

miRNAs und B-Zellen

Die Rolle von mikro-RNAs während der B-Zell-Entwicklung

JÜRGEN WITTMANN

ABTEILUNG FÜR MOLEKULARE IMMUNOLOGIE, UNIVERSITÄT ERLANGEN-NÜRNBERG

B cell development in vertebrates is a complex process, involving numerous differentiation stages at many anatomical locations. Long-known regulators of B cell gene expression include transcription factor networks, cytokines, and cell surface receptors. In recent decades, small non-coding microRNAs (miRNAs) have been shown to exert an additional layer of control over gene expression and have been demonstrated to act as critical gatekeepers at various checkpoints during the tightly regulated B cell development.

DOI: 10.1007/s12268-024-2172-3

© Der Autor 2024

■ Das Immunsystem der Säugetiere ist ein komplexes Zusammenspiel verschiedener Zelltypen und Organe und spielt eine wesentliche Rolle beim Schutz unseres Körpers. Diese Aufgabe erfüllt es, indem es krankheitserregende Mikroorganismen bekämpft, aber auch, indem es z. B. Umweltgifte in unserem Körper aufspürt und eliminiert sowie krankheitsverursachende Veränderungen wie Krebszellen erkennt und bekämpft.

Zwei eng miteinander verbundene Teilsysteme des Immunsystems, das angeborene und das adaptive Immunsystem, arbeiten zusammen, um eine effektive Immunantwort zu ermöglichen. Das eher unspezifische angeborene Immunsystem wehrt schädliche Mikroorganismen und Krankheitserreger, die über die Haut oder das Verdauungssystem in den Körper eindringen, mit Immunzellen wie Phagozyten (d. h. „Fresszellen“) oder natürlichen Killerzellen ab. Die Reaktionen des adaptiven Immunsystems, auch „erworbenes Immunsystem“ genannt, werden von Lymphozyten, einer Untergruppe der weißen Blutkörperchen, ausgeführt, wobei zwei Arten, die B-Lymphozyten (B-Zellen) und die T-Lymphozyten (T-Zellen), für die spezifischen Immunreaktionen entscheidend sind. Das adaptive Immunsystem passt sich an und lernt ständig dazu, damit der Körper neuartige oder mutierte Erreger

bekämpfen kann. Das immunologische Gedächtnis ermöglicht es ihm, bei erneutem Erregerkontakt stärker und schneller zu reagieren als beim ersten Mal.

B-Zellen spielen eine zentrale Rolle im adaptiven Immunsystem bei der Abwehr von Infektionen. Die Entwicklung der B-Zellen beginnt in der fetalen Leber und setzt sich über hämatopoetische Stammzellen im Knochenmark (KM) fort, wo sich die Zellen über mehrere Zwischenstufen zur Pro-B-Zelle entwickeln (**Abb. 1**, obere Reihe). Dort beginnt die sequenzielle genetische Neuordnung der Gene für die schwere (S) und später die leichte (L) Kette (K) der Immunglobuline (Ig), die V(D)J-Rekombination, die letztlich zur Bildung der IgM-exprimierenden unreifen B-Zellen führt. Die Überprüfung der Funktionalität der zunächst durchgeführten Umlagerung der V-, D- und J-Gensegmente am SK-Locus erfolgt im Prä-B-Zellstadium durch die Bildung und Oberflächenexpression des Prä-B-Zell-Rezeptors (Prä-BZR), der aus zwei SK und zwei invarianten Surrogat-leichten Ketten besteht. Große Prä-B-Zellen mit verkürzten oder nicht funktionsfähigen SK werden am Prä-BZR-Kontrollpunkt durch Apoptose eliminiert. Nach einer kurzen Expansionsphase rekombinieren die nun ruhenden kleinen Prä-B-Zellen die V- und J-Ig-Gensegmente am kappa- oder seltener am lambda-LK-Locus. Beim zweiten Entwicklungskont-

rollpunkt wird in den nun unreifen B-Zellen die Paarungsfähigkeit der neu rekombinierten LK mit der SK und der Oberflächentransport des so entstandenen B-Zell-Rezeptors (BZR) getestet und nicht autoreaktive Zellen können weiter differenzieren. Ist dies nicht der Fall, werden die Zellen durch Apoptose eliminiert. Da die Rekombination zwischen den Gensegmenten an den SK- und LK-Loci zufällig ist, ist ein breites Spektrum von Antikörper(AK)-Sequenzen möglich und jede Tochterzelle exprimiert normalerweise einen AK/BZR mit einer anderen Antigen-spezifität.

