

Antikörperproduktion

Antigenspezifische Aktivierung von B-Lymphozyten *in vitro*

SOPHIA MICHELCHEN, BURKHART MICHEEL, KATJA HANACK
UNIVERSITÄT POTSDAM

We established an *in vitro* activation protocol for the generation of monoclonal antibodies. Purified murine B lymphocytes were activated *in vitro* with combinations of antigen and selected stimuli. Within ten days we induced specific IgM and IgG antibody responses against a viral coat protein. Permanently antibody-producing hybridomas were generated to produce monoclonal antibodies.

DOI: 10.1007/s12268-022-1829-z
© Die Autorinnen und Autoren 2022

■ Antikörper sind essenzielle Werkzeuge in der modernen Laboranalytik, der medizinischen Therapie und Diagnostik. Als Reaktion auf den Kontakt mit einem Pathogen resultiert im Organismus aus dem komplexen Zusammenspiel der Immunzellen eine polyclonale Antikörperantwort. Diese heterogene Mischung unterschiedlicher Antikörper im Serum ist entscheidend für die effektive Beseitigung des Immunogens. Für biotechnologische Anwendungen hingegen werden meist monoklonale Antikörper von hoher Affinität und Spezifität benötigt. Die Herstellung solcher Antikörper ist ein zeit- und arbeitsintensiver Prozess.

Antikörperantwort *in vivo*

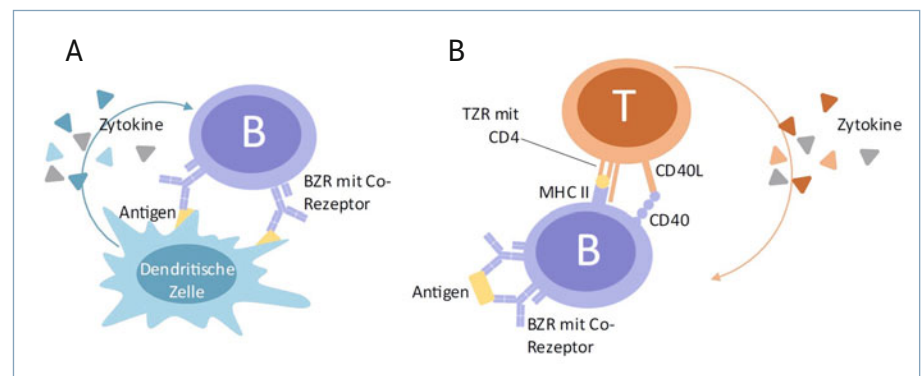
Im Organismus erkennen die auf der Oberfläche von B-Lymphozyten befindlichen B-Zell-Rezeptoren (BZR) freies oder von dendritischen Zellen (DCs) präsentiertes Antigen (**Abb. 1**, [2]). In einigen Fällen löst bereits die resultierende Quervernetzung der BZR eine Antikörperantwort aus, die man als T-Zell-unabhängig bezeichnet und die wichtig für die frühe Immunreaktion ist. Dabei entstehen meist niedrig affine IgM-Antikörper. Die Produktion spezifischer IgG-Antikörper erfolgt in der Regel nach T-zell-abhängiger Aktivierung der B-Lymphozyten (**Abb. 1**). Aktivierte T-Helferzellen übermitteln dazu Aktivierungssignale in Form von Zytokinen und durch Expression des CD40-Liganden (CD40L) auf ihrer Oberfläche [3]. Das Zusammenfinden von B-Lymphozyten mit aktivier-

ten T-Lymphozyten, die spezifisch für dasselbe Antigen sind, ist dabei entscheidend für die Antikörperantwort. Die Kombination aus Antigen, DC- und T-Zell-Signalen führt zur Aktivierung der B-Lymphozyten, die mit massiver Proliferation und Mutation der Antikörpergene einhergeht. Dabei durchlaufen die Antikörper einen Reifungsprozess, sodass hoch affine Antikörper entstehen. Bei konventionellen Methoden zur Antikörperherstellung werden Versuchstiere über einen Zeitraum von mehreren Wochen oder Monaten mit dem Antigen von Interesse immunisiert, um im Organismus eine solche Antikörperantwort auszulösen, die antikörperproduzierenden B-Lymphozyten zu ernten und weiter zu verwerten.

