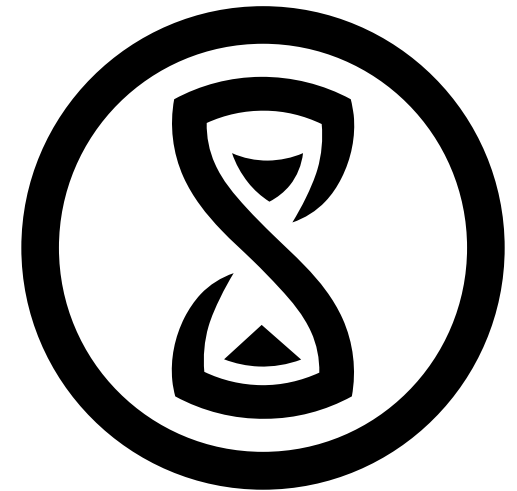


Herstellung und Selektion rekombinanter Antikörper

Für jeden Topf ein Deckel

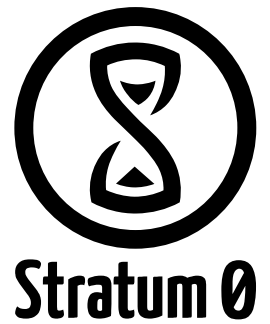
Sintox

16.04.2015



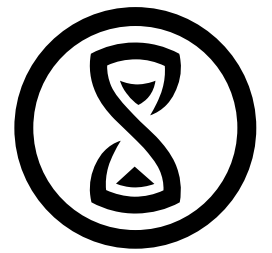
Stratum 0

Inhalte



- **Begriffsklärungen**
 - **Rekombinant**
 - **Lymphozyten**
 - **Antikörper und Antigene**
 - **Somatische Hypermutation und VDR-Rekombination**
 - **Polyklonal ↔ Monoklonal**
 - **Plasma- und Memory-B-Zellen**
- **Produktion monoklonaler Antikörper**
 - **Immunisierung**
 - **Selektion**
 - **Phage-Display/Biopanning**
 - **Hybridoma-Technologie**

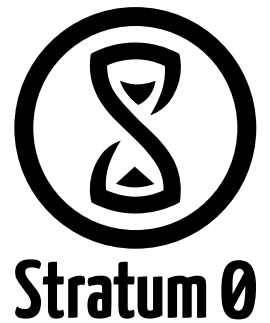
Begriffsklärungen



Stratum 0

- **Rekombinant:**
 - „Rekombinante Proteine sind biotechnologisch hergestellte Proteine, die **mit Hilfe von gentechnisch veränderten Organismen** oder mit transient transfizierten Zellkulturen erzeugt wurden.“

