

Charakterisierung von Antikörpern mit BRAND PCR Platten

Autor: AG Arndt/ Krauss
Nationales Centrum für Tumorerkrankungen (NCT) Heidelberg
Im Neuenheimer Feld 460
69120 Heidelberg

Einführung

Die Gewinnung von vollständig humanen Antikörpern mit spezifischen funktionellen Eigenschaften, die für medizinische Anwendungen genutzt werden können, ist ein großes Ziel bei der Entwicklung von therapeutischen Antikörpern. Diese Antikörper können aus humanen B-Zellen, die Kontakt mit einem spezifischen Antigen hatten, isoliert werden.

In dieser Studie wurden B-Zell Repertoires aus Lymphknoten von Hals-Kopf-Tumorpatienten als Quelle zur Klonierung der variablen Antikörpergene von Immunglobulin G (IgG) verwendet. Die Sequenzanalyse der Antikörper aus den Lymphknoten zeigte ein natürlich auftretendes Verteilungsmuster von Antikörpersequenzen, die alle bekannten variablen Genfamilien und die meisten funktionellen Keimbahnsequenzen repräsentieren.

Um die Machbarkeit der Antikörperselektion mit therapeutischem Potential aus diesem Repertoire zu zeigen, wurden diese Antikörper auf ihre Affinität gegen das Zielantigen auf HSV-1 (Herpes simplex Viren) infizierten Zellen geprüft. Die Mehrheit der scFv (engl.: single chain variable Fragment)-Antikörperfragmente band mit nanomolarer Affinität an das Antigen von HSV-Stämmen.

Material und Methoden¹

Zur Antikörpergewinnung wurden IgG-Spender-Repertoires aus Lymphknoten von Hals-Kopf-Tumorpatienten genutzt. So konnten unabhängige Genpools der variablen Domänen der leichten und schweren Ketten (VH/ VL-kappa und VH/ VL-lambda) generiert werden.

Mit diesen Genen transformierte Bakterienzellen wurden auf Agarplatten ausgebreitet und über Nacht kultiviert. Diese transformierten und kultivierten *E.coli* Zellen wurden in einem nächsten Schritt in Glycerol Aliquots bei -80 °C gelagert.

Beispielhaft wurden transformierte Proben der Aliquots ausgewählt und im Schüttelkolben kultiviert, bevor eine 10-fache Verdünnung der *E.coli* Zellen auf Agarplatten überführt wurde.

Von jeder Platte wurden 8 Klone gepickt und weiter über eine Kolonie-PCR, bezüglich der Frage, ob sowohl die Gene der schweren, als auch leichten Kette integriert sind, analysiert (Fragmentgröße ~ 1kb).

Tabelle 1: Temperaturverlauf des PCR-Zyklus

PCR-Programm	Zeit	
erste Denaturierung	95 °C	5 min
Denaturierung	95 °C	15 sec
Annealing	51 °C	15 sec
Elonation	72 °C	15 sec
letzte Elonation	72 °C	10 min
Kühlung	4 °C	unbegrenzt

} 35 Zyklen

Tabelle 2: PCR-Ansatz

	Volumen
KAPA 2 G Fast Ready Mix (Puffer, Polymerase, dNTPs, Gel Loading Dye)	12,5 µl
Primer A	0,5 µl
Primer B	0,5 µl
Template	gepickte Einzelkolonie
H ₂ O	11,5 µl
Gesamtvolumen	25,0 µl

Um die Anzahl der in *E.coli* vollständig exprimierten scFvs zu bestimmen, wurde im Anschluss an die Kolonie-PCR eine Agarose Gelelektrophorese der zufällig gepickten Klone durchgeführt.

Ergebnis

Alle 8 Klone (in Triplikaten) zeigten eine Bande bei einer Fragmentgröße von ~ 1 kb. Damit enthalten sie sowohl die Gene der schweren, also auch leichten Kette.

