

3. Blandini F, Armentero M-T. (2012). Animal models of Parkinson's disease. *FEBS J* 279: 1156–1166.
4. Blesa J, Przedborski S. (2014). Parkinson's disease: animal models and dopaminergic cell vulnerability. *Front Neuroanat* 8: 155.
5. Dawson TM, Ko HS, Dawson VL. (2010). Genetic animal models of Parkinson's disease. *Neuron* 66: 646–61.
6. Gaj T, Gersbach CA, Barbas CF. (2013). ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends Biotechnol* 31: 397–405.
7. Konopka W. (2004). Zwierzęta transgeniczne w neurobiologii. *Konf „Nowe Metody w Neurobiologii”* 21–26.
8. Kozubski W, Liberski P. (2006). *Neurologia: podręcznik dla studentów medycyny*. Wydawnictwo Lekarskie PZWL: Warszawa.
9. Lee Y, Dawson VL, Dawson TM. (2012). Animal models of Parkinson's disease: vertebrate genetics. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2: a009324.
10. Miko I, LeJeune L (red). (2009). *Essentials of Genetics*. NPG Education: Cambridge, MA.
11. Modliński JA, Karasiewicz J. (2001). Klonowanie somatyczne ssaków. *Med Wieku Rozwoj* nr 1: 9–25.
12. Overbeek PA. (2014). Factors Affecting Transgenic Animal Production. In: *Transgenic Animal Technology: A Laboratory Handbook*, Pinkert, CA (red), Elsevier, ss 71–107.
13. Pinkert, C.A., Irwin, M.H., Moffatt RJ. (1995). Transgenic animal modeling. In: *Molecular Biology and Biotechnology*, Meyers, RA (red), VCH Publishing: New York, ss 901–907.
14. Vekrellis K, Xilouri M, Emmanouilidou E, Rideout HJ, Stefanis L. (2011). Pathological roles of α -synuclein in neurological disorders. *Lancet Neurol* 10: 1015–1025.
15. Welchko RM, Lévêque XT, Dunbar GL. (2012). Genetic rat models of Parkinson's disease. *Parkinsons Dis* 2012: 128356.

Barbara Kosmowska. E-mail: mroz@if-pan.krakow.pl

PRZECIWCIAŁA – NARZĘDZIE PRZYRODY I CZŁOWIEKA

Alicja Görlich (Kraków)

Streszczenie

Poznanie molekularnego mechanizmu i specyfiki wzajemnego oddziaływania antygeny i przeciwciała leży u podstawy rozwoju nowych technik badawczych, tzw. immunotechnik. Wykorzystują one interakcję pomiędzy antygenem i przeciwciałem jako narzędzie do wykrywania i izolowania innych cząsteczek biologicznie czynnych. Kluczową rolę w tej metodzie odgrywają przeciwciała, które wykorzystywane są jako markery badanych molekuł. Niepodważalną wartość zastosowania przeciwciał do celów badawczych opisuje metaforyczne stwierdzenie, że przeciwciała są koniem pociągowym nauk biologicznych i medycznych. Jednak pomimo powszechności i doniosłości ich stosowania, efektywność metod immunologicznych zależy od wielu czynników, które determinują precyzję i specyficzność przeciwciał użytych w danej technice. Artykuł zwraca uwagę na konieczność tzw. walidacji przeciwciał, podczas której należy wykazać, że zastosowane przeciwciała są nie tylko specyficzne i selektywne, ale też zapewniają wysoką powtarzalność w kolejnych eksperymentach.

Abstract

The understanding of the molecular mechanism and the specificity of interactions between antigen and antibody underlies the development of the new techniques, the so called immunotechniques. Immunotechniques use these interactions as a tool to identify and isolate other biomolecules. The key role in this method play antibodies, which are used as the markers of investigated molecules. Antibodies are real workhorses for life science research. The efficiency of immunotechniques, however, depends on many factors, which determine the specificity of antibodies used in the assay. This article points to the necessity of the standardisation of antibodies, named antibody validation. During validation it must be shown that not only are the antibodies specific and selective but they can also provide reproducible results.

Reakcja odpornościowa organizmu

W toku ewolucji zwierząt w ich organizmach wykształciły się złożone systemy obrony przed czynnikami chorobotwórczymi (patogenami). Elementami tych systemów są wyspecjalizowane komórki odpornościowe, które nie tylko rozpoznają patogen, ale w następstwie uruchamiają mechanizmy, które ten patogen neutralizują.

Szczególne miejsce wśród systemów obronnych zwierząt zajmuje układ odpornościowy kręgowców, w którym rolę wyspecjalizowanych komórek odpornościowych pełnią limfocyty, jeden z typów komórek obecnych w krwi.

Limfocyty są produkowane w szpiku kostnym. Część z nich dojrzewa w szpiku, przekształcając się w populację limfocytów B (litera B pochodzi od nazwy narządu ptaków - kaletki Fabrycjusza, łac. *bursa fabricii*, w którym dokonano odkrycia tych komórek), a część migruje do grasicy, gdzie dojrzewa do tzw. limfocytów T (*thymus* – graseica). Te dwa typy limfocytów posiadają na powierzchni błony komórkowej specyficzne receptory. Receptory te wiążą obce cząsteczki wywołując odpowiedź obronną organizmu. Na poziomie komórkowym oznacza to zmianę w liczbie limfocytów B i T oraz w ich zachowaniu, gdyż patogeny związane z receptorami stymulują te limfocyty do podziałów, tym samym inicjując tzw. selekcję klonalną, czyli pojawienie się klonu identycznych limfocytów potomnych.

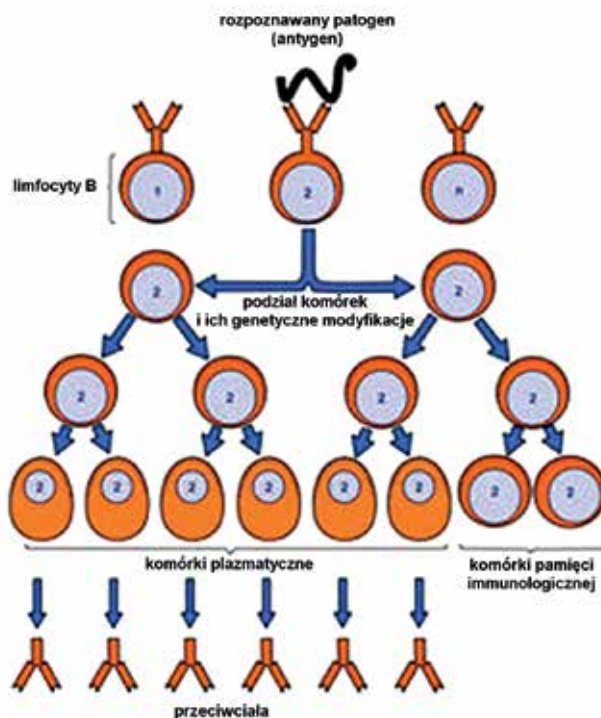
Choć oba typy limfocytów wchodzi w interakcję z patogenem, a następnie dzielą się, dając linie siostrzanych komórek (klony) o określonych funkcjach, to tylko limfocyty B dają początek tzw. komórkom plazmatycznym, które syntetyzują i wydzielają rozpuszczalne białka, zwane przeciwciałami (ang. *antibody*), których rolą jest rozpoznawanie i wiązanie obcych, patogennych cząsteczek (Ryc. 1).

