
2.1 Grundlagen

Antikörper sind Glykoproteine, die von Wirbeltieren gebildet werden, um den Organismus vor eingedrungenen, körperfremden Substanzen zu schützen. Die fremde Substanz bindet an Rezeptoren auf der Oberfläche von reifen B-Zellen im Blutplasma und regt sie zur Teilung an. Die Plasmazellen sezernieren Antikörper, die unter anderem Viren inaktivieren, Bakterientoxine neutralisieren, fremde Zellen miteinander verkleben oder zu ihrer Zerstörung führen.

Eine Substanz, die das Immunsystem erkennt, wird als Antigen bezeichnet; löst sie eine Immunantwort aus, nennt man sie Immunogen. Ob eine Substanz eine Immunantwort auslöst und zur Produktion von Antikörpern führt, hängt zum Einen von der Substanz, zum Anderen von der Tierart ab, in die die Substanz gelangt. Die meisten Antigene sind Proteine, Glykoproteine, Lipoproteine oder große Polysaccharide mit einem Molekulargewicht größer als 10.000 Da. Niedermolekulare Stoffe, die für sich keine Immunantwort auslösen (= Haptene), können durch Kopplung an einen höhermolekularen Träger immunogen werden. Es werden dann Antikörper gegen den Träger und auch gegen das Hapten gebildet. In ähnlicher Weise kann man durch Zugabe eines Immunogens Antikörper gegen eine nicht immunogene Substanz erhalten.

Den Bereich eines Antigens, an den ein Antikörper spezifisch bindet, nennt man Epitop. Die meisten Antigene haben viele verschiedene Epitope und können entsprechend unterschiedliche Antikörper binden. Die Bindungsstärke zwischen einem Epitop und einer Bindungsstelle eines Antikörpers bezeichnet man als Affinität.

Antikörper gehören zur Proteinfamilie der Immunglobuline (Ig). Sie sind aus jeweils zwei identischen schweren und zwei leichten Polypeptidketten zusammengesetzt, die über Disulfidbrücken miteinander verknüpft sind. Jede Kette besteht aus einer variablen (V-) und einer konstanten (C-)Region.

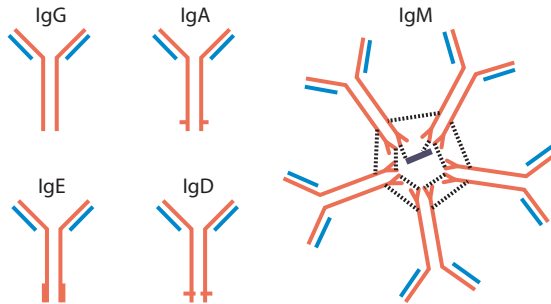


Abb. 2.1 Ig-Klassen, schematisch. Die Unterschiede betreffen die schweren Ketten (orange). IgG: Gamma-Immunglobulin, IgA: Alpha-Immunglobulin, IgE: Epsilon-Immunglobulin, IgD: Delta-Immunglobulin, IgM: My-Immunglobulin (schwarz: *joining*-Peptid, gepunktet: Disulfidbrücken)

Die fünf Klassen: IgG, IgA, IgM, IgD, IgE (Abb. 2.1) unterscheiden hinsichtlich Größe, Molekulargewicht, Struktur und Funktion.

Die IgG- und IgM-Klassen der Immunglobulin-Moleküle sind besonders geeignet für die Immunmarkierung. IgGs sind wie ein Y geformt; IgM-Moleküle bestehen aus jeweils 5 IgG-ähnlichen Molekülen, die durch ein *joining*-Peptid und Disulfidbrücken miteinander verbunden sind (Abb. 2). Die zwei kurzen Arme des Y tragen die variablen Regionen, in denen jeweils eine Antigenbindungsstelle liegt. Am Aufbau der Antigenbindungsstelle sind die variablen Regionen der schweren und der leichten Kette beteiligt, wobei die eigentliche Bindungsstelle oftmals nur aus wenigen Aminosäuren besteht, den sogenannten hypervariablen Regionen. Jeweils ein IgG-Molekül ist spezifisch für ein Epitop. Durch Verdau mit den Proteasen Papain oder Pepsin kann das Ig in unterschiedliche Fragmente zerlegt werden (Abb. 2.2): in zwei zusammenhängende kurze Arme, die $F(ab)_2$ -Fraktion (Fab = *antibody binding fraction*), in einzelne kurze Arme (Fab) und in die Fc-Fraktion (*crystalline fraction* oder *constant fraction*), die aus dem langen Arm besteht. Fab- und $F(ab)_2$ -Fragmente werden in der Immunmarkierung häufig an Stelle ganzer Antikörper verwendet. Durch ihre geringe Größe können sie leichter eindringen und in dichter Packung binden. Darüber hinaus werden unspezifische Bindungen vermindert.