Begriffsklärungen



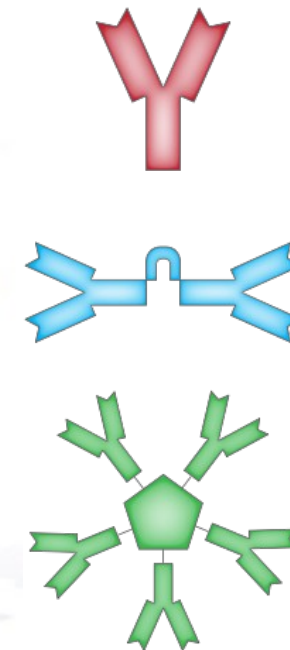
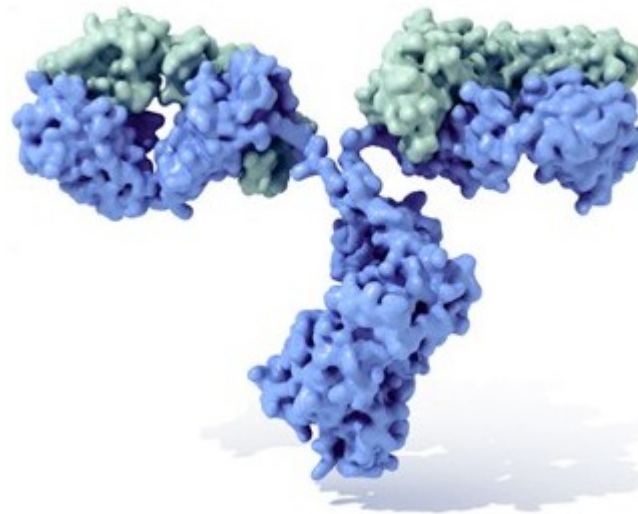
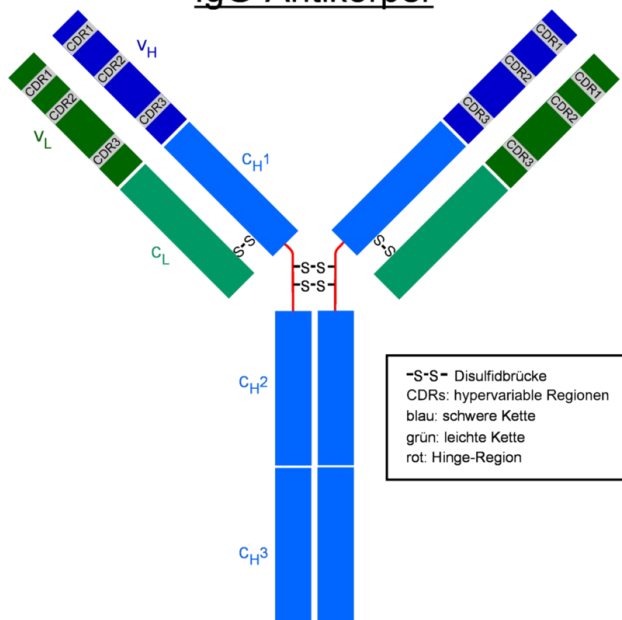
- **Lymphozyten:**
 - Gehören zu den „weißen Blutkörperchen“ (Leukozyten)
 - Anteil: 25-40 % aller Leukozyten
 - Hauptaufgabe: Erkennung von Fremdstoffen und deren Entfernung
- **B-Zellen**
 - Humorale Immunantwort → Antikörper-Produzenten
- **T-Zellen**
 - Zelluläre Immunantwort → Überwachen körpereigene Zelloberflächen und aktivieren B-Zellen
- **NK-Zellen**
 - „natural killer“, Erkennen und töten abnormale Zellen wie Tumor-Zellen oder virusinfizierte Zellen

Begriffsklärungen

- **Antikörper**

- Auch „Immunoglobulin“, verschiedene Klassen wie IgG, IgM oder IgA
- Protein zur spezifischen Bindung von Antigenen
- Im Rahmen der adaptiven Immunantwort gebildet