Ponieważ każdy limfocyt ma na swej powierzchni jeden rodzaj receptorów, więc linia klonalna wywodząca się od jednego limfocytu B produkuje jeden typ przeciwciał, swoistych w stosunku do określonego fragmentu patogenu, który zapoczątkował reakcję. Patogen, który wyzwała produkcję specyficznych przeciwciał nazywany jest antygenem. Nazwa ta pochodzi od początku angielskich słów *antibody generation* i odnosi się do każdego czynnika stymulującego produkcję przeciwciał.

Czym jest antygen ...

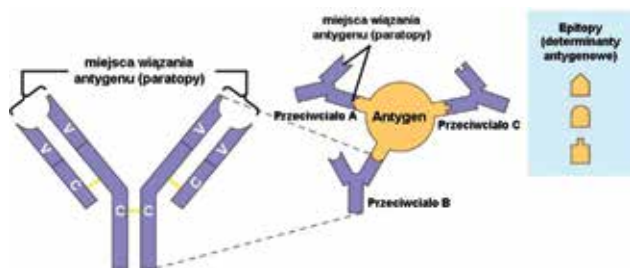
Antygen, w sensie chemicznym jest najczęściej białkiem lub polisacharydem o wysokiej masie

cząsteczkowej. Antygenami są także wirusy i bakterie posiadające wewnątrz lub na swej powierzchni immunogenne (czyli wywołujące odpowiedź odpornościową) cząsteczki. Polipeptydy, lipidy, kwasy nukleinowe i wiele innych biomolekuł może również oddziaływać jako antygen. Małe cząsteczki (tzw. hapteny), na przykład niektóre leki, cukry proste czy aminokwasy, pod warunkiem, że są przyłączone do większych białkowych nośników, również mogą wywołać odpowiedź immunologiczną.



Ryc. 1. Mechanizm selekcji klonalnej limfocytów B. Źródło: http://www.neuro.mpg.de/26129/news_publication_570455?c=22167, zmienione.

Na powierzchni antygeny znajdują się specyficzne regiony, tzw. **epitopy** (inaczej **determinanty antygenowe**), które są rozpoznawane przez przeciwciała (Ryc. 2). Regiony te są albo ciągłymi fragmentami łańcucha aminokwasów (tzw. epitopy linearne) albo złożone są z wielu odległych odcinków łańcucha, które tworzą jeden epitop po zmianach konformacyjnych, gdy cząsteczka osiągnie drugo- i trzeciorzędową strukturę (tzw. epitop konformacyjny). Jeden antygen może posiadać wiele epitopów. Na przykład insulina ma ich około 115 [9]. Praktycznie całą powierzchnię antygeny mogą tworzyć zachodzące na siebie epitopy rozpoznawane przez odrębne przeciwciała. Determinantą antygenową może być zaledwie 5–8 aminokwasów (w przypadku antygeny białkowej) czy 1–6 monosacharydów (w przypadku polisacharydu).



Ryc. 2. Determinanty antygenowe. Źródło: Campbell N. A., Reece J. B., Biologia wyd. 2012, zmienione.

... a czym jest przeciwciało?

Przeciwciało (często nazywane immunoglobuliną, w skrócie Ig) jest glikoproteiną. Zbudowane jest z czterech łańcuchów polipeptydowych, dwóch tzw. ciężkich (około 450–575 reszt aminokwasowych) oraz dwóch tzw. lekkich (około 220 reszt aminokwasowych), połączonych mostkami dwusiarczkowymi w symetryczną strukturę. W schematycznym ujęciu kształtem przypomina literę Y (Ryc. 3 i 4). Poszczególne części cząsteczki immunoglobuliny pełnią stałe funkcje, z których najistotniejszą jest wiązanie antygeny. Miejsce, w którym wiązany jest antygen określane jest jako **paratop** lub **antydeteminanta**. Są nim dwa tzw. regiony Fab (ang. **fragment antigen-binding**), obejmujące skrajne obszary ramion litery Y. Miejsce rozpoznające antygen jest kombinacją aminokwasów ciężkiego i lekkiego łańcucha. Dolna część „Y”, nazywana regionem Fc (ang. **fragment crystalizable**), nie jest zaangażowana w rozpoznawanie antygeny. Region ten jest ważny ze względu na to, że sam może być rozpoznawany jako antygen lub też wiązać się z innymi dużymi białkami.

Sekwencja aminokwasów w łańcuchach lekkich i ciężkich w miejscu paratopu jest wysoce zmienna. Wynika ona z rearanżacji kilkuset genów kodujących łańcuchy przeciwciała oraz z mutacji somatycznych [3].

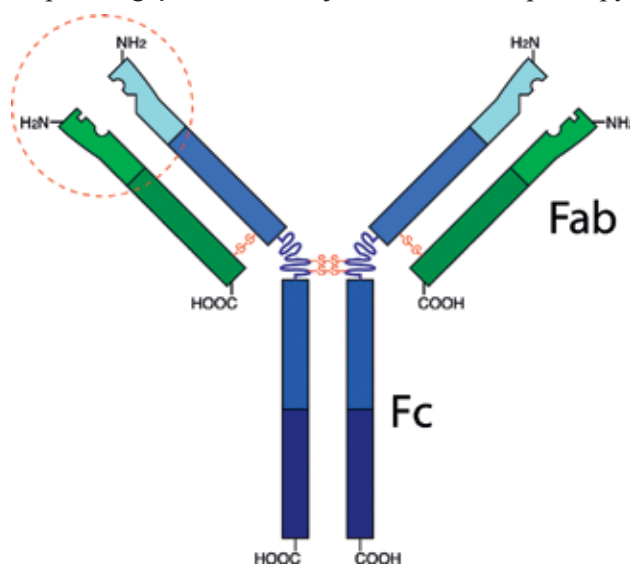
Przeciwciała podzielono na pięć klas: IgG, IgM, IgA, IgD oraz IgE. Kryterium stanowią różnice w budowie łańcucha ciężkiego.