Der Fc-Teil ist in allen IgG-Molekülen einer Unterklasse jeweils bei einer Tierart gleich und trägt eine immunogene Sequenz auf jeder seiner zwei identischen Aminosäureketten. Wenn ein Tier mit IgG einer anderen Tierart immunisiert wird, entwickelt es Antikörper, die überwiegend an den Fc-Anteil des fremden IgG-Moleküls binden. Dadurch wird es möglich, die Bindung eines Antikörpers an das Antigen über einen zweiten Schritt (mit Hilfe eines gegen den Antikörper gerichteten und markierten Antikörpers) verstärkt sichtbar zu machen (indirekte Immunmarkierung).

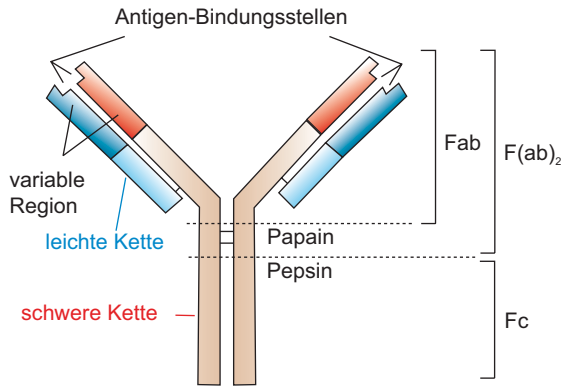


Abb. 2.2 Schema eines IgG-Moleküls. Die variablen Regionen der leichten und der schweren Kette bilden jeweils eine Antigenbindungsstelle. Durch Verdauung mit Papain werden 2 Fab-Fragmente, mit Pepsin wird ein F(ab)₂-Fragment freigesetzt

2.2 Bezug von Antikörpern

Forschungseinrichtungen, die eine Vielzahl verschiedener spezifischer Antikörper benötigen und über entsprechende Tierzuchten, -ställe und Fachpersonal verfügen, stellen die benötigten Antikörper häufig selbst her. Da für die Immunisierung nur standardisierte Zuchten und gesunde Tiere (ohne einen hohen Gehalt an bereits vorhandenen Antikörpern im Serum) verwendet werden sollten, ist der Aufwand erheblich. Für viele Anwender in Forschung und medizinischer Diagnostik ist die breite Auswahl an Produkten von kommerziellen Anbietern ausreichend. Die Suche nach einem passenden Antikörper wird durch das Internet, zum Beispiel den „Antibody Explorer“, sehr vereinfacht. Antikörper, die nicht im Handel erhältlich sind, kann man von Firmen herstellen lassen; für diese Dienstleistung gibt es ebenfalls viele Anbieter. Diese geben auch Hilfestellung bei der Auswahl, Isolierung und Aufreinigung des Immunogens.

2.2.1 Polyklonale und monoklonale Antikörper

Für die Herstellung von Antikörpern wird die später nachzuweisende Substanz (z. B. ein Protein) in ein Tier (zumeist Maus oder Kaninchen) injiziert. Wirkt die Substanz als Immunogen, regt sie die reifen B-Zellen des Immunsystems an, jeweils einen Zellklon zu produzieren, der Immunglobuline in das Blut sezerniert.

Nach dem ersten Kontakt des Körpers mit einer Fremdschubstanz erfolgt die primäre Immunantwort, bei der zunächst die Konzentration (= Titer) an IgM im Plasma ansteigt, gefolgt von einem Anstieg an IgG. Nach wiederholter Injektion erfolgt die sekundäre Immunantwort mit einem sehr starken Anstieg (*boost*) des Antikörpertiters; es werden überwiegend IgG gebildet.