IgG-Antikörper

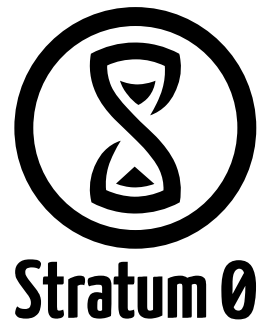


Monomer
IgD, IgE, IgG

Dimer
IgA

Pentamer
IgM

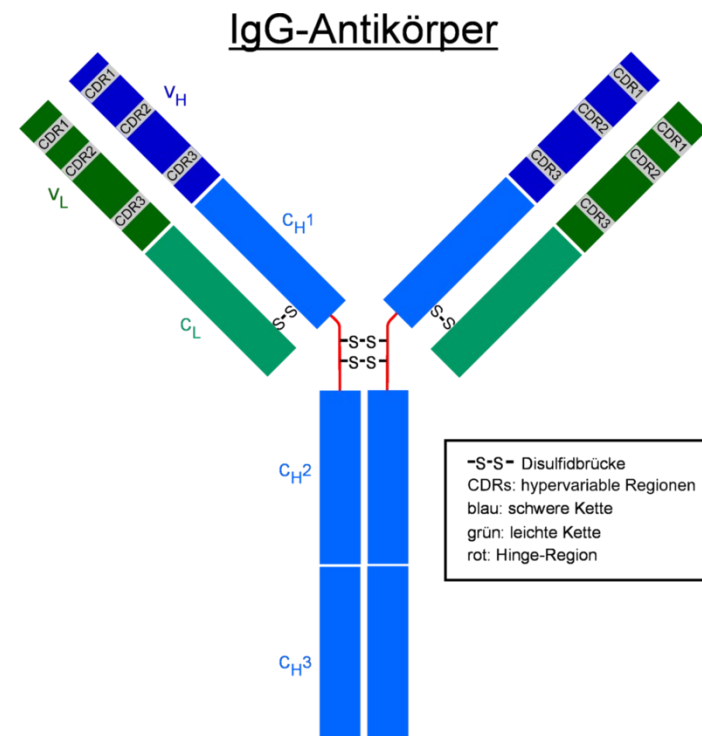
Begriffsklärungen



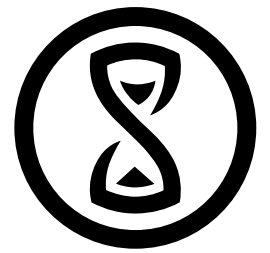
- **Antigen:**
 - Aus dem Englischen für „**Antibody generating**“
 - Stoff, an den sich Antikörper und spezifische Lymphozyten-Rezeptoren binden können
 - Meist Proteine, aber auch Kohlehydrate, Lipide und weitere Stoffe

Begriffsklärungen

- **Somatische Hypermutation und VDR-Rekombination:**
 - Mutationen der hypervariablen Domänen (CDR's)
 - Rekombination unterschiedlicher Exons, aus denen sich die variablen Domänen zusammensetzen



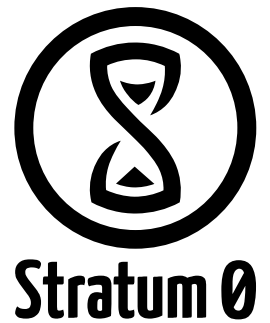
Begriffsklärungen



Stratum 0

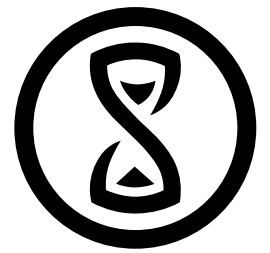
- **Polyklonal/Monoklonal:**
 - Bei der Immunisierung eines Wirtes mit einem Antigen entstehen verschiedene Antikörper gegen unterschiedliche Epitope (Oberflächen-Substrukturen) des Antigens → **Polyklonal**
 - Wenn man nur die Antikörper isoliert/produziert, die von EINER B-Zelle produziert werden und die nur gegen EIN Epitop gerichtet sind → **Monoklonal**

Begriffsklärungen



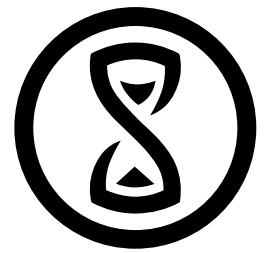
- **Plasma-B-Zellen:**
 - Durch Differenzierung aus aktivierten B-Zellen hervorgegangen
 - Produzieren und sekretieren Antikörper
- **Memory-B-Zellen:**
 - Durch Differenzierung aus aktivierten B-Zellen hervorgegangen
 - Sehr langlebig
 - Bei erneutem Kontakt mit dem Antigen können sie in nur wenigen Stunden eine Immunreaktion auslösen
 - → typischer „Impfschutz“, kein/nur leichter Krankheitsausbruch

Produktion monoklonaler Antikörper



Stratum 0

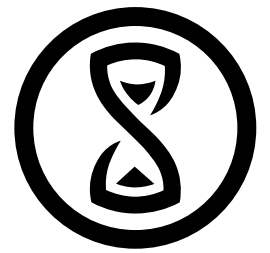
- 1) Immunisierung des Wirtes (z.B. Kaninchen) mit dem Antigen von Interesse
z.B. Virus-Hüllproteine
- 2) Nach 3-4 Tagen Entnahme und Isolation der gebildeten B-Zellen aus dem Blut
des Wirtes
- 3) **Selektion!**