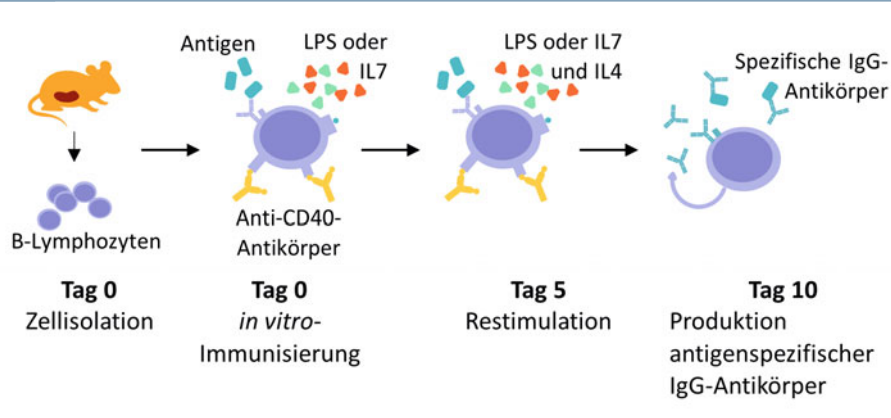
In vitro-Immunisierung

Bei einer *in vitro*-Immunisierung wird der Prozess der Immunisierung in die Kulturschale verlegt. Die entsprechenden Immunzellen werden isoliert und in Kultur mit dem Antigen stimuliert, um eine Antikörperantwort außerhalb des Organismus anzuregen. Die Notwendigkeit der *in vivo*-Immunisierung wird so umgangen, die benötigte Menge an Antigen erheblich reduziert. Es können außerdem Antigene eingesetzt werden, die für die Anwendung am lebenden Organismus ungeeignet sind, z. B. toxische oder endogene.

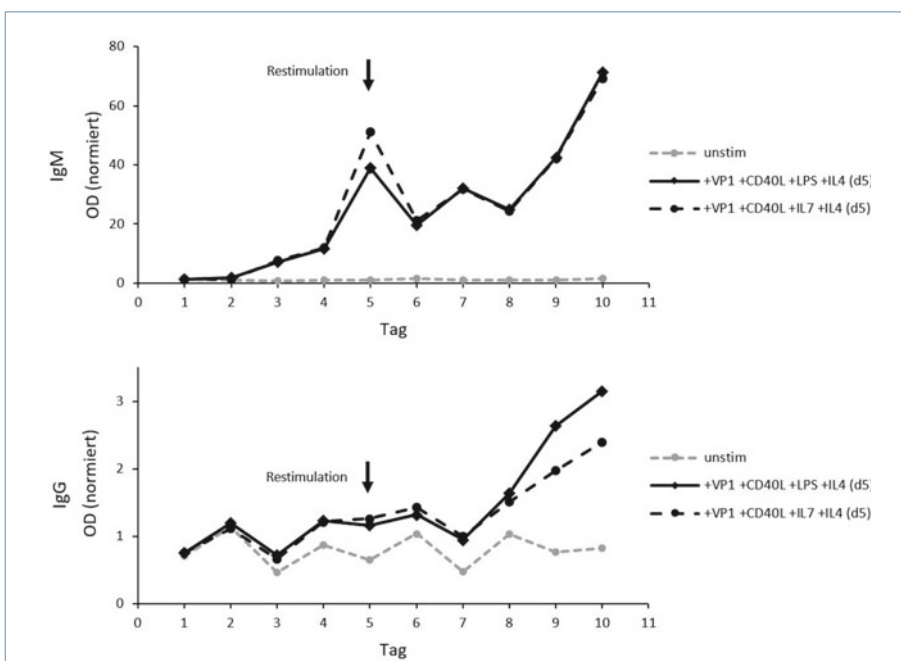
Ein solcher Ansatz wurde 1966 erstmals von Mishell und Dutton [4] publiziert, die Splenozyten einer nicht immunisierten (naiven) Maus mit Schaf-Erythrozyten als Antigen und einem Nährstoffcocktail kultivierten und so *ex vivo* eine Antikörperantwort induzierten. Seitdem wurde die Methode in verschiedenen Ansätzen mit variierenden Erfolgen adaptiert, von denen viele daran scheiterten, spezifische IgG-Antikörper hervorzu- bringen [5–7]. Die hinreichende Aktivierung der verwendeten Immunzellen ist dafür essenziell. Darüber hinaus muss die Interaktion der wenigen für das Antigen spezifischen B- und T-Lymphozyten gewährleistet werden. Die individuelle Varianz von Aktivität und Spezifität der einzelnen Immunzell-