Interakcja antygen-przeciwciało

Interakcja pomiędzy antygenem i przeciwciałem polega na dopasowaniu przestrzennym powierzchni epitopu i paratopu. Odpowiedzialny za to jest tak zwany region CDR łańcuchów aminokwasowych paratopu (CDR, ang. *complementarity determining region*), który tworzy powierzchnię komplementarną do powierzchni antygeny. Wspomniana wyżej zmienność dotyczy właśnie tych regionów i warunkuje dopasowanie. A im ono dokładniejsze, tym mocniejsze

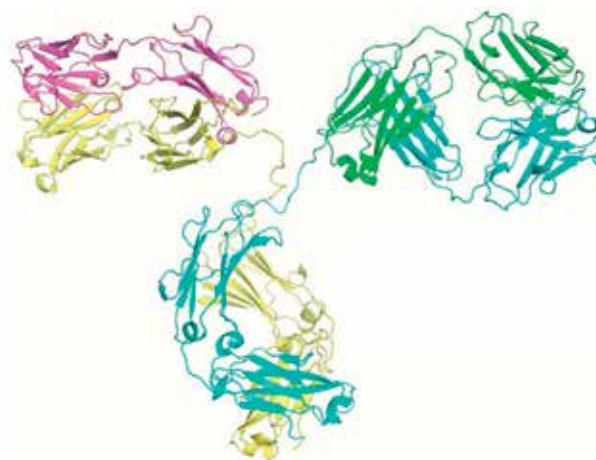
oddziaływanie, tym większe tzw. powinowactwo przeciwciała do antygeny. Pomiędzy przeciwciałem a antygenem nie powstają wiązania chemiczne – oddziaływanie między nimi ma charakter niekowalencyjny, nie jest trwałe i zachodzi poprzez wiązania wodorowe, elektrostatyczne lub siły van der Waalsa.

Paratopy jednego przeciwciała działają niezależnie, to znaczy, że każdy z dwóch paratopów może oddziaływać z różnymi, spokrewnionymi lub nie, epitopami [8]. Również jeden epitop może być rozpoznany jako komplementarny przez dwa zupełnie różne pod względem sekwencji aminokwasów paratopy,



Ryc. 3. Schemat cząsteczki przeciwciała.

zielony – łańcuchy lekkie, niebieski – łańcuchy ciężkie, jasnoniebieski i jasnyniebieski (w kółku) – regiony zmienne, Fab – miejsce rozpoznające antygen, Fc – region rozpoznawany przez inne przeciwciała jako antygen, -S-S- – mostki dwusiarczkowe, -NH₂ oraz -COOH – grupy funkcyjne końcowych aminokwasów łańcucha białkowego. Źródło: <http://xray.bmc.uu.se/lars/Practicals/Immun/antibody.html>, zmienione.



Ryc. 4. Diagram wstążkowy (model wstążkowy) 3D przedstawiający organizację przestrzenną łańcuchów białkowych cząsteczki przeciwciała. Niebieski i żółty – łańcuchy ciężkie, fioletowy i zielony – łańcuchy lekkie. Źródło: http://nfs.unipv.it/nfs/minf/dispense/immunology/lectures/files/structure_abs_tcr.html, zmienione.

ponieważ możliwe jest podobieństwo przestrzenne pomimo różnic w składzie aminokwasowym łańcucha. Zostało to potwierdzone badaniami krystalograficznymi [5].

Przeciwciało jako narzędzie badawcze

Poznanie specyfiki wzajemnego oddziaływania antygeny i przeciwciała uczyniło możliwym powstanie nowych technik badawczych, tzw. immunotechnik, które wykorzystują interakcję pomiędzy tymi dwoma biomolekułami jako narzędzie do badania cząsteczek biologicznie czynnych. Przeciwciała odgrywają w nim kluczową rolę, gdyż wykorzystywane są jako markery badanych molekuł, będących zarazem potencjalnymi antygenami.

W ogólnym zarysie techniki te polegają na tym, że cząsteczki przeciwciała skierowanego przeciwko badanemu antygenowi są przyłączane do niego w kontrolowanych warunkach. Przeciwciała te są „uzbrojone” w znaczniki chemiczne, które dzięki procesom chemicznym lub fizycznym, którym są poddawane, pozwalają uwidocznąć obecność antygeny (badanej cząsteczki).

Przeciwciała skierowane przeciwko określonemu antygenowi są produkowane w organizmach zwierząt laboratoryjnych, a następnie izolowane i oczyszczane. Obecnie można je kupić, wybierając z katalogów wielu producentów. Na świecie produkuje się miliony przeciwciał w blisko 200 firmach. Samych tylko przeciwciał skierowanych przeciwko ludzkim białkom na potrzeby terapeutyczne jest ponad 500 000; ich światowy rynek w 2014 roku był wart około półtora miliarda dolarów (wg <http://www.researchandmarkets.com>). Mając unikalny antygen, można wyprodukować skierowane przeciwko niemu unikalne przeciwciało. Jeśli uda się otrzymać przeciwciało optymalne do danego zastosowania, badacz czy lekarz otrzymuje genialne w swej prostocie narzędzie.

Z dobrodziejstwa takiego zastosowania przeciwciał korzystają nie tylko badania podstawowe, ale także diagnostyka medyczna i terapie przeciwnowotworowe. Zastosowanie przeciwciał umożliwia: (A) przeprowadzenie analiz ilościowych i jakościowych stwierdzających, czy dany antygen (badana molekula) jest obecny w preparacie, a jeśli tak, to w których komórkach/tkankach; (B) oczyszczenie (wyizolowanie) antygeny oraz innych cząsteczek lub komórek z nim połączonych, (C) uzyskanie efektów fizjologicznych w celach terapeutycznych.

Otrzymywanie przeciwciał

W odpowiedzi immunologicznej reakcją na jeden epitop antygeny jest selekcja klonalna limfocytów B o receptorach najlepiej do niego pasujących, lecz także limfocytów B o receptorach zbliżonych. Ponieważ antygen może mieć wiele różnych epitopów, w toku odpowiedzi immunologicznej powstaje jednocześnie wiele linii klonalnych produkujących przeciwciała, które są skierowane do wszystkich epitopów jednego antygeny. Zjawisko to ma fundamentalne znaczenie dla procesu otrzymywania i stosowania przeciwciał w celach badawczych.