Stratum 0

Exkurs: Antikörper-Selektion

- **Grund:**
 - **Statt der Verwendung eines polyklonalen Antikörper-Serums gegen viele mögliche Epitope des selben Antigens**
 - **Auswahl des Antikörpers mit der höchsten Affinität gegen ein Epitop des Antigens**
- **Grundlegendes Prinzip:**
 - **Isolation der Antikörper-Gene aus jeder isolierten B-Zelle → Umwandlung in svFv-Fragment → Expression auf Phagen → Biopanning**

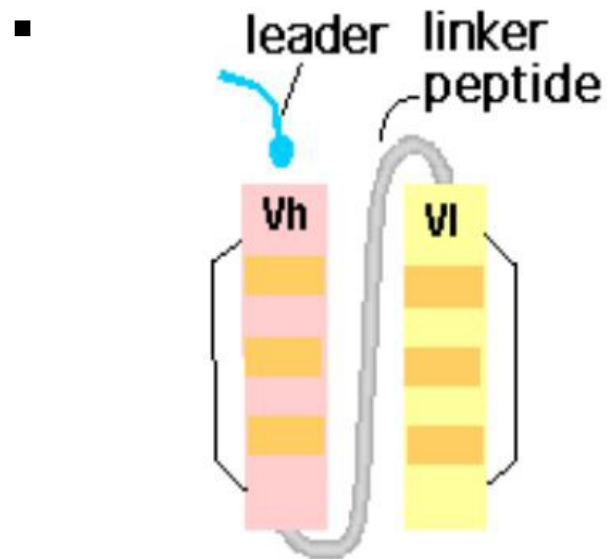


Exkurs: Antikörper-Selektion

1) Isolation der Antikörper-DNA

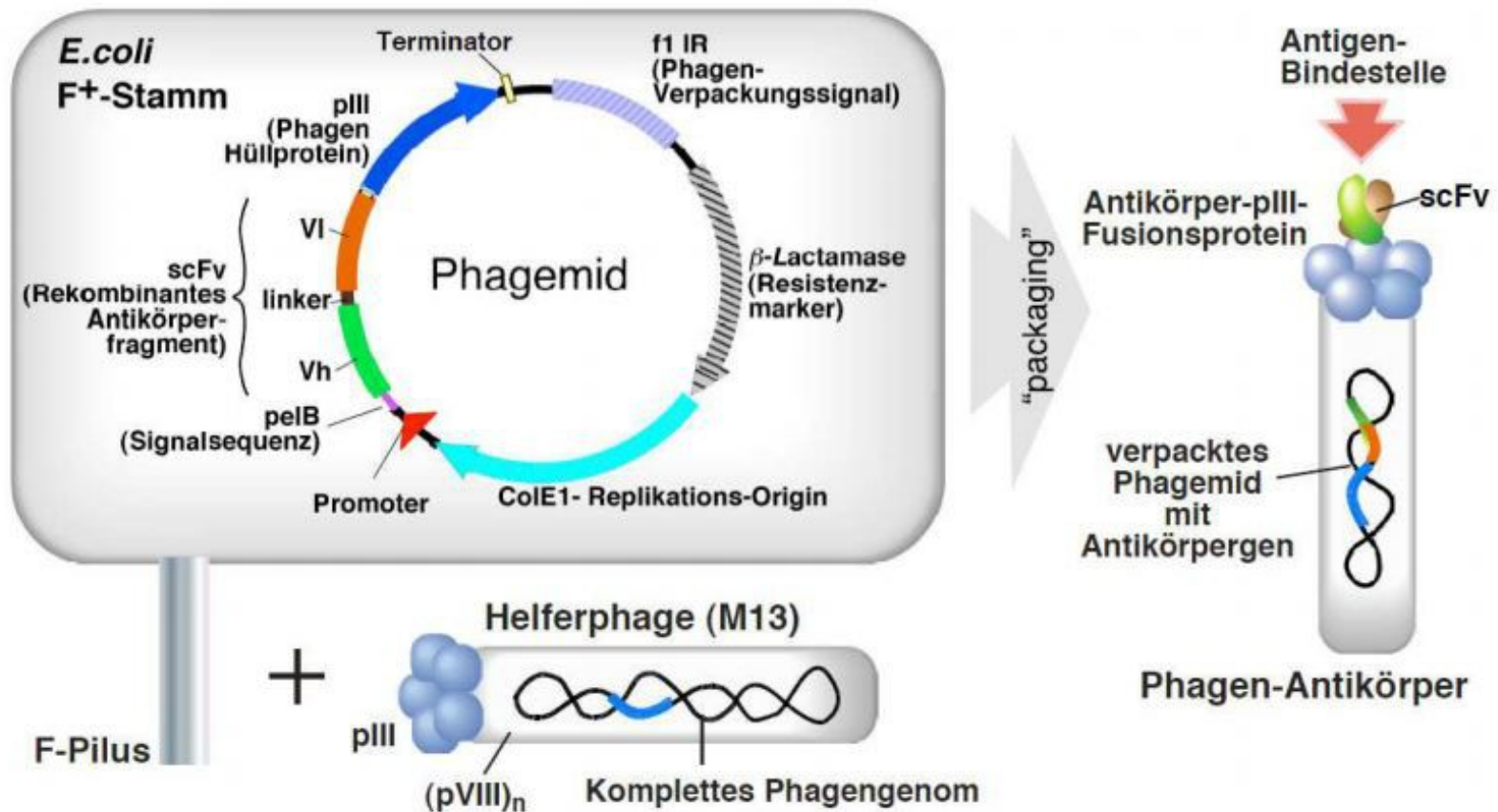
- PCR mit Universalprimern → Sequenzierung