▲ **Abb. 1:** *In vivo*-Aktivierung von B-Lymphozyten. **A**, Dendritische Zellen (DCs) präsentieren Antigen und sezernieren Zytokine. **B**, B-Lymphozyten präsentieren Antigenfragmente auf MHC-II-Komplexen, die vom T-Zell-Rezeptor (TZR) aktivierter spezifischer T-Lymphozyten erkannt wird. T-Lymphozyten senden Aktivierungssignale in Form von Zytokinen und CD40L auf ihrer Oberfläche, die mit CD40-Rezeptoren auf B-Lymphozyten interagieren [1]. BZR: B-Zell-Rezeptor.



▲ **Abb. 2:** Ablauf der *in vitro*-Immunsierung von B-Lymphozyten. Milz-B-Lymphozyten werden aus naiven Mäusen isoliert und mit Antigen und Stimulantien kultiviert. Nach fünf Tagen erfolgt eine Restimulation. Am zehnten Tag der *in vitro*-Immunsierung produzieren die B-Lymphozyten antigenspezifische IgG-Antikörper.



▲ **Abb. 3:** Spezifische Antikörperproduktion im Verlauf der *in vitro*-Immunsierung. B-Lymphozyten aus naiven Mäusen wurden mit dem Modell-Antigen VP1 und verschiedenen Stimulantien *in vitro* immunisiert und nach fünf Tagen restimuliert (↓). Ab dem dritten Tag konnten in stimulierten Ansätzen antigenspezifische IgM-Antikörper nachgewiesen werden, spezifische IgG-Antikörper ab dem achten Tag.

populationen wiederum führt zu wechselhaften Ergebnissen und schlägt sich in einer geringen Reproduzierbarkeit der jeweiligen Protokolle nieder. Das komplexe Zusammenspiel der Immunzellen während der Antikörperantwort *in vivo* wird bei seiner Abbildung *in vitro* zur Schwierigkeit.

Um diesen Ansatz zu vereinfachen, haben wir eine Methode etabliert, die ausschließlich auf der Verwendung der eigentlichen Antikörperproduzenten, den B-Lymphozyten, basiert [8]. Die Zahl der involvierten Faktoren wird dadurch reduziert und es entsteht eine kontrollierbare Umgebung für die *in vitro*-Immunantwort. Dazu wurden B-Lymphozyten aus naiven Mäusen isoliert und mit

einem Modellantigen und verschiedenen Stimuli kultiviert, die die Bedingungen der *in vivo*-Immunsierung nachahmen sollen. Nach wenigen Tagen Stimulation konnten in der Kultur antigenspezifische IgG-Antikörper nachgewiesen werden.