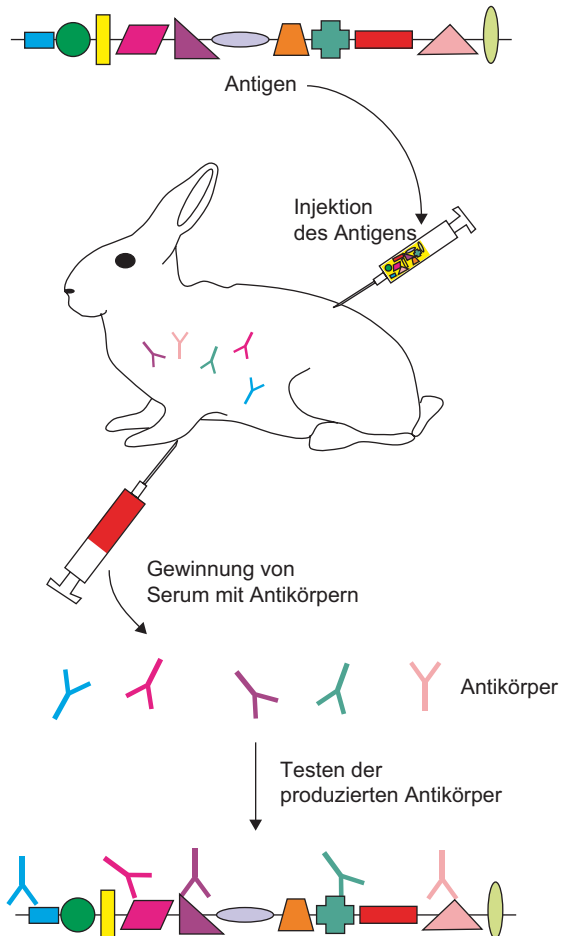
Jeweils ein Immunogen sorgt für die Produktion eines Typs von Antikörper. Große Moleküle wie Proteine setzen sich aus mehreren immunogenen Abschnitten (Epitopen) zusammen, die jeder zur Produktion eines spezifischen Antikörpers anregen. In dem Blut des immunisierten Tieres finden sich daher entsprechend verschiedene Populationen von Antikörpern gegen die injizierte Substanz. Die Antikörpermischung bezeichnet man als polyklonalen Antikörper, da sie von verschiedenen B-Zellklonen stammt (Abb. 2.3).

- Polyklonale Antikörper werden für die Immunhistochemie an fixiertem und eingebettetem Gewebe bevorzugt eingesetzt, da mehr Antikörper an ein Antigen binden, so dass eine stärkere Markierung resultiert. Sie reagieren toleranter auf kleine Änderungen der Epitope, wie sie zum Beispiel durch leichte Denaturierung (Fixierung, Entwässerung, höhere Temperaturen) auftreten. Auf der anderen Seite führen sie zu unerwünschten „Kreuzreaktionen“, wenn ähnliche Epitope bei verschiedenen Antigenen im Präparat vorhanden sind. Dies sollte man schon bei der Auswahl des Immunogens berücksichtigen.

Um einen Antikörper zu erhalten, der nur ein bestimmtes Epitop erkennt, lässt man ihn von nur einem Zellklon produzieren. Zur Herstellung monoklonaler Antikörper (Abb. 2.4) entnimmt man die Milz eines immunisierten Tieres (meistens Maus) mit antikörperproduzierenden Plasmazellen und bringt sie mit Tumorzellen (Myeloma) der gleichen Tierart zusammen. Durch künstliche Verschmelzung entstehen unsterbliche, antikörperproduzierende Hybridomazellen. Sie werden isoliert, vereinzelt, kultiviert und auf Antikörperproduktion getestet. Man erhält schließlich Klone, die jeweils nur einen Typ von Antikörper bilden, der für ein einziges Epitop spezifisch ist. Diese Klone kann man in der Zellkultur oder in Tieren beliebig vermehren, so dass die Antikörper in praktisch unbegrenzter Menge zur Verfügung stehen.