Die unreifen B-Zellen wandern aus dem KM in sekundäre lymphatische Organe, wo sie sich weiter entwickeln und schließlich zu reifen B-Zellen differenzieren, die IgD und IgM ko-exprimieren (**Abb. 1**, untere Reihe). Das Zellschicksal hängt dabei von vielen Variablen ab, einschließlich der BZR-Spezifität, der Verfügbarkeit von Zytokinen und der Konkurrenz mit bereits vorhandenen reifen B-Zellen.

Reife B-Zellen in den lymphatischen Organen der Peripherie benötigen zwei Signale zur Aktivierung und Differenzierung in AK-produzierende Plasmazellen (PZ). Das erste Signal stammt vom Antigen-gebundenen BZR, das zweite Signal kann T-Zell-unabhängig (TI) oder T-Zell-abhängig (TD) vermittelt werden. TD-Antworten, die durch die Interaktion mit follikulären T-Helferzellen initiiert werden, ermöglichen es den B-Zellen, entweder schnell zu kurzlebigen PZ zu differenzieren oder die Keimzentrumsreaktion zu durchlaufen. Durch somatische Hypermutation, Affinitätsreifung und Selektion entstehen hochaffine BZR. Hier findet auch der Klassenwechsel statt, bei dem der Isotyp und damit die Effektorfunktion der AK so verändert werden kann, dass sie für den Schutz vor dem Erreger am besten geeignet sind. Die B-Gedächtniszellen exprimieren Oberflächen-Ig und bilden einen langlebigen Schutz bei erneuter Antigenexposition. Langlebige PZ, die antigenspezifische AK sezernieren, sind für die Bildung eines humoralen Gedächtnisses gegen Krankheitserreger unerlässlich.

Dieser sehr kurze Abriss kann natürlich nur sehr wenige Aspekte der B-Zell-Entwicklung skizzieren, weshalb interessierten Lesenden die entsprechenden Kapitel in Lehrbüchern [1] oder Übersichtsartikeln [2, 3] empfohlen werden.

Biogenese und Funktion von mikro-RNA

Die Regulation der B-Zell-Entwicklung im Immunsystem von Wirbeltieren ist sehr komplex. Neben der Regulation durch Transkriptionsfaktoren, Zytokine und Rezeptoren hat sich gezeigt, dass das Immunsystem für die Feinregulation der Genexpression auch auf mikro-RNAs (miRNA) angewiesen ist. miRNA-Gene werden hauptsächlich durch die RNA-Polymerase II transkribiert. Die Biogenese beginnt mit der Prozessierung des primären miRNA-Transkripts (pri-miRNA), einem langen, haarnadelförmig gefalteten RNA-Molekül im Zellkern (**Abb. 2**). Das RNase-III-Protein Drosha und das doppelsträngige RNA-bindende Protein DGCR8 vermitteln die präzise endonukleolytische Spaltung der pri-miRNA, wodurch ein Vorläufermolekül (prä-miRNA) von etwa 70 nt entsteht, das durch Exportin-5 ins Zytoplasma exportiert wird. Das zweite RNase-III-Enzym, Dicer, prozessiert die prä-miRNA weiter zur reifen miRNA von etwa 21–25 nt Länge, die in den RNA-induced silencing complex (RISC) geladen wird, der aus einem der vier Argonaute-Proteine und anderen akzessorischen Faktoren besteht [4]. Der „Passagierstrang“ der miRNA wird abgebaut, während der reife, einzelsträngige Führungsstrang der miRNA im RISC an Zielsequenzen binden kann, die sich meist in den 3'-untranslatierten Regionen (3'-UTR) von mRNA-Transkripten befinden. Die Ziel-mRNA kann bei partieller Sequenzkomplementarität zum Abbau der mRNA oder zur Hemmung der Translation führen, während bei perfekter Komplementarität die mRNA auch gespalten werden kann. In fast allen Fällen wird die Proteinmenge der entsprechenden mRNA reduziert (Übersichtsartikel in [5]).

