

4 Klonierung bzw. Generierung von Genen für die Genexpression

Inhaltsvorschau

Für die Produktion biopharmazeutischer Produkte werden deren Gene benötigt. In diesem Kapitel wird erläutert, wie die Gene, die für biopharmazeutische Produkte bzw. für Naturstoffbiosynthese-Enzyme kodieren, kloniert werden können. Die Herstellung von antikörperkodierenden Genen wird beschrieben, außerdem werden einige Datenbanken und Computerprogramme, die zur Analyse von Sequenzdaten herangezogen werden können, angezeigt.

4.1 Gene, die für Proteine kodieren

cDNA: komplementäre DNA (durch reverse Transkriptase aus mRNA herstellbar)

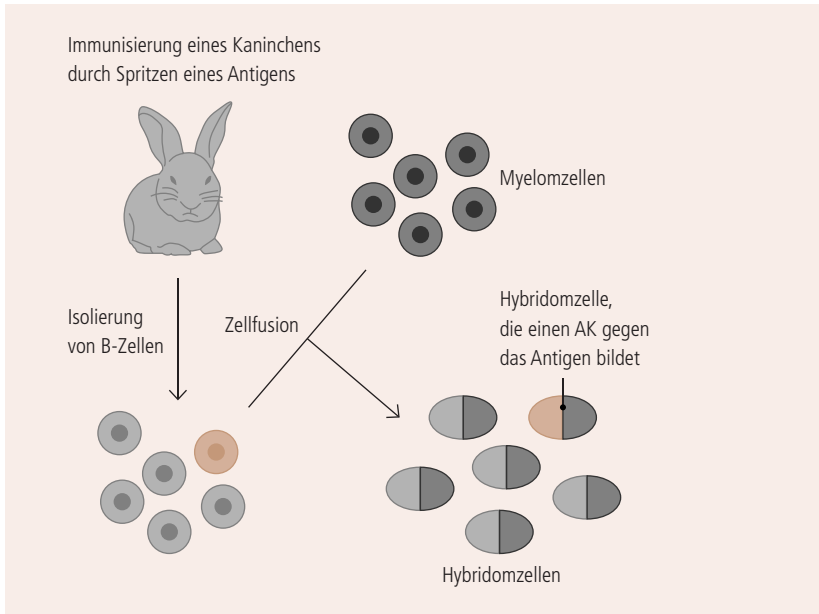
Fortschritte der Molekularbiologie, die erfolgreiche Durchführung von Genomprojekten, die Etablierung der Bioinformatik und die Möglichkeit der Herstellung synthetischer Gene haben das Auffinden von Genen, die für ein Protein kodieren, enorm vereinfacht. Standen früher die Sequenzierung von Proteinen und die Herstellung und das Screening von cDNA-Banken im Mittelpunkt der Forschung, um ein Gen, das für ein Protein kodiert, zu finden und zu klonieren, so kann man heute auf Datenbanken zurückgreifen, in denen Sequenzen zahlreicher Proteine und deren Gene hinterlegt sind. Schnell findet man die Sequenz des Gens, das man exprimieren will. Am Computer entwickelt man dann eine geeignete DNA-Sequenz, die eine optimale Expression des Gens in einem auszuwählenden Organismus erlaubt. Die Synthese des DNA-Fragments ist preiswert und kann innerhalb kurzer Zeit realisiert werden. Es kommt jedoch auch heute noch immer wieder vor, dass unbekannte Gene kloniert werden müssen. Wichtige molekularbiologische Methoden, die hierfür eingesetzt werden können, sind das Aufreinigen und Ansequenzieren von Proteinen, die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) sowie die Herstellung und das Screening von cDNA-Banken. Die Optimierung von Genen bzw. der Genprodukte kann notwendig werden, um die Stabilität oder die Aktivität eines Proteins zu verbessern. Dies kann, besonders dann, wenn die Struktur des Proteins bekannt ist, auf rationalem Weg erfolgen oder durch Zufallsmutagenese. Auch für diese Verfahren stehen zahlreiche molekularbiologische Verfahren zur Verfügung.

4.2 Gene, die für Antikörper kodieren

G. Köhler: dt. Wissenschaftler (1946–1995)

C. Milstein: argentin. Wissenschaftler (1927–2002)

Die Gewinnung eines Antikörpers (AK) ist ein recht langwieriger Prozess, der auf die Arbeiten von G. Köhler zurückzuführen ist. Zusammen mit C. Milstein etablierte er 1975 die Hybridom-Technik, welche die Herstellung von stabilen AK-produzierenden Zellen ermöglicht.



