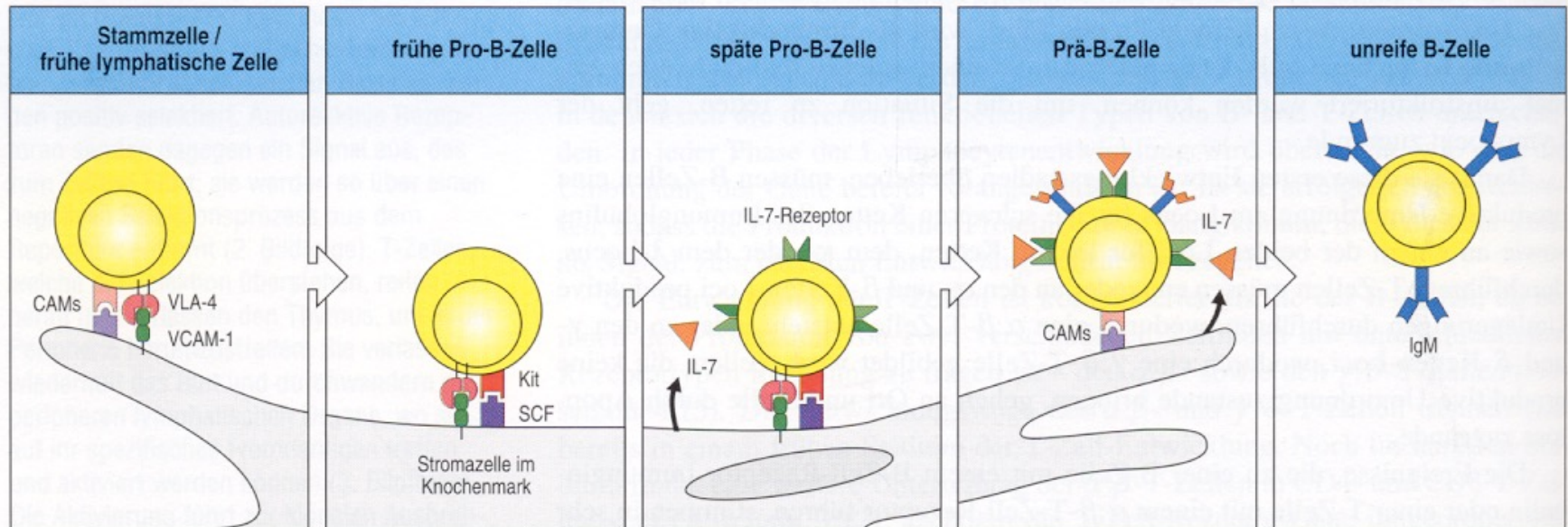
Stromazellen:

- 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"

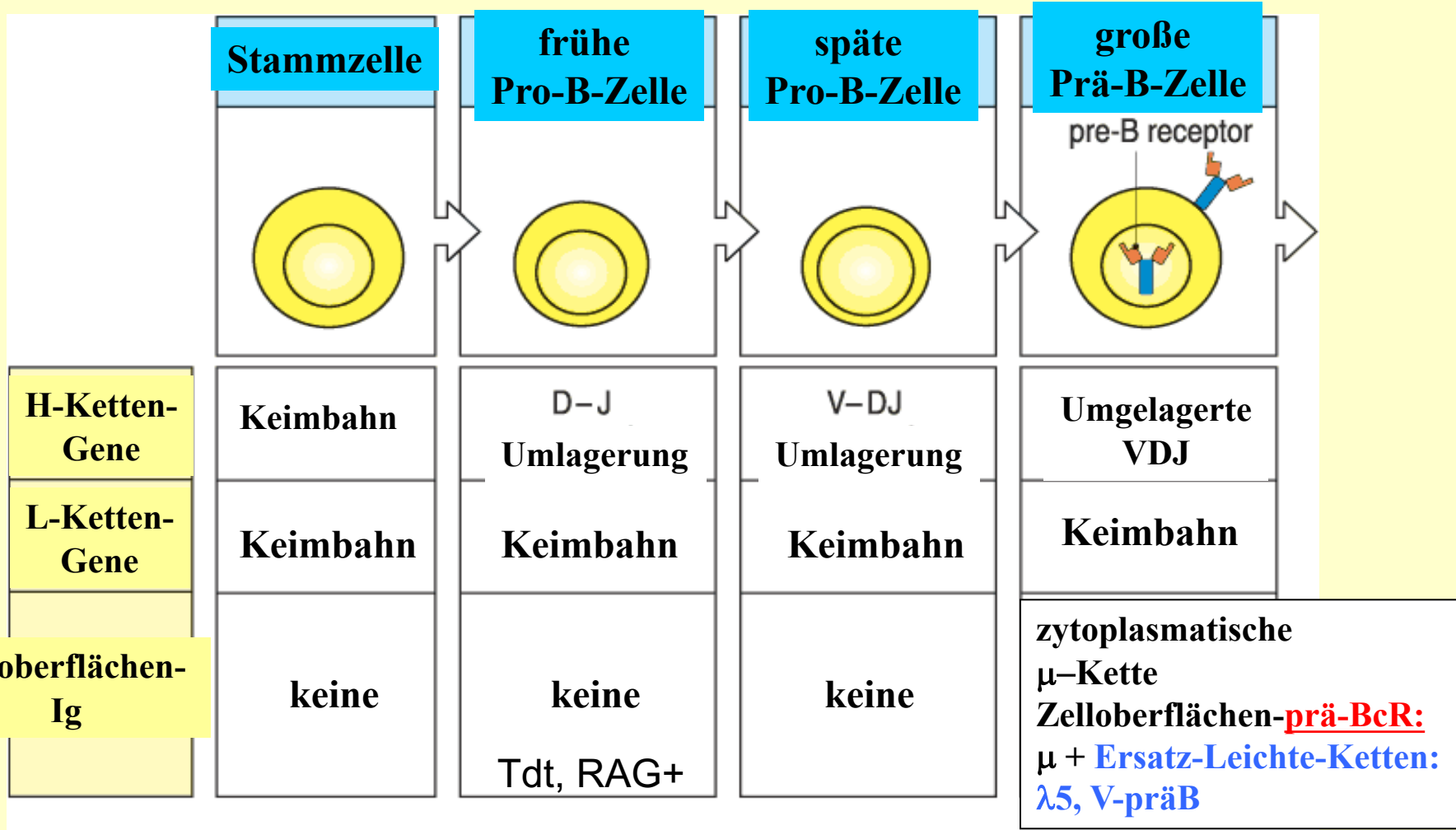


Fig 7.5 part 1 of 2 © 2001 Garland Science

Zelloberflächen-moleküle

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

CD22, CD25

Knochenmark II: "kleine prä-B-Zelle" > "reife B-Zelle"