W praktyce laboratoryjnej, aby pozyskać przeciwciała skierowane przeciwko danemu antygenowi, wprowadza się do krwioobiegu zwierząt laboratoryjnych ten właśnie antygen (immunogen), czyli immunizuje się zwierzęta. Są to najczęściej króliki i myszy, ale także szczury, kurczęta, kawy domowe (dawna nazwa: świnki morskie), owce lub kozy. Podawany antygen można przygotować w różnych formach. Może to być cząsteczka natywna, wyizolowana z naturalnego źródła albo produkt inżynierii genetycznej, np. białko rekombinowane, będące w skrajnym przypadku tylko immunogennym linearnym fragmentem większej cząsteczki. Możliwe jest również wstrzyknięcie zwierzęciu cDNA (ang. *complementary DNA*) zawierającego gen kodujący dany immunogen [4]. W tej metodzie, nazywanej genetyczną immunizacją, cDNA ulega ekspresji w organizmie gospodarza, produkując obce białko i w następstwie wywołując odpowiedź immunologiczną. Do produkcji przeciwciał w celach terapeutycznych zwykle immunizuje się zwierzęta antygenem w postaci kompletnej cząsteczki białka lub domeny antygenowej z zachowaną strukturą przestrzenną. Jeśli natomiast przeznaczeniem danego przeciwciała jest technika immunochemiczna, często powstaje ono w wyniku immunizacji zwierząt syntetycznym peptydem lub białkiem.

W odpowiedzi immunologicznej, po wielokrotnym podaniu danego antygeny, w surowicy krwi zwierzęcia pojawiają się immunoglobuliny (Ig) skierowane specyficznie przeciwko temu antygenowi. Spośród pięciu klas Ig najczęściej używane w procedurach immunochemicznych są IgG. Stanowią one 80% wszystkich przeciwciał obecnych w surowicy krwi kręgowców. Pozyskaną surowicę oczyszcza się metodą chromatografii powinowactwa kolejno z białkowych składników, które nie są immunoglobulinami oraz z innych niż IgG klas przeciwciał. Eliminuje się także te IgG, które wykazują niespecyficzne, tzw. krzyżowe reakcje (ang. *cross reactivity*) z konserwatywnymi domenami immunoglobulin zwierząt

obcych gatunkowo w stosunku do gospodarza, czyli zwierzęcia, które zostało immunizowane. Choć wysoce oczyszczona, taka surowica nadal zawiera przeciwciała o zróżnicowanej specyficzności, ponieważ są one produktami odrębnych klonów limfocytów B powstałych w odpowiedzi na wszystkie poszczególne epitopy podanego antygeny. Dlatego surowica taka nosi nazwę surowicy poliklonalnej, a przeciwciała w niej zawarte – to przeciwciała poliklonalne.

W przeciwieństwie do surowicy poliklonalnej, tak zwana surowica monoklonalna zawiera tylko jeden rodzaj przeciwciał, nazywanych przeciwciałami monoklonalnymi, będących produktami linii klonalnej tylko jednego limfocyta B, a więc skierowanych tylko i wyłącznie przeciw jednemu epitopowi podanego antygeny.

O ile surowicę poliklonalną, zwaną krótko – surowicą, można uważać za produkt względnie naturalny, o tyle przeciwciał monoklonalnych nie da się pozyskać w opisany wyżej sposób. Metoda ich produkowania została opracowana w połowie lat siedemdziesiątych ubiegłego wieku przez Cesara Milsteina i Georgesa Koehlera. Dokonali oni połączenia w jedną strukturę, czyli fuzji, komórek linii limfocytarnej produkujących swoiste przeciwciała z komórkami nowotworowymi szpiku kostnego, szpiczaka mnogiego. Zabieg ten spowodował, że nowo powstałe komórki, tzw. hybrydy (ang. *hybridomas*), otrzymały dwie cechy: zdolność nieograniczonego namnażania się, wniesioną przez komórki nowotworowe oraz zdolność do produkcji przeciwciał, która pochodzi od komórek produkujących przeciwciała. Nieustająco mnożące się komórki hybrydowe produkują stale przeciwciała, mające zawsze identyczne własności fizyczne, biochemiczne i immunologiczne. W roku 1984 roku Cesar Milstein i Georges Koehler, a także Niels Jerne – twórca teoretycznych podstaw nowoczesnej immunologii, za swe dokonania otrzymali Nagrodę Nobla.

Produkcja przeciwciał monoklonalnych pozwoliła rozwinąć nowe techniki badawcze i otworzyć kolejny rozdział w naukach biologicznych, dając precyzyjne narzędzie, dzięki któremu może być identyfikowany tylko jeden spośród wielu epitopów danego antygeny. Techniki te mają szczególne znaczenie w terapiach medycznych, gdzie istotne jest punktowe „naznaczenie” cząsteczki białka, na przykład na powierzchni komórek nowotworowych.

Przeciwciała monoklonalne mogą być zawarte w płynach hodowlanych zebranych z hodowli hybrydom (tzw. supernatanty, ang. *hybridoma tissue culture supernatants*) lub pochodzić z innej formy kultury komórek hybrydowych, jaką jest hodowanie

ich w jamie otrzewnej myszy lub innego zwierzęcia (gospodarz, ang. *host*). Jeśli wszczepi się gospodarzowi komórki hybrydom, namnażają się one i produkują płyn (ang. *ascites*) w jamie brzusznej. Płyn ten zawiera wysokie stężenie przeciwciał monoklonalnych. Wydajność takiej hodowli jest znacząco wyższa niż hodowle komórkowej hybrydom. Obecnie jednak odchodzi się od tego typu kultur. Ich miejsce zajmują bioreaktory, wyspecjalizowane aparaty do hodowli komórkowych, gdzie hoduje się wyosobnione komórki hybrydom w mediach pozwalających na produkcję wysoce skoncentrowanych supernatantów.