Mikro-RNAs sind essenziell für die B-Zell-Entwicklung

Erste Hinweise, dass miRNAs für die Entwicklung von B-Zellen wichtig sind, ergaben sich aus Studien, in denen miRNA-Prozessierungsfaktoren in B-Zellen selektiv

ausgeschaltet wurden. Beispielsweise führt die Deletion von DGCR8 in frühen B-Zellen zu einem fast vollständigen Entwicklungsblock am Übergang vom Pro zum Prä-B-Zell-Stadium [6]. Nur die forcierte Expression des Apoptoseregulators Bcl2 konnte *in vitro* die B-Zell-Entwicklung teilweise retten, was darauf hindeutet, dass DGCR8 und höchstwahrscheinlich die von ihm prozessierten miRNAs für das Überleben und die Differenzierung früher B-Zell-Vorläufer essenziell sind.

Differenzielle miRNA-Expression während der B-Zell-Entwicklung

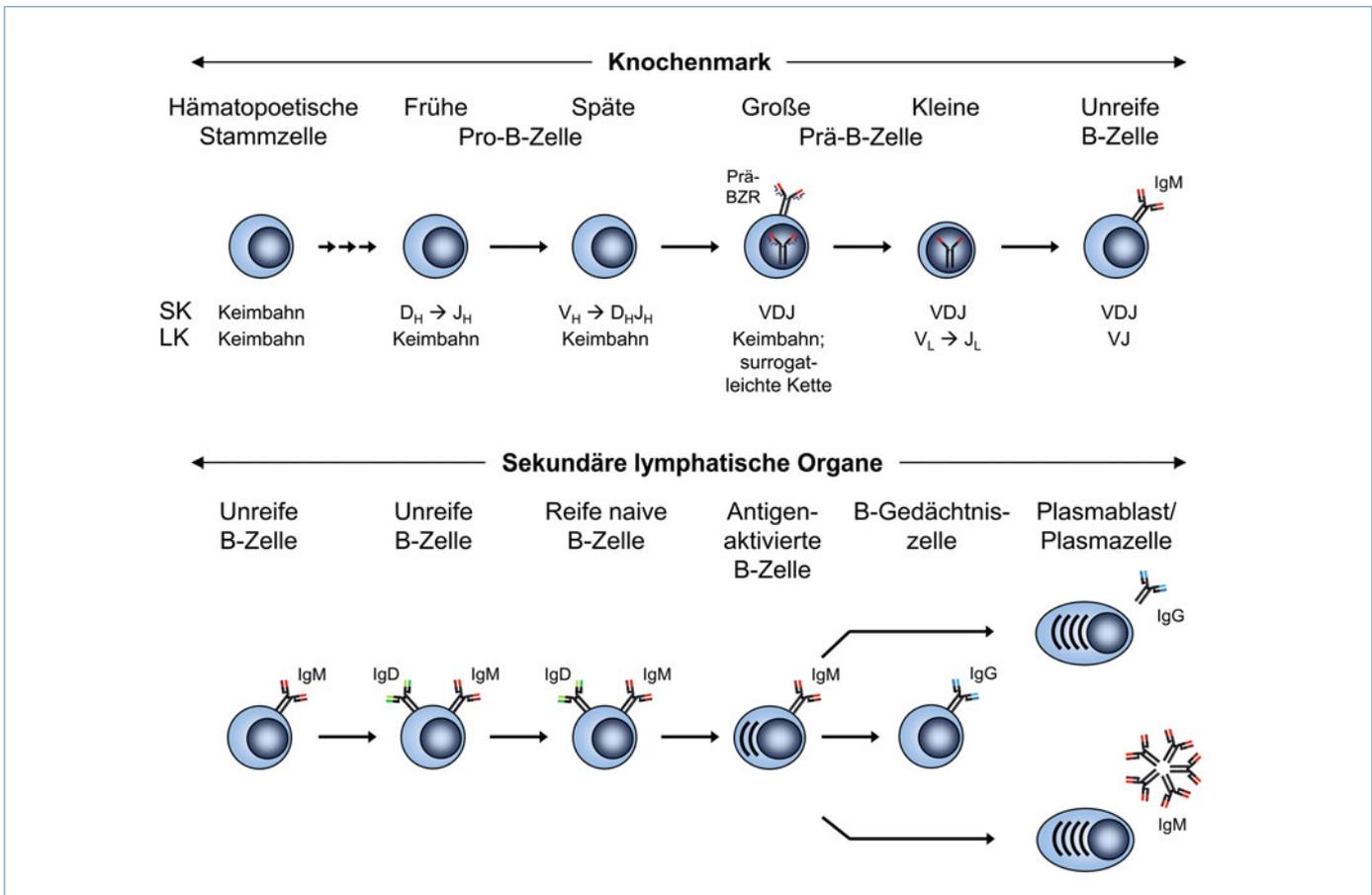
Um einen Überblick über das „miRNom“ während der B-Zell-Entwicklung zu erhalten, wurden Hochdurchsatz-Sequenzanalysen von primären murinen B-Zell-Stadien durchgeführt [Schreiber et al., unpubliziert]. Diese Analysen zeigten, dass eine große Anzahl von miRNAs ähnlich wie *housekeeping* mRNAs während der B-Zell-Entwicklung in relativ gleichbleibenden Mengen exprimiert werden, wohingegen einige miRNAs während der B-Zell-Entwicklung dynamisch reguliert werden.