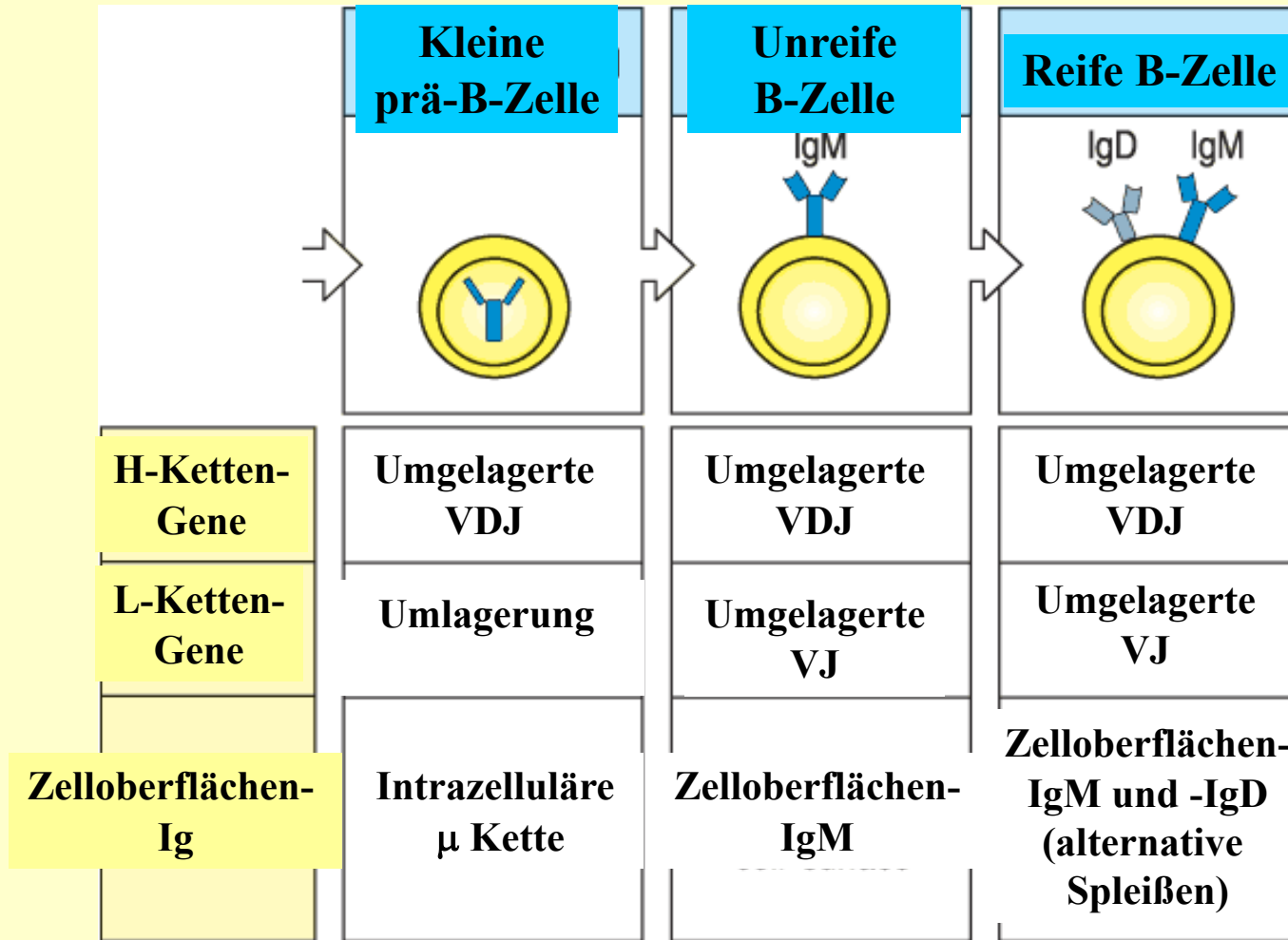


Fig 7.5 part 2 of 2 © 2001 Garland Science

Zelloberflächen-moleküle

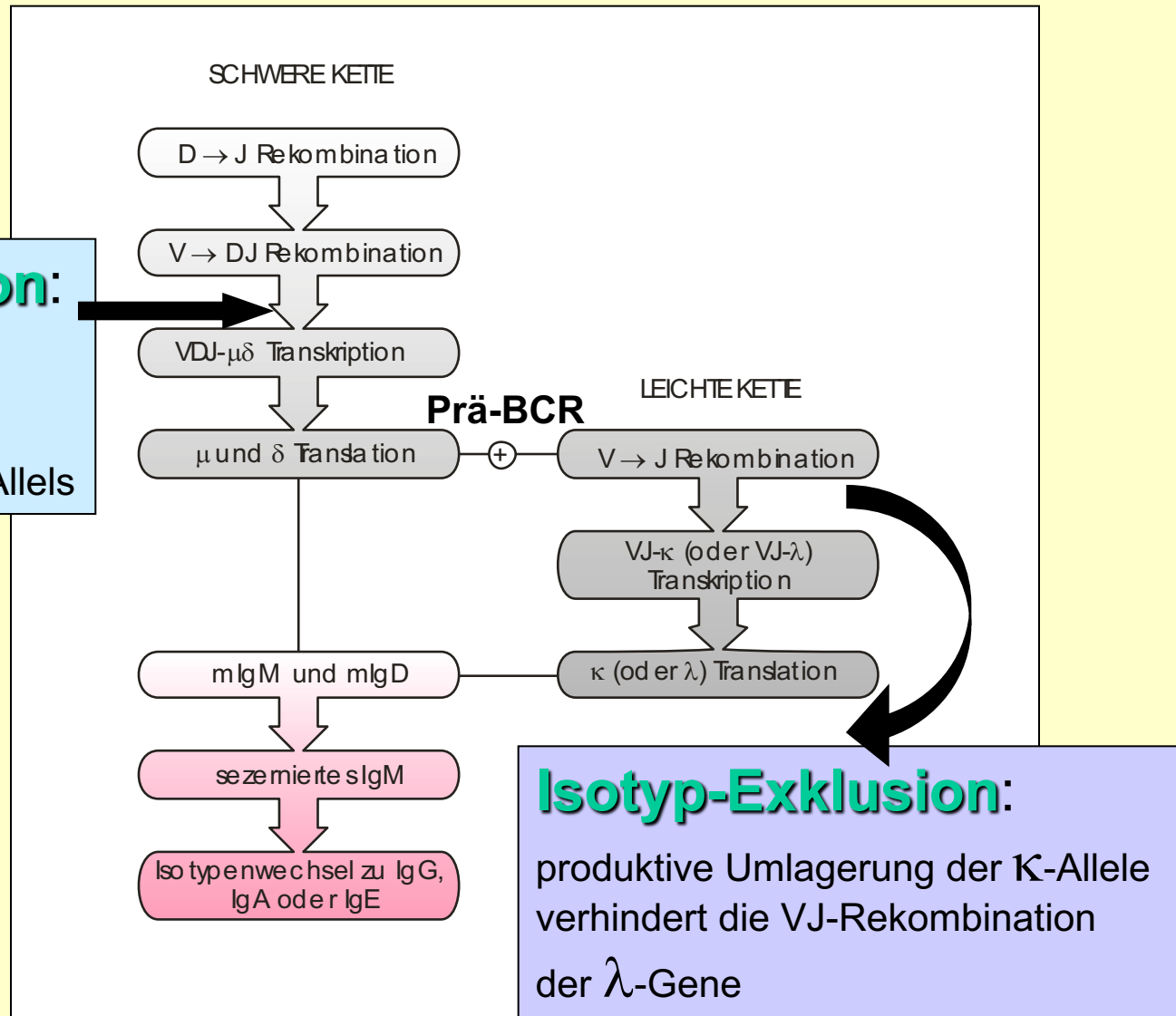
CD19, CD20

CD25

MHC-II, CD21, CD40

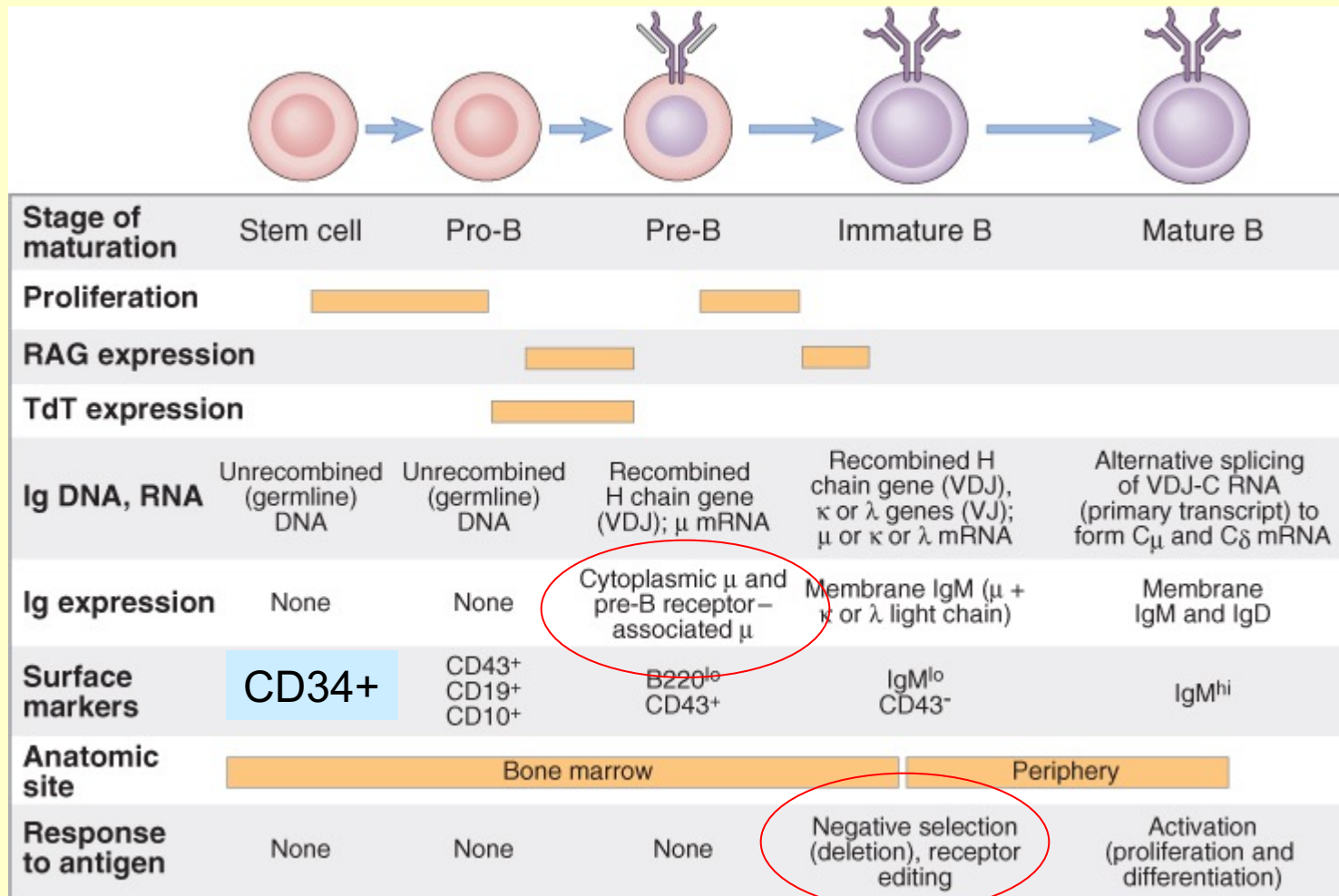
Ordnung der Ig-Genrearrangierung

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

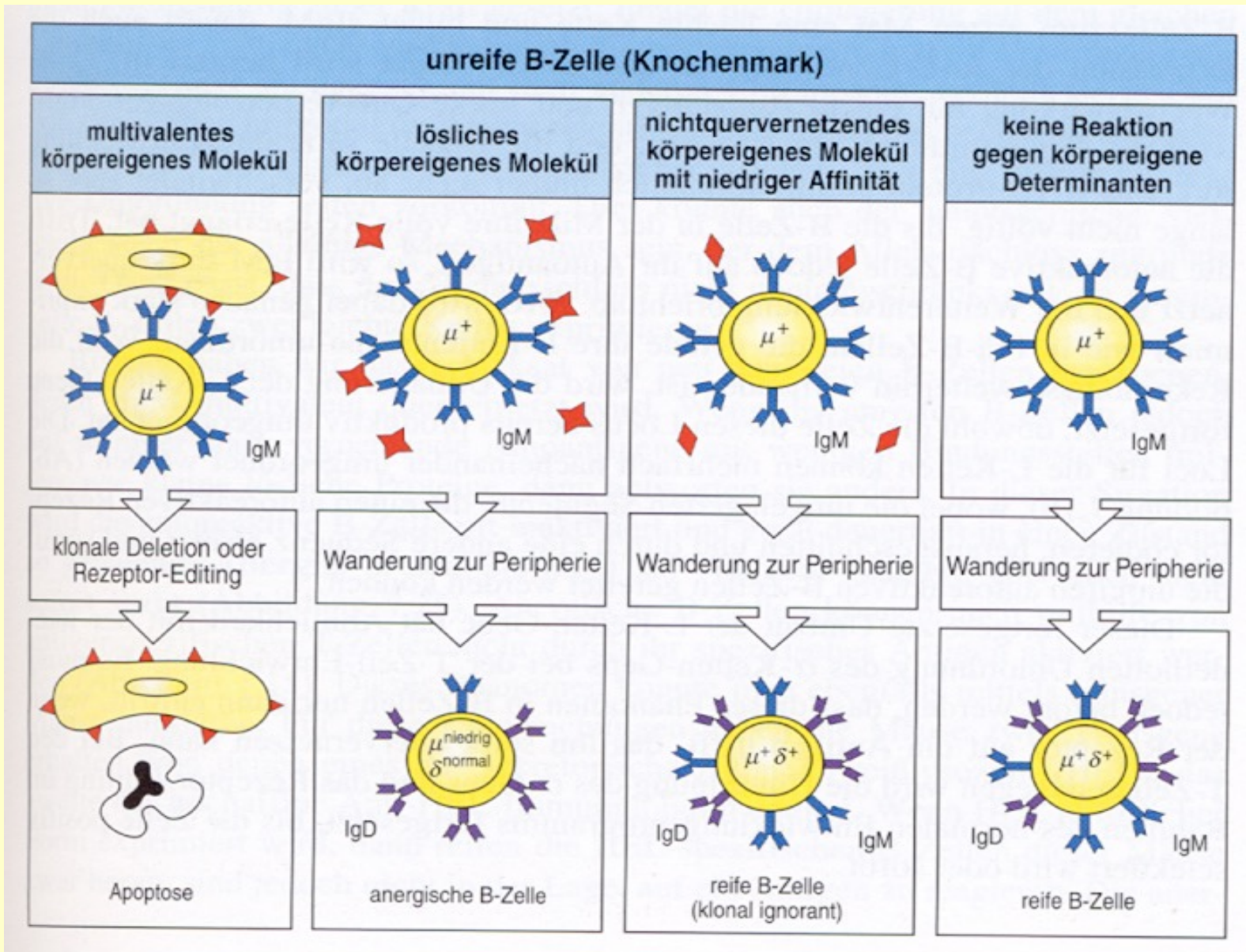


Jede lymphoide Zelle besitzt nur eine einzige Rezeptorspezifität.

Selektionsprozesse im Knochenmark



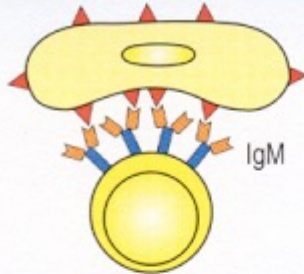
Selektionsprozesse im Knochenmark



„Receptor editing“

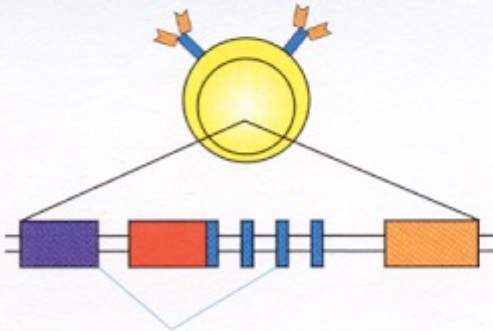
1.