○ **Abb. 4.1** Hybridom-Technik zur Herstellung von murinen Antikörpern

Hybridom-Technik

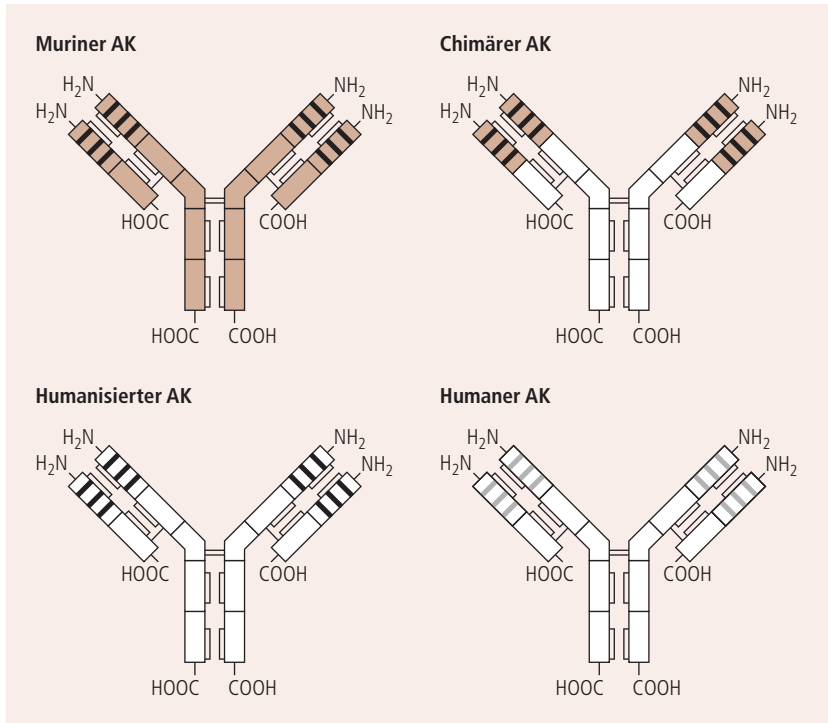
Zu Beginn des Prozesses wird eine Maus mit einem Antigen immunisiert. Hier muss berücksichtigt werden, dass kleine Moleküle (<10 kDa) kaum immunogen wirken und an Träger gekoppelt werden müssen. Die Milz der Maus bildet anschließend AK-produzierende B-Lymphozyten. Diese werden isoliert und mit Myelomzellen fusioniert. Die dabei verwendeten Myelomzellen weisen eine Mutation im Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase-Gen auf, dessen Produkt für die Bildung von Purinen essenziell ist. Eine aus einer Milzzelle und einer Myelomzelle entstandene Zelle wird als Hybridom bezeichnet (○ Abb. 4.1). Hybridomzellen gelten, wie Myelomzellen, als unsterblich. Um Hybridomzellen von fusionierten Milzzellen und Myelomzellen zu unterscheiden, werden alle Zellen im HAT-Medium angezogen. Das Medium enthält Hypoxanthin, Aminopterin und Thymidin. Hypoxanthin ist Substrat der Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase und kann zu Purinen umgesetzt werden. Aminopterin wirkt als Folsäure-Hemmstoff und verhindert die Biosynthese von Purinen aus Ribose-5-Phosphat und die Biosynthese von dTMP aus dUMP. Thymidin kann mittels Thymidinkinase in dTMP umgesetzt werden. Folglich können Myelomzellen nicht wachsen, da sie kein Purin bilden können. Milzzellen wachsen zunächst, sterben aber bald, weil sie eine kurze Halbwertszeit aufweisen. Nur Hybridomzellen wachsen, da sie das Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase-Gen der Milzzelle enthalten und die „Unsterblichkeit“ der Myelomzelle.