Przeciwciała monoklonalne są otrzymywane z hodowli komórek mysich lub króliczych. W przypadku zastosowań klinicznych system immunologiczny człowieka traktuje te przeciwciała jak antygen, który wyzwała odpowiedź układu odpornościowego. Zawansowane techniki inżynierii genetycznej umożliwiły modyfikację zwierzęcych przeciwciał monoklonalnych, która przewyższa to ograniczenie. Stworzono przeciwciała hybrydowe (lub chimeryczne), które składają się zarówno z komponent zwierzęcych, jak i ludzkich. Jeśli znaczną część pierwotnego przeciwciała monoklonalnego stanowi komponent ludzki, mówi się wtedy o przeciwciałach humanizowanych. Niektóre zwierzęce przeciwciała monoklonalne są praktycznie całe zamienione w ludzkie przeciwciała, co oznacza, że są bezpieczniejsze i bardziej efektywne w zastosowaniach medycznych. Inżynieria humanizowanych przeciwciał terapeutycznych umożliwia także podanie jedynie fragmentu przeciwciała zamiast całej cząsteczki, gdyż małe cząsteczki łatwiej docierają do celu, np. do komórek nowotworowych. Mogą one nieść ze sobą leki, cząstki radioaktywne czy inne czynniki dezaktywujące lub zabijające komórki patologiczne.

Mechanizm reakcji immunochemicznej

Techniki wykorzystujące przeciwciała do badań cząsteczek biologicznych są procesami wieloetapowymi. Ustalenie optymalnych warunków fizycznych i chemicznych środowiska reakcji immunologicznej odbywa się metodą kolejnych prób. Pomimo że producenci przeciwciał zwykle podają wstępne dane na temat warunków stosowania danego przeciwciała, każde laboratorium musi wypracować własne, szczegółowe procedury zależne od rodzaju materiału biologicznego, sposobu przygotowania próbek i celu badawczego. Jednakże sam schemat działania jest podobny w wielu zastosowaniach (Tab. 1), a celem i końcowym produktem tej kilkustopniowej reakcji jest wizualizacja powstałego kompleksu antygen-

-przeciwciało, czy to na kliszy fotograficznej, czy przy użyciu technik mikroskopowych.

ze znacznikiem (metoda bezpośrednia, ang. *direct immunodetection*). Najczęściej jednak stosuje się

Tab. 1. Charakterystyka technik immunochemicznych.

Oznaczenia: WB – Western Blotting, IHC – immunohistochemia, ICC – immunocytochemia, ELISA – test immunoenzymosorpcyjny (ang. enzyme-linked immunosorbent assay), EM – mikroskopia elektronowa, FLOW – cytometria przepływowa (ang. flow cytometry), IP – immunoprecypitacja.

TECHNIKA	FORMA ANTYGENU	TYP LIGANDU sprzężonego z przeciwciałem II-rzędowym	NARZĘDZIE ODCZYTU
WB	zdenaturowana antygen związany z powierzchnią membrany (nitroceluloza lub polifluorek winylidenu, PVDF)	ENZYM peroksydaza chrzanowa (HRP), alkaliczna fosfataza (AP)	klisza fotograficzna lub czytnik (chemiluminescencji, fluorescencji, podczerwieni)
IHC/ICC	zdenaturowana utrwalony skrawek mikroskopowy	FLUOROCHROM fluoresceina, rodamina, cyjanina i ich pochodne	mikroskop fluorescencyjny lub konfokalny
ELISA	natywna antygen zawieszony w buforze	ENZYM peroksydaza chrzanowa (HRP), alkaliczna fosfataza (AP)	czytnik płytek do ELISA
EM	zdenaturowana utrwalony ultracienki skrawek mikroskopowy	ATOM METALU złoto koloidalne, ferrytyna	mikroskop elektronowy transmisyjny
FLOW	natywna żywe komórki zawieszone w buforze	FLUOROCHROM fluoresceina, rodamina, cyjanina i ich pochodne	cytometr przepływowy
IP	natywna antygen związany z przeciwciałem sprzężonym z nośnikiem (kulki agarozowe lub magnetyczne)	wyizolowany antygen poddawany jest dalszym procedurom np. analizie Western Blot	

Początkiem procedury jest przyłączenie się przeciwciała o określonej specyficy, zwanego **pierwszorzędowym** (ang. *primary antibody*) do antygeny, który jest badaną cząsteczką (Ryc. 5). W kolejnym etapie następuje przyłączenie tak zwanego przeciwciała **drugorzędowego** (ang. *secondary antibody*), które swoim fragmentem F_{ab} przyłącza się do fragmentu F_c przeciwciała pierwszorzędowego, będącego dla niego antygenem. Drugorzędowe przeciwciało (poprzez swój F_c) sprzężone jest również z elementem kluczowym dla wizualizacji reakcji, tzw. znacznikiem. Znacznik jest substancją chemiczną, która w końcowym etapie bierze udział w procesie chemicznym lub fizycznym, prowadzącym do powstania barwnego lub emitującego światło produktu w miejscu obecności badanego antygeny (Ryc. 6 i 7). Możliwa jest też reakcja z użyciem tylko przeciwciała pierwszorzędowego, wtedy to ono sprzężone jest

przeciwciała drugorzędowe (metoda pośrednia ang. *indirect immunodetection*), gdyż technika ta wzmaga czułość wykrywania (detekcji). Wynika to z faktu, że fragment F_c pierwszorzędowego przeciwciała, będąc dla drugorzędowego antygenem z wieloma epitopami, może przyłączać wiele „uzbrojonych” w znacznik cząsteczek drugorzędowego przeciwciała. W efekcie więc w miejscu powstałego pojedynczego kompleksu antygen-przeciwciało widoczna jest wzmocniona reakcja, pochodząca zamiast od jednego, to od wielu znaczników.

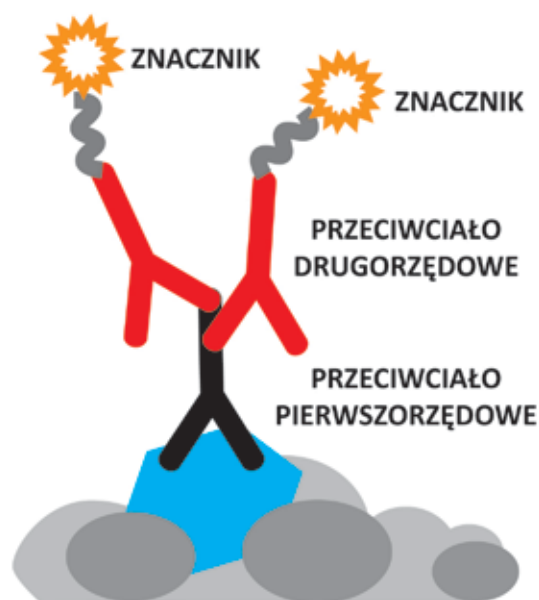
W stosunku do wielkiej liczby produkowanych na świecie przeciwciał pierwszorzędowych, co związane jest z ogromną ilością wykrywanych białek, a nawet poszczególnych ich epitopów, lista drugorzędowych przeciwciał jest znacznie krótsza. Przede wszystkim dlatego, że krótka jest lista gospodarzy (ang. *hosts*), w których powstają przeciwciała

pierwszorządowe, zwykle są to myszy i króliki, a więc wystarczy, by drugorzędowe skierowane były przeciwko IgG mysim lub króliczym (Ryc. 8.). Pośród drugorzędowych immunoglobulin można natomiast wybierać warianty o różnym stopniu oczyszczenia cząsteczki, specyficzności czy modyfikacji cząsteczki IgG (np. tylko pewne fragmenty IgG zamiast całej molekuly), podnoszące jakość detekcji. Najważniejszy jest jednak dobór znacznika, z którym drugorzędowe przeciwciało zostało sprzężone, odpowiedniego dla danej immunotechniki (Tab. 1).