körpereigenes Antigen fest an IgM gebunden



2.

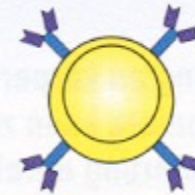
B-Zell-Entwicklung gestoppt, fortgesetzte Umordnung der L-Kette: wenig IgM auf der Zelloberfläche



eine neue Rezeptorspezifität wird exprimiert

3.

eine neue Rezeptorspezifität wird exprimiert

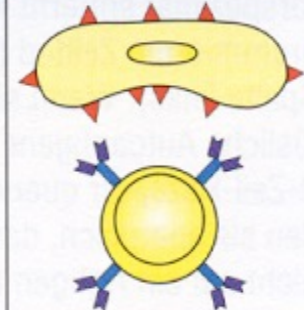


4.

reagiert der neue Rezeptor immer noch gegen körpereigene Determinanten, unterliegt die B-Zelle der Apoptose

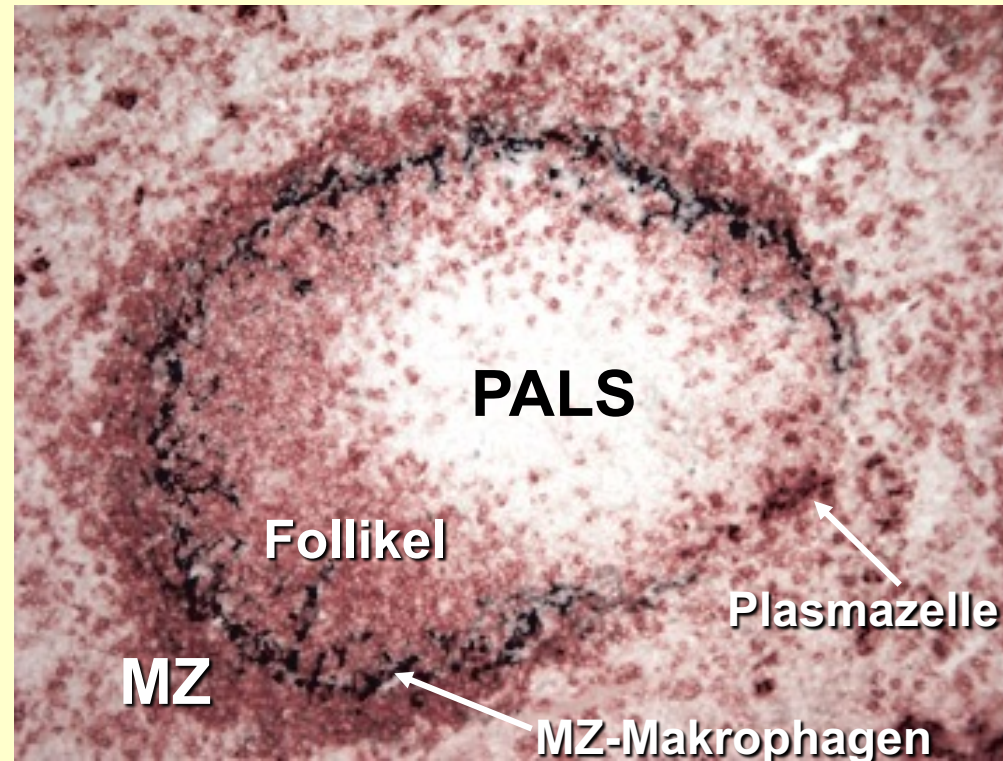


reagiert der neue Rezeptor nicht mehr auf körpereigene Determinanten, wandert die unreife B-Zelle zur Peripherie und reift dort heran