In vitro-Aktivierung von B-Lymphozyten

Für unsere Studie wurden die Milz-B-Lymphozyten einer naiven C57Bl/6-Maus isoliert. Die gereinigten B-Lymphozyten wurden mit dem Modellantigen VP1 (Hamster-Polyomavirus-Kapsidprotein) sowie einem Anti-CD40-Antikörper, Interleukin 4 (IL4) und IL7 oder Lipopolysaccharid (LPS) kultiviert

(Abb. 2). Nach fünf Tagen erfolgte eine Restimulation nach demselben Schema. Unstimulierte B-Lymphozyten dienten als Kontrolle. Der Kulturüberstand der Zellen wurde täglich auf die Produktion antigenspezifischer Antikörper getestet. Im Gegensatz zu den Kontrollansätzen konnten in stimulierten Ansätzen antigenspezifische IgM-Antikörper ab dem dritten Tag der *in vitro*-Immunsierung detektiert werden, spezifische IgG-Antikörper ab dem achten. Die Signalstärke nahm bis zum zehnten Tag zu und das verwendete Antigen konnte mit den im Kulturüberstand enthaltenen Antikörpern spezifisch nachgewiesen werden (Abb. 3). Als Indikatoren der erfolgreichen B-Zell-Aktivierung wurden deren Proliferation und die Expression von Aktivierungsmarkern auf der Zelloberfläche demonstriert. Die so stimulierten B-Lymphozyten konnten demnach ohne das Zutun anderer Immunzellen aktiviert und zur Produktion antigenspezifischer Antikörper angeregt werden. Aus den aktivierten B-Lymphozyten wurden durch Fusion mit Myelomzellen permanente antikörperproduzierende Zelllinien generiert, um langfristig die stabile Produktion monoklonaler Antikörper zu sichern. In nachfolgenden Versuchen konnte die Übertragbarkeit des erarbeiteten Protokolls auf andere Antigentypen gezeigt werden: Es konnten spezifische IgG-Antworten in Folge der *in vitro*-Immunsierungen gegen hitzeinaktivierte *Legionella pneumophila* und gegen ein Carrier-gekoppeltes Peptid induziert werden.

Zusammenfassung und Ausblick

In der vorgestellten Studie demonstrieren wir die effektive Induktion einer spezifischen IgG-Antikörperantwort durch *in vitro*-Aktivierung muriner B-Lymphozyten. *In vivo* ist die koordinierte Interaktion von DCs, T- und B-Lymphozyten nötig, um B-Lymphozyten spezifisch zu aktivieren und eine IgG-Antwort auszulösen. Subklasse und Spezifität der gebildeten Antikörper hängen dabei vom Antigen und den Signalen der DCs und T-Lymphozyten ab. Das kann bei Immunsierungen am Tier dazu führen, dass die resultierenden Antikörper nicht den Anforderungen entsprechen und aufwendige Modifikationen oder eine wiederholte Immunsierung mit veränderter Strategie vonnöten ist. Die *in vitro*-Immunsierung erlaubt die Induktion einer Antikörperantwort in kontrollierbarer Umgebung. Dennoch brachten viele bisherige Versuche lediglich IgM-Antikörper hervor [5–7]. Um die effiziente Aktivierung und Rei-

fung der B-Lymphozyten zu gewährleisten, war es unser Ziel, die Zahl der involvierten Variablen zu reduzieren. In unserer Studie [8] ist es gelungen, effizient und spezifisch murine B-Lymphozyten *in vitro* zu aktivieren und zur Produktion von IgG-Antikörpern anzuregen. Die *in vivo*-Immunisierung kann so ersetzt und der Zeitaufwand von mehreren Monaten auf wenige Tage reduziert werden. Gleichzeitig werden deutlich geringere Mengen Antigen benötigt, sodass sich die Methode besonders für rare Antigene oder für *in vivo*-Immunisierungen ungeeignete Antigene anbietet. Welche molekularen Mechanismen der Aktivierung zugrunde liegen und ob dabei verschiedene Populationen von B-Lymphozyten unterschiedliche Funktionen ausführen, bleibt zu untersuchen. Die Methode ist möglicherweise ebenso an B-Lymphozyten anderer Spezies durchführbar und bietet eine Grundlage für eine universelle Immunisierungsstrategie. Diese *in vitro*-Immunisierung eignet sich für die Herstellung monoklonaler Antikörper mittels Hybridomtechnologie und bietet eine effiziente Erweiterung zum Spektrum konventioneller Methoden der Antikörperentwicklung. ■

