



Antikörper

Ein Werkzeug für die Bioanalytik

Sabine Glögger

Antikörper gehören zu den gängigsten Werkzeugen, die in den Life Sciences verwendet werden. Mit ihrer Hilfe lassen sich unterschiedlichste Moleküle identifizieren. Sie werden sowohl für diagnostische Zwecke als auch in der Grundlagenforschung eingesetzt.

Allerdings sind Antikörper auch ein häufiger Grund für auftretende Probleme. Dieser Artikel gibt einen kurzen Überblick über die verschiedenen Arten von Antikörpern und deren Vor- und Nachteile sowie einige Fragestellungen, mit denen sich jeder Anwender von Antikörpern auseinandersetzen sollte.

Bei der Herstellung von Antikörpern stehen verschiedene Optionen zur Wahl. Je nachdem, wie die Antikörper generiert werden, kann man durch Immunisierung von Tieren polyklonales Serum gewinnen, man kann monoklonale Antikörper herstellen oder mit Hilfe von Genbibliotheken auch rekombinante Antikörper erzeugen.

Polyklonale Antikörper

Bei polyklonalen Antikörpern handelt es sich um eine Mischung von Antikörpern. Da

ein Antigen normalerweise unterschiedliche Epitope aufweist, werden bei einer Immunisierung eines Tieres auch Antikörper gegen die unterschiedlichen Epitope gebildet. Der Anteil der gewünschten Antikörper in dem Gesamtpool an Antikörpern beträgt maximal 10%, häufig auch sehr deutlich darunter. Vorteil der polyklonalen Antikörper ist die einfache, schnelle und kostengünstige Herstellung. Allerdings ist die herstellbare Menge limitiert. Zudem sollten sie vor Benutzung aufgereinigt werden, es treten chargenbedingte Schwankungen auf und es kommen meist diverse Kreuzreaktionen vor.

Monoklonale Antikörper

Im Gegensatz hierzu werden monoklonale Antikörper nur von einem B-Zell-Klon gebildet. Daher erkennt ein monoklonaler Antikörper nur ein einziges Epitop des Antigens. Durch die Monospezifität werden Kreuzreaktivitäten im Vergleich zu polyklonalen Antikörpern deutlich verringert. Da sich die Hybridomazellen, die die Antikörper produzieren, in Kultur normalerweise problemlos vermehren lassen, können monoklonale Antikörper in großen Mengen und zeitlich unbegrenzt hergestellt werden. Auch bleibt

die Qualität im Idealfall immer gleich, was eine hohe Reproduzierbarkeit verspricht. Die Aufreinigung aus der Zellkultur ist einfacher als aus Serum. Nachteile der monoklonalen Antikörper sind deren aufwändigere und länger dauernde Herstellung. Außerdem müssen die Zellen genetisch stabil sein und dürfen nicht die Fähigkeit verlieren, Antikörper zu produzieren. Aktuelle Studien zeigen, dass viele monoklonale Antikörper nicht monospezifisch sind, da die Hybridome unter Umständen eine genetische Heterogenität aufweisen und somit Antikörper unterschiedlicher Spezifität produzieren [1]. Zudem zeigte sich, dass sich ein Klon und damit der produzierte Antikörper im Laufe der Kultur durchaus verändern kann.

Rekombinante Antikörper

Als Alternative zu poly- und monoklonalen Antikörpern gibt es auch rekombinante Antikörper.

Diese werden hauptsächlich für therapeutische Anwendungen hergestellt und spielen in der Forschung noch keine so große Rolle. Die Antikörper werden durch Selektion aus Antikörpergenbibliotheken gewonnen, die Proteinbiosynthese erfolgt dann meist in Bakterien.

Mit dieser Methode lassen sich große Mengen an Antikörpern in gleichbleibender Qualität produzieren. Allerdings kann sich, bei bakterieller Expression, eine fehlende Glykosylierung und die nicht korrekte räumliche Faltung mitunter als problematisch erweisen. Aus Genbibliotheken generierte Antikörper zeigen zudem mitunter schlechte Lagerstabilitäten, ohne dass die Gründe bislang klar erforscht sind.

Auswahl des richtigen Antikörpers

Bei der Auswahl eines Antikörpers sollte man wissen, für welche Anwendung man diesen verwenden möchte. Denn jede Anwendung stellt eine andere Anforderung an einen Antikörper.

Antikörper, die z.B. gegen ein synthetisches Peptid generiert wurden, funktionieren bisweilen nicht gut, wenn die native Konformation des Gesamtproteins mit intakter 3-D Struktur erkannt werden soll. Solche Antikörper funktionieren dann manchmal bei einer Immunoprecipitation oder bei Immunhistochemie nicht. Sie sind aber unter Umständen für einen Western Blot sehr gut geeignet, da dort das Protein in denaturierter Form vorliegt. Umgekehrt kann auch ein Antikörper, der durch Immunisierung mit einem gereinigten full-length Protein hergestellt wurde, sehr gut zum Nachweis nativer Strukturen sein, aber sich für denaturierte Proteine als ungeeignet erweisen.