Ontogenetische Differenz von peripheren B-Zellklassen

- **Konventionelle folliculäre B-Zellen (B2):** (IgM+/IgD++, CD21+, CD23++, Rezirkulation)
- **B-1 B-Zellen:** Selbsterneuerung, niedrige Affinität
Autoantikörperproduktion, Ansiedlung im Brust- und Bauchbereich, relatives Gewicht bei Neugeborenen (und in B-CLL); (CD5+, CD43+, IgM++/IgD+)
- **Marginale-Zonen-B-Zellen:**
ähnlich dem B1-Zellen-Ig-Phenotyp, Differenzierung in der Milz, keine Migration (IgM++/IgD+, CD21++, CD23+/-)



Eigenschaften der B1- und B2-Zellen

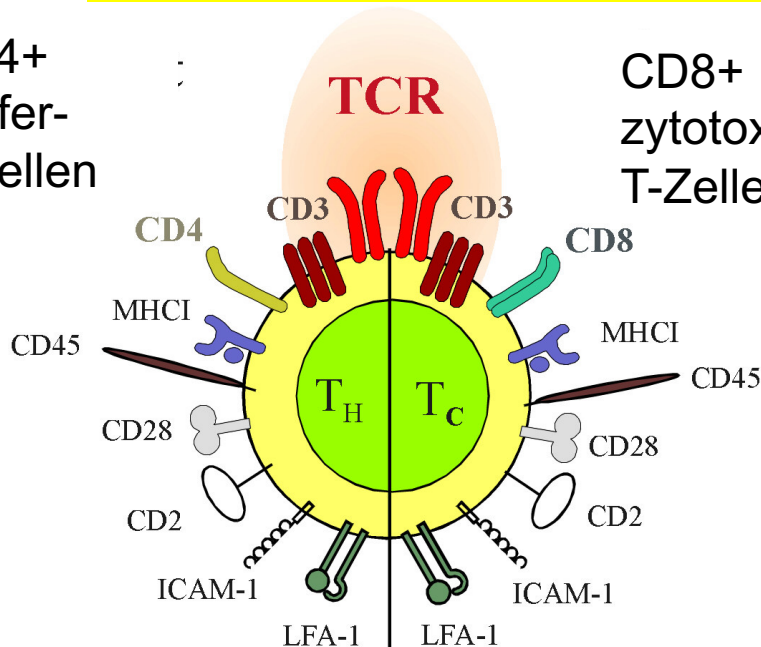
Eigenschaft	B-1-Zellen	konventionelle B-2-Zellen
zum ersten Mal produziert	Fetus	nach der Geburt
N-Bereiche in VDJ-Verbindungen	wenige	zahlreiche
Repertoire des V-Bereichs	eingeschränkt	vielfältig
primäre Lokalisation	Körperhöhlen (peritoneal, pleural)	sekundäre lymphatische Organe
Art der Erneuerung	selbsterneuernd	ersetzt aus dem Knochenmark
spontane Immunglobulinproduktion	stark	schwach
sezernierte Isotypen	IgM >> IgG	IgG > IgM
Reaktion auf Kohlenhydratantigen	ja	unter Umständen
Reaktion auf Proteinantigen	unter Umständen	ja
Hilfe von T-Zellen erforderlich	nein	ja
somatische Hypermutation	niedrig bis überhaupt nicht	stark
Gedächtnisentwicklung	Wenig bis überhaupt nicht	ja

Die zentrale (thymische) T-Zell- Entwicklung

Zwei verschiedene T-Zell-Linien mit unterschiedlichen Rezeptortypen (TcR)

T-Lymphozyten mit $\alpha\beta$ TcR

CD4+
Helfer-
T-Zellen



CD8+
zytotoxische
T-Zellen

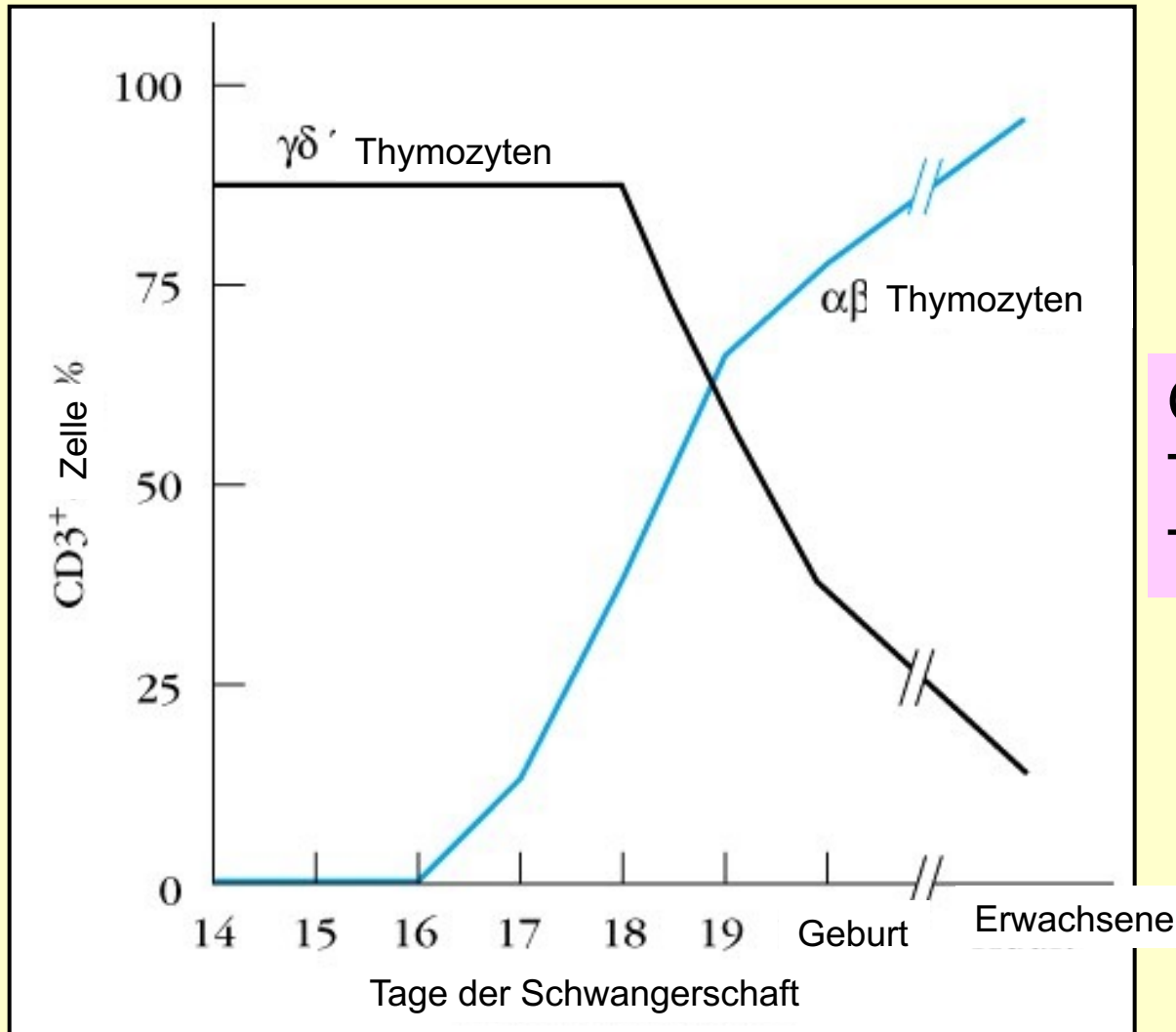
T-Lymphozyten mit $\gamma\delta$ TcR

- CD4-CD8- zytotoxische
T-Zellen

Intraepitheliale – mit
geringer TcR-Diversität

Lymphatische Organe -
stark diversifizierte
Rezeptoren
Regulatorische
Zytokinproduktion