2) Fusion der V-Domänen mit Linker-Sequenz zu scFv-Fragment



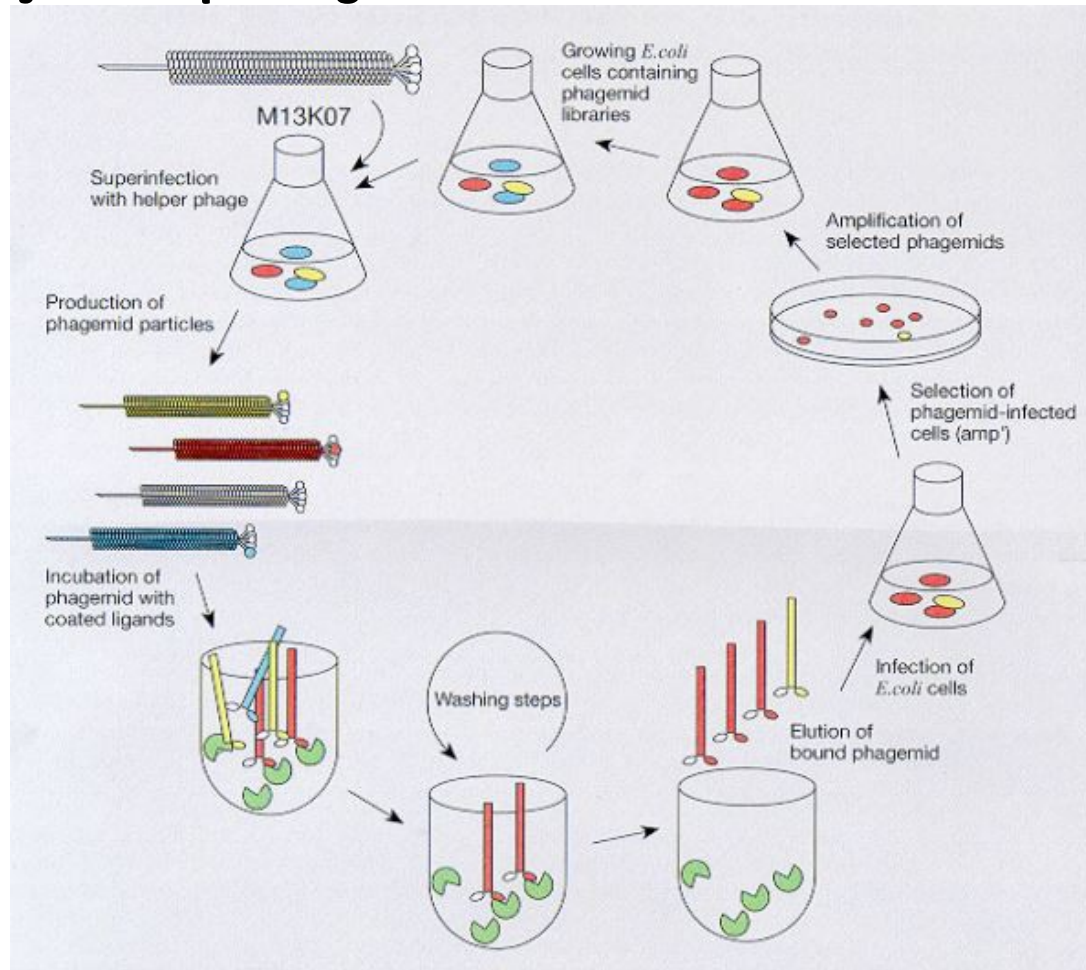
Exkurs: Antikörper-Selektion

- **Phage-Display und Biopanning**

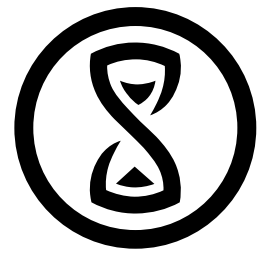


Exkurs: Antikörper-Selektion

- **Phage-Display und Biopanning**



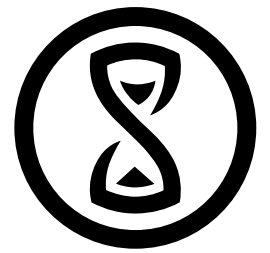
Produktion monoklonaler Antikörper



Stratum 0

- 1) **Immunisierung des Wirtes (z.B. Kaninchen) mit dem Antigen von Interesse
z.B. Virus-Hüllproteine**
- 2) **Nach 3-4 Tagen Entnahme und Isolation der gebildeten B-Zellen aus dem Blut
des Wirtes**
- 3) **Selektion!**

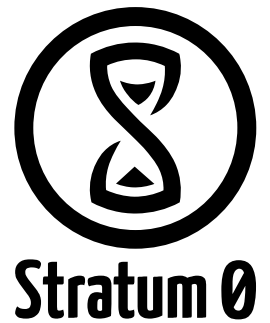
Produktion monoklonaler Antikörper



Stratum 0

- 1) Immunisierung des Wirtes (z.B. Kaninchen) mit dem Antigen von Interesse
z.B. Virus-Hüllproteine**