Frühe B-Zell-Stadien exprimieren miR-128

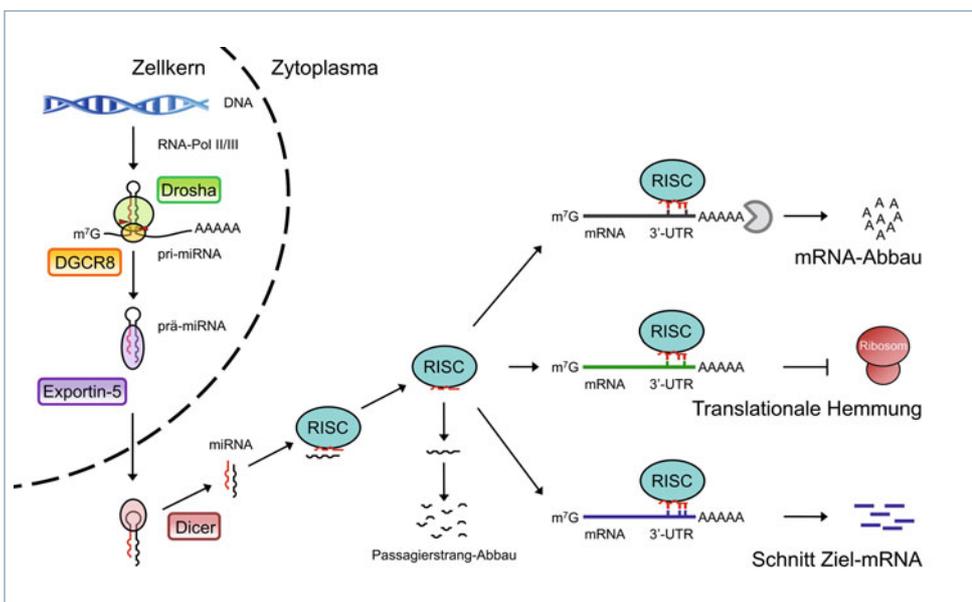
Eine der miRNAs, die während der B-Zell-Entwicklung dynamisch reguliert wird, ist miR-128. Obwohl ursprünglich angenommen wurde, dass miR-128 gehirnspezifisch exprimiert wird [7], fanden wir sie überraschenderweise auch in sehr frühen B-Zellen, und ihre hohe Expression nimmt im Verlauf der Differenzierung im KM ab [Schreiber et al., unveröffentlicht; 8]. Da die Stoffwechselwege, die miR-128 in der frühen B-Zell-Entwicklung steuert, unklar sind, wollten wir zunächst ein geeignetes Modellsystem für B-Zellen zur Modulation endogener miR-128-Mengen etablieren, um vorhergesagte miR-128-Ziel-mRNAs in B-Zellen validieren zu können [9]. Die Überprüfung der miR-128-Expression verschiedener B-Zelllinien in unterschiedlichen Stadien der B-Zell-Entwicklung mittels Northern-Blot-Analyse zeigte, dass die prä-miR-128 zwar überall nachweisbar ist, aber nur primäre Gehirnzellen signifikante Mengen an reifer miR-128 aufweisen, was auf eine zell- oder stadienspezifische Prozessierung des Vorläufermoleküls hindeuten könnte.