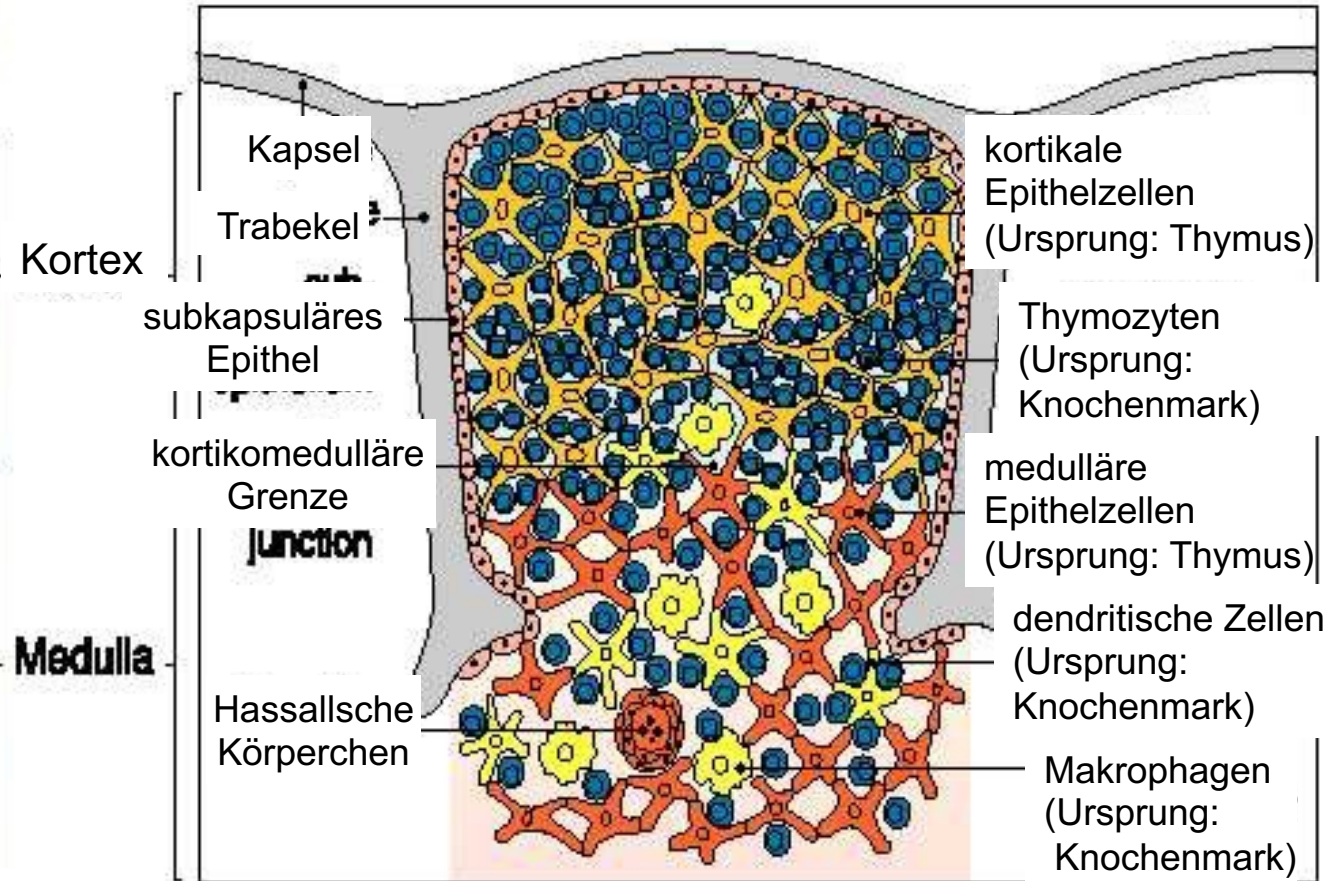
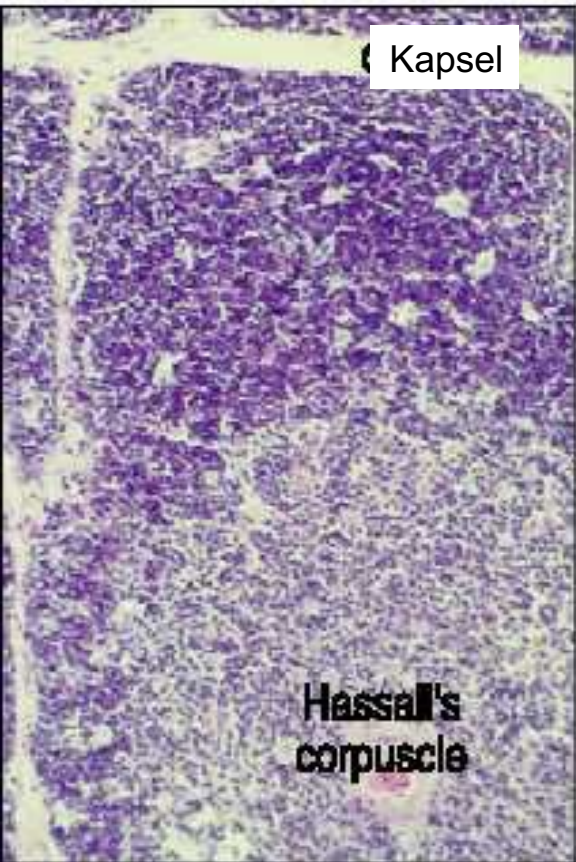
Zahl der T-Zellgruppen während der Entwicklung des Individuums



Ganzes Repertoire:
TCR α , β : 10^{15}
TCR γ , δ : 10^{16}

Struktur des Thymus

Figure 5.3



Funktion der Stromazellen

Kortikale Epithelzellen:

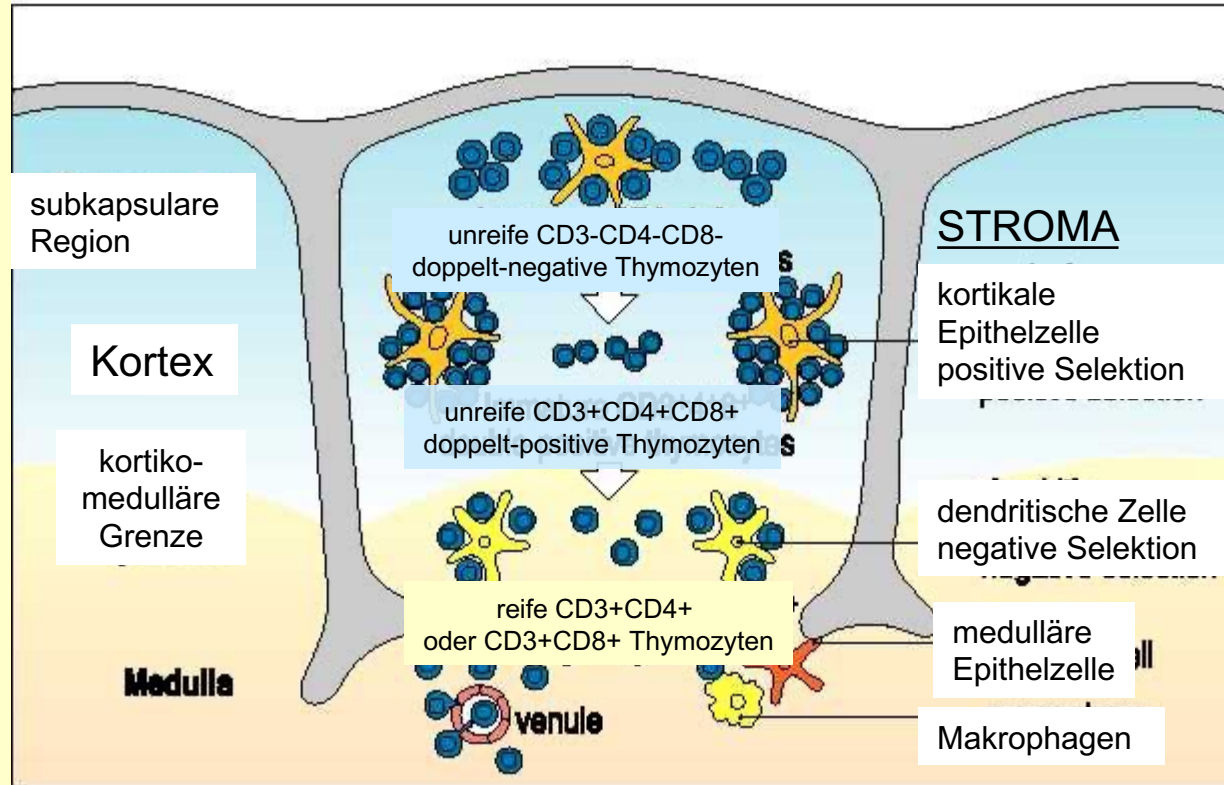
- chemotaktische Signale für hämatopoetische Vorläuferzellen zu bilden
- Überlebens und Differenzierungssignalen zu bilden
- Sie präsentieren Selbst-Antigenen zur positiven Selektion