REAKCJA BEZPOŚREDNIA



REAKCJA POŚREDNIA



Ryc. 5. Schemat reakcji immunologicznej bezpośredniej i pośredniej.

W reakcji bezpośredniej znacznik przyłączony jest wprost do przeciwciała łączącego się z antygenem; w reakcji pośredniej – znacznik przyłączony jest do przeciwciała drugorzędowego. Rys. Alicja Görlich, oprac. graf. Maria Görlich-Opyd.

Poli- czy monoklonalne?

Może się wydawać, że przewaga przeciwciał monoklonalnych nad poliklonalnymi jest oczywista. Tak jednak nie jest. Obydwa rodzaje przeciwciał mają tak wady, jak i zalety. W zależności od celu badawczego wada może zamienić się w zaletę i odwrotnie [6].

Jak już wspomniano, przeciwciała poliklonalne rozpoznają różne epitopy na jednym antygenie. Z tego powodu do jednej cząsteczki antygeny, do jej wielu epitopów, przyłącza się wiele przeciwciał. Zjawisko to jest korzystne w sytuacji, gdy ilość badanego białka jest niewielka. W ten sposób można wzmocnić czułość detekcji. Wprawdzie należy się wówczas liczyć z możliwością reakcji krzyżowych (czyli reakcji z antygenami, które nie były immunogenem, mającymi przypadkowo podobne epitopy; wykrywa się więc jednocześnie białko, które nie jest przedmiotem

badan), ale jako wstępna charakterystyka próbki metoda ta jest wystarczająca. Z drugiej strony dzięki reakcjom krzyżowym przeciwciała poliklonalne znajdują zastosowanie w wykrywaniu homologii między białkami różnych gatunków zwierząt (ustalenie tzw. rodziny białek). Reakcja krzyżowa stanowi wtedy cenną informację, mówiącą o pokrewieństwie filogenetycznym.

Przeciwciała poliklonalne stosuje się także z powodzeniem w metodzie immunoprecypitacji, która służy do izolowania białka z mieszaniny. Nie jest wówczas

ważne to „za który epitop” białko „wyciągniemy” z mieszaniny, ale to, by je w ogóle z preparatu wydobyć. Przeciwciała poliklonalne są tolerancyjne wobec zmian konformacyjnych w antygenie – wykrywają nawet białka zdenaturowane, z którymi mamy do czynienia w niektórych procedurach, którym poddawany jest preparat.

Przy tylu istotnych zaletach przeciwciała poliklonalne posiadają jednak podstawową wadę: różne porcje surowicy nie są powtarzalne, gdyż podczas kolejnych immunizacji to samo zwierzę w różnych chwilach swego życia daje inną odpowiedź immunologiczną. Ponadto różne osobniki charakteryzują się odmienną reakcją na obecność antygeny. Za każdym razem więc spektrum otrzymywanych przeciwciał jest inne i ma to istotny wpływ na słabą powtarzalność oznaczeń.

Na koniec jeszcze jedna właściwość przeciwciał poliklonalnych, może nie najistotniejsza z punktu

widzenia celu badawczego, ale jednak ważna ze względów ekonomicznych. Jest to cena. Produkcja przeciwciał poliklonalnych jest relatywnie tania i szybka oraz nie wymaga najwyższych umiejętności, czego nie można powiedzieć o produkcji przeciwciał monoklonalnych. Te są produktem wysokiej technologii wymagającej niemałych nakładów finansowych, także inwestycji w przygotowanie specjalistów.

W porównaniu z otrzymywaniem przeciwciał poliklonalnych, proces otrzymywania przeciwciał monoklonalnych jest zdecydowanie dłuższy, za to raz otrzymana hybrydoma jest ciągłym i samoodnawialnym źródłem produkującym bardzo duże ilości specyficznych i zawsze identycznych przeciwciał. I to jest ich zasadnicza zaleta, uwzględniona – niestety – w ich cenie. Rekompensatą za ponoszone koszty jest wysoki standard otrzymywanych wyników: powtarzalność w kolejnych eksperymentach, jednoznaczność detekcji epitopów i brak reakcji krzyżowych. Z racji swojej specyficzności są doskonałymi przeciwciałami pierwszorzędowymi w detekcji biomolekuł w każdego rodzaju preparacie. Zastosowane do oczyszczania antygenu z mieszaniny metodą immunoprecypitacji zwiększają wydajność tego procesu.

Z drugiej strony ich specyficzność utrudnia detekcję epitopu w cząsteczce, której struktura uległa choćby niewielkiej zmianie, na przykład wskutek fosforylacji, dlatego czasem, aby wykryć badane białko, trzeba zastosować kilka przeciwciał monoklonalnych, skierowanych do różnych jego epitopów.

Przeciwciało nie jest czarodziejską różdżką. O walidacji przeciwciał

Chociaż przeciwciała są powszechnie stosowanym narzędziem, często są one źródłem niemałych problemów [1]. Badacze zmagają się z niepowtarzalnością wyników, mającą przyczynę w zmiennej jakości tych samych przeciwciał, ale pochodzących z nowych porcji surowicy. Jeszcze bardziej problematyczne jest to, że przeciwciała, pomimo zapewnień producenta, często są niespecyficzne, czyli wykrywają więcej niż jedno białko, albo wiążą się specyficznie, ale do zupełnie innego białka niż było przewidywane. Powoduje to trudności w interpretacji wyników. Ponadto przeciwciała znakomicie sprawdzające się w jednej immunotechnice mogą zawodzić w innej. Nierzadko zdarza się, że słabo scharakteryzowane przez producenta przeciwciała rujną projekt badawczy.

