

Inhalt

1.	Grundlagen	13
1.1	Wie unser Körper Antikörper herstellt	13
1.1.1	Die Antikörpervielfalt entsteht durch die zufällige Kombination von Peptidbausteinen	13
1.1.2	Die Spezifität der Antigenbindung wird von den hypervariablen Domänen bestimmt	15
1.1.3	Die konstanten Regionen stabilisieren den Zusammenhalt der variablen Domänen	15
1.1.4	Die konstanten Regionen vermitteln die Effektorfunktionen	17
1.1.5	Antikörper binden im Lauf der Immunantwort immer besser	17
1.1.6	B-Lymphozyten werden durch klonale Selektion ausgewählt	18
1.1.7	Gedächtniszellen, die besser bindende Antikörper codieren, überleben	19
1.1.8	Das Immunsystem der höheren Wirbeltiere macht seit Millionen von Jahren Antikörper-Engineering	22
1.2	Die Herstellung von Antikörpern: altbewährte und neue Wege	22
1.2.1	Die Nutzung von Antikörpern in Forschung und Diagnose	22
1.2.2	Antiseren enthalten polyklonale Antikörper	23
1.2.3	Unsterbliche B-Lymphozyten produzieren monoklonale Antikörper	24
1.2.4	„Rekombinante Antikörper“ sind gentechnologisch hergestellte Antikörperfragmente	26
1.2.5	Fv-Fragmente sind die kleinste antigenbindende Einheit	26
1.2.6	Warum rekombinante Antikörper?	27
	Literatur	30

2.	Gewinnung spezifischer rekombinanter Antikörperfragmente	31
2.1	Einleitung	31
2.1.1	Rekombinante Antikörperfragmente können aus Bakterien gewonnen werden	31
2.1.2	Die Antikörperbildung des humoralen Immunsystems kann in Bakterien imitiert werden	32
2.2	Wie kommt man an Antikörpergene?	37
2.2.1	Die Erzeugung der Antikörpervielfalt in unserem Körper	37
2.2.2	Warum Antikörper-Genbibliotheken unterschiedlicher Komplexität?	38
2.2.3	Die Kontrolle der Komplexität von Antikörper-Genbibliotheken	40
2.2.4	Klonierung der Antikörpergene aus Hybridom-Zelllinien	42
2.2.5	Genbibliotheken immunisierter Spender	48
2.2.6	„Universelle“ Genbibliotheken nicht-immunisierter Spender	51
2.2.7	Genomische Genbibliotheken	52
2.2.8	Hybrid- und semisynthetische Genbibliotheken	53
2.2.9	Vollständig synthetische Genbibliotheken mit Zufallssequenzen in den CDRs	53
2.2.10	Überwindung der Engstelle Transformation: <i>In vivo</i> -Rekombinationssysteme ermöglichen „Superlibraries“	55
2.3	Von der Vielfalt zur Spezifität: Die Selektion der rekombinanten Antikörper aus Genbibliotheken	58
2.3.1	Rekombinante Antikörper können mit klassischen Expressionssystemen aufgefunden werden	58
2.3.2	Die Kopplung von Gen und Genprodukt ermöglicht eine Selektion in Lösung	59
2.3.3	Peptide können auf der Oberfläche von Bakteriophagen exprimiert werden	60
2.3.4	Auch rekombinante Antikörper können auf der Oberfläche von filamentösen Phagen verankert werden	61
2.3.5	Mit Hilfe von Oberflächenexpressionsvektoren können Milliarden verschiedener Antikörperklone auf Bindung untersucht werden	64