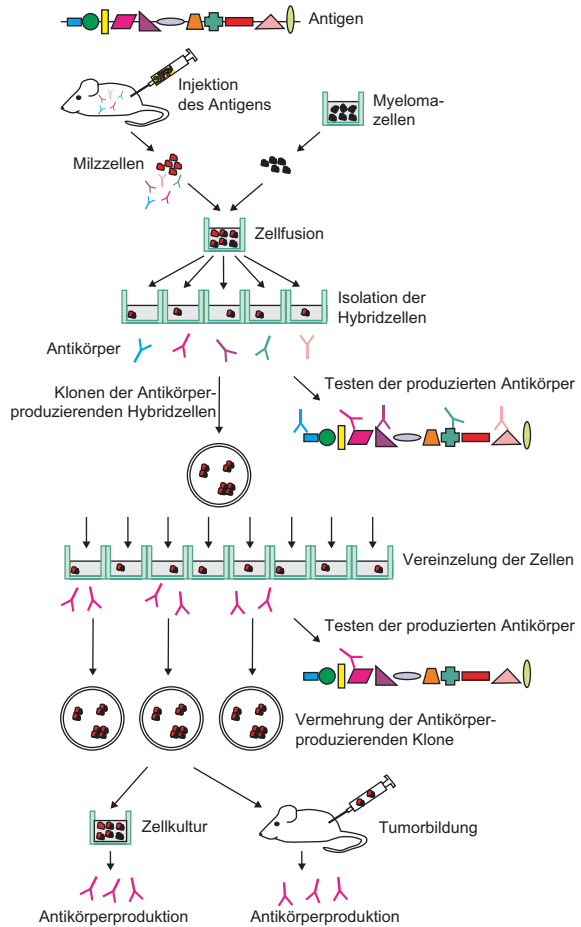
- Der Vorteil monoklonaler Antikörper für die Immunmarkierung ist ihre hohe Spezifität. Die Markierungen sind normalerweise sehr eindeutig mit wenig Hintergrund. Bei gleichen Versuchsbedingungen ergeben sie in der Anwendung identische Ergebnisse. Da monoklonale Antikörper jedoch nur jeweils ein bestimmtes Epitop erkennen, binden sie in geringerer Zahl an ein Antigen als

Abb. 2.3 Herstellung polyklonaler Antikörper. Das Antigen (aus verschiedenen Epitopen zusammengesetzt) wird in ein Tier (zumeist Kaninchen) injiziert. Das Tier bildet Antikörper, die mit dem Blut entnommen werden. Die Antikörpermischung bindet an verschiedene Epitope des Antigens



polyklonale Antikörper, so dass die Markierung insgesamt schwächer ausfällt. Dies kann man über Verstärkungstechniken ausgleichen. Häufiger als bei polyklonalen Antikörpern ergibt die Immunmarkierung mit einem monoklonalen Antikörper überhaupt kein Signal, z. B. dann, wenn sich das Epitop durch die Präparation leicht verändert hat. Daher kann es sinnvoll sein, für Immunmarkierungen mikroskopischer Präparate ein Gemisch aus mehreren monoklonalen Antikörpern einzusetzen, von denen jeder spezifisch ist für ein Epitop des Immunogens.

Abb. 2.4 Herstellung monoklonaler Antikörper



2.2.2 Peptidantikörper

Wenn es nicht möglich ist, zur Antikörperherstellung ein vollständiges Protein zu isolieren oder zu produzieren, kann ein Antikörper gegen ein synthetisches Peptid erzeugt werden. Hierzu wird aus Proteindatenbanken ein Abschnitt des Proteins von ca. 15–20 Aminosäuren ausgewählt. Aminosäuresequenz und Lage des Abschnitts entscheiden über die Qualität (Spezifität, Affinität) des Antikörpers. Die Peptidsynthese und Antikörpergewinnung wird auch als Auftragsarbeit von darauf spezialisierten Firmen durchgeführt.

Antikörper gegen Peptide unterscheiden sich von Antikörpern gegen ein vollständiges Protein:

- Die Spezifität ist ähnlich hoch wie die monoklonaler Antikörper.
- Die Affinität ist meist geringer als die polyklonaler Antikörper gegen das vollständige Protein.
- Die Immunisierung mit synthetischen Peptiden liefert Antikörper, die ausschließlich lineare Epitope erkennen können.

Bei Immunmarkierungen mit ungereinigten Anti-Peptid-Antikörpern können falsch-positive Signale auftreten, die auf Antikörper zurückzuführen sind, die nicht gegen das Peptid sondern gegen ein Trägermolekül gerichtet sind. Das Trägermolekül (z. B. BSA) wird vor der Immunisierung an das Peptid gekoppelt, um es immunogen zu machen. Der Anteil an Antikörpern gegen das Trägermolekül im Serum kann mehr als 10% betragen. Ein gegen ein Peptid gerichteter Antikörper sollte daher immer affinitätsgereinigt werden.