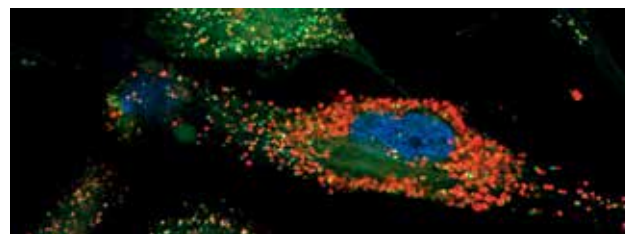
Niepowodzenia w stosowaniu niektórych przeciwciał zmobilizowały laboratoria do współpracy. Wymiana doświadczeń doprowadziła do uznania za konieczne określenie standardów, jakie powinny

spełniać przeciwciała używane do badań. Standardy określa tak zwana walidacja przeciwciał. Jest to procedura, która wykazuje, że dane przeciwciało reaguje specyficznie z określonym epitopem w obecności innych epitopów, ponadto w reakcji wykazuje dostateczną czułość oraz pozostaje specyficzne podczas zastosowania w poszczególnych immunotechnikach. Na koniec walidacja ma wykazać powtarzalność w kolejnych próbach eksperymentalnych.

Jakość przeciwciała zależy zarówno od immunogenu, jak i od organizmu, w którym przeciwciało powstało. Uważa się na przykład, że królicze przeciwciała są lepsze od mysich, gdyż są mniejszymi cząsteczkami, a więc łatwiej penetrują tkanki, łatwiej też wpasowują się w epitop. Z drugiej strony badacze zgadzają się co do tego, że efektywność zastosowania danego przeciwciała zależy od konkretnego eksperymentu, a więc od materiału biologicznego i sposobu jego przygotowania, od powinowactwa przeciwciała do badanego antygenu czy typu rozpoznawanego epitopu, ale też od zastosowanej immunotechniki i szczegółów protokołu laboratoryjnego.



Ryc. 6. Białko presynaptyczne Bruchpilot (BRP) warstwy lamina *Drosophila melanogaster* uwidocznione na membranie PVDF metodą Western Blot. Wyk. Alicja Görlich, Zakład Biologii i Obrazowania Komórki, Instytut Zoologii, Uniwersytet Jagielloński w Krakowie.



Ryc. 7. Ludzkie komórki mezenchymalne wyznakowane fluorochromami: DAPI – niebieski, wybarwione jądra komórkowe; lysotracker – czerwony, wybarwione lizosomy; danzylokadaweryna – zielony, wybarwione lizosomy. Wyk. Grzegorz Tylko, Zakład Biologii i Obrazowania Komórki, Instytut Zoologii, Uniwersytet Jagielloński w Krakowie.

Obecnie walidację przeciwciał stosowanych w poszczególnych metodach przeprowadzają producenci. Im bardziej rzetelny jest ten proces, tym bardziej wiarygodne przeciwciało, a tym samym producent. Z dokumentacją można się zapoznać w materiałach informacyjnych dotyczących danego przeciwciała.

Wstępnym etapem walidacji jest sprawdzenie, czy dane przeciwciało wykrywa tylko jedno białko o zgodnej z przewidywaniami masie cząsteczkowej. Służy do tego technika nazywana Western Blot. Jest to technika, w której białka rozdzielone elektroforetycznie są transferowane na dwuwymiarową membranę,

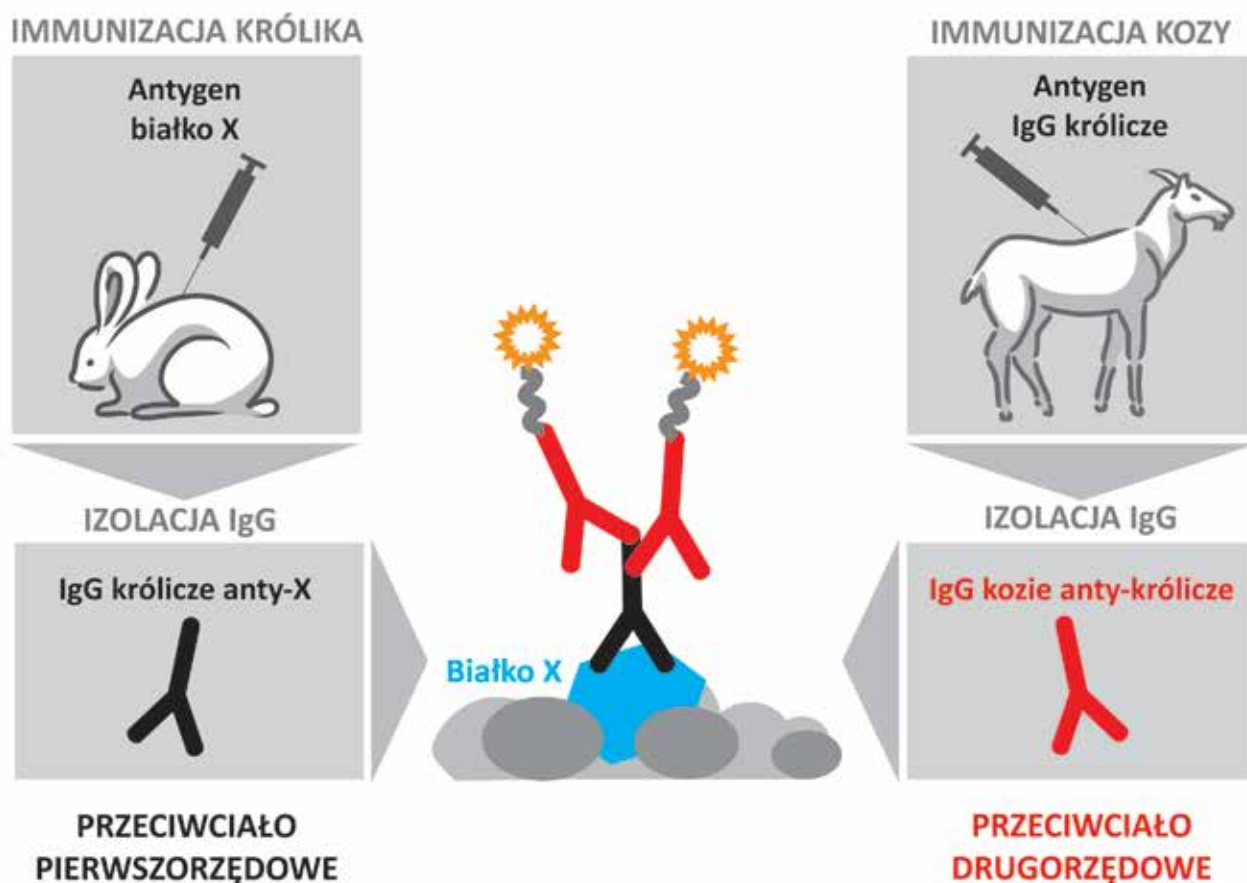
gdzie są następnie inkubowane z przeciwciałami i ostatecznie identyfikowane na podstawie wielkości masy cząsteczkowej. Jeśli po inkubacji ze sprawdzanym przeciwciałem otrzymuje się tylko jeden prążek świadczący o obecności jednego białka, wówczas możemy twierdzić, że dane przeciwciało jest specyficzne dla tej formy białka.