2.3.6	Oberflächenexpressionsvektoren ermöglichen die Herstellung humaner rekombinanter Antikörperfragmente	69
2.3.7	Die Antigen-spezifische Infektion von Bakterien	73
2.3.8	Andere prokaryontische Oberflächen-expressionsvektoren	74
2.3.9	Antikörper können auch auf der Oberfläche von eukaryontischen Viren verankert werden	76
2.4	Antikörper-Engineering	77
2.4.1	Warum Antikörper-Engineering?	77
2.4.2	Maus-Mensch-Chimären	78
2.4.3	Die Gerüstregionen der variablen Domänen von Maus-Antikörpern können humanisiert werden	79
2.4.4	Die dreidimensionale Struktur von Antikörpern kann am Computer modelliert werden	82
2.4.5	Effiziente Suchsysteme helfen bei der Humanisierung von Antikörpern durch <i>chain shuffling</i>	84
2.4.6	Die Affinität der rekombinanten Antikörper kann durch Wiederholung von Mutation und Selektion erhöht werden	87
2.4.7	Antikörpergene können durch Gensynthese oder mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion mutiert werden	88
2.4.8	Die „sexuelle“ PCR kombiniert mehrere Mutationen	90
2.4.9	Fv-Fragmente werden durch eine Peptidverbindung zwischen den variablen Domänen stabilisiert	93
2.4.10	Fv-Fragmente können durch interne Disulfidbrücken stabilisiert werden	96
2.4.11	Kamelantikörper enthalten nur eine variable Domäne	98
2.4.12	Antikörper können die Funktion von Enzymen übernehmen	100
2.5	Zusammenfassung	105
	Literatur	106

3.	Antikörper mit erweiterten Funktionen	119
3.1	Warum bispezifische und bifunktionelle Antikörper?	119
3.2	Neue Funktionen durch homologe Fusionspartner: Bispezifische Antikörper	123
3.2.1	Bispezifische Antikörper vereinigen die Bindungseigenschaften von zwei unterschiedlichen monoklonalen Antikörpern in einem Molekül	123
3.2.2	Bispezifische Antikörper können rekombinant hergestellt werden	128
3.2.3	Verknüpfung zu bispezifischen Antikörpern mit Hilfe von heterologen Bindungsdomänen	131
3.2.4	Universelle bispezifische Antikörper	134
3.2.5	Rekombinante bispezifische Antikörper sind deutlich kleiner als ein IgG	135
3.3	Neue Funktionen durch heterologe Fusionspartner: Bifunktionelle Antikörper	136
3.3.1	Was sind bifunktionelle Antikörper?	136
3.3.2	Bifunktionelle Antikörper können als Immuntoxine eingesetzt werden	137
3.3.3	Antikörper können zu Radioimmuntoxinen umgebaut werden	145
3.3.4	Intrazelluläre Antikörper	145
3.3.5	Rekombinante Antikörper können an der Oberfläche von Zellen verankert werden	148
3.4	Zusammenfassung	151
	Literatur	152
4.	Produktion und Reinigung rekombinanter Antikörperfragmente	161
4.1	Eigenschaften rekombinanter Antikörper und Auswahl des Expressionssystems	161
4.1.1	Strukturelle Charakterisierung eines Antikörpers: Die Definition der hypervariablen Regionen (CDRs)	162
4.1.2	Biochemische Charakterisierung eines Antikörpers: Spezifität und Affinität	166
4.1.3	Verschiedene Anwendungen von Antikörpern erfordern unterschiedliche Expressionssysteme	173
4.2	Prokaryontische Expressionssysteme	174
4.2.1	Produktion in <i>E. coli</i>	174

4.2.2	Produktion in Gram-positiven Bakterien	183
4.3	Eukaryontische Expressionssysteme für rekombinante Antikörper	184
4.3.1	Expression im Cytoplasma	184
4.3.2	Die Zellen des Immunsystems sind die natürlichen Produktionsstätten von Antikörpern	185
4.3.3	Produktion in anderen Säugerzellen	186
4.3.4	Produktion rekombinanter Antikörperfragmente in Insektenzellen (Baculovirus-System)	188
4.3.5	Produktion rekombinanter Antikörperfragmente in Pflanzen	190
4.3.6	Produktion rekombinanter Antikörperfragmente in Pilzen	191
4.3.7	Produktion in zellfreien Systemen	193
4.4	Reinigung rekombinanter Antikörper und Antikörperfragmente	193
4.4.1	Physikalische Trennmethode stehen am Anfang jeder Antikörperreinigung	193
4.4.2	Affinitätschromatographie: Der Schlüssel zur effizienten Reinigung rekombinanter Proteine	194
4.4.3	Affinitätschromatographische Reinigung mit Hilfe der Bindungseigenschaften des Antikörperanteils	195
4.4.4	Affinitätschromatographische Reinigung mit Hilfe eines heterologen Fusionsanteils	200
4.4.5	Spezialfall Humantherapeutika: Entfernung von bakteriellem Endotoxin	210
4.4.6	Aufbewahrung von gereinigten rekombinanten Antikörpern	210
Literatur		211
Anhang		225
Index		227