Die Identifizierung der Hybridomzelle, die einen gegen das Antigen gerichteten AK produziert, erfolgt mittels „enzyme linked immunosorbent assay“ (ELISA). Das Antigen kann nun an ein Enzym gekoppelt vorliegen, das eine leicht zu detektie-

4.2.1

B-Lymphozyten:
B-Zellen, die zu den
Leukozyten gehören

Myelomzelle: entartete
B-Zelle (Plasmazelle),
vermehrt sich im
Knochenmark



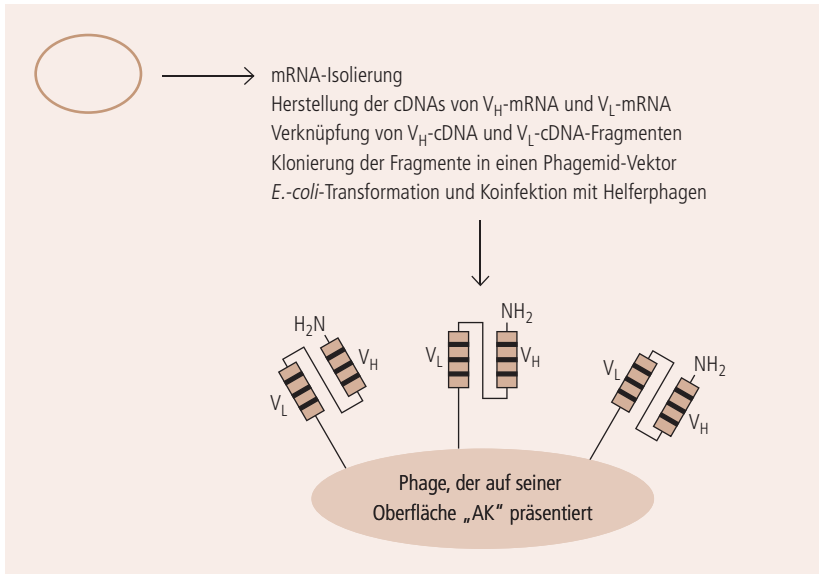
○ **Abb. 4.2** Murine, chimäre, humanisierte und humane Antikörper

rende Reaktion katalysiert. Die Bindung des Antigens an die den richtigen AK produzierende Hybridomzelle erfolgt dann durch Messung der Aktivität des ancondensierten Enzyms. Geeignete AK werden anschließend bezüglich ihrer Eigenschaften charakterisiert (Bindefähigkeiten, strukturelle Eigenschaften etc.).

4.2.2 Herstellung chimärer und humanisierter Antikörper

Während 1988 der erste monoklonale Antikörper noch unverändert eingesetzt wurde, geht man heute dazu über, die AK in eine für den Menschen verträgliche Form umzuwandeln.

Zunächst gelang es, über einen Austausch der murinen, für die Effektordomänen der AK kodierenden Gene durch analoge humane Gene, aus monoklonalen AK chimäre AK zu bilden (der Anteil an DNA, die aus der Maus stammt, liegt bei chimären AK bei ca. 30%). Bei humanisierten AK wurden dann auch die murinen Framework-Regionen durch humane ersetzt (der Anteil an DNA, die aus der Maus stammt, liegt bei humanisierten AK bei ca. 5%). Bei humanen AK sind auch die hypervariablen Bereiche humanen Ursprungs (○ Abb. 4.2).



○ **Abb. 4.3** Phagen-Display zur Herstellung humaner Antikörper

Herstellung humaner Antikörper-Gene

4.2.3

Inzwischen sind drei Methoden bekannt, die eingesetzt werden können, um humane Antikörper herzustellen. Sie werden im Folgenden beschrieben.

Phagen-Display

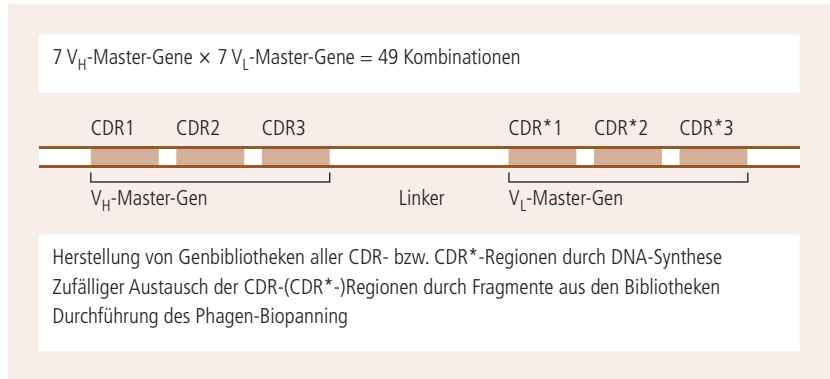
Antikörperproduzierende B-Zellen bzw. deren mRNA werden aus dem Blut eines Menschen isoliert. Nach der Herstellung einer cDNA werden mittels PCR die DNA-Fragmente, die für die variablen Regionen (V_L , V_H) der Gene der leichten und schweren Ketten kodieren, vervielfältigt. In einer zweiten PCR werden V_L - und V_H -Fragmente über eine Linker-Sequenz, die für das scFv-Fragment kodiert, miteinander verbunden. Die entstandenen Fragmente kodieren für V_H -G-G-G-G-S-S- V_L -Sequenzen („AK“).