Kolejne etapy walidacji powinny wykazać, że wykryte białko znajduje się we właściwym miejscu tkanki lub komórki. W tym celu przeprowadza się tzw. reakcję immunocyto-(histo-)chemiczną przebie-

Jeśli w takim preparacie walidowane przeciwciało wykazuje reakcję pozytywną, oznacza to, że reakcja jest niespecyficzna, a przeciwciało jest niewiarygodne.

Producent powinien wykazać ponadto, w których metodach przeciwciało zostało sprawdzone z wynikiem pozytywnym i podać przedział roboczych stężeń w poszczególnych zastosowaniach.

Powyższe kryteria pozwalają badaczowi oszacować przydatność przeciwciała w danym zamierzeniu badawczym. Nie zwalnia to jednak z własnej walidacji w konkretnej procedurze laboratoryjnej [7].



Ryc. 8. Schematyczne przedstawienie zagadnienia zgodności gatunkowej przeciwciał uczestniczących w reakcji immunotechnicznej wykrywającej przykładowe białko X. Do detekcji białka X zastosowano pierwszorzędowe przeciwciało królicze, a więc drugorzędowe przeciwciało musi być anty-królicze, w tym przypadku otrzymane w organizmie kozy. Rys. Alicja Görlich, oprac. graf. Maria Görlich-Opyd.

gającą według schematu opisanego wcześniej (Ryc. 5 i 7), w której walidowane przeciwciało wykrywa antygen obecny w preparacie komórkowym lub tkan-
kowym.

W procesie walidacji niezbędne jest zastosowanie rozmaitych form kontroli pozytywnych i negatywnych. Mają one potwierdzać, czy możliwe jest występowanie danego antygeny w materiale badanym, czy nie. Znakomitą kontrolą negatywną jest zastosowanie materiału biologicznego pochodzącego od mutantów, tzw. *null*, u których zniesiona jest ekspresja danego genu (oczywiście nie może to być mutacja letalna).

Oprócz producenta dodatkowym źródłem informacji na temat jakości danego przeciwciała, jego specyficzności, czułości i powtarzalności są inne laboratoria. Suma ich doświadczeń buduje szeroką bazę wiedzy praktycznej o produkowanych przeciwciałach, co jest szczególnie ważne dla zastosowań terapeutycznych. Informacje na temat przeciwciał można znaleźć na portalach informacyjnych pod adresami: www.antibodypedia.com, www.antibodies-online.com, antibodyregistry.org, <http://pabmabs.com/wordpress/> lub www.proteinatlas.org. Znajdują się tam katalogi sprawdzonych (walidowanych)

w praktyce laboratoryjnej przeciwciał, przede wszystkim skierowanych przeciw ludzkim proteinom wraz z ich charakterystyką. Portale stanowią forum, w którym uczestniczą zarówno producenci przeciwciał, jak i ich użytkownicy.

Spojrzenie w przyszłość

Świadomość możliwości powstawania artefaktów sprowokowała szeroką dyskusję nad tym, jak należałoby zmienić przeciwciała, aby stały się mniej problematycznym narzędziem. Jedną z sugestii jest zmiana sposobu ich produkowania [1, 2]. Przede wszystkim dążyłoby się do całkowitego wyeliminowania przeciwciał poliklonalnych, jako że są niepowtarzalne z samej natury. Przeciwciała miałyby być wyłącznie produktami inżynierii genetycznej, syntetyzowane na podstawie znajomości sekwencji ich DNA. Produkcja odbywałaby się tylko w formie hodowli hybrydom powstałych z komórek z rekombinowanym DNA. Koncepcja ta ma swoich przeciwników, którzy uważają, że to, jak przeciwciało naprawdę „pracuje” widać dopiero po zastosowaniu w konkretnej immunotechnice, a sama sekwencja DNA niczego nie przesądza.

Na razie na przeszkodzie temu kierunkowi stoi ekonomia; procedury tworzenia „przeciwciał rekombinacyjnych” są wielokrotnie droższe od obecnie stosowanych.

Zanim powyższe innowacje staną się faktem, trzeba nadal z dużą ostrożnością podchodzić do metod immunologicznych, przestrzegać standardów i być świadomym, że jakość prac badawczych nigdy nie będzie lepsza niż jakość zastosowanych przeciwciał. Jednak zastrzeżenia te nie umniejszają wartości opisanej metody badawczej.

Bibliografia

1. Baker M., 2015, Blame it on the antibodies, *Nature* Vol. 521
2. Bradbury A. i in., 2015, Standardize antibodies used in research, *Nature* Vol. 518
3. Campbell N. A., Reece J. B., *Biologia* wyd. 2012
4. De-chu Tang, Michael DeVit & Stephen A. Johnston, 1992, Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response, *Nature* 356, 152–154
5. Lescar J., Pellegrini M., Souchon H., Tello D., Poljak R. J., Peterson N., Greene M., Alzari P. M., 1995, Crystal structure of a cross-reaction complex between Fab F9.13.7 and guinea fowl lysozyme, *Journal of Biological Chemistry* 270, 18067–18076.
6. Lipman N.S. i in., *Monoclonal Versus Polyclonal Antibodies: Distinguishing Characteristics, Applications, and Information Resources*, 2005, *ILAR Journal*, 46, 258–268,
7. Long K., Mohan Ch., Speckmann W., 2014, Further considerations of antibody validation and usage. How to avoid reviewer challenges. White Paper Merck Millipore
8. Richards F. F., Konigsberg W. H., Rosenstein R. W., Varga J. M., 1975, On the specificity of antibodies: biochemical and biophysical evidence indicates the existence of polyfunctional antibody combining regions, *Science* 187:130–137.
9. Schroer JA, Bender T, Feldmann RJ, Kim KJ., 1983, Mapping epitopes on the insulin molecule using monoclonal antibodies, *Eur J Immunol.*, 13(9):693–700