Literatur

- [1] Murphy KM, Weaver C, Janeway C (2018) Janeway Immunologie. 9. Aufl. Springer Spektrum, Heidelberg
 [2] Qi H, Egen JG, Huang AYC et al. (2006) Extrafollicular activation of lymph node B cells by antigen-bearing dendritic cells. *Science* 312: 1672–1676

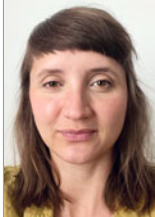
- [3] Crotty S (2015) A brief history of T cell help to B cells. *Nat Rev Immunol* 15: 185–189
 [4] Mishell RI, Dutton RW (1966) Immunization of normal mouse spleen cell suspensions *in vitro*. *Science* 153: 1004–1006
 [5] Ait Mebarek M, Wijkhuizen A, Adel-Patient K et al. (2013) Production of human antibodies by *in vitro* immunization using a fusion protein containing the transcriptional transactivator of HIV-1. *J Immunol Methods* 396: 96–106
 [6] Federspiel G, McCullough KC, Kihm U (1991) Production of monoclonal antibodies specific for African swine fever virus following *in vitro* primary immunization of mouse splenocytes in the presence of stimulated T lymphocyte supernatants. *J Immunol Methods* 145: 71–81
 [7] Wohlleben G, Gray D, Schimpl A (1996) *In vitro* immunization of naive mouse B cells: establishment of IgM secreting hybridomas specific for soluble protein or hapten from B cells cultured on CD40 ligand transfected mouse fibroblasts. *Int Immunol* 8: 343–349
 [8] Michelchen S, Micheel B, Hanack K (2021) *In vitro* immunization approach to generate specific murine monoclonal IgG antibodies. *J Immunol Methods* 499: 113149

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:

Prof. Dr. Katja Hanack
 Stiftungsprofessur Immuntechnologie
 Universität Potsdam
 Karl-Liebknechtstraße 24-25
 D-14476 Potsdam-Golm
 katja.hanack@uni-potsdam.de

AUTORINNEN UND AUTOREN



Sophia Michelchen

2009–2014 Studium der Biotechnologie und Biomedizin an den Universitäten Jena und Antwerpen, Belgien. 2015–2021 Promotion über die *in vitro*-Immunisierung von B-Lymphozyten, Universität Potsdam. Seit 2022 Postdoc im Projekt NeuroMiR: Analyse neurodegenerativer Biomarker.



Burkhard Micheel

1962–1967 Biologiestudium, HU Berlin. 1970 Promotion, anschließend Postdoc, Institut für Krebsforschung, Akademie der Wissenschaften der DDR. 1989 Professor für Immunologie, Akademie der Wissenschaften der DDR. 1991–1996 Max-Delbrück-Centrum, Berlin. 1996–2009 Professor für Biotechnologie, Universität Potsdam. Seit 2009 emeritiert, Mentor der Professur Immuntechnologie, Universität Potsdam.



Katja Hanack

1996–2002 Biologiestudium, Universität Rostock und HU Berlin. 2006 Promotion. 2006–2007 Postdoc, Charité Universitätsklinikum Berlin. 2008 Leiterin der InnoProfile Nachwuchsgruppe „Antikörper-Technologien“, Universität Potsdam. Seit 2015 Stiftungsprofessorin für Immuntechnologie, Universität Potsdam.

Hier steht eine Anzeige.