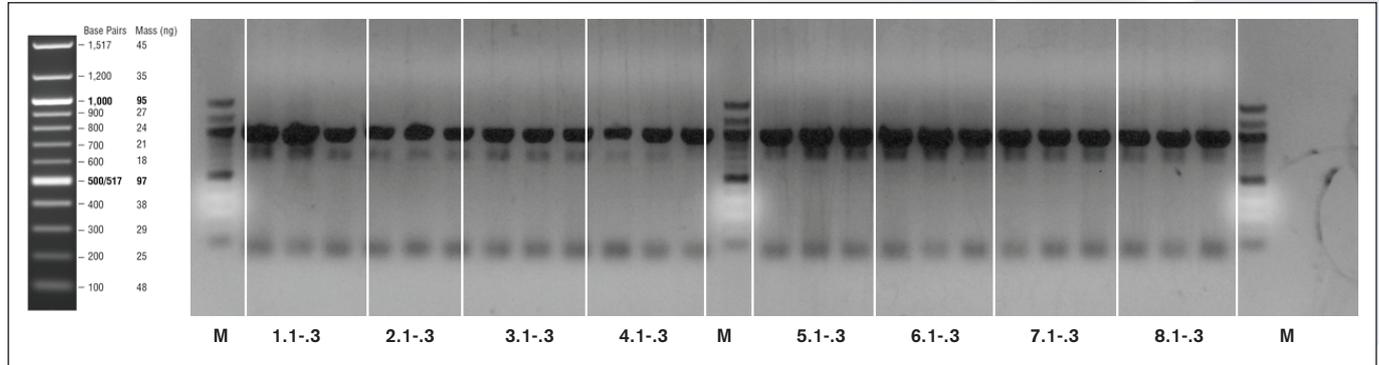


Abbildung 1: [rechts]: DNA-Marker (100bp DNA Ladder (N3231) von NEB an Position 1;14 und 27. Das 1,5%ige Agarosegel lief bei 140 V für 40 Minuten) mit Markerbeschreibung; [links]: Agarosegel (jeweils Triplikate)

Anschließend wurde die Gleichgewichtskonstante (K_D) der Bindung der scFvs mit dem Zielantigen HSV-1 infizierter Zellen anhand einer Durchflusszytometrieaffinitätsmessung bestimmt. Der K_D -Wert lag im nanomolaren Bereich.

Diskussion

BRAND PCR-Platten (Best.-Nr. 7813 75) eignen sich hervorragend für die Kolonie-PCR. Die glatten Welloberflächen minimieren das Anbinden der Reaktanten an die Welloberfläche, so dass die PCR-Reaktion vollständig ablaufen kann. Des Weiteren ist das hochwertige Polypropylen dieser PCR-Platte frei von PCR-Inhibitoren, die die Ausbeute reduzieren könnten. Die passend zur PCR-Platte entwickelte Verschlussmatte (Best.-Nr. 7814 05) reduziert Verdunstungsverluste auf ein Minimum. Unter diesen Voraussetzungen konnten die Antikörperfragmente aller transformierten Klone zuverlässig in hoher Ausbeute vervielfältigt und über ein Agarosegel nachgewiesen werden.

1 Philipp Diebold, Armin Keller, Stephanie Haase, Anne Schlegelmilch, Jonathan D Kiefer, Tamana Karimi, Tobias Weber, Gerhard Moldenhauer, Roland Kehm, Anna M Eis-Hübinger, Dirk Jäger, Phillippe A Ferderspil, Christel Herold-Mende, Gerhard Dyckhoff, Roland E Kontermann, Michaela AE Arndt, and Jürgen Krauss. Generation of „LYmph Node Derived Antibody Libraries“ (LYNDAL) for selecting fully human antibody fragments with therapeutic potential. mAbs 6:1, 130-142; January/ February 2014; ©2014 Landes Bioscience