Hier steht eine Anzeige.





▲ **Abb. 1:** Überblick der B-Zell-Entwicklung. **Obere Reihe:** Hämatopoetische Stammzellen durchlaufen im Knochenmark (KM) mehrere Entwicklungsstadien bis zur unreifen B-Zelle. Dabei kommt es zu schrittweisen Genumlagerungen an den Loci der schweren (S) und leichten (L) Ketten der Immunglobuline (Ig). Die funktionelle Genumlagerung am SK-Locus während des Prä-B-Zell-Stadiums wird durch die Oberflächenexpression der SK zusammen mit einer Surrogat-leichten Kette als Prä-B-Zellrezeptor (Prä-BZR) überprüft. Wurde auch die LK erfolgreich umgelagert, werden die SK und LK zusammen als Antikörper vom IgM-Typ auf der Oberfläche unreifer B-Zellen exprimiert. **Untere Reihe:** Nach Test auf Autoreaktivität wandern die unreifen B-Zellen schließlich aus dem KM in die sekundären lymphatischen Organe und die Peripherie, wo sie weitere Übergangsstadien durchlaufen, um sich zu reifen, naiven B-Zellen zu entwickeln. Nach Antigenkontakt und mithilfe von T-Zellen können sich die aktivierten B-Zellen durch die Keimzentrumsreaktion in B-Gedächtniszellen sowie Plasmablasten und Plasmazellen differenzieren, die in der Regel hochaffine B-Zell-Rezeptoren mit Isotypen unterschiedlicher Effektorfunktion exprimieren bzw. sezernieren.



◀ **Abb. 2:** Biogenese und Funktion von mikro-RNAs. Die primäre mikro-RNA (pri-miRNA) wird im Zellkern transkribiert, durch die RNase Drosha und dem Ko-Faktor DGCR8 zu einer Vorläufer-miRNA (prä-miRNA) prozessiert und durch Exportin-5 ins Zytoplasma exportiert. Dort prozessiert die RNase Dicer die prä-miRNA zur reifen miRNA von ca. 21–25 nt, die mit einem Protein der Argonaute-Familie als RNA-induced silencing complex (RISC) interagiert. Nach dem Abbau des miRNA-Passagierstrangs bindet RISC hauptsächlich an die 3'-untranslatierte Region (3'-UTR) von Ziel-mRNA und steuert den mRNA-Abbau, die Translationshemmung oder das Schneiden von perfekt-komplementären Ziel-mRNAs.

miR-148a spielt eine wichtige Rolle bei der Entwicklung von AK-sezierenden Zellen

Eine weitere dynamisch regulierte miRNA, die eine wichtige Rolle bei der Entwicklung von B-Zellen zu langlebigen PZ spielt, ist miR-148a, die häufigste miRNA unserer Untersuchungen in primären PZ von Maus und Mensch [10]. miR-148a fördert die PZ-Differenzierung durch die Unterdrückung der Transkriptionsfaktoren BACH2 und MITF (ein Inhibitor von IRF4, der Teil des PZ-Transkriptionsnetzwerks ist) und das Überleben durch Herunterregulierung von BIM und PTEN.