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 %

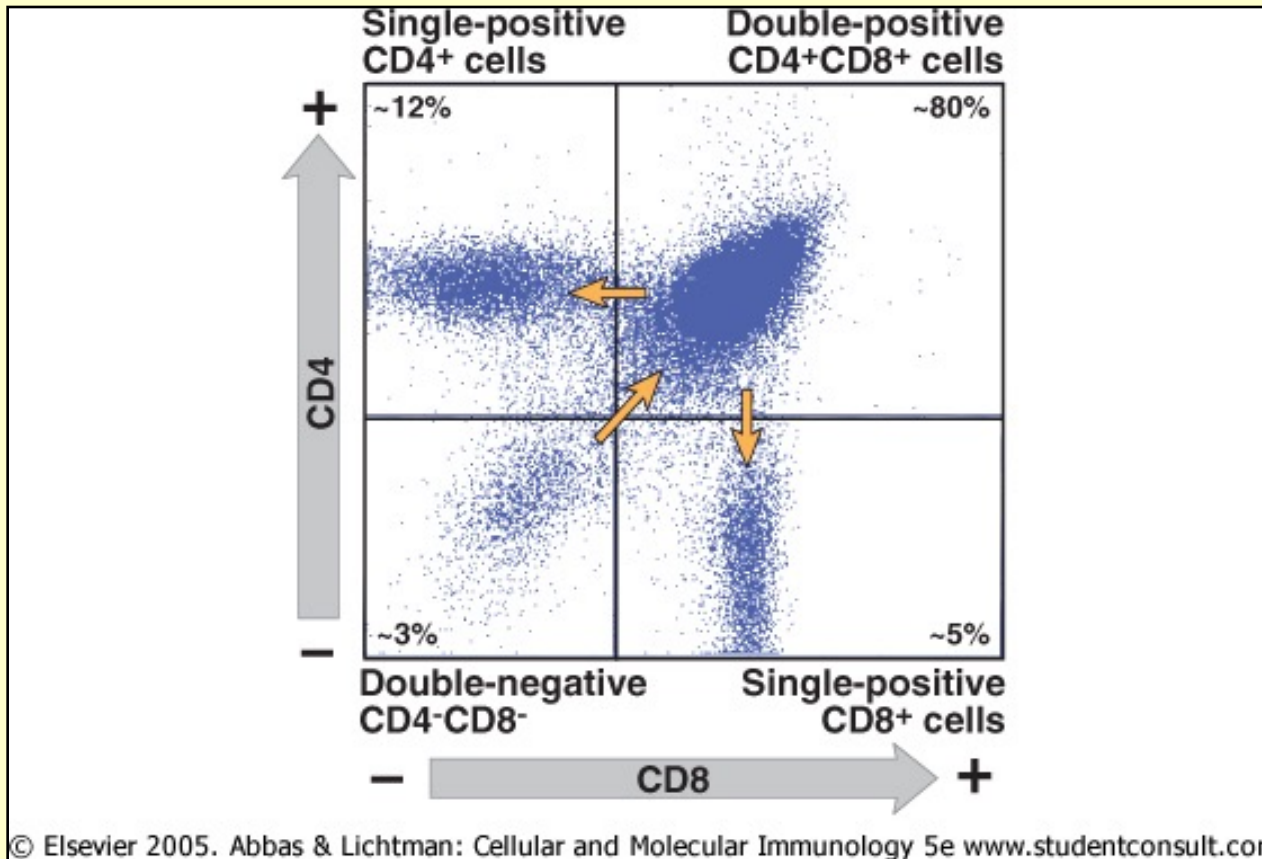
doppelt-positive
DP: 75-80%

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

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

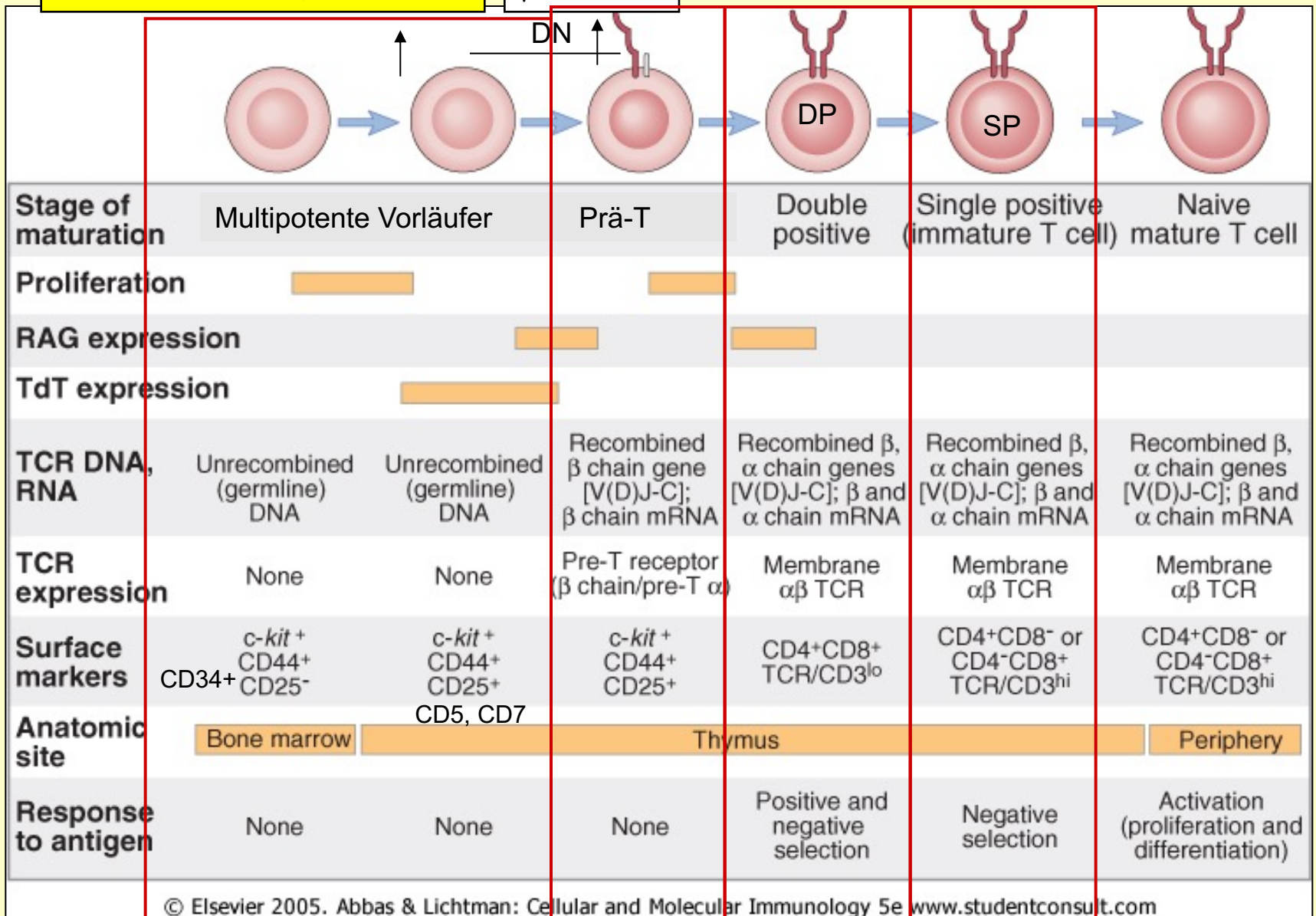
$1-2 \times 10^6$ reife T-Zellen wandern täglich zur Peripherie.