Bei kommerziell erhältlichen Antikörpern verspricht das Label auf der Verpackung oft was anderes, als das was sich tatsächlich darin befindet. Deshalb sollten Antikörper gewisse Kriterien erfüllen. Zum einen sollten sie spezifisch sein, d.h. sie sollten zwischen unterschiedlichen Antigenen unterscheiden können und beispielsweise so wenig wie möglich mit strukturell ähnlichen Strukturen kreuzreagieren. Zum anderen sollten sie eine hohe Affinität aufweisen. Diese charakterisiert die Stärke, mit der das Epitop gebunden wird. Und zuletzt ist noch die Reproduzierbarkeit wichtig. Damit ist gemeint, dass die Verwendung desselben Antikörpers über die Zeit mit unterschiedlichen Chargen immer noch zum selben Ergebnis führt. Je nach der gewünschten Verwendung des Antikörpers – dem intended use – sollten diese Kriterien jeweils mehr oder weniger stark bei der Auswertung und Entscheidung gewichtet werden

[2]. Die Erfahrung zeigt jedoch, dass dies nicht immer ausreichend untersucht wird.

Der Antikörpermarkt ist ein Milliardenmarkt und man schätzt, dass in den USA alleine 350 Millionen US-Dollar jährlich wegen schlechter Antikörper verschwendet werden [3].

Bei der Vielzahl an Antikörpern, die gegen viele unterschiedliche Zielproteine angeboten werden, ist es leider häufig so, dass die Antikörper nur unzureichend charakterisiert und validiert sind sowie experimentelle Daten nicht zur Verfügung stehen. Meist ist es für die Hersteller schwer machbar, jeden Antikörper für jede mögliche Anwendung zu validieren. Daher liegt ein Teil der Verantwortung auch beim Anwender, seinen Antikörper im entsprechend biologisch relevanten System mit den entsprechenden Kontrollen zu testen. Es gibt allerdings schon Initiativen und auch Hersteller, die versuchen, Qualitätsstandards für Antikörper zu etablieren [4,5]. Prinzipiell ist es immer hilfreich und empfehlenswert, wenn vom Hersteller umfangreiche Informationen über den Antikörper zur Verfügung gestellt werden. Dies können z.B. Informationen zum Immunogen sein, Angaben zur Affinität und zu beschriebenen Kreuzreaktivitäten, Tests in diversen Anwendungen (z.B. Western Blot, ELISA, IHC, IP), Positiv- und Negativkontrollen sowie im Idealfall Testergebnisse zur Chargenkonsistenz.

Richtige Anwendung eines Antikörpers

Wenn man dann den „richtigen“ Antikörper gefunden hat, gibt es immer noch Fallstricke, die es zu beachten gibt. Zum Beispiel können sich durch Markierung die Bindungseigenschaften des Antikörpers wieder verändern und es können zusätzliche Störungen durch das Label auftreten. Auch kann die Haltbarkeit der Antikörper mitunter kritisch sein. Viele lassen sich problemlos über längere Zeiträume bei -20°C lagern, während andere bereits schnell ihre Funktion verlieren und auch Einfrier- und Auftauzyklen schwer verkraften. Daher sollte man bei jedem Experiment überprüfen, ob der Antikörper noch funktionsfähig ist. Hier sollte man auch unbedingt die Angaben des Herstellers zu Lagerung und Haltbarkeit beachten. Ten-

denziell sind polyklonale Antikörper dabei in der Regel robuster als monoklonale. Für Antikörper, die man häufig nutzt, gibt es mittlerweile auch spezielle Stabilisierer, in denen man den Antikörper verdünnt und dann im Kühlschrank lange Zeit ohne Verlust an Funktionalität lagern kann. Solche Lösungen wurden zunächst für die Immunodiagnostika-Produktion entwickelt, werden aber mittlerweile auch für Forschungsanwendungen angeboten. Die Stabilität und Funktionalität des Labels (z.B. Enzym, Fluoreszenz) kann ebenfalls kritisch sein. Fluoreszenzmarkierte Antikörper können Aggregate bilden, also regelrecht verklumpen, oder die Peroxidase kann ihre Aktivität verlieren. Auch für diese gelabelten Antikörper gibt es spezielle Stabilizer (z.B. Peroxidase (HRP) oder Alkalische Phosphatase (AP) Stabilizer) in denen die Antikörper bei 4°C gelagert werden können und somit nicht eingefroren werden müssen.

Ausblick

Antikörper sind sehr nützliche und vielfältige Werkzeuge. Allerdings sollte man sich immer im Klaren darüber sein, für was man sie einsetzen möchte und welche Kriterien sie dabei erfüllen müssen. Die kritische Auswahl und die eigene Testung mit passenden Kontrollen werden mitunter zu wenig beachtet. Das kann zu falschen Ergebnissen oder falschen Interpretationen von Ergebnissen führen. Dieser Problematik sollte man sich bewusst sein und so genau hinschauen, dass man sicher sein kann, dass der verwendete Antikörper das gewünschte Target – und nur das gewünschte Target – erkennt.

KONTAKT |

Dr. Sabine Glöggler
Candor Bioscience GmbH
Wangen, Deutschland
s.gloeggler@candor-bioscience.de
www.candor-bioscience.de