- 2) Nach 3-4 Tagen Entnahme und Isolation der gebildeten B-Zellen aus dem Blut
des Wirtes**
- 3) Selektion durch Phage-Display und Biopanning**
- 4) Sequenzierung des „erfolgreichen“ Phagen und Rückschluss auf die
dazugehörige, Antikörper-produzierende B-Zelle**
- 5) Hybridoma-Technik zur „Großproduktion“ des monoklonalen Antikörpers**

Produktion monoklonaler Antikörper

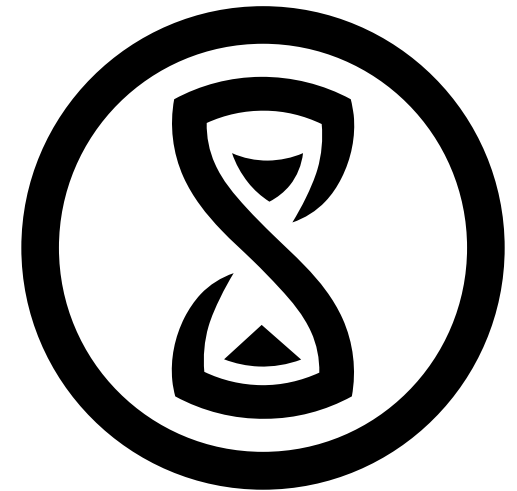


- **Hybridoma-Technologie:**
 - **Fusion einer Antikörper-produzierenden B-Zelle mit einer Myelom-Zelle (Tumor-Plasma-B-Zelle)**
 - **Resultat: Nahezu unbegrenzt, uneingeschränkt teilungsfähige, antikörperproduzierende Zell-Kultur**

Vielen Dank für eure Aufmerksamkeit!

Sintox (Carsten)
sinthox@gmail.com

Stratum 0 e.V. Braunschweig
<https://stratum0.org>



Stratum 0