Thymozytengruppen



Dendritische Zellen, NK-Zellen

$\gamma\delta$ T-Zellen

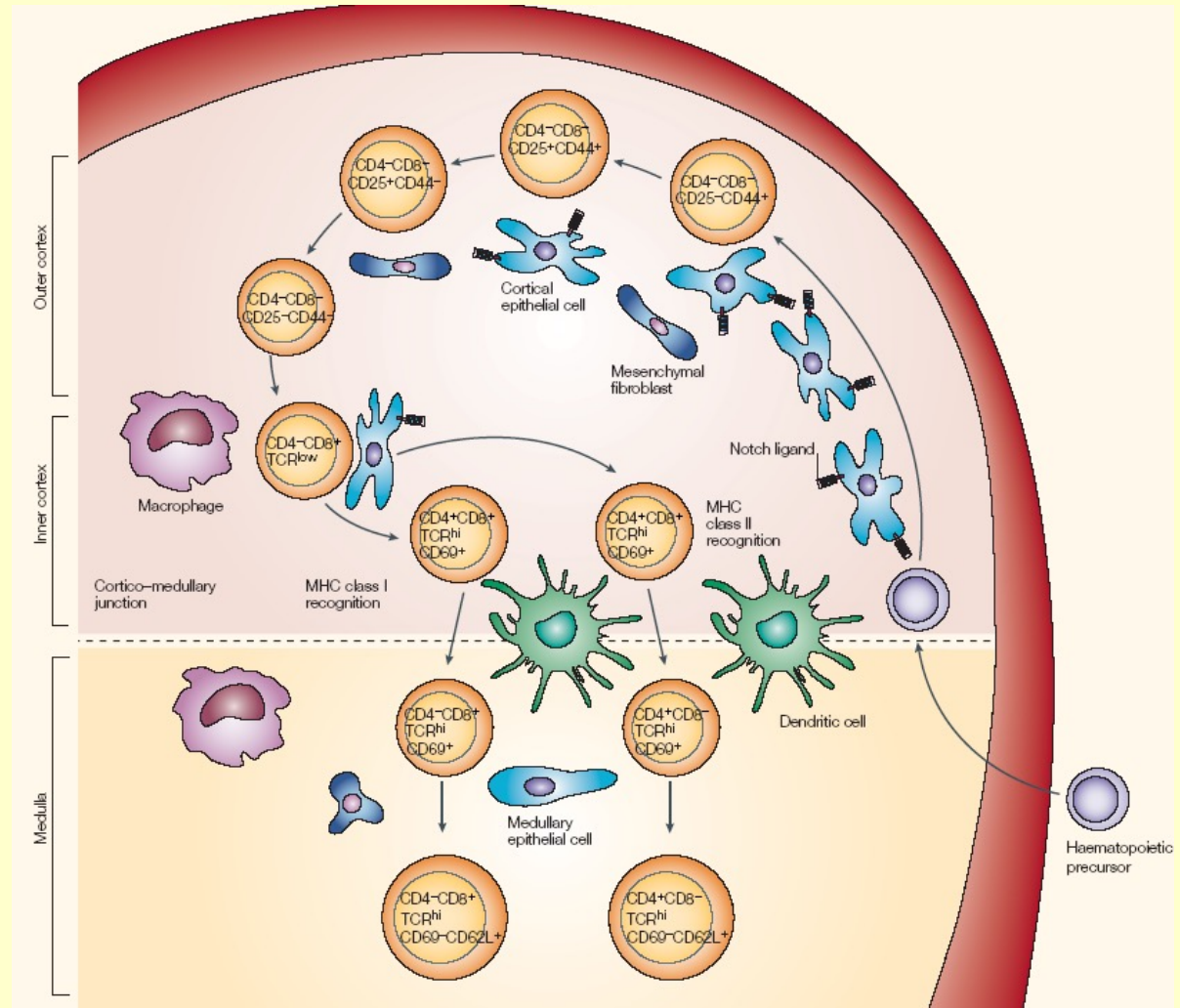


Regulation von Thymozyten-Reifungsprozessen

- **Zelloberflächenmoleküle** - Adhäsionsmoleküle (CD44), CD28 – B7.1/7.2 , Notch – Notch-Ligand-Wechselwirkungen, Chemokinrezeptoren
- **Humorale Faktoren** – Zytokine (IL-7), Chemokine, Thymozine, Prothymozin- α , Thymulin (FTS-Zn), Thymopoietin, Thymostimulin (TP-1), thymisch humoraler Faktor (THF) und THF-g2, Glukokortikoid-Hormone (GC)

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

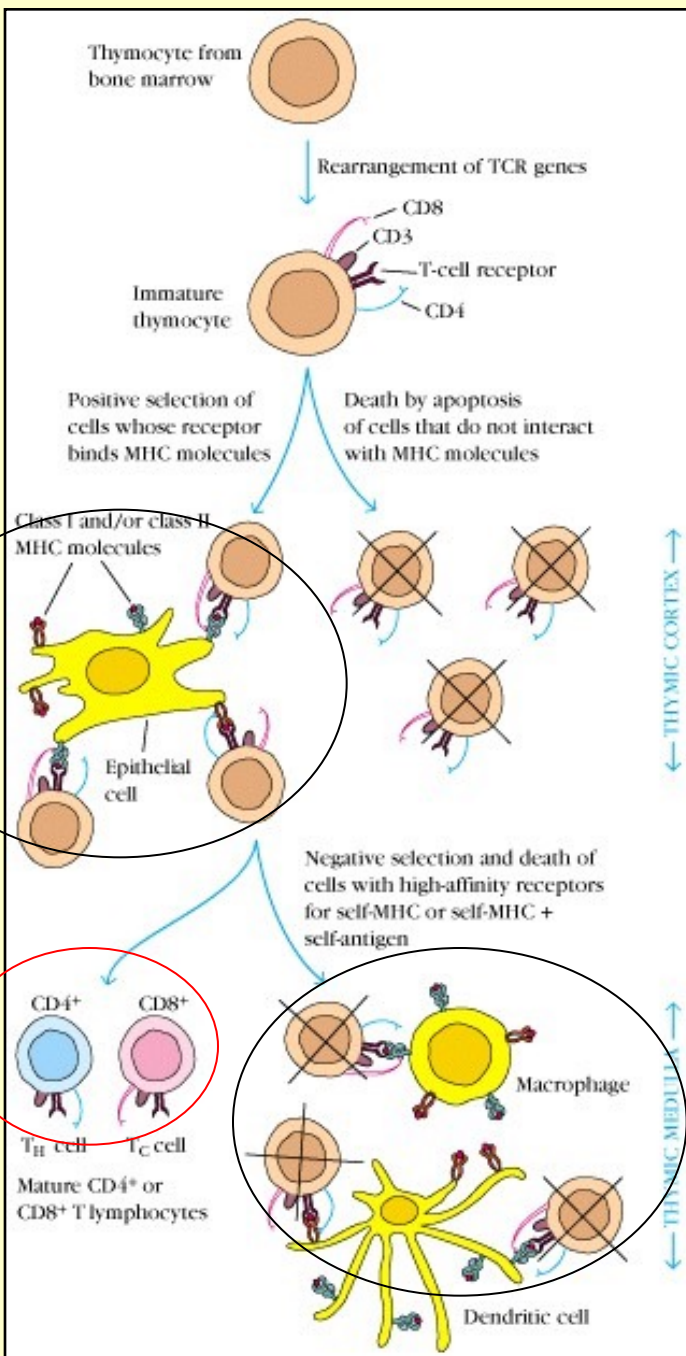
DP-Zellen, die Selbst-MHC-Moleküle erkennen können, werden überleben
→ **MHC-RESTRIKTION**

Negative Selektion:

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

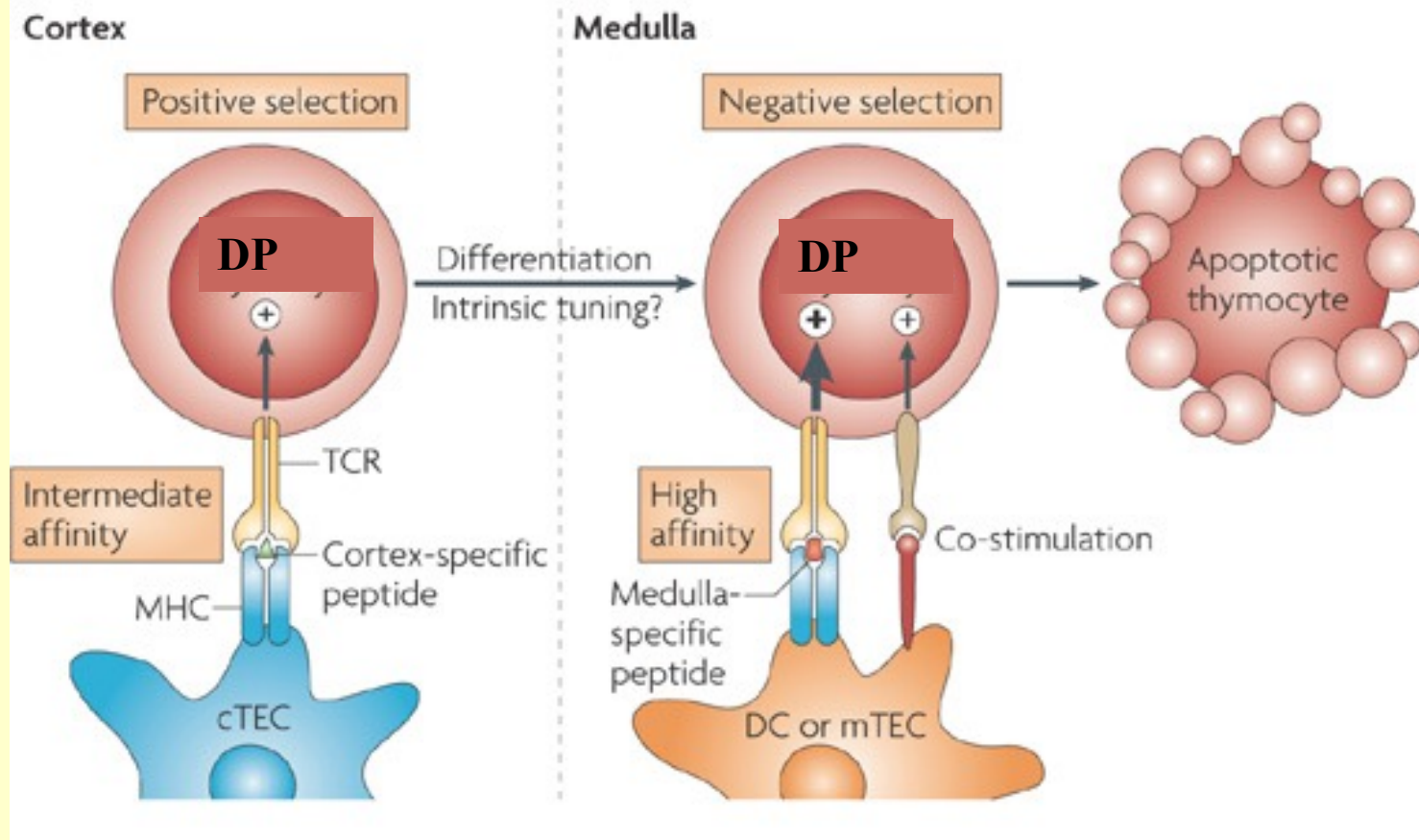
Apoptose von Zellen mit hoher TcR-Affinität gegen Selbst-Antigene
→ **TOLERANZ**