Die PCR-Fragmente werden unter Verwendung von Phagemid-Vektoren an ein DNA-Fragment, das aus einem verkürzten, für das Hüllprotein pIII (minor coat protein) des M13-Phagen kodierenden Gen und einem für ein Signalpeptid kodierenden Gen besteht, gebunden und in *E. coli* exprimiert. Das Signalpeptid bewirkt, dass die Fusionsproteine ins Periplasma gelangen.

Nach Koinfektion mit einem M13-Helferphagen, der die Bildung des nicht modifizierten pIII und anderer Phagenproteine garantiert, werden die fusionierten „AK“ in die Außenhülle des Phagen eingebaut. Die Phagen enthalten außerdem die genetische Information des jeweiligen „AK“-Proteins, das sie auf ihrer Oberfläche präsentieren. Die Methode, mit der dann die Phagen, die das „richtige“ „AK“-Protein präsentieren, über seine Antigenbindefähigkeiten erkannt werden können, wird „Biopanning 2“ genannt. Letztendlich erhält man die DNA-Sequenz der DNA-Fragmente, die für die variablen Regionen der humanen leichten und humanen schweren Ketten eines ein bestimmtes Antigen bindenden AK kodieren (○ Abb. 4.3). Die

Phagemid-Vektor:
Hybridvektor aus
M13-Phagen und
Plasmiden

Periplasma: Zellkompartiment zwischen Cytoplasmamembran und äußerer Membran gramnegativer Bakterien



○ **Abb. 4.4** Kombinatorische Bibliotheken zur Herstellung humaner Antikörper

erhaltenen DNA-Fragmente müssen anschließend mit DNA verbunden werden, die für einen humanen Fc-Teil eines AK kodieren, um ein komplettes für einen AK kodierendes Gen zu erhalten.

Human Combinatorial Libraries

Grundlage dieser Technologie zur Herstellung humaner Antikörper ist, dass die meisten AK von Genen kodiert werden, deren DNA-Sequenzen auf sieben V_H -Sequenzen, vier $V_L\kappa$ -Sequenzen und drei $V_L\lambda$ -Sequenzen zurückzuführen sind. Durch Kombination der Gene, die für eine schwere Kette kodieren, mit Genen, die für eine leichte Kette kodieren, entstanden 49 als „Master-Gene“ bezeichnete Konstrukte, die in *E. coli* exprimierbar sind und deren Produkte, ähnlich wie bei der Phagen-Display-Methode in die Außenhülle eines Phagen eingebaut werden können. Anschließend wurden von sechs CDR-Regionen (CDR 1, CDR 2, CDR 3, CDR* 1, CDR* 2, CDR* 3) bzw. deren DNA-Sequenzen CDR- bzw. CDR*-Bibliotheken erzeugt (○ Abb. 4.4). DNA-Fragmente, die für CDRs bzw. CDR*s in den Master-Genen kodieren, wurden nun durch Fragmente aus den Bibliotheken ersetzt. Es entsteht eine AK-Bibliothek, die die Basis für die Entwicklung eines AK ist.

Aus dieser Bibliothek können durch Phagen-Biopanning AK detektiert werden, die ein bestimmtes Antigen binden. Die Optimierung der Bindefähigkeit dieser AK kann nun dadurch erfolgen, dass man in einem Antikörper CDRs bzw. CDR*s durch andere CDRs bzw. CDR*s ersetzt, die aus anderen das Antigen bindenden AK stammen. Man erhält letztendlich die DNA-Sequenz von humanen schweren und humanen leichten Ketten eines ein bestimmtes Antigen bindenden AK.