2.2.3 Nanobodies

Im Blut von Kamelen (Hamers et al. 1993) und Haien (Greenberg et al. 1995) entdeckte man Antikörper, die nur aus zwei schweren Peptidketten bestehen, die darüber hinaus noch besonders kurz sind. Dennoch können diese Antikörper Antigene binden. Aus diesen Antikörpern entwickelte man noch kleinere Antikörper, die nur noch aus einer einzigen variablen Domäne bestehen (*single-domain antibodies*) (Nicholis 2007). Diese Antikörper (von der Entwicklerfirma Ablynx „*Nanobodies*“ genannt) werden insbesondere für pharmazeutische Anwendungen erforscht.

Besonders kleine Antikörper sind jedoch auch für Immunmarkierungen zu zellbiologischen oder diagnostischen Zwecken interessant, da sie leichter in Gewebe

und Zellen eindringen und in dichter Packung binden können. Kürzlich gelang es, *single-domain antibodies* mit Quantum Dots zu verbinden, und damit sehr kleine Detektionsmoleküle zu entwickeln (Sukhanova et al. 2012).

2.3 Reinigung von Antikörpern

Antikörper werden in unterschiedlichen Reinheitsgraden geliefert: als Serum bzw. Antiserum oder gereinigt nach verschiedenen Verfahren.

Serum bzw. Antiserum bezeichnet das rohe Blutserum – ohne Gerinnungsfaktoren und Erythrocyten – des immunisierten Tieres. Es enthält noch Immunglobuline aller Klassen sowie andere Serumproteine. Da jedes Tier eine Reihe spontan entstandener Antikörper besitzt, sind im Serum neben polyklonalen Antikörpern gegen das Zielantigen Antikörper gegen andere Antigene vorhanden, die bei einer Immunmarkierung unspezifisch binden können. Insbesondere für die Immunzytochemie sollte das rohe Antiserum vor der Anwendung von unerwünschten Proteinen gereinigt und die spezifisch bindende Fraktion angereichert werden.

Protein A aus *Staphylococcus aureus* und Protein G aus *Streptococcus* haben eine hohe Affinität zur Fc-Region von Antikörpern. Gekoppelt an Agarose-Beads werden sie in Säulen zur Reinigung und Konzentration polyklonaler Antikörper eingesetzt. Durch die Aufreinigung des Serums mit Hilfe von Protein A- oder Protein G-Säulen werden die meisten Serumproteine, nicht aber die unspezifisch bindenden Immunglobuline aus dem Rohserum entfernt. Um eine vollständige Reinigung zu erreichen, verwendet man die Affinitätsreinigung mit Hilfe des Immunogens. Derart affinitätsgereinigte polyklonale Antikörper binden hoch spezifisch und dicht und sind daher insbesondere für Immunogoldmarkierungen in der Elektronenmikroskopie zu empfehlen. Detaillierte Rezepte zur Affinitätsreinigung erhält man bei den meisten Anbietern von Matrixmaterialien (z. B. Sigma, Pharmacia).

Monoklonale Antikörper werden von Zellkulturen abgegeben und dann als Hybridomaüberstand (*hybridoma supernatant*) abgesammelt. Alternativ werden die antikörperproduzierenden Zellen in Mäusen oder Ratten kultiviert, und die Antikörper liegen dann in der relativ unsauberen Ascites-Flüssigkeit (*ascites fluid*) vor. Hieraus sollten sie vor der Anwendung affinitätsgereinigt werden, entweder über Protein A-/G-Säulen oder über die spezifischere Affinitätschromatografie mit Hilfe des Immunogens (Hermanson et al. 1992).

Um die Antikörperkonzentration in aufgereinigten Fraktionen zu bestimmen, sollten Standard-Protein-Assays angewendet werden, bevor stabilisierende Proteine wie BSA (Rinderserumalbumin) zugesetzt werden.

Verfahren der Immunlokalisation

Ein Überblick

Mulisch, M.

2014, VIII, 47 S. 13 Abb., 12 Abb. in Farbe., Softcover

ISBN: 978-3-658-03828-1