Differenzierung zu reifen T-Zellen



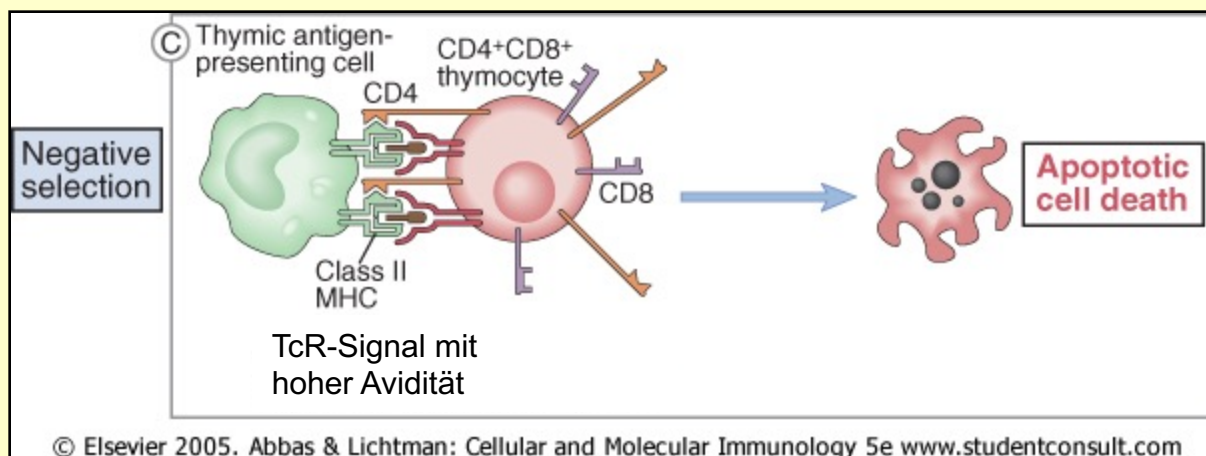
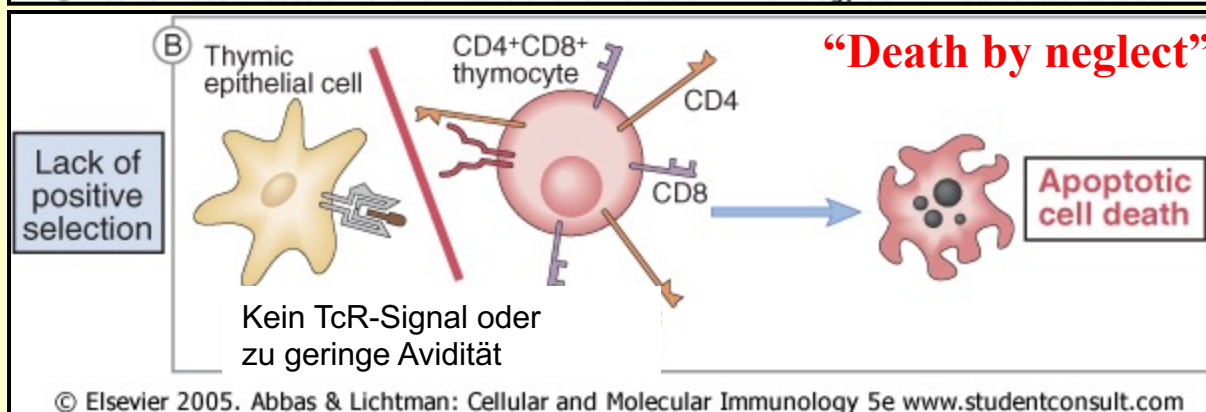
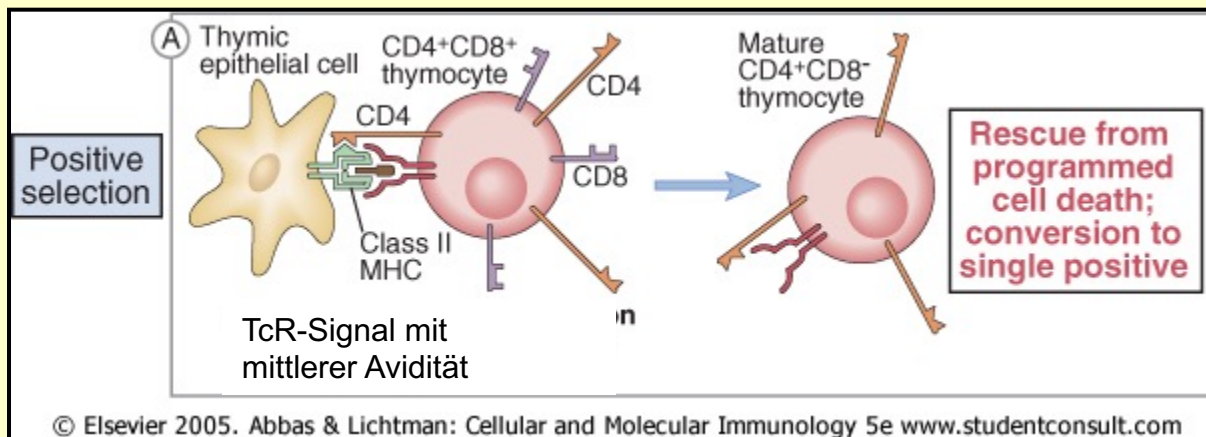
Affinitätsmodell der positiven und negativen Selektion

a Deletion by high-affinity medulla-specific peptide

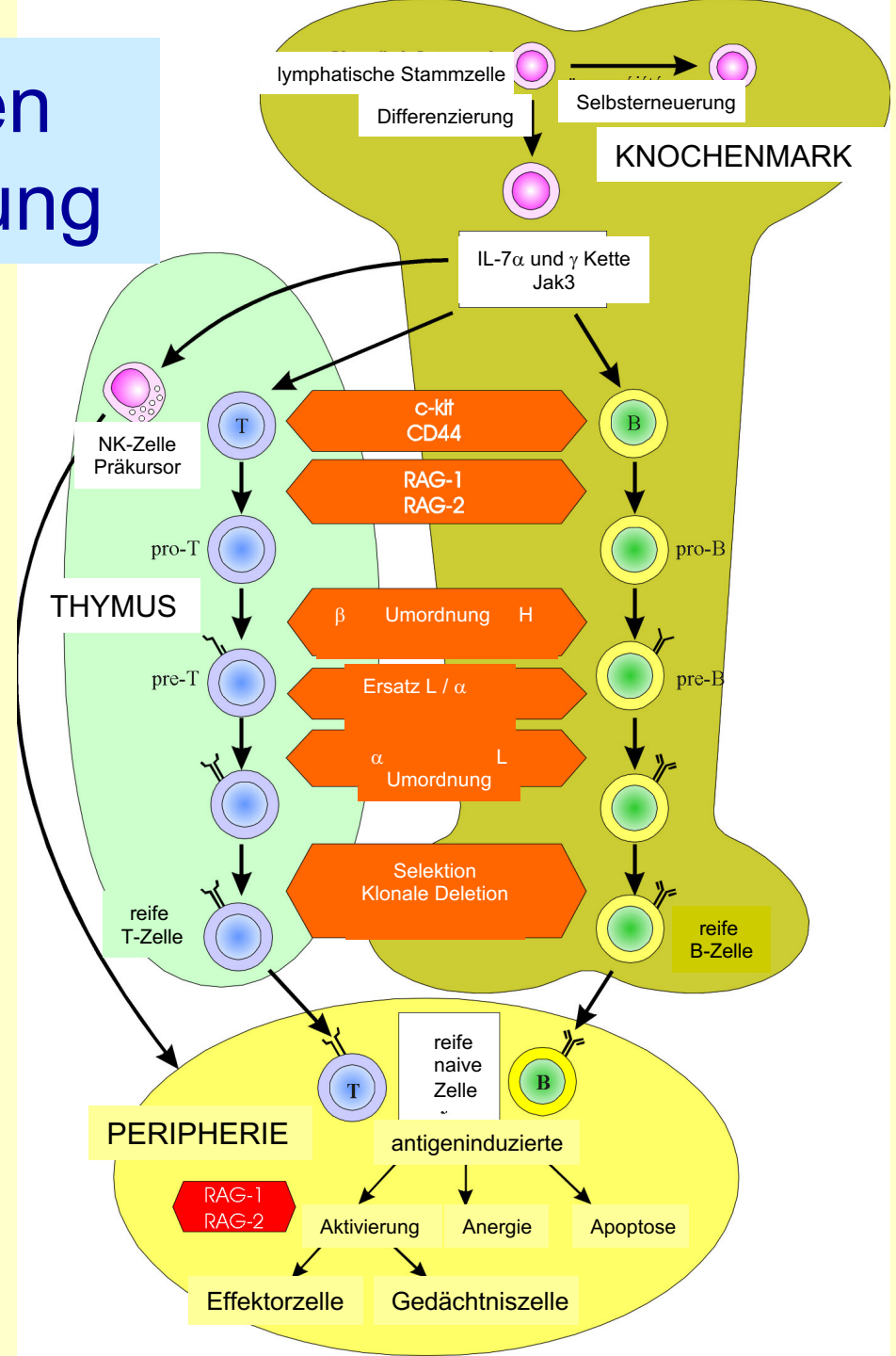


AIRE (=Autoimmune regulator):

- Promiskuitiven Genexpression von Epithelzellen (Expression von extrathymischen Antigenen)
- Defizienz: multiplen Autoimmunpathologien in Mäuse und Menschen



Gleiche Eigenschaften der B- und T-Zell-Reifung



„Checkpoints“ der zentralen B/T-Lymphozytenreifung