Verwendung humanisierter Mäuse

Bereits vor ca. 20 Jahren sind Mäuse (XenoMouse, HuMab-Mouse) hergestellt worden, bei denen die eigenen für Antikörper kodierenden Gene deletiert und durch humane ersetzt wurden. Zunächst waren erste Mauslinien noch eingeschränkt in ihrem AK-Bildungspotenzial, doch wurden nach und nach neue Maus-Linien erzeugt, die für die Entwicklung humaner AK eingesetzt werden konnten. Erst kürzlich gelang die Entwicklung einer Maus, die als KM-Maus bezeichnet wird. In dieser Maus sind sämtliche murinen AK-Gene durch humane AK-Gene ersetzt worden.

Unter Verwendung einer humanisierten Maus kann man somit nach der Hybridom-Technologie humane AK entwickeln. Derzeit befindet sich mit Panitumumab

ein AK auf dem Markt, der mit einer XenoMouse entwickelt wurde. AK, die mittels HuMab-Mouse-Linien entwickelt wurden, werden derzeit klinisch getestet.

Merke

Für die Herstellung humaner Antikörper stehen verschiedene Verfahren zur Verfügung:

- Phagen-Display-Methode,
- Verwendung kombinatorischer Antikörper-Gen-Bibliotheken (human combinatorial libraries),
- Verwendung humanisierter Mäuse.



Gene, die für Naturstoffbiosynthese-Enzyme kodieren

4.3

Um Gene, die für Enzyme kodieren, die an der Biosynthese eines Naturstoffs durch ein Bakterium beteiligt sind, klonieren zu können, bedient man sich heute zunächst der Genomsequenzierung. Innerhalb kurzer Zeit kann man die komplette Sequenz eines Genoms erhalten. Häufig wird die Genomsequenzierung begleitet durch die Herstellung einer Cosmidbank. Isolierte Cosmide helfen einerseits bei der Sequenzierung, andererseits kann man sie zu einem späteren Zeitpunkt verwenden, um Gene oder Gencluster ohne großen Aufwand verwenden zu können. Einzelne Biosynthese-Gene und auch ganze Biosynthese-Gencluster werden immer häufiger nicht mehr kloniert, sondern synthetisch hergestellt.

Cosmid: cos-sites aufweisendes Plasmid, das mittels Transduktion in Bakterien übertragen werden kann

Die Klonierung von Genen aus anderen Organismen (Pilze, Pflanzen, Tiere) ist auch heute noch recht schwierig. Zwar existieren auch von eukaryotischen Organismen sequenzierte Genome, doch lässt sich ein neues Genom noch immer nicht in kurzer Zeit sequenzieren. Hier werden Gene auch heute noch in cDNA-Banken gesucht.

Bioinformatische Tools (Computerprogramme und Datenbanken)

4.4

Die moderne Pharmazeutische Biotechnologie kommt ohne Datenbanken und Internet-Suchprogramme nicht aus. In **■** Tab. 4.1 sind Internetadressen angegeben, die bei der Auswertung von Sequenzdaten hilfreich sind. Mit ihnen können DNA-Sequenzen untersucht, Funktionsvorhersagen gemacht und Proteine analysiert werden.

■ **Tab. 4.1** Adressen von Computerprogrammen und Datenbanken, die zur Analyse von Sequenzdaten herangezogen werden (Stand 2013)

Name der Datenbank	Internetadresse	Funktion
Computerprogramme bzw. Programmsammlungen		
antiSMASH	http://antismash.secondarymetabolites.org/	antiSMASH ist ein Programm, das zur Vorhersage der Funktion von (Biosynthese-)Genen verwendet werden kann
BLAST	http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/	Sammlung mehrerer Programme, die den Vergleich von Sequenzen ermöglichen (Programm des NCBI)
CLUSEAN	http://redmine.secondarymetabolites.org/projects/clusean	CLUSEAN ist ein Programm, das zur Vorhersage der Funktion von Biosynthese-Genen verwendet werden kann
EMBOSS	http://emboss.sourceforge.net/	EMBOSS bietet zahlreiche Programme an, die eingesetzt werden können, um eine DNA- oder eine Protein-Sequenz zu analysieren
Galaxy	https://main.g2.bx.psu.edu/	Galaxy bietet zahlreiche Programme an, die eingesetzt werden können, um eine DNA- oder eine Protein-Sequenz zu analysieren
Glimmer	http://www.cbcb.umd.edu/software/glimmer/	Glimmer bietet zahlreiche Programme an, die eingesetzt werden können, um eine DNA- oder eine Protein-Sequenz zu analysieren
InterProScan	http://www.ebi.ac.uk/Tools/pfa/iprscan/	InterProScan ist eine Sammlung von Programmen zur Analyse von Protein-Sequenzen
MultAlin	http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/	MultAlin kann für das Sequenz-Alignment eingesetzt werden
National Center for Biotechnology Information (NCBI)	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/	NCBI bietet zahlreiche Programme an, die eingesetzt werden können, um eine DNA- oder eine Protein-Sequenz zu analysieren
Notepad++	http://notepad-plus-plus.org/release/	Notepad++ kann zur Modifizierung von Protein-Datenbank-Files verwendet werden