Die Analyse von miR-148a-defizienten Mäusen zeigte verminderte Serum-Ig-Konzentrationen, eine geringere Anzahl neu gebildeter PZ und weniger langlebige PZ [11]. Metabolische und Transkriptom-Analysen ergaben eine gestörte Glukoseaufnahme, eine reduzierte mitochondriale Atmung und eine veränderte Häufigkeit von Rezeptoren für die Gewebeeinwanderung in miR-148a-defizienten PZ. Der parallele Anstieg von B-Gedächtniszellen könnte darauf hindeuten, dass miR-148a die Differenzierung in PZ begünstigt, indem es konkurrierende Zellschicksale – wie die Bildung von B-Gedächtniszellen – hemmt und das Überleben und die Fitness langlebiger PZ unterstützt. ■

Literatur

- [1] Murphy K, Weaver C (2017) Janeway's immunobiology. Garland Science/Taylor & Francis Group, LLC, New York
- [2] Pieper K, Grimbacher B, Eibel H (2013) B-cell biology and development. *J Allergy Clin Immunol* 131: 959–971
- [3] Tellier J, Nutt SL (2019) Plasma cells: The programming of an antibody-secreting machine. *Eur J Immunol* 49: 30–37
- [4] Müller M, Fazi F, Ciaudo C (2020) Argonaute Proteins: From Structure to Function in Development and Pathological Cell Fate Determination. *Front Cell Dev Biol* 7: 360
- [5] Bartel DP (2018) Metazoan MicroRNAs. *Cell* 173: 20–51
- [6] Brandl A, Daum P, Brenner S et al. (2016) The microprocessor component, DGCR8, is essential for early B-cell development in mice. *Eur J Immunol* 46: 2710–2718
- [7] Tan CL, Plotkin JL, Venø MT et al. (2013) MicroRNA-128 governs neuronal excitability and motor behavior in mice. *Science* 342: 1254–1258
- [8] Yang Y, Xu J, Chen H et al. (2016) MiR-128-2 inhibits common lymphoid progenitors from developing into progenitor B cells. *Oncotarget* 7: 17520–17531
- [9] Schreiber S, Daum P, Danzer H et al. (2023) Identification of miR-128 Target mRNAs That Are Expressed in B Cells Using a Modified Dual Luciferase Vector. *Biomolecules* 13: 1517
- [10] Porstner M, Winkelmann R, Daum P et al. (2015) miR-148a promotes plasma cell differentiation and targets the germinal center transcription factors Mitf and Bach2. *Eur J Immunol* 45: 1206–1215
- [11] Pracht K, Meinzinger J, Schulz SR et al. (2021) miR-148a controls metabolic programming and survival of mature CD19-negative plasma cells in mice. *Eur J Immunol* 51: 1089–1109

Funding note: Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.
Open Access: Dieser Artikel wird unter der Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz veröffentlicht, welche die Nutzung, Vervielfältigung, Bearbeitung, Verbreitung und Wiedergabe in jeglichem Medium und Format erlaubt, sofern Sie den/die ursprünglichen Autor(en) und die Quelle ordnungsgemäß nennen, einen Link zur Creative Commons Lizenz beifügen und angeben, ob Änderungen vorgenommen wurden. Die in diesem Artikel enthaltenen Bilder und sonstiges Drittmaterial unterliegen ebenfalls der genannten Creative Commons Lizenz, sofern sich aus der Abbildungslegende nichts anderes ergibt. Sofern das betreffende Material nicht unter der genannten Creative Commons Lizenz steht und die betreffende Handlung nicht nach gesetzlichen Vorschriften erlaubt ist, ist für die oben aufgeführten Weiterverwendungen des Materials die Einwilligung des jeweiligen Rechteinhabers einzuholen. Weitere Details zur Lizenz entnehmen Sie bitte der Lizenzinformation auf <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de>.

Korrespondenzadresse:

Dr. Jürgen Wittmann
 Abteilung für Molekulare Immunologie an der
 Medizinischen Klinik 3 – Rheumatologie und
 Immunologie
 Nikolaus-Fiebiger-Zentrum für Molekulare Medizin
 Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg (FAU)
 Glückstraße 6
 D-91054 Erlangen
juergen.wittmann@uk-erlangen.de

AUTOR



Jürgen Wittmann

1994–2000 Biologiestudium an den Universitäten Erlangen und Greifswald. 2000–2004 Promotion, Universität Erlangen-Nürnberg. 2004–2010 PostDoc an der Abteilung für Molekulare Immunologie, Universitätsklinikum (UK) Erlangen, Universität Erlangen-Nürnberg. Seit 2010 Arbeitsgruppenleiter an der Abteilung für Molekulare Immunologie am UK Erlangen, Universität Erlangen-Nürnberg.

Hier steht
eine Anzeige.

 Springer