■ **Tab. 4.1** Adressen von Computerprogrammen und Datenbanken, die zur Analyse von Sequenzdaten herangezogen werden (Stand 2013; Fortsetzung)

Name der Datenbank	Internetadresse	Funktion
PSIPRED	http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred	PSIPRED kann zur Vorhersage einer Proteinstruktur eingesetzt werden
PyMOL	http://pymol.org/educational/	PyMOL kann zur Visualisierung von Proteinstrukturen verwendet werden
Swiss-Model	http://swissmodel.expasy.org/workspace/index.php?func=modelling_simple1	Swiss-Model kann zur Modellierung einer Proteinstruktur eingesetzt werden
TMHMM	http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/	TMHMM ist ein Programm zur Vorhersage von Transmembransequenzen
tRNA-scan-SE	http://lowelab.ucsc.edu/tRNAscan-SE/	tRNA-scan-SE ist ein Programm, das zur Vorhersage von tRNAs verwendet werden kann
WinCoot	http://www.ysbl.york.ac.uk/~lohkamp/cool/wincoot-download.html	WinCoot kann zum Übereinanderlagern von Proteinstrukturen verwendet werden
Datenbanken		
GO	http://www.geneontology.org/	Datenbank, die eine Vereinheitlichung sämtlicher Genbankeintragen zum Ziel hat
KEGG	http://www.genome.jp/kegg/	Datenbank, die Stoffwechsel- und Biosynthesewege beinhaltet
RefSeq	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/RefSeq/	Datenbank mit zahlreichen Eintragungen (Datenbank des NCBI)
TCDB		Membrantransportprotein-Datenbank
UniProtKB/Swiss-Prot	http://www.ebi.ac.uk/uniprot/	Datenbank, die nur Sequenzen von biochemisch gut untersuchten Proteinen aufnimmt
UniProtKB/TrEMBL	http://www.ebi.ac.uk/uniprot/TrEMBLstats/	Datenbank, die auch Sequenzen von nicht biochemisch untersuchten Proteinen aufnimmt

Fragen

Wiederholungsfragen

Frage 1

Welche Aussage ist bezüglich der Hybridom-Technik **nicht** richtig?

- A) Nach Immunisierung mit einem Antigen bildet die Milz der Maus AK-produzierende B-Lymphozyten.
- B) B-Zellen werden mit Myelomzellen fusioniert, es entstehen Hybridomzellen.
- C) Hybridomzellen weisen nur eine kurze Lebensdauer auf.
- D) Hybridomzellen können manchmal auch in der Produktion von AK eingesetzt werden.
- E) Moleküle mit einem Molekulargewicht < 10 kDa sind kaum immunogen.

Frage 2

Welche Aussage ist **nicht** richtig?

- A) Es existieren verschiedene Verfahren zur Herstellung humaner AK.
- B) Etwa 5 % der DNA eines Gens, das für einen humanisierten AK kodiert, stammen von einer Maus.
- C) Etwa 30 % der DNA eines Gens, das für einen chimären AK kodiert, stammen von einer Maus.
- D) AK sind meist glykosyliert.
- E) Die XenoMouse und die HuMab-Mouse sind Mäuse, die zur Herstellung von chimären AK herangezogen werden.

Synopsis

Zusammenfassung

- Unter Einsatz molekularbiologischer Verfahren lassen sich biopharmazeutische Produkte in großem Maßstab herstellen.
- Ausgangsmaterial für alle Herstellungsverfahren sind die Gene, die für die Produkte kodieren.
- Die Klonierung von Genen, die für therapeutische Proteine oder für biotechnologische Werkzeuge kodieren, ist heute wesentlich einfacher als früher, da molekularbiologische Techniken viel effizienter geworden sind.
- Auch für die Bereitstellung von Genen, die für humane Antikörper kodieren, existieren Verfahren, die die Herstellung humaner Antikörper erheblich